



**Universidade Brasília (UnB)
Pós-graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Medicina.**

**Análise mutacional de alelos do *vpu*, exon 1 do *rev* e a
seqüência do peptídeo sinal do *env*, isolados de
pacientes em diferentes estágios clínicos da infecção pelo
HIV-1.**

Joaquim Xavier da Silva

Brasília, abril de 2006.

Universidade de Brasília (UnB)

Pós-graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Medicina

Análise mutacional de alelos do *vpu*, exon 1 do *rev* e a seqüência do peptídeo sinal do *env*, isolados de pacientes em diferentes estágios clínicos da infecção pelo HIV-1.

Joaquim Xavier da Silva

Orientador: Enrique Roberto Argañaraz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Brasília, abril 2006.

Universidade de Brasília (UnB)

Pós-graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Medicina

Análise mutacional de alelos do *vpu*, exon 1 do *rev* e a seqüência do peptídeo sinal do *env*, isolados de pacientes em diferentes estágios clínicos da infecção pelo HIV-1.

Banca examinadora

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco – Universidade Católica de Brasília

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves – Universidade Brasília

Prof. Dr. Tatsuya Nagata – Universidade Católica de Brasília

Brasília, abril 2006.

“A CIÊNCIA, a ciência, a ciência...

Ah, como tudo é nulo e vão!

A pobreza da inteligência

Ante a riqueza da emoção!

Aquela mulher que trabalha

Como uma santa em sacrifício,

Com tanto esforço dado a ralha!

Contra o pensar, que é o meu vício!

A ciência! Como é pobre e nada!

Rico é o que alma dá e tem”.

(Fernando Pessoa)

Dedico essa dissertação com muito carinho ao meu pai, a minha mãe e aos meus irmãos, que mesmo sem saber o real significado desse trabalho me incentivaram e apoiaram nas horas difíceis. Ao meu querido filho que sentiu a minha falta ao longo desses anos e por fim, a Gizelle que de uma forma ou de outra teve que suportar minha ausência durante muitos finais de semana.

AGRADECIMENTOS

- À minha família pelo apoio, mesmo sabendo que estaria ausente durante todo esse tempo.
- Ao meu filho, que tem grande importância nos meus sonhos realizados e que foi capaz de entender minha ausência.
- A Gizelle Takeda, pelo apoio concedido, além de ter sido companheira e compreensiva, e que mesmo nos momentos difíceis esteve ao meu lado.
- Ao meu Orientador Enrique Argañaraz, pela paciência, sabedoria e confiança depositada, que assim conduziu mais um graduado à pós-graduação. Muito obrigado.
- Aos meus grandes amigos, Natan Monsores, Pablo Sousa, Erismar, Marcos da Silva, Sócrates Ornelas, Carlos Maximiliano, Fabrício Bittencourt, Renan Ornelas, Iago Assunção, Fernando, Artur, Bruno e ao Dr. Paulo Nery, pelo apoio.
- Às amigas, Sandra Elisa, Camila Chaves, Thaize Ribeiro, Juliana Pasiani, Daniela Ornellas, Maurícia Daniela e a Dr^a Isabel Irene, por terem me incentivado.
- Em especial aos meus dois alunos de iniciação científica e amigos, Silas Dino e Kássia Daglaby, que foram de grande importância para realização dessa dissertação.
- Ao Professor Georgios Pappas, por ter me dado suporte em bioinformática, por meio do seu talento e sabedoria.
- À Alessandra, responsável pelo laboratório de Biotecnologia e Ciências Genômicas, por colaborar nos resultados finais desse trabalho.
- Aos dois técnicos e amigos, André Luiz e Willian Baião, por realizar todo sequenciamento desse trabalho.
- Ao meu estimado ex-orientador, Augusto Simões, pela nossa amizade, pelo incentivo e confiança depositada em mim e por ter cedido gentilmente o kit para o sequenciamento, além é claro dos vários artigos enviados.

- Ao Professor Eduardo Leonardecz da Universidade de Católica de Brasília e a Isabel Cristina, do Laboratório de Biologia Molecular, por terem me ajudado na análise final do sequenciamento e estatístico. A vocês minha gratidão.
- A todos os colegas do Laboratório de Farmacologia Molecular, que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.
- Ao Laboratório de Farmacologia Molecular, por ter concedido todo espaço físico.
- A Universidade Católica de Brasília, que nos abriu as portas do Laboratório de Biotecnologia e nos concedeu seus equipamentos necessários, para que pudéssemos realizar nossos experimentos.
- À Érica e Carol da secretária do curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular, por terem sido sempre gentis, educadas e que me atenderam muito bem.
- Aos professores Francisco de Assis, Octávio Franco e Tatsuya Nagata, por terem aceitado participar da formação da banca examinadora.
- Ao professor Luis Kanzaki, pelo apoio e auxílio na correção dessa dissertação, obrigado.
- Aos Professores e ao Diretor do curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Prof. Dr. Jaime Santana, que contribuíram para minha formação acadêmica.

Sumário

<i>Resumo</i>	X
<i>Abstract</i>	XI
<i>Listas de Figuras</i>	XII
<i>Lista de Tabelas</i>	XIV
<i>Lista de Siglas e Abreviaturas</i>	XV
<i>1. Introdução</i>	1
1.1 A Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS).....	2
1.1.1 <i>Breve histórico</i>	2
1.1.2 <i>Epidemiologia</i>	2
1.1.3 <i>Perspectivas no controle da AIDS</i>	5
1.2 Diagnóstico, Manifestações Clínicas e Tratamento.	6
1.2.1 <i>Diagnóstico</i>	6
1.2.2 <i>Manifestações clínicas</i>	6
1.2.3 <i>Tratamento</i>	7
1.3 O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1).....	8
1.3.1 <i>Um breve histórico</i>	8
1.3.2 <i>Classificação filogenética</i>	9
1.3.3 <i>Estrutura</i>	10
1.4 A proteína acessória – Vpu.....	14
1.4.1 <i>Vpu e a degradação do receptor viral CD4</i>	16
1.4.2 <i>Vpu e a liberação viral</i>	19
1.4.3 <i>A proteína acessória – Rev</i>	21
1.4.4 <i>Peptídeo sinal da glicoproteína de membrana (gp120)</i>	22
1.5 O ciclo de vida - “Uma extraordinária viagem através da célula”.	23
1.5.1. “Começando a travessia” – a entrada na célula hospedeira.	23
1.5.2 “Encontrando o caminho para o núcleo”.	25
1.5.3 “Navegando através do poro nuclear”.	26
1.5.4 “Ancorando no cromossoma da célula hospedeira”.	26
1.5.5 “Construindo as novas partículas”.	27
1.5.6 “Partindo da célula hospedeira”.	28
1.6 Infecção, Resposta Imune e Patogênese da AIDS.....	30

1.6.1 Infecção.....	30
1.6.2 Resposta Imune.....	31
1.7 Patogênese.....	35
1.7.1 A depleção de LT Auxiliares.....	35
1.7.2 Diminuição da expressão do receptor viral CD4 e sua relevância na patogênese da infecção pelo HIV-1.....	36
1.7.2.1 A modulação de CD4 mediada por Nef e sua influência no desenvolvimento da doença.....	40
1.7.2.2 Importância de Vpu na patogênese do HIV-1.....	41
2. Relevância da Pesquisa & Objetivos.....	42
2.1 Relevância da Pesquisa.....	43
2.2 Objetivo Geral.....	43
2.3 Objetivos Específicos.....	43
3. Materiais e Métodos.....	44
3.1 Material de Estudo.....	45
3.2 Extração de DNA genômico de células mononucleares de sangue periférico.....	45
3.3 Quantificação das amostras de DNA e Reação de Polimerização em Cadeia (PCR). ...	46
3.4 Ligação e Clonagem.....	48
3.5 Obtenção de DNA plasmidial e análise dos recombinantes.....	49
3.6 Sequenciamento.....	50
3.7 Análises de homologia e estudo estatístico.....	50
3.8 Gráfico de regressão.....	51
4. Resultados.....	52
4.2 Amplificação do gene da β -globina em amostras de DNA de sangue periférico de pacientes HIV-1 positivos.....	54
4.3 Amplificação dos alelos de vpu presentes em células de sangue periférico em diferentes estágios da infecção.....	54
4.4 Análise mutacional de alelos do gene vpu, presentes nos estágios iniciais e tardios da infecção em pacientes HIV positivos.....	55
4.5 Análise da correlação entre as mutações presentes nos alelos de vpu e os diferentes estágios clínicos da infecção pelo HIV-1.....	62

4.6 Análise mutacional de alelos do exon 1 do gene rev, presentes nos estágios iniciais e tardios da infecção em pacientes HIV positivos.....	63
4.7 Análise da relação entre as variações da seqüência de Rev e os níveis de LT-CD4 ⁺	67
4.8 Análise mutacional de alelos dos primeiros 55 aminoácidos do gene env, presentes nos estágios iniciais e tardios da infecção em pacientes HIV positivos.....	69
5. <i>Discussão</i>	74
5.1 Análise mutacional da proteína Vpu.	77
5.2 Análise mutacional do exon 1 de rev.	80
5.3 Análise mutacional da seqüência do peptídeo sinal do gene env.....	81
6. Perspectivas	84
7. Referências Bibliográficas:.....	85
8. <i>Apêndice</i>	104
<i>Apêndice 1a.</i>	105
<i>Apêndice 1b.</i>	127

Resumo

A diminuição da expressão do receptor CD4 da superfície da célula infectada é um dos mais importantes eventos durante a infecção pelo vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV-1). Três proteínas virais, Nef, Env e Vpu, participam neste processo, sugerindo que a remoção do receptor viral possui um papel crítico no ciclo de vida destes retrovírus. Dentro deste contexto, estudos descritos por outros grupos e o nosso, mostraram claramente a relação entre a capacidade de diminuir a expressão do receptor viral e o aumento de infectividade e capacidade replicativa do HIV-1, o que sugere a participação deste fenômeno na patogênese e progressão à doença. Baseado nestes dados, este estudo propõe investigar a presença de possíveis mutações nas seqüências de alelos de *vpu*, presente em diferentes estágios clínicos da infecção. Por outro lado, aproveitando a abordagem de PCR utilizada, foram também analisadas as seqüências dos alelos do exon 1 do gene *rev* e do peptídeo sinal do gene *env*. Na análise dos alelos de *vpu* em amostras de DNA genômico de células de sangue periférico de 12 pacientes, nos estágios inicial e tardio da infecção, foram detectadas 37 mutações (P3S, -L, I4Q, V6L, I8P, I26F, L41I, L45I, I46R, E59D, -QEE, A74P, W75G, V6I, A7T, V60L, I4E, V6F, I15A, V20I, I26L, R36K, M66T, E50D, -V, I4V, V6S, A14V, S23T, I24L, I26G, R29S, M69L, I78V, D79V, I27G e D79A) nos alelos presentes no estágio inicial, sendo que oito mutações (P3S, -L, L45I, I46R, E59D, -QEE, I15A, M66T) apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Após análise dos alelos do exon 1 de *rev*, foram detectadas seis mutações no estágio inicial da infecção (S5R, E11D, I13L, R14K, L18V e L21F) e uma (I19T) no estágio tardio, sendo que três das presentes no estágio inicial (I13L, R14K, L21F) apresentaram um valor de $p < 0,05$, e a presente no estágio tardio um $p > 0,05$. Finalmente, no peptídeo sinal da proteína Env, foi detectado seis mutações (IRKN, IRRNC, GIKKNC, IRMSC, IRKNC e TLL) no estágio inicial e uma (K16E) no estágio tardio, porém essas mutações, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). A localização das mutações detectadas, assim como, sua possível correlação com os estágios clínicos da infecção, sugerem que estas possam vir a desempenhar importante papel na função das proteínas analisadas e conseqüentemente no curso da infecção. Dessa forma, espera-se que as informações obtidas neste estudo nos permitam posteriormente junto com testes funcionais “in vitro”, determinar a relevância fisiológica da proteína Vpu, como das outras regiões analisadas, na patogênese da AIDS.

Palavras Chaves: HIV-1, AIDS, Vpu, Diminuição da expressão de CD4, Patogênese.

Abstract

Down-modulation of CD4 receptor expression is one of the most important events during the HIV-1 infection. Three viral proteins, Nef, Env and Vpu participate in this process, suggesting that viral receptor removal from the cell surface exerts a critical role in the retroviral life cycle. In this context, results achieved by for our group and others clearly showed a relationship between the infected cells' viral receptor down-modulation and the increased infectivity and viral replication of HIV-1. These data suggest participation of this phenomenon in the pathogenesis and progression to the syndrome. Based on these data, it was investigated the presence of possible mutations in the alleles sequences of *vpu*, present in different clinical stages of HIV-1 infection. On the other hand, and taking advantage of the PCR approach utilized it was also analysed the allelic sequences of exon 1 *rev* gene and of *env* gene signal peptide. The analysis of genomic DNA obtained from peripheral blood samples of 12 patients, in the early and late stage of infection, detected 37 mutations (P3S, -L, I4Q, V6L, I8P, I26F, L41I, L45I, I46R, E59D, -QEE, A74P, W75G, V6I, A7T, V60L, I4E, V6F, I15A, V20I, I26L, R36K, M66T, E50D, -V, I4V, V6S, A14V, S23T, I24L, I26G, R29S, M69L, I78V, D79V, I27G e D79A) in the *vpu* alleles present in the early stage of infection, of these, eight mutations (P3S, -L, L45I, I46R, E59D, -QEE, I15A, M66T) showed statistically differences significant ($p < 0,05$). Analysis of alleles of exon 1 *rev* gene, showed six mutations were detected in the initial stage of infection (S5R, E11D, I13L, R14K, L18V e L21F). Of them three (I13L, R14K, L21F), were statistically significant ($p < 0.05$), one mutation (I19T) in late stage was also statistically significant with $p > 0.05$ value. Finally, in the *env* peptide signal, six mutations were detected (IRKN, IRRNC, GIKKNC, IRMSC, IRKNC e TLL) in the initial stage and one (K16E) in the late stage of infection. Nevertheless, these mutations did not show statistical differences ($p > 0.05$). Mapping of detected mutations, as well as, the possible correlation with different clinical infection stages of AIDS, suggests that Vpu and Env peptide signal could play an important function in the disease evolution. Therefore, we hope these informations, related to mutations in different alleles, would allow us in the near future; allied with "in vitro" experiments, contribute to the elucidation the physiological relevance of Vpu protein as also, the other analyzed regions, in the pathogenic mechanisms of AIDS.

Key words: HIV-1, AIDS, Vpu, CD4 down-modulation, pathogenesis.

Listas de Figuras

Figura 1. Representação esquemática do vírus da Imunodeficiência Humana, HIV-1..	Erro! Indicador não definido.
Figura 2. Estrutura genômica do HIV-1, HIV-2 e SIV..	12
Figura 3. Estruturas da proteína Vpu do HIV-1..	15
Figura 4. Modelo esquemático do mecanismo de degradação de CD4 mediado por Vpu.....	18
Figura 5. Ciclo de vida e fatores celulares que promovem ou inibem a replicação do vírus HIV-1.....	29
Figura 6. Resposta imunitária e estágios clínicos da infecção pelo HIV-1.....	32
Figura 7. Mecanismos envolvidos na diminuição da expressão de CD4 da superfície da célula infectada pelo HIV-1.....	37
Figura 8. Representação esquemática da abordagem de PCR para amplificação dos alelos de <i>vpu</i> , do exon 1 de <i>rev</i> e do peptídeo sinal da proteína Env.	48
Figura 9. Amplificação do gene da β -globina dos pacientes infectados pelo HIV-1.....	54
Figura 10. Amplificação do pool de alelos de <i>vpu</i> presentes nos estágios iniciais da infecção de pacientes HIV positivos..	55
Figura 11. Amplificação do pool de alelos de <i>vpu</i> presente nos estágios tardios da infecção de pacientes HIV positivos..	55
Figura 12. Alinhamento das seqüências dos alelos de <i>vpu</i> de cada paciente no estágio inicial da infecção, em relação à seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1 subtipo “B”.....	56
Figura 13. Alinhamento das seqüências dos alelos de <i>vpu</i> de cada paciente no estágio tardio da infecção, em relação à seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1 subtipo “B”.....	56
Figura 14. Alinhamento das seqüências consenso dos alelos de <i>vpu</i> presentes no estágio inicial da infecção, com a seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1.....	57
Figura 15. Alinhamento das seqüências consenso dos alelos de <i>vpu</i> presente no estágio tardio da infecção, com a seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1.....	58
Figura 16. Correlação entre os escores das seqüências dos diferentes estágios e a contagem de células CD4 ⁺ nos 12 pacientes.	63

Figura 17. Alinhamento das seqüências dos alelos do exon 1 de <i>rev</i> de cada paciente no estágio inicial da infecção, em relação à seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1 subtipo “B”.....	64
Figura 18. Mutações presentes nas seqüências dos alelos do exon 1 de <i>rev</i> de cada paciente no estágio tardio da infecção, em relação à seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1 subtipo “B”.....	64
Figura 19. Alinhamento das seqüências consenso dos alelos do exon 1 de <i>rev</i> presente no estágio inicial da infecção, com relação à seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1.....	65
Figura 20. Alinhamento das seqüências consenso dos alelos do exon 1 de <i>rev</i> , com relação à seqüência tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1, presente no estágio final da infecção.....	65
Figura 21. Correlação entre os escores das seqüências dos diferentes estágios e a contagem de células CD4 ⁺ nos 12 pacientes.....	68
Figura 22. Alinhamento das seqüências dos alelos correspondente aos primeiro 55 aminoácidos da proteína Env de cada paciente no estágio inicial da infecção, em relação a seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1.....	69
Figura 23. Alinhamento das seqüências dos alelos correspondente aos primeiros 55 aminoácidos da proteína Env de cada paciente no estágio tardio da infecção, em relação a seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1.....	69
Figura 24. Alinhamento das seqüências consenso dos alelos correspondente aos 55 primeiros aminoácidos da proteína Env, presente no estágio inicial da infecção, com relação à seqüência tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1.....	70
Figura 25. Alinhamento das seqüências consenso dos alelos correspondente aos 55 primeiros aminoácidos da proteína Env, presentes no estágio tardio da infecção com relação à seqüência tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1.....	71

Lista de Tabelas

Tabela 1. Relação dos genes do HIV-1 e suas funções.	13
Tabela 2. Dados laboratoriais das amostras de pacientes infectados pelo HIV-1 – banco de sangue New England Comprehensive Hemophilia Center do UMass / Memorial Health Center, Worcester, Massachusetts	53
Tabela 3. Frequência das mutações encontradas nos alelos de <i>vpu</i> , presente no estágio inicial da infecção pelo HIV-1.....	58
Tabela 4. Frequência das mutações e valor de “p” (teste t) encontrados nos alelos de <i>vpu</i> , presente no estágio inicial e tardio da infecção pelo HIV-1.	60
Tabela 5. Frequência das mutações encontradas no exon 1 de <i>rev</i> , presente no estágio inicial da infecção pelo HIV-1.....	66
Tabela 6. Frequência das mutações encontradas no exon 1 de <i>rev</i> , presente no estágio tardio da infecção pelo HIV-1.	66
Tabela 7. Frequência das mutações e valor de “p” (teste t) encontrados no exon 1 de <i>rev</i> , presente no estágio inicial e tardio da infecção pelo HIV-1.....	67
Tabela 8. Frequência das mutações encontradas no peptídeo sinal de Env, presente no estágio inicial da infecção pelo HIV-1.	71
Tabela 9. Frequência das mutações encontradas no peptídeo sinal de Env, presente no estágio tardio da infecção pelo HIV-1.....	72
Tabela 10. Frequência das mutações e valor de “p” (teste t) encontrado no peptídeo sinal de Env, presente nos estágios inicial e tardio da infecção pelo HIV-1.....	72

Lista de Siglas e Abreviaturas

A - alanina	M - metionina
aa - aminoácido	μL - microlitros
APOBEC - lipoproteína APO "B"	μM - micromolar
ARV - AIDS - <i>Associated Retrovirus</i>	ml - mililitros
AZT - zidovudina	MIP-1α - macrophage-inhibitory protein 1α
C - cisteína	MIP-1β - macrophage-inhibitory protein 1β
CA - capsídeo	mm ³ - milímetros cúbico
CaCl ₂ - cloreto de cálcio	N - asparagina
CCR5 - co-receptor	NL4.3 - cepa tipo "B" selvagem
CDC - " <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> "	nm – nanômetro
CD4 - proteína de superfície celular	NSI - não indutores de sincício
CPH-1 - Complexo Principal de Histocompatibilidade	O - outlier
CRFs - " <i>Circulant Recombinat Forms</i> "	OMS - Organização Mundial da Saúde
CXCR4 - co-receptor	P - prolina
D - aspartato	pb - pares de base
DNA - ácido desoxirribonucléico	PBMC - células mononucleares de sangue periférico
dNTP - deoxinucleotídeo trifosfato	PCR - " <i>Polymerase Chain Reaction</i> "
E - glutamato	PIC - " <i>Pre-Integration Complex</i> "
EDTA - ácido etileno diamino tetracético	PR - protease
ELISA - " <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> "	Q - glutamina
F - fenilalanina	R - arginina
TNF-α - fator de necrose tumoral α	RANTES - " <i>C-C Chemokine</i> "
FDA - " <i>Food and Drug Administration</i> "	RBD - " <i>RNA Binding Domain</i> "
G - glicina	RER - retículo endoplasmático rugoso
gp120 - glicoproteína 120	RNA - ácido ribonucléico
H - histidina	RNA-BP - " <i>RNA Binding Protein</i> "

HAART - " <i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i> "	RRE - " <i>Rev Responsive Element</i> "
HTLV - " <i>Human T-Lymphotropic Virus</i> "	S - serina
I - isoleucina	AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Humana
ICAM - " <i>Intercellular Adhesion Molecule</i> "	SDS - " <i>Sodium dodecylsulfate</i> "
ICTV - " <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> "	T - treonina
IN - integrase	P-TEFb - fator "b" de alongação positivo
IFN- γ - interferon- γ	TM - transmembrana
K - lisina	V - valina
Kb - kilobases	HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
kDa - kilodalton	HIV-1 - Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
L - leucina	HIV-2 - Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2
LAV - " <i>Lymphadenopathy Associated Virus</i> "	W - triptofano
LTc - Linfócito "T" Citotóxico	Y - tirosina
LTRs - " <i>Long Terminal Repeat Sequences</i> "	

1. Introdução

1.1 A Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

1.1.1 Breve histórico.

Os primeiros casos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foram detectados em 1981, nos Estados Unidos, quando médicos observaram que pacientes homossexuais do sexo masculino apresentavam doenças como sarcoma de Kaposi e infecções oportunistas, como pneumonia decorrente da infecção por *Pneumocystis carini*, que normalmente não acometiam pacientes imunocompetentes (Gotlieb *et al.*, 1981). Todos estes pacientes tinham em comum um número reduzido de linfócitos T auxiliares (LT-CD4⁺) o que redundava numa imunidade deficitária (Gotlieb *et al.*, 1981).

Os primeiros indícios de que a AIDS tinha como agente infeccioso um retrovírus, surgiram em 1983, quando um grupo de pesquisadores francês liderado por Luc Montaigner no Instituto Pasteur em Paris isolou um vírus aparentemente novo. Esse vírus foi denominado de *Lymphadenopathy Associated Virus* (LAV). Nessa mesma época, outro grupo de pesquisadores, dos Estados Unidos, liderado pelo pesquisador Robert Gallo, relatou o isolamento de um novo vírus que infectava as células T, denominando de *Human T-Lymphotropic Virus* (HTLV), que receberia a designação de HTLV tipo III. Posteriormente, foi descoberto que o vírus descrito pela equipe norte-americana era o mesmo descrito pelo grupo francês. Em 1984, Jay Levy e colaboradores descreveram o vírus em pacientes assintomáticos, sugerindo então, que se tratava de pacientes portadores, recebendo a denominação de retrovírus associado à AIDS (AIDS - *Associated Retrovirus* (ARV) (Wigg *et al.*, 2002). No entanto, em 1986, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses* – ICTV), determinou que o vírus recebesse a designação de Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1). Nesse mesmo ano, outro vírus com características semelhantes foi denominado de (HIV-2).

1.1.2 Epidemiologia.

Quase 25 anos depois da descoberta do vírus, a pandemia da AIDS continua excedendo todas as expectativas em severidade e impacto sócio-global. Assim, previsões feitas em 1991 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) estimavam que, para o ano 2000, o número total de casos acumulados em todo o mundo, poderia atingir

os 40 milhões (Healthy, 2002). Porém, estas predições foram amplamente superadas quando, no ano 2000, estudos epidemiológicos mostravam que o número total de casos atingia os 56 milhões de pessoas, quase a população do Reino Unido, sendo que 20 milhões de pessoas já tinham falecido em consequência da infecção (Unaid, 2000).

Resultados de estudos epidemiológicos realizados no ano de 2005 (Saúde, 2005), mostraram que o número de pessoas infectadas em todo o mundo já atingia 45 milhões, continuando a superar todas as expectativas, e que, somados ao número de óbitos, o número total de casos acumulados poderia estar próximo aos 60 milhões de pessoas, sendo que a África subsaariana acumula três quartos dos casos. Entretanto, a falta de acesso a dados epidemiológicos confiáveis em algumas regiões como Ásia e Oriente Médio, sugere que o impacto global desta epidemia possa ser bem maior do que o estimado.

Estes estudos também demonstraram que, em cada seis segundos uma nova pessoa é infectada, e que a cada dez mortes, uma morre em consequência da AIDS ou doenças associadas. O estudo também mostrou que nesse mesmo ano, cinco milhões de pessoas teriam adquirido o HIV-1 (Saúde, 2005), o que comparado aos dados obtidos no ano de 2000, onde o número de pessoas infectadas foi de 5.3 milhões, demonstra que a epidemia no mundo continua sem controle. Entretanto, no Brasil a situação parece estar sob controle, sendo de aproximadamente 650.000 o número total de casos acumulados desde o início desta pandemia até a metade de 2005 (pt.wikipedia.org/wiki/sindrome, acesso em 03/02/2006), (AbcdAids, 2005). Já no Distrito Federal no ano 2004, foram registrados 474 casos, e de janeiro a junho de 2005, foram registrados 188 casos (Saúde, 2005). Baseado neste panorama devastador e considerando o enorme impacto social, a AIDS deixou de ser uma epidemia para passar a ser considerada uma pandemia, e se, os números de novas infecções continuarem crescendo no mesmo ritmo, as consequências devastadoras observadas até aqui poderão ser mínimas, ao serem comparadas com as de um futuro próximo. Assim, a prevalência da AIDS nos países mais populosos permanece relativamente baixa, mas em muitos deles, as condições para o surgimento de uma epidemia em grande escala já existem, se não forem implantados programas de controle urgentemente.

Entretanto, nos países industrializados da América do Norte, Sul e Oeste Europeu, as características da epidemia mudaram, onde o índice baixo de prevalência associado ao acesso à terapia retroviral teve um impacto favorável, tanto na progressão

como na mortalidade. Já nas minorias étnicas e populações pobres dentro destes países o impacto benéfico da terapia é menos pronunciado, onde a incidência da AIDS aumentou mais que nas populações mais ricas (Prevention, 2000). Em alguns destes países, a transmissão heterossexual passou a ser a principal via de contaminação. Por outro lado, o acesso à terapia retroviral teve alguns efeitos contrários, já que se detectou um aumento na incidência devido a um tipo de comportamento chamado de “fadiga do sexo seguro”. Assim, estudos minuciosos entre jovens homossexuais dos Estados Unidos e Reino Unido, mostraram que menos de 20% tinha conhecimento de estar infectado e 41 % declarou fazer sexo anal sem proteção, surpreendentemente, este tipo de comportamento foi associado aos efeitos benéficos do coquetel anti HIV-1 (Dodds *et al.*, 2000).

As vias de transmissão do HIV são diversas. O vírus pode ser transmitido por meio do contato com sangue e/ou secreções contaminadas, seja por intercurso sexual, transmissão vertical, pelo uso de seringas e agulhas contaminadas, ou por transfusão de sangue contaminado (Selik *et al.*, 1995; Prevention, 1994). Estudos epidemiológicos realizados em casais heterossexuais europeus, e nortes americanos, estimaram que a transmissão pelo ato sexual fosse de aproximadamente 1 em 1000 (Mastro e Kitayaporn, 1998). Em outro estudo, levando em consideração a carga viral presente no sêmen, foi estimado que com uma carga viral alta, aproximadamente 100.000 cópias de RNA do tipo R5 (receptor viral), a probabilidade de transmissão era de 1 em cada 100 episódios por intercurso sexual, entretanto, em sêmen com aproximadamente 100 cópias de RNA viral, a probabilidade de transmissão diminuía, sendo de 3 em cada 10.000 episódios por intercurso sexual (Chakraborty *et al.*, 2001).

A transmissão pela via oral é pobremente entendida. Tem sido sugerido, que os riscos de transmissão oral seriam maiores do que previamente estimados, no entanto, a transmissão oral é de oito a dez vezes menos provável que a via vaginal ou retal (Younai, 2001). Entretanto, estudos em macacos neonatos mostraram que a infecção por esta via parece ser bem mais freqüente que em adultos (Baba *et al.*, 1996; Ruprecht *et al.*, 1998), sugerindo que as mucosas orais dos infantes, apresentariam um crítico defeito, como a ausência de fatores salivares, tais como defensas, mucinas, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, complemento e anticorpos anti-HIV (Rothemberg *et al.*, 1998; Younai, 2001; Sun *et al.*, 2005) o que os tornaria mais susceptíveis à infecção. Apesar disso, foi relatado um caso de transmissão em adulto em consequência de um

ataque epiléptico, onde um indivíduo HIV positivo transmitiu o vírus para sua mãe por meio de uma mordida (Andreo *et al.*, 2004).

Estima-se que mais de 90% das infecções em recém-nascidos e crianças são causadas pela transmissão perinatal (Quinn, 1996), sendo que, em 2002, foi estimado que 800.000 crianças tivessem sido infectadas, antes ou durante o nascimento ou por meio da amamentação (Unaid, 2000). Sem tratamento, o risco da transmissão vertical é de aproximadamente 25% a 30%, embora esta taxa de transmissão seja aumentada na África (Wiktor *et al.*, 1997).

Um outro dado preocupante, é que a AIDS tem aumentado significativamente entre as mulheres. Quase 60% dos infectados com o HIV-1 são mulheres (Annan, 2002), despertando a necessidade em desenvolver vacinas, microbidas e outras estratégias de prevenção para amenizar a propagação do HIV, principalmente nesses casos.

A epidemia da AIDS tem causado um alto custo quando se trata de perda e/ou diminuição na qualidade de vida no mundo, especialmente na África, onde aproximadamente 70% das mortes ocorridas são decorrentes da infecção pelo HIV (Healthy, 2002).

1.1.3 Perspectivas no controle da AIDS.

Historicamente, os mais marcantes avanços em saúde pública sempre envolveram mudanças radicais no comportamento social, e no caso de certas doenças, também envolveram avanços tecnológicos. Certamente o controle desta nova pandemia não fugirá ao requerimento destes dois fatores.

O componente social, certamente deverá se focalizar no implemento de estratégias globais de prevenção, assim como garantir o acesso universal aos diferentes meios de prevenção e tratamento.

Sob o ponto de vista tecnológico, a pesquisa na AIDS atingiu uma encruzilhada marcada pelo surgimento de novos paradigmas, entre os quais se destacam os surgimentos de variantes resistentes aos inibidores presentes no coquetel antiretroviral, a permanência de reservatórios virais latentes, a presença de efeitos tóxicos colaterais causados pelo tratamento e por último, o alto custo das drogas disponíveis no mercado. Dessa forma, a pesquisa de mecanismos básicos de patogênese volta a desempenhar um papel crucial na identificação de novos alvos farmacológicos e conseqüentemente, no

desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

1.2 Diagnóstico, Manifestações Clínicas e Tratamento.

1.2.1 Diagnóstico.

O diagnóstico para detecção da infecção pelo HIV é realizado por meio de testes laboratoriais, que envolvem a detecção de anticorpos por ensaio imunoenzimático (ELISA), entretanto, este exame pode ser reativo devido a alta sensibilidade do teste, fazendo se necessário o uso de métodos mais específicos, como “western blotting”, imunofluorescência e diagnóstico molecular, em caso de janela imunológica, como a reação de polimerização em cadeia (PCR) usada em pesquisas (Wigg *et al.*, 2002).

Os testes utilizados são incapazes de identificar pessoas recentemente infectadas, uma vez que após a infecção tarda-se de 6 a 12 semanas para que aja a produção de anticorpos (soroconversão) período este denominado janela imunológica. Os testes utilizados apresentam, geralmente, níveis de até 95% de positividade, nos primeiros seis meses após a infecção (Saúde, 2005).

1.2.2. Manifestações clínicas.

A infecção pelo HIV pode ser dividida em dois diferentes estágios ou fases: fase aguda e fase crônica. Na fase aguda que pode ser assintomática, a contagem de linfócitos T CD4 é superior a 500 células/mm³. Quando presente os sintomas, que só aparecem durante o pico de viremia e no início da resposta imunitária, que pode consistir numa simples gripe, febre, linfadenopatia, certa perda de peso, náusea, vômito e hepatoesplenomegalia. Nesta fase é também possível o surgimento de doenças oportunistas como candidíase oral, meningoencefalite, tuberculose, pneumonia e síndrome de Guillain-Barré (Wigg *et al.*, 2002).

Na fase crônica ou tardia, a contagem de linfócitos T CD4 cai drasticamente entre 50 a 200 células/mm³. Nesta fase, os pacientes estão muito mais susceptíveis, a infecções oportunistas causadas por vírus, bactérias, fungos e protozoários, como pneumonia decorrente da infecção por *Pneumocystis carinii*, criptosporidíase, encefalite por *Toxoplasma gondii*, e alguns tipos de neoplasia, como sarcoma de Kaposi e linfoma não Hodgkin (Wigg *et al.*, 2002).

1.2.3 Tratamento.

O surgimento da terapia antiretroviral (HAART) proporcionou ao paciente drástica supressão da replicação viral, aumentando-lhe o tempo e qualidade de vida. Atualmente, os diversos anti-retrovirais licenciados, têm como alvo molecular, principalmente, as enzimas transcriptase reversa (RT), protease (PR) e integrase (IN).

Dentre os inibidores de RT, seis são análogos de nucleosídeos (AZT, Didanosine; Zalcitabine; Lamivudine; Stavudine; Abacavir e as formulações combinadas), um inibidor análogo de nucleotídeo (Tenofovir) e três são inibidores não-análogos de nucleotídeos (Nevirapine; Delavirdine e Efavirenz). Atualmente, há oito inibidores de PR licenciados: Saquinavir, Indinavir, Ritonavir, Nelfinavir, Lopinavir, Amprenavir, Atazanavir e Tipranavir. Apesar de existirem alguns problemas, no que concerne à toxicidade e disponibilidade dos inibidores da IN (Naphthyridine e Dilketoacid), estes foram liberados para testes clínicos em 2004 (Kilby e Eron, 2003).

No Brasil, o tratamento dos pacientes infectados tem um alto custo, pois dos 17 medicamentos antivirais utilizados, nove são importados. Em 2005, registraram-se 170.000 infectados, sob tratamento, o que representou neste ano um custo de aproximadamente R\$ 800 milhões de reais. Para este ano de 2006, estão previstos aproximadamente R\$ 960 milhões de reais na compra de anti-retrovirais (Saúde, 2005).

Após o uso do coquetel anti-retroviral por mais de uma década, o tratamento mostrou ter sérias limitações: ineficácia na erradicação da infecção, dada à persistência de reservatórios virais, o surgimento de variantes resistentes, devido a mutações e finalmente, por apresentar sérios efeitos colaterais, como alterações no metabolismo de lipídeos que redundam, em alguns casos, em acidentes cardiovasculares e lipodistrofia muscular e ainda alterações neurológicas (Furtado *et al.*; Yerly *et al.*, 1999). Dentro dessa nova realidade, e graças aos novos conhecimentos trazidos pela pesquisa básica, novas drogas e abordagens terapêuticas estão sendo desenvolvidas.

Uma nova tendência no tratamento é a indução de uma resposta imunitária capaz de complementar o tratamento anti-retroviral. Dessa forma, mediante um fenômeno chamado de “auto-imunização”, conseguido pela interrupção temporária da terapia, busca-se estimular a resposta imune específica, em pacientes submetidos à terapia retroviral.

Muitas, das mais promissoras drogas, que estão sendo testadas em ensaios clínicos visam inibir a interação entre as proteínas virais e celulares. Estas drogas agem

basicamente, nos três diferentes estágios da entrada do vírus na célula hospedeira.

No primeiro estágio, interação gp120-CD4, encontram-se os compostos BMS488043 (Hanna, 2004) e PRO542 (Jacobson *et al.*, 2004), os quais provaram não serem tóxicos e diminuir em mais de 10 vezes os níveis de RNA viral no plasma.

No segundo estágio, os compostos Schering D, UK 427-857, GW873140, Tak 220 e moléculas análogas ao ligante natural, RANTES, que agem inibindo os co-receptores na entrada viral, são direcionados contra o co-receptor CCR5. Os que estão dirigidos contra as moléculas CXCR4, são: AMD070 e KRH-2371 (Greene, 2004). Talvez, a principal limitação do uso dos inibidores do co-receptor CCR5, seja a possibilidade de induzir mudanças, no uso do co-receptor CCR5 para o CXCR4, o que levaria a uma evolução mais rápida para AIDS.

As drogas mais promissoras são as que agem no último estágio, onde ocorre a fusão das membranas virais e celulares. A mais promissora, dentre elas, é o inibidor T-20 (De Clercq, 2004), a qual foi aprovada pela “US Food and Drug Administration”.

Dentro das abordagens experimentais, baseadas em novas informações a respeito dos mecanismos da regulação da expressão gênica e patogênese do HIV-1, diferentes grupos de pesquisa, inclusive o nosso, vem desenvolvendo projetos, como o uso de RNAs de interferência contra proteínas virais e celulares (Anderson e Akkina, 2005) (Lee *et al.*, 2003), e vetores lentivirais com capacidade de interferir na modulação de CD4, mediada pelo HIV-1 (Pham *et al.*, 2004) (ver item 5.3.3). Outras áreas promissoras da pesquisa, que podem redundar no desenvolvimento de novas drogas, são as focalizadas no estudo de inibidores naturais da infecção, presentes na célula do hospedeiro, como APOBEC e Trim 5 α (Sheehy *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003).

1.3 O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1).

1.3.1 Um breve histórico.

A ancestralidade do HIV, tem sido investigada, a partir de um vírus símio muito semelhante ao HIV, o SIV do chimpanzé (SIVcpz), encontrado no oeste da África central (Gao *et al.*, 1999). No entanto, a exata origem do SIVcpz permanece desconhecida, devido a existência de mais de 20 espécies de primatas não humanos africanos (Hahn *et al.*, 2000). A análise filogenética de SIVcpz, tem sugerido que este, pode ter se originado como resultado da recombinação entre o SIV presente no “red capped mangabeys” (SIVrcm) e o SIV presente no “greate spotted nose” (SIVgsn)

(Santiago *et al.*, 2002). Outra hipótese é que chimpanzés por possuírem o hábito de predação primatas menores, poderiam ter adquirido vírus por meio da alimentação (Hout *et al.*, 2004).

Embora ainda não se saiba ao certo, a forma que o HIV tenha sido transmitido do macaco, seu hospedeiro natural, ao ser humano, muitas especulações têm surgido nesses últimos 25 anos. Alguns pesquisadores têm levantado hipóteses de que o HIV teria surgido em humanos, como consequência da presença do vírus do símio, em amostras de tecidos renais de macacos, usadas para a preparação da vacina contra o vírus da poliomielite, que era aplicada em grande escala, na região da África ocidental a meados do século passado (Butler, 2004). No entanto, essa teoria foi refutada recentemente, por não serem encontradas evidências filogenéticas que sustentassem esta hipótese (Worobey *et al.*, 2004).

1.3.2 Classificação filogenética.

O HIV pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus* (Latim *lentus* = lento) e por meio de estudos sorológicos, foram evidenciados dois tipos antigênicos: HIV-1 e HIV-2 (Grant e Cock, 2001), sendo que o HIV-1 é mais virulento, e mais disseminado pelo mundo todo, enquanto o HIV-2 é menos virulento e se encontra quase exclusivamente no oeste da África. Tanto o HIV-1 como o HIV-2, compreende em diferentes subtipos, em diferentes organizações genômicas (Hahn *et al.*, 2000).

O HIV-1, amplamente distribuído pelo mundo, é caracterizado por uma variabilidade genética rara, resultado de sua alta taxa de mutação, que levou a originar inúmeros subtipos, e dentro de cada subtipo, há regiões de polimorfismos e de hipervariabilidade (Domingo *et al.*, 1998). As diferentes variantes são definidas, por meio da análise da sequência de nucleotídeos dos genes *gag*, *env* e *pol*. Assim, através deste tipo de análise foi possível subdividir o HIV-1 em três grandes grupos: M (major), O (outlier) e N (nem M, nem O). O grupo M pode ser subdividido em subtipos filogeneticamente associados, "A" a "J" (Yang *et al.*, 1999) e suas formas recombinantes (CRFs), (Robertson *et al.*, 2000).

Embora a maioria dos subtipos seja comum na África central, a distribuição mundial pode variar: o subtipo B é prevalente na América do Norte, Sul e Europa; o subtipo A é prevalente na África; o subtipo E na Tailândia; o subtipo C mais prevalente na Índia e África do Sul; e o subtipo F está presente na Romênia, Brasil e Argentina

(Heyndrickx *et al.*, 1998). Em adição, o grupo O está centrado em Camarões e países vizinhos como, Guiné Equatorial e Gabão, embora a infecção pelo HIV-1 do grupo O também tenha sido identificada na Europa e Estados Unidos. Finalmente, o grupo N do HIV-1 foi identificado em Camarões (Yang *et al.*, 1999).

1.3.3 Estrutura.

O HIV-1 é um patógeno bastante simples com nove genes e 15 proteínas. Apresenta um envoltório lipoglicoprotéico denominado envelope, que recobre o nucleocapsídeo. O envelope na sua parte externa apresenta projeções ou “spikes” contendo trimêros formados pelas glicoproteínas gp120 (SU) e gp41 (TM). A gp120 localiza-se externamente ao virion, estendendo por meio da gp41 na região hidrofóbica do envelope viral (Turner e Summers, 1999). Internamente, o envelope está constituído pela proteína matriz (MA) p17 ligada ao ácido mirístico, sendo responsável pela integridade viral e pela incorporação das proteínas no virion maturo.

O nucleocapsídeo possui formato cônico, típico de lentivírus, constituído pela proteína do capsídeo (CA) p24, e como todo retrovírus, o material genético é composto por duas fitas de RNA. Três importantes enzimas encontram-se associadas às duas moléculas de RNA, a transcriptase reversa (TR), a integrase (IN) e a protease (PR), além das proteínas acessórias Nef, Vif e Vpr e as proteínas p6 e p9 (Figura 1).

O genoma do HIV-1 tem aproximadamente 9,8 kb constituindo-se de nove genes, sendo três estruturais, *gag*, *pol* e *env*, dois regulatórios, *tat* e *rev*, e quatro acessórios, *nef*, *vpu*, *vpr* e *vif*, possuindo nas extremidades 5' e 3' longas seqüências repetidas invertidas ou LTRs (Long terminal repeats sequences). Entretanto, existem algumas variações entre os genomas do HIV-1, 2 e SIV, como, por exemplo, a presença do gene *vpx*, presente somente no genoma do HIV-2 e algumas cepas de SIV, substituído pelo o gene *vpu* no HIV-1 (Fackler e Peterlin, 2000) (Figura 2). A grande versatilidade viral é fundamentada nas múltiplas funções associadas às proteínas virais (Tabela 1).

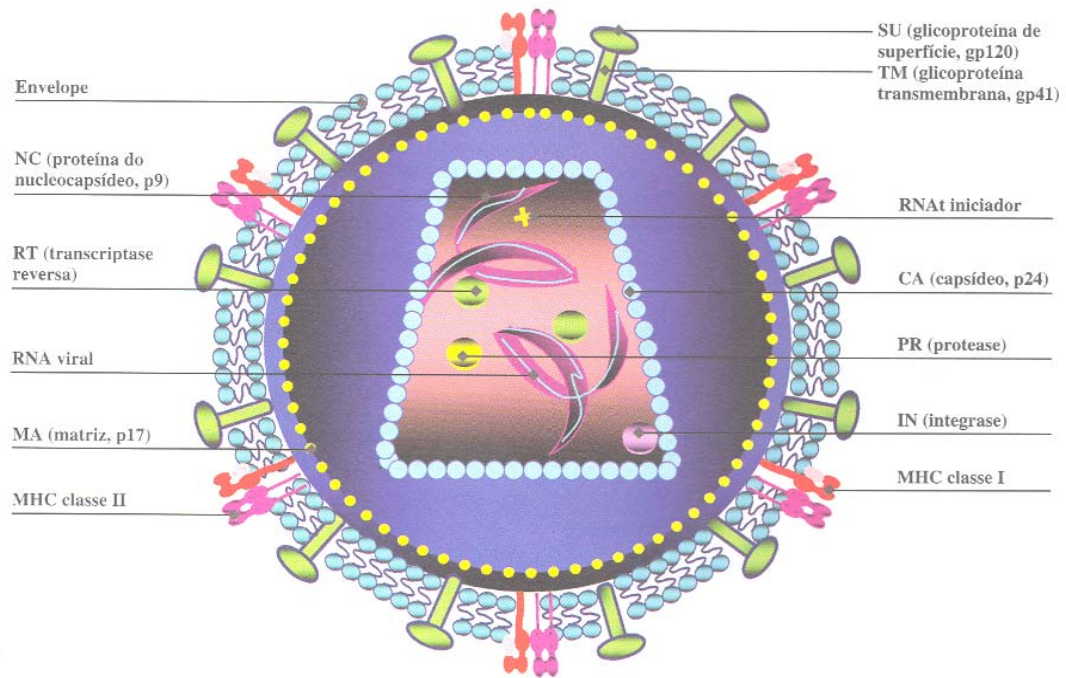


Figura 1. Representação esquemática do vírus da Imunodeficiência Humana, HIV-1. O HIV-1 é envolto por um envelope de natureza lipoglicoprotéica. Em sua face interna, localiza-se a matriz, e na porção central da partícula viral, encontra-se o capsídeo com formato cônico. O genoma viral é constituído por duas fitas de RNA estabilizadas pelas proteínas do nucleocapsídeo (p7). No interior do capsídeo, encontram-se as enzimas Protease (PR), Transcriptase Reversa (RT), Integrase (IN) e as proteínas (Nef, Vif e Vpr) (Wigg *et al.*, 2002).

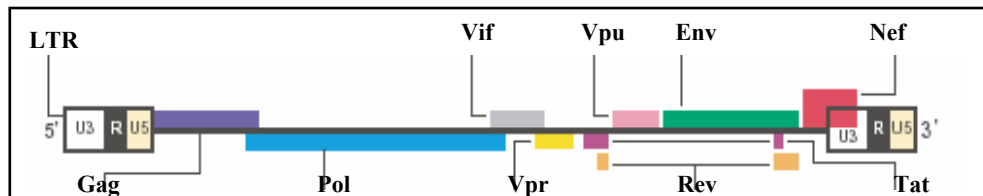
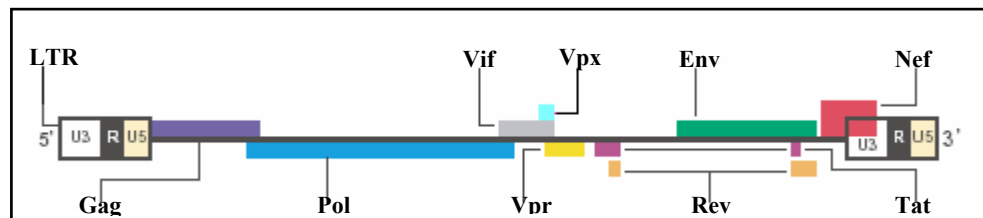
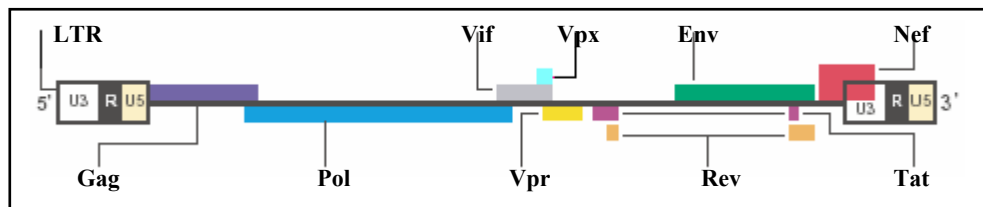
a) HIV-1b) HIV-2c) SIV

Figura 2. Estrutura genômica do HIV-1, HIV-2 e SIV.(a) HIV-1 (Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1). (b) HIV-2 (Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2). (c) SIV (Vírus da Imunodeficiência de Símios). Os genes *gag*, *pol* e *env* (barras lilás, azul e verde respectivamente), codificam proteínas estruturais. Os genes *tat* e *rev* (barras roxas e laranjas respectivamente) codificam proteínas regulatórias. Os genes *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* ou *vpx* em HIV-2 (barras vermelhas, cinzas, amarelas, rosas e azul claras, respectivamente) codificam proteínas acessórias. Nas terminações 3' e 5', encontram-se as seqüências repetitivas longas, chamadas de LTRs (Greene e Peterlin, 2002).

Tabela 1. Relação dos genes do HIV-1 e suas funções.

<i>Proteína</i>	<i>Tamanho (kDa)</i>	<i>Função</i>
Gag	p24	➤ Proteína do Capsídeo se liga ciclofilina “A”.
	p17	➤ Proteína Matriz (MA), por miristol auxilia Gag para lipid raft e importa (PIC) para fosforilação. ➤ Proteína associada ao RNA.
	p9	➤ Proteína associada ao RNA - auxilia no brotamento, interage com Vpr, PTAP-TGS101.
	p6	
Transcriptase Reserva	p66, p51	➤ Responsável pela transcrição reversa, com função de DNA polimerase. RNA dependente, RNase H e DNA polimerase – DNA dependente.
Protease	p11	➤ Realiza o processamento das poliproteínas precursoras virais.
Integrase	p32	➤ Realiza a integração do DNA proviral.
Envelope (Env)	gp160	➤ Clivada no retículo endoplasmático em gp120(SU) e gp41(TM). • gp120 se liga a CD4 e ao receptor da quimiocina (CCR5 e CXCR4). • Gp41 medeia fusão com a membrana citoplasmática. • Contém elementos responsivos ao RNA (RRE) que liga a Rev.
Ativador transcricional (Tat)	p14	➤ Liga-se a região de ativação transcricional (TAR). • Associa-se ao W da ciclina T1 e CDk9. • Aumenta a extensão da RNA Pol II.
Regulador da expressão viral (Rev)	p19	➤ Liga-se ao RRE. • Inibe o splicing do RNA viral. • Exporta RNA spliced incompleto do núcleo.
Fator de regulação negativa (Nef)	p27	➤ Modulação de CD4/MHC I. • Bloqueia apoptose. • Aumenta a infectividade viral. • Altera o estado da ativação celular. • Aumenta patogênese.
Fator de infectividade viral (Vif)	p23	➤ Supera os efeitos inibitórios da célula do hospedeiro. • Estabiliza o complexo RT. • Aumenta a infecciosidade viral. • Auxilia a síntese do DNA proviral e/ou empacotamento viral.
Proteína viral “R” (Vpr)	p15	➤ Retarda a fase G2. • Facilita a infecção de Macrófagos.
Proteína viral “U” (Vpu)	p16	➤ Promove a degradação de CD4. • Auxilia a liberação do vírus.
Proteína viral “X” (Vpx)	p15	➤ Auxilia a infecciosidade.

1.4 A proteína acessória – Vpu.

A proteína viral U (Vpu) é uma fosfoproteína de membrana, que varia de 77-86 aminoácidos, sendo capaz de homo-oligomerização, (Binette e Cohen, 2004) (Tiganos *et al.*, 1998). Esta proteína está presente exclusivamente no HIV-1, em alguns tipos SIV de chimpanzés (SIVcpz) e em outras três espécies de macaco do gênero *Cercopithecus* como, greater spot-noised *Cercopithecus nictitans* (SIVgsn); macacos mona, *Cercopithecus mona* (SIVmon); macacos mostache *Cercopithecus cwephus* (SIVmus) (Barlow *et al.*, 2003; Courgnaud *et al.*, 2002), encontrados no velho mundo (Gomez *et al.*, 2005), mas não são encontrados em outros vírus, como HIV-2 e SIV presentes no restante dos primatas não humanos (Huet *et al.*, 1990). Entretanto, não se sabe, se as variantes desta proteína presentes nos primatas não humanos, possuem as mesmas funções, observadas no HIV-1, uma vez que, os genes situados nos SIVcpz e SIVmon, possuem apenas 1 dos 4 potenciais sítios para cinase II e os presentes em SIVgsn e SIVmus, não possuem nenhum sítio para cinase II. Estudos evolucionários realizados em vírus encontrados em chimpanzés (SIVcpz) mostraram evidências, que o gene *vpu* poderia ter surgido nestas espécies por recombinação entre SIV do “red capped mangabeys” (SIVrcm) e o SIV do “greater spot-noised” (SIVgsn) (Kimura *et al.*, 1994; Santiago *et al.*, 2002).

O HIV-2, não possui o gene *vpu*, encontrando-se o gene *vpx* em seu lugar, mas parece estar mais relacionado ao gene *vpr*, tendo-se sugerido, que este teria surgido, por meio de uma duplicação deste gene, durante a evolução (Tristem *et al.*, 1992).

A proteína Vpu é codificada pelo mesmo mRNA bicistrônico, que codifica a glicoproteína de envelope (Env), gp160 (Gomez *et al.*, 2005). Estudos com a proteína Vpu do HIV-1, subtipo “B”, tem mostrado que esta se localiza predominantemente no complexo de Golgi, mas também está presente no retículo endoplasmático rugoso. Esta proteína viral é composta por três domínios: um pequeno N-terminal (NTD), um domínio trans-membrana hidrofóbico (TM) e um domínio citoplasmático hidrofílico (CD) (Pacyniak *et al.*, 2005).

O domínio NTD e o TM estão constituídos pelos primeiros 27 aminoácidos. O NTD possui a função de ancorar a proteína na membrana e o de TM forma um domínio helicoidal perpendicular à membrana plasmática, que participa na liberação das partículas virais (Bour e Strebel, 2000). Já o domínio citoplasmático, ligado ao TM por um peptídeo flexível, tem sido associado à diminuição da expressão do receptor CD4

(Tiganos *et al.*, 1998) e estão constituídos por 2 α -hélices conectadas por um peptídeo conector “região de dobradiça”. A primeira α -hélice é anfipática, e está formada pela seqüência que corresponde aos resíduos 35-49, que por sua vez, encontra-se em orientação paralela a membrana, tendo seu lado hidrofóbico voltado para a membrana e o hidrofílico para o citoplasma. Logo em seguida, encontra-se um peptídeo conector flexível presente entre os aminoácidos 52-56. Este “loop” flexível possui dois sítios fosfoceptores, dois resíduos de serinas, altamente conservados nas posições 52 e 56. Ambas serinas são fosforiladas por uma caseína cinase II celular (CK-II), eventos requeridos para degradação da molécula de CD4 (Tiganos *et al.*, 1998; Gomez *et al.*, 2005).

A segunda α -hélice, menos anfipática, está presente entre os resíduos 58-70 seguida por um motivo helicoidal, entre os resíduos 73 e 78 (Figura 3). Esta α -hélice, seria responsável pela retenção da proteína no complexo de Golgi, no caso do subtipo “B” (Pacyniak *et al.*, 2005).

É importante ressaltar, que este modelo de estrutura terciária de Vpu pode sofrer importantes alterações, em consequência da ligação à proteínas celulares, como CD4 (Reeves *et al.*, 1999), β -transducina (β -TrCP) (Simmons *et al.*, 1998), UBP (Proteína de ligação a Vpu) (Simmons *et al.*, 1996) e TASK-1 (Hsu, 2004) ligações descritas posteriormente.

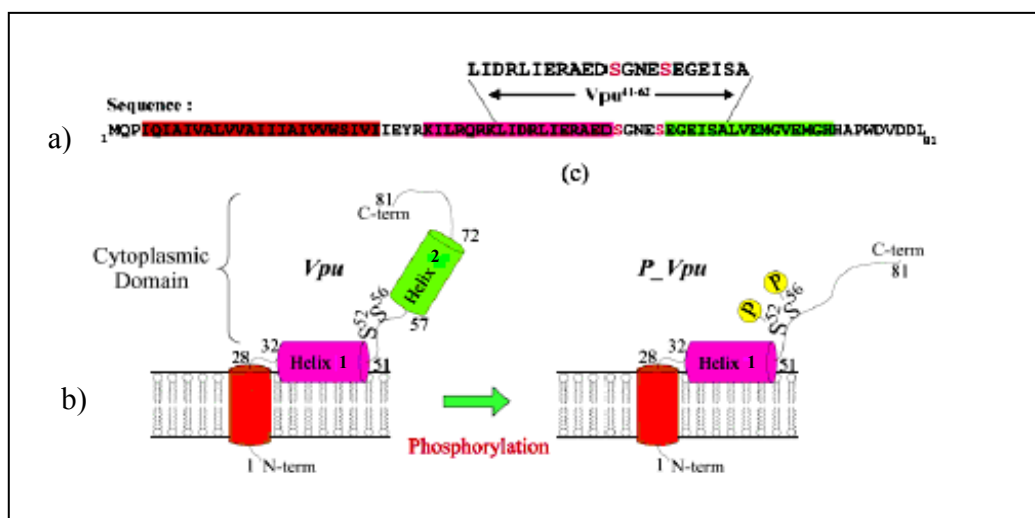


Figura 3. Estruturas da proteína Vpu do HIV-1. a) Seqüência primária da proteína Vpu, (b) Estrutura terciária da proteína Vpu, mostrando os principais domínios. A região N-terminal hidrofóbica é seguida pela região de transmembrana (em vermelho), e por duas hélices anfipáticas (rosa e verde). Ambas as hélices estão associadas por uma ligação flexível, a qual contém dois fosfoceptores, Ser52 e Ser56 (Coadou *et al.*, 2003).

1.4.1 Vpu e a degradação do receptor viral CD4.

A modulação da expressão do receptor CD4 é um dos mais importantes eventos durante a infecção pelo HIV-1, sendo conservada tanto nos mecanismos de infecção pelo retrovírus da imunodeficiência humana (HIV-1, HIV-2) como na imunodeficiência simiana (SIV), (Foster *et al.*, 1994; Garcia e Miller, 1991). Três proteínas virais, Nef, Env e Vpu, participam neste processo, sugerindo que a remoção do receptor viral da superfície celular possui um papel crítico no ciclo de replicação destes retrovírus (Lama *et al.*, 1999; Coleman *et al.*, 2001).

Enquanto a proteína Nef participa na degradação das moléculas CD4 presentes na superfície da célula infectada, Vpu e Env, participam na degradação das moléculas que estão sendo sintetizadas no retículo endoplasmático (Hout *et al.*, 2004) (Schubert e Strebel, 1994). Neste último mecanismo, a glicoproteína de envelope (gp160) devido a sua alta afinidade, interage com o receptor viral dentro do retículo endoplasmático rugoso (RER) bloqueando o processamento e o transporte de CD4 para superfície celular. A formação deste complexo gera um determinado transtorno para o vírus, uma vez que, a glicoproteína Env também se encontra impedida de ir para superfície da célula, onde é requisitada para montagem de virions infecciosos (Jabbar e Nayak, 1990).

Posteriormente, a proteína Vpu libera a molécula CD4 deste complexo e a direciona para degradação proteossômica (Schubert e Strebel, 1994) o que permite que Env seja liberado para superfície da célula (Willey *et al.*, 1992), o que sugere, que Vpu não só participaria na degradação de CD4, mas também seria importante na liberação da gp160 e sua subsequente incorporação na superfície das partículas virais. Nesse mesmo estudo foi mostrado que em células HeLa expressando Vpu, a molécula CD4 foi rapidamente degradada com a diminuição da meia-vida de 12h para aproximadamente 15min (Willey *et al.*, 1992).

Por outro lado, os trabalhos de Levesque e colaboradores (2003) e Tanaka e colaboradores (2003) têm mostrado a importância da degradação de CD4 mediada por Vpu na infectividade viral. Apesar de mostrar claramente uma maior incorporação da molécula CD4, na superfície viral, estes autores não conseguiram correlacionar estes dados com uma menor incorporação da glicoproteína de superfície, sugerindo a formação de complexos CD4-gp120 não funcionais como mecanismo mais provável

(Levesque *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003). A acumulação de CD4 traz uma outra consequência deletéria para o vírus, a inibição da liberação das partículas virais. Assim, Bour e Strebel (1999) demonstraram claramente que a expressão de CD4 em células HeLa inibia a liberação viral, por um mecanismo independente de Env. Em resumo estes e outros trabalhos apontam que a degradação de CD4 mediada por Vpu é necessária para a produção de partículas virais infecciosas (Strebel e Bour, 1999).

Sob o ponto de vista mecanístico, Env não é absolutamente necessária para a degradação de CD4, restringindo-se apenas a função de reter a molécula de CD4 no RE (Lenburg e Landau, 1993).

O processo de degradação de CD4 mediado por Vpu envolve múltiplos passos, começando pela ligação de Vpu à calda citoplasmática de CD4 (Bour *et al.*, 1995). Estudos mutacionais e de deleção, identificaram um fragmento compreendido entre os resíduos 416 e 419 (EKKT) como o fragmento responsável pela ligação com a proteína viral. Este domínio é diferente daqueles envolvidos na ligação com Nef ou na interação com a tirosina cinase (p56Lck), proteína esta envolvida na expressão de CD4 na superfície celular.

O domínio de Vpu, requerido para ligação de CD4, parece ser mais discreto, porém a primeira α -hélice foi identificada como o principal domínio envolvido (Cohen *et al.*, 2000). No entanto, esta ligação não é suficiente para induzir a degradação de CD4, uma vez que, mutações nos dois resíduos de serina susceptíveis a fosforilação e localizados na curta dobradiça, entre as duas α -hélices, inibem o processo de degradação de CD4 (Margottin *et al.*, 1998), sugerindo que a fosforilação desses resíduos é crucial para atividade de Vpu. No entanto, foi demonstrado em algumas cepas de SIV, que a falta de uma segunda serina é provavelmente substituída por trecho de aminoácidos carregados negativamente (Gomez *et al.*, 2005). Um outro requerimento para a verificação destes mecanismos é a formação de complexos multiprotéicos (Schubert *et al.*, 1998).

Após a fosforilação dos resíduos de Ser52 e Ser56, e principalmente por meio da pSer52, Vpu se liga a uma proteína contendo repetições de F-box- β -transducina (β -TrCP), um componente do complexo de ligação ao complexo E3 ubiquitina, o SCF ^{β -TrCP} (Coadou *et al.*, 2003). Isso sugere que a serina fosforilada permite a associação proteína-proteína, por uma estabilização eletrostática, onde a região negativa de Vpu, é reconhecida pelos resíduos positivos (Arginina e Lisina) presentes no domínio C-

terminal ou WD da proteína β -TrCP, denominação esta por conter sete repetições dos aminoácidos triptofano/ácido aspártico (W/D) (Coadou *et al.*, 2003).

O complexo $SCF^{\beta-TrCP}$ reconhece um fragmento compreendido entre os aminoácidos 41-61, sendo as sete repetições WD, suficientes para a ligação ao peptídeo DS^pGXXS^p , presente na maioria dos substratos protéicos, inclusive a proteína Vpu (Margottin *et al.*, 1998).

Já o N-terminal, contendo um motivo F-box, recruta o complexo SCF ubiquitina ligase E3 por intermédio da ligação com uma de suas subunidades, a Skp1, (Deshaies, 1999) o qual por sua vez, recruta a enzima E1, componente chave na ligação de moléculas de ubiquitina a proteínas alvo (Figura 4).

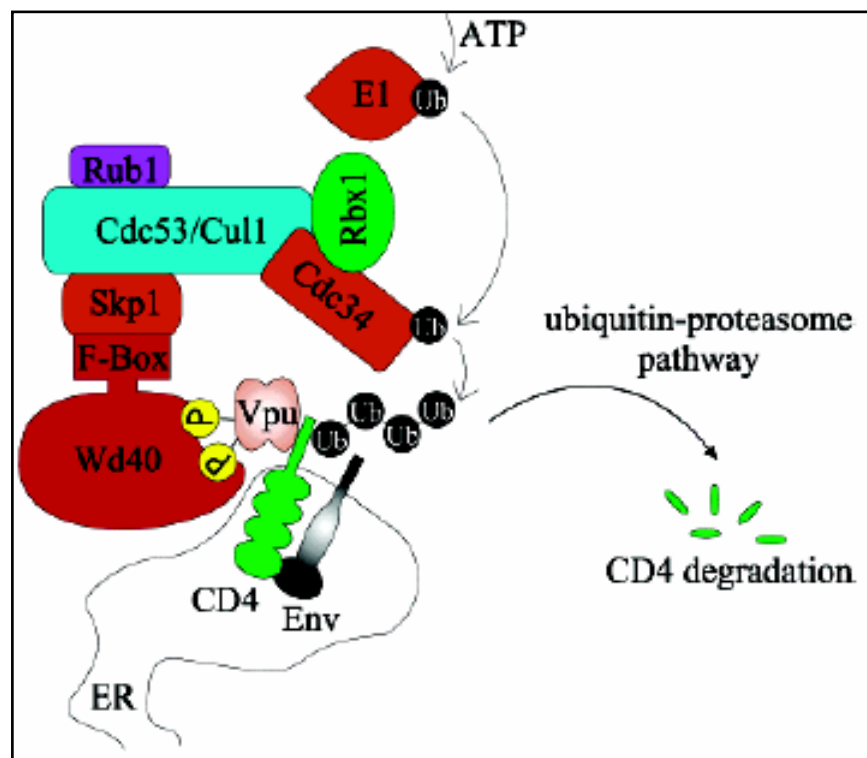


Figura 4. Modelo esquemático do mecanismo de degradação de CD4 mediado por Vpu. O esquema mostra como a proteína Vpu, ao ser fosforilada por uma caseína cinase II celular, desencadeia uma série de reações, que levam a ubiquitinação e posterior degradação da molécula CD4 via proteossômica (Coadou *et al.*, 2003).

Diferente de outros substratos do complexo SCF ^{β -TrCP}, Vpu não é degradado, sendo ainda desconhecido o mecanismo responsável. Uma possibilidade seria que Vpu de alguma forma mascara o resíduo de lisina, o qual é um potencial alvo de ubiquitinação pelas proteínas E1 e E2 (Binette e Cohen, 2004). Esta peculiaridade tem importantes conseqüências biológicas, já que seqüestraria a maquinaria de ubiquitinação dependente do complexo SCF, piorando a degradação de várias proteínas celulares e contribuindo para os efeitos patogênicos do HIV-1.

Dentre as proteínas que também são substratos da β -TrCP e cujo metabolismo é afetado por Vpu, encontram-se o inibidor do fator NF κ B, o I κ B α NF, a β -catenina e o fator transcripcional ATF4 (Lassot *et al.*, 2001). A inibição da atividade do fator transcripcional NF κ B, mediante a inibição da degradação do seu inibidor, o I κ B α , poderia levar a apoptose da célula infectada, o que afetaria os mecanismos de imunidade inata, dada a participação deste fator na expressão de genes anti-apoptóticos e de ativação celular mediada pela ação de fatores, como o de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) entre outros (Pahl, 1999; Akari *et al.*, 2001). Por outro lado, foi atribuída uma função anti-apoptótica a esta proteína, ao relacionar a presença em dois isolados clínicos do subtipo B, de um “stop codon” prematuro, logo depois da primeira metionina ou na interface do domínio transmembrânico e citoplasmático, a um aumento de apoptose em células de sangue periférico (Komoto *et al.*, 2003).

O acúmulo da β -catenina, pode também ter importantes conseqüências biológicas, desde que, a presença deste fator, foi relacionada à ativação de vários genes com efeito oncogênico, o que levanta a possibilidade que Vpu contribui ao desenvolvimento de tumores, sintomas característicos da fase crônica da AIDS (Bour *et al.*, 2001).

1.4.2 Vpu e a liberação viral.

A liberação das partículas virais da célula infectada é um dos tópicos mais estudados, e ao mesmo tempo mais obscuros da biologia deste vírus, mas sabe-se que a expressão de Vpu estimula drasticamente a saída viral em células humanas (Bour e Strebel, 2003) e que vírus deficientes nesta proteína se acumulam no citoplasma e na membrana plasmática (Klimkait *et al.*, 1990).

Por outro lado, os mecanismos envolvidos neste processo, podem ser basicamente divididos em dependentes e independentes da proteína Gag, sendo que, a

proteína Vpu estaria envolvida nos mecanismos independentes de Gag, mas não podemos descartar a possibilidade, de que estes mecanismos, estejam relacionados ou que sejam interdependentes. De fato, experimentos de localização celular indicam que Vpu aumentaria a liberação do HIV-1, promovendo o transporte de Gag para a membrana plasmática ou aumentando a afinidade do domínio matriz (MA) com a membrana, sugerindo a existência de uma conexão entre os mecanismos dependentes e independentes de Gag (Deora e Ratner, 2001).

Ainda não se sabe exatamente quais são os mecanismos pelos quais Vpu promove a saída viral, mas está bem definido que é mecanisticamente diferente do fenômeno de degradação de CD4, com o qual, apresenta importantes diferenças como: a) a degradação de CD4 e a liberação viral acontecem em diferentes compartimentos celulares, RE e pós-RE, respectivamente; b) a degradação de CD4 depende de seqüências presentes no domínio citoplasmático, entretanto, a liberação viral se dá principalmente por meio da região de TM localizada no N-terminal e é parcialmente afetada por mutações, que evitam a fosforilação das serinas (Friborg *et al.*, 1995).

O fato que Vpu, pode estimular a produção de partículas virais, na presença da proteína Gag de outros retrovírus distantemente relacionados, como o da leucemia murina (Gottlinger *et al.*, 1993) sugere fortemente, que esta proteína viral agiria de uma forma indireta modificando o ambiente celular.

Mediante mutações no domínio de TM, pelo uso da droga "amiloride", que leva a inibir a formação de homopolímeros, bloqueia a capacidade desta proteína de se comportar como uma proteína formadora de canais de íons (Ewart *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 1996). Entretanto não está claro como esta função pode regular a liberação viral.

Um dado curioso, é que o efeito de Vpu é dependente do tipo celular, e parece ser influenciado pelo nível de proliferação celular (Deora e Ratner, 2001). Assim, Vpu é imprescindível para o brotamento viral em linhagens celulares humanas, no entanto, é dispensável em linhas celulares de macacos. Estudos com heterocarions indicaram claramente a presença de um inibidor na montagem ou brotamento viral em células de primatas humanos, e não em células de primatas não humanos, o qual seria bloqueado pela proteína viral (Varthakavi *et al.*, 2003).

Seguindo esta linha de raciocínio, é interessante destacar que Vpu interage com duas proteínas celulares, as que mostraram inibir a produção de partículas virais. A

primeira é uma proteína de 41 kDa chamada UBP (proteína de ligação à Vpu) (Callahan *et al.*, 1998). Curiosamente, esta proteína (UBP) também interagir com a proteína Gag, entretanto, existe um efeito competitivo, mais que aditivo, entre ambas as interações. Por outro lado, a superexpressão da UBP deprime a habilidade de Vpu de promover a saída do vírus, sugerindo que UBP seria um fator negativo para a montagem viral, o que precisaria ser desligado de Gag ou inibido por Vpu, para permitir o transporte de Gag à membrana celular e mais especificamente, nos microdomínios ricos em colesterol, “lipid raft”, onde aconteceria o encapsulamento e liberação viral (Nguyen e Hildreth, 2000; Deora e Ratner, 2001).

A segunda proteína, que inibe a liberação viral e que interage com Vpu é uma proteína formadora de canais de K^+ , chamada de TASK-1 (Hsu, 2004). Os efeitos inibitórios de Vpu parecem obedecer à formação de hetero-complexos (Vpu-TASK-1) e a uma acelerada degradação de TASK-1. Estes dados sugerem que Vpu poderia aumentar a liberação viral, por uma alteração no potencial elétrico da membrana plasmática, o que por sua vez, poderia levar a alterar a fluidez e estrutura da mesma.

1.4.3 A proteína acessória – Rev.

A proteína Rev do HIV-1 é uma fosfoproteína de 116 aminoácidos, e é essencial para replicação viral, além de ser responsável pela exportação de RNAs virais não processados ou incompletamente processados do núcleo para o citoplasma, como são os transcritos dos genes *gag/pol*, *vif*, *vpr* e *vpu/env* (Bohne *et al.*, 2005).

Codificada por dois exons, (exon 1: dos aminoácidos 1 ao 25 e exon 2: dos aa 26 ao 116), possui três domínios: a) um domínio básico rico em arginina (do aminoácido 38 ao 50), sendo que dos 12 aminoácidos presentes nesse domínio, nove são argininas. Esse domínio rico em arginina se liga especificamente a uma região do complexo secundária do RNA, denominado RRE, além disso, esse domínio medeia à ligação ao RNA (RBD) e serve como sinal de localização nuclear e nucleolar (NLS / NOS) (Malim *et al.*, 1998); b) duas regiões de multimerização essenciais para a função da proteína, que se encontram flanqueando o domínio básico, a primeira região corresponde do aminoácido 14 ao 23, e a segunda região do aminoácido 55 ao 63 (Kjems e Askjaer, 2000) e c) um domínio de exportação nuclear carboxi terminal, rico em leucina (aminoácido 75 a 84).

Rev exerce sua função mediante a interação, com uma região intrônica do RNA do HIV-1 presente no transcrito do gene *env*, denominada elemento responsivo de Rev (RRE) (Jain e Belasco, 2001), formando multímeros, que exporta grandes complexos ribonucleoprotéicos contendo RNAs incompletamente processados para o citoplasma (Hope, 1999; Cullen, 2003). Este processo é mediado pela interação de multímeros da proteína Rev com fatores de exportação nuclear (CRM1 e exportina 1) (Jain e Belasco, 2001).

A replicação do HIV-1 é caracterizada por uma expressão coordenada dos diferentes transcritos, onde o HIV-1 usa um processo alternativo, que gera vários transcritos importantes para produção de vírus. A ausência dessa proteína faz com que esses transcritos permaneçam no núcleo da célula, sendo processados completamente ou submetidos à degradação. Diferentemente, na presença de Rev os transcritos incompletamente processados são acumulados no citoplasma para servirem como moldes na síntese de proteínas estruturais e acessórias, assim como, para formação do genoma viral (Thomas *et al.*, 1998).

Dessa forma, a proteína Rev do HIV-1 é um tipo de RNA-BP (proteína ligada ao RNA) que desempenha importante função na biologia do HIV-1, já que permite a expressão de genes tardios como Vif, Vpr e Vpu-Env, proteínas essenciais à transição do estágio inicial para o estágio tardio. Por outro lado, esta proteína parece cumprir um importante papel na saída do estado de latência viral (Jain e Belasco, 2001).

1.4.4 Peptídeo sinal da glicoproteína de membrana (gp120).

A glicoproteína gp 120 do envoltório do HIV-1 participa em processos cruciais no ciclo de replicação do vírus, como no reconhecimento de receptores específicos e a posterior entrada na célula hospedeira (Hammonds *et al.*, 2003) e na degradação da molécula CD4 no retículo endoplasmático (Lenburg e Landau, 1993). Esta glicoproteína é sintetizada como um precursor inativo, a gp160 (Klenk e Garten, 1994) que posteriormente sofre processamento proteolítico por uma furina celular, (Moulard e Decroly, 2000) gerando duas subunidades funcionais, as glicoproteínas gp120 e gp41, as que permanecem associadas à superfície viral por interações não covalentes.

O processo de maturação, desta glicoproteína, acontece durante o trânsito pelas diferentes organelas intracelulares, sendo sintetizada nos polirribossomas. O peptídeo

sinal, desta glicoproteína, possui importante papel na translocação para o retículo endoplasmático (RE) e no dobramento da proteína. Como característica peculiar, este peptídeo sinal é maior que os presentes em outras proteínas secretoras, possui em média cinco aminoácidos carregados positivamente antes de um “core” hidrofóbico e uma região C-terminal polar que contém um sítio de clivagem para a peptidase (Li *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000). Acredita-se, que a presença destes aminoácidos carregados positivamente sejam os responsáveis pela menor velocidade no processamento e secreção da glicoproteína do envelope viral, quando comparada a outras glicoproteínas secretadas.

1.5 O ciclo de vida - “Uma extraordinária viagem através da célula”.

De modo semelhante a qualquer vírus, o HIV é um parasita, que precisa se replicar dentro da célula do hospedeiro para garantir sua sobrevivência. Para atingir seu objetivo precisa percorrer um longo caminho desde sua entrada, até o núcleo da célula alvo, onde integra seu material genético. A continuação será proporcionada uma visão geral dessa longa jornada percorrida e os diferentes mecanismos usados pelo HIV-1 (Figura 5).

1.5.1. “Começando a travessia” – a entrada na célula hospedeira.

Tanto o HIV-1 como o HIV-2, podem infectar a célula hospedeira ou por fusão, ou por endocitose, no entanto, a relevância destas vias na produção de uma infecção produtiva não é totalmente conhecida. Certamente, a relevância destas vias depende do tipo celular e dos diferentes isolados virais, por exemplo, estudos de Fackler e colaboradores mostraram que à diferença do HIV-1 NL4.3, a cepa HIV-1 SF2, infecta a célula principalmente por via endocítica, o que é seguido pela ativação da capacidade fusogênica da gp41 a um baixo pH (Fackler e Peterlin, 2000).

No processo de entrada por fusão, após reconhecimento do receptor primário, CD4 (Dalglish *et al.*, 1984), por trimeros formado pela glicoproteína de superfície viral, a gp120, mudanças conformacionais são induzidas levando a uma outra glicoproteína também presente na superfície viral, a gp41, reconhecer um segundo tipo de receptor, os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4, processo que culmina na fusão de ambas as membranas (Feng *et al.*, 1996). Por outro lado, a incorporação na membrana viral de colesterol e esfingolipídios presentes em microdomínios da membrana celular “lipid raft”

(Kozak *et al.*, 2002) no momento do brotamento, aumenta a infectividade das partículas virais (Liao *et al.*, 2001), provavelmente proporcionando um melhor microambiente para a verificação do processo de fusão (Campbell *et al.*, 2001).

Como consequência da interação do envelope viral com a molécula CD4 e o co-receptor, uma cascata de sinais intracelulares é disparada (Freedman *et al.*, 2003). Entretanto, como estes sinais influenciam a fisiologia da célula infectada e permitem o estabelecimento da infecção não é completamente entendido. Em linhas gerais, fatores virais conjuntamente com fatores transcricionais celulares agem sobre o promotor viral LTR regulando a transcrição dos genes virais, de acordo com os estágios fisiológicos da célula (Rohr *et al.*, 2003).

Diferentemente dos eventos qualitativos da infecção, os parâmetros quantitativos são pobremente entendidos, por exemplo, o número de moléculas CCR5 requeridas para uma eficiente fusão, mostrou depender da disponibilidade da molécula CD4 (Kuhmann *et al.*, 2000), o que por sua vez, determina a eficiência dos passos pós-infecção (Lin *et al.*, 2002). Por outro lado, o número de trómeros de Env requeridos para uma infecção ainda é tópicio de controvérsia. Baseados em análises bioquímicas e diferentemente do que se pensava, o número de “spikes” presentes na superfície viral é bem menor, entre 7-14 aproximadamente (Chertova *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2003), dessa forma existe citações posteriores que colocam em dúvida estes números. Interessantemente, os níveis de expressão da gp160 na célula produtora não parece ser um fator limitante na quantidade de “spikes” incorporados na superfície viral (Hammonds *et al.*, 2003).

O tropismo celular é determinado pelo uso de co-receptores de quimiocinas, sendo a molécula CCR5 a mais importante na transmissão “in vivo” (Moore *et al.*, 2002). Este receptor encontra-se na superfície das principais células alvo como LT⁻CD4⁺, macrófagos e células dendríticas e se caracterizam por não induzir a formação de sincícios (Clapham e Mcknight, 2002).

A maioria dos isolados virais de pacientes assintomáticos apresenta tropismo por este co-receptor (cepas R5), (Alkhatib *et al.*, 1996) e indivíduos homozigotos para uma deleção de 32pb neste co-receptor, presente em 1 a 2% dos brancos caucasianos, são resistentes à infecção (O'Brien e Nelson, 2004). Durante o curso da infecção, podem surgir vírus com capacidade de usar outros co-receptores, principalmente o CXCR4 (vírus X4), que se caracterizam por formar sincícios (Simmons *et al.*, 1996). Em 50% das infecções causadas por vírus do subtipo B, o surgimento destas variantes está associado

com a progressão à doença.

Além destes dois principais co-receptores, o HIV -1 pode usar outros receptores de quimiocinas, e isolados primários do HIV-2 podem usar um maior espectro de co-receptores que os isolados do HIV-1 (Reeves *et al.*, 1999). Dentre os diferentes co-receptores encontram-se o CCR2b, CCR3, CCR8 e CXR6, todos estes expressos em LT e ou em macrófagos, assim como em outros tipos celulares encontrados nos (Clapham e Mcknight, 2002) rins, no fígado, em células do trato reprodutivo, em astrócitos, em células da microfilia, no cérebro, onde a molécula CD4 é pouco ou não expressa, e a expressão dos co-receptores CCR5 e CXCR4 é variável. Isto levanta importante questão, como estes co-receptores podem participar no estabelecimento de reservatórios virais em tecidos não linfóides e especialmente em sítios imunoprivilegiados e de pobre acesso às drogas anti-retrovirais.

Entretanto, a inabilidade de usar estes co-receptores nas principais células alvo, linfócitos e macrófagos, levou a questionamentos a respeito da relevância deles "in vivo" (Moore *et al.*, 2002), talvez o exemplo mais claro seja a dos isolados "dual tropic" (R5X4) que são incapazes de usar o co-receptor CXCR4 para infectar macrófagos, embora esteja presente neste tipo celular (Simmons *et al.*, 1996). Recentemente Stuart e colaboradores, (2005) identificaram um receptor endotelial de quimiocinas, presente nos vasos linfáticos, a molécula D6 ou CCBP2, como um eficiente co-receptor para uma variedade de isolados primários de HIV-1 e HIV-2, o que sugere, que esta molécula seria um importante receptor na disseminação da infecção, facilitando a passagem do vírus através dos vasos dos nódulos linfáticos.

1.5.2 "Encontrando o caminho para o núcleo".

Uma vez dentro do citoplasma da célula, o vírus desencapsida, por um processo pouco entendido, mas que provavelmente envolve proteínas celulares e virais, como a ciclofilina "A" (Franke *et al.*, 1994), Nef e Vif (Schaeffer *et al.*, 2001), (Ohagen e Gabuzda, 2000) e a fosforilação da proteína da matriz por uma cinase celular (Cartier *et al.*, 1999). Logo depois se forma um complexo, que recebe o nome de complexo de pré-integração (PIC), o qual compreende as moléculas de RNA viral, molécula de tRNA(3)Lys e as proteínas virais, transcriptase reversa, integrase, matriz, nucleocapsídeo, proteína viral R (Vpr), Vif e um grupo de proteínas do hospedeiro, HMGI(Y), ligada ao DNA (Miller, Farnet *et al.*, 1997). Em 2002, (Sheehy *et al.*, 2002),

foi desvendada uma incógnita que envolvia a proteína viral Vif, identificando uma deaminase celular, APOBEC, a qual é inibida pela proteína viral, protegendo o material genético do vírus da introdução de mutações, que possam comprometer a mensagem viral.

Uma vez sintetizada a dupla cadeia de DNA, o PIC se move em direção ao núcleo usando a rede de microtúbulos da célula como um canal. Neste processo, a interação de Nef com a proteína celular Vav (fator de intercambio de guanina, GEF) desencadearia uma série de funções efetoras culminando com o reordenamento do citoesqueleto e conseqüentemente facilitando a migração do PIC para o núcleo (Pulkkinen *et al.*, 2004).

1.5.3 “Navegando através do poro nuclear”.

Uma vez na vizinhança do núcleo e dado o seu tamanho, o PIC deve enfrentar um outro obstáculo, que é atravessar o poro nuclear. Neste processo, algumas proteínas virais teriam um papel chave, como a proteína viral MA, que está envolvida neste fenômeno, caracterizando assim um sinal de localização nuclear (NLS), que é reconhecido pelas importinas α e β , as quais fazem parte da via clássica de importação de proteínas para o núcleo. Em outras duas proteínas virais, Vpr e IN, também foram identificados sinais de migração nuclear (Sherman *et al.*, 2001; Gallay *et al.*, 1997), entretanto, ainda não estão elucidados o papel real dessas proteínas neste processo. Finalmente, a formação de um domínio triplo-helicoidal no DNA durante o processo de transcrição reversa, conhecido como “DNA flap”, foi descrito como um importante fator na migração do PIC, já que permitiria a ligação de proteínas do hospedeiro, que apresentam sinais para migração nuclear. Entretanto, essa “invasão” não é aceita de forma passiva pela célula, logo após 30 minutos da infecção, algumas proteínas nucleares, como o inibidor da integrase 1 (INI-1), cujo efeito é bloqueado pela integrase viral, são deslocadas para o citoplasma (Turelli *et al.*, 2001).

1.5.4 “Ancorando no cromossoma da célula hospedeira”.

Uma vez dentro do núcleo, o DNA viral pode sofrer quatro diferentes processos, mas somente um deles levará a integração no genoma do hospedeiro. Dessa forma, o DNA viral pode sofrer um processo de autoligação, formando um círculo contendo duas

repetições longas (2-LTR); alternativamente pode sofrer recombinação homóloga, gerando um único círculo com apenas um LTR, e finalmente, o DNA viral pode ser auto integrado, produzindo uma estrutura circular reorganizada. Nenhuma dessas formas circulares produz infecção, embora algumas formas, possam ser transcritas levando a produção do transativador transcripcional de Tat e ou Nef (Wu e Marsh, 2001). A integração eficaz do DNA viral dentro do cromossoma é mediada pela proteína viral IN (Miller *et al.*, 1997) e duas proteínas celulares identificadas, como HMGI(Y) e a barreira da autointegração (BAF), embora, as funções precisa delas, permaneçam desconhecidas (Chen *et al.*, 1999).

Após passar por todos esses obstáculos, o DNA proviral se integra em diferentes locais no genoma do hospedeiro, podendo levar a um estado de latência ou de replicação, dependendo do local e da disponibilidade de fatores transcripcionais. Mediante a análise de mais de 500 sítios de integração, Schroder e colaboradores (2002), mostraram uma forte e inesperada seleção por genes particularmente ativos após infecção. Estes dados poderiam explicar porque a infecção pelo HIV é seguida de uma agressiva replicação viral (Schroder *et al.*, 2002).

1.5.5 “Construindo as novas partículas”.

A transcrição do DNA viral é dirigida pelo 5' LTR, o qual possui seqüências promotoras, como “TATA-box” e 3 sítios SP1. Por outro lado, “upstream” destas seqüências encontram-se sítios para a ligação de fatores de transcrição, como NF- κ B e NFAT. Além disso, uma transcrição eficiente é promovida após a ligação da proteína viral Tat associada a ciclina T1 a um “domínio de transativação”, presente no RNA do LTR, ligação que termina recrutando uma cinase celular dependente de ciclinas Cdk9, o que conjuntamente com o fator “b” de alongação positivo (P-TEFb), leva a fosforilação do domínio C-terminal da RNA Polimerase II e conseqüentemente a uma eficiente transcrição (Wei *et al.*, 1998; Price, 2000).

A falha em algum destes eventos, pode contribuir para geração e manutenção do provírus no estágio de latência pós-infecção (Sherman e Greene, 2002).

A transcrição do genoma viral gera vários transcritos, alguns como os codificantes para Tat, Nef e Rev, os quais são processados na ausência de seqüências inibitórias de RNA de “splicing” e são transportados para o citoplasma (Yang *et al.*, 2001). Outros são incompletamente ou não processados devido à carência de sítios nos

transcritos e aos efeitos inibitórios da proteína viral Rev, que interage com alguns fatores celulares (Powell *et al.*, 1997). Estes transcritos codificam para algumas proteínas estruturais e proporciona o genoma viral necessário para ser empacotado dentro do capsídeo. Entretanto, o transporte destes transcritos para o citoplasma depende da ligação de Rev a uma estrutura secundária, presente no transcrito do gene *env*, que por sua vez, leva ao recrutamento de vários fatores celulares, que garantem o transporte destes transcritos para o citoplasma (Malim *et al.*, 1990). Dessa forma, o equilíbrio entre estes dois mecanismos, “splicing” total e parcial, é requerido para a propagação da infecção.

1.5.6 “Partindo da célula hospedeira”.

A montagem dos diferentes componentes dos virions (duas moléculas de RNA e várias proteínas virais como Nef, Vpr, Vif, TR e IN), acontece essencialmente na membrana celular e é dirigida principalmente pela proteína Gag, que é sintetizada no citoplasma e possui diferentes domínios funcionais: matriz (MA), envolvida no acoplamento a membrana; capsídeo (CA), envolvido diretamente na interação proteína-proteína, que ocasiona oligomerização; nucleocapsídeo (NC), responsável pelo recrutamento do RNA viral e domínios do tipo PTS/AP (Late domains) presente na porção p6 e que após ubiquitinação adquirem a capacidade de recrutar proteínas celulares, como a TSg101, Hrs e a STAM (Morita e Sundquist, 2004), relacionadas com a formação dos corpos multivesiculares (MVBs), usufruindo esta via de exocitose para formar vesículas intraluminais (Pornillos *et al.*, 2003), o que culmina no brotamento das partículas virais englobadas.

Outras proteínas virais, além de Gag, envolvidas na saída viral são: Env, envolvida no direcionamento de Gag para a membrana plasmática e saída viral (Lodge *et al.*, 1994; Lodge *et al.*, 1998; Deschambeault *et al.*, 1999) e Vpu, envolvida na saída viral, processo descrito anteriormente.

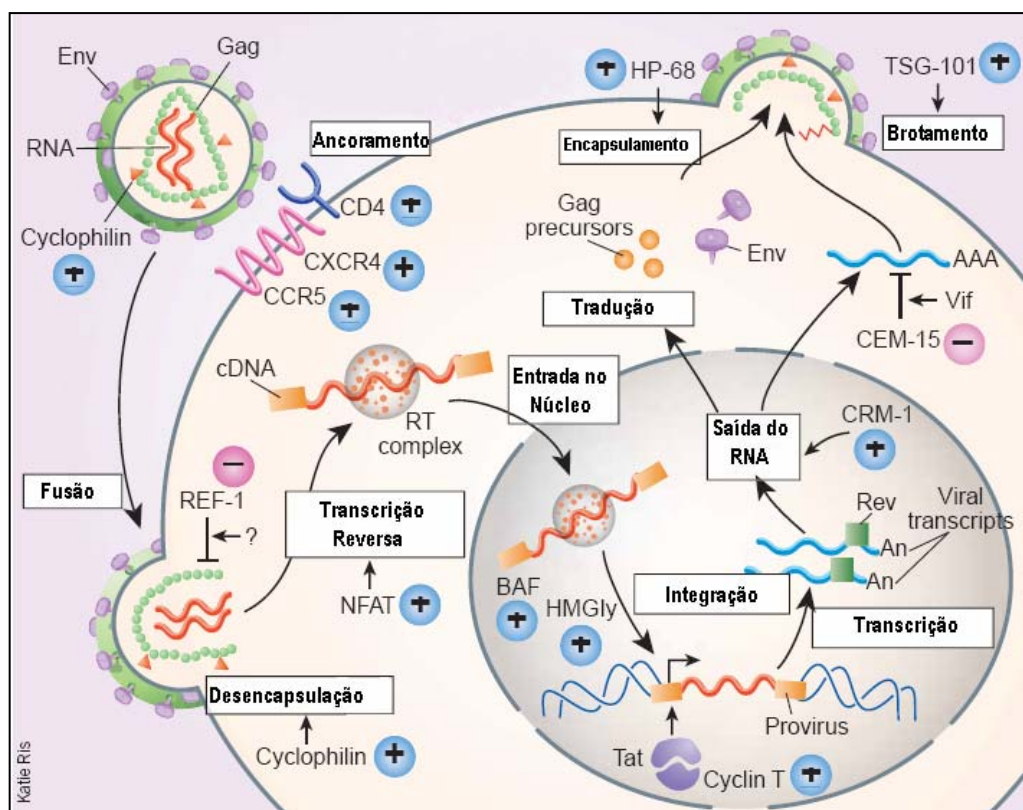


Figura 5. Ciclo infeccioso e fatores celulares que promovem ou inibem a replicação do vírus HIV-1. *Ancoramento - fusão:* a entrada do vírus é mediada pela ligação da gp120 ao receptor celular CD4, o que induz mudanças conformacionais na glicoproteína viral, facilitando a fusão do outro componente do envelope, a gp41 com o co-receptor CCR5 ou CXCR4. *Desencapsidização - transcrição reversa:* uma vez liberado no citoplasma, a partícula viral se desencapsida e o RNA sofre transcrição reversa, gerando um DNA dupla fita. *Entrada no núcleo:* o DNA dupla fita junto com proteínas virais (IN, Vpr) e outras proteínas celulares, formam o complexo de pré-integração (PIC), o qual migra para o núcleo. *Integração:* O DNA viral integra no genoma da célula hospedeira. *Transcrição e Saída dos RNAs mensageiros:* a transcrição do DNA proviral realizada pela RNA polimerase II celular origina transcritos que são total, parcialmente e não processados. Posteriormente, todos os transcritos independentemente de ser processados ou não são exportados para o citoplasma, processo mediado em alguns casos pela proteína Rev. *Tradução, encapsulação e brotamento:* os transcritos são traduzidos por ribossomas no retículo endoplasmático, gerando as poliproteínas Gag, Gag-Pol e Env e proteínas como Nef, Vif, Vpu. Posteriormente, os componentes dos virions são envelopados ocorrendo o brotamento viral por um processo de fusão com a membrana celular. Os fatores celulares que influenciam as diferentes etapas do ciclo infeccioso do HIV (fatores positivos (+) e negativos (-)), estão indicados após cada passo na replicação viral. A proteína REF-1 bloqueia a infecção do HIV-1 após entrar na célula de alguns macacos. O fator CEM-15 (APOBEC) pode modificar o RNA genômico viral, sendo inibido pela proteína viral Vif. Os fatores celulares CD4, CXCR4, CCR5, Ciclina T-1, CRM-1 e TGS-101 promovem a replicação viral (Stevenson, 2003).

1.6 Infecção, Resposta Imune e Patogênese da AIDS.

1.6.1 Infecção.

Após contato com a mucosa, o primeiro tipo celular com que o HIV tem contato são as células dendríticas (CD). Estas células desempenham importante papel no processamento e apresentação de antígenos e possuem dois estágios funcionais: imaturo e o maturo. As CD imaturas estão localizadas nos tecidos, como peles e mucosas, e são muito eficientes na captura de antígenos, as quais expressam em sua membrana, receptores quimiotáticos, que lhes permitem migrar para os nódulos linfáticos, onde se diferenciam em células maduras. Estas, por sua vez, são imunoestimulatórias, apresentando diferentes antígenos às células do sistema imune, principalmente aos linfócitos T (LT) (Larsson, 2005).

No caso da infecção pelo HIV, as CD da submucosa entram em contato com o vírus por meio de uma estrutura especializada chamada DC-SIGN (Geijtenbeek *et al.*, 2000). Esta proteína é uma lecitina do tipo C e se caracteriza por ter grande afinidade pela glicoproteína da superfície viral, gp120. Entretanto, esta interação não desencadeia nenhum evento de fusão, sendo as partículas virais apenas internalizadas em um compartimento ácido e subsequentemente transportadas até os nódulos linfáticos, onde são apresentadas às células T previamente ativadas pelas próprias CD (Kwon *et al.*, 2002). Por outro lado, foi sugerido que a exposição dos virions a pH ácido no interior das células dendríticas aumentaria a capacidade de fusão das partículas virais com suas principais células alvo (linfócito T CD4⁺ e macrófago) (Skehel e Wiley, 2000). Desse modo, as células dendríticas agem como um “Cavalo de Tróia”, facilitando a disseminação da infecção da superfície mucosa para os órgãos linfáticos. Como descrito no item 1.5 (Ciclo infeccioso), a entrada nos linfócitos T e macrófagos ocorre principalmente por fusão, mediante a interação das glicoproteínas de superfície gp120 e 41 com as moléculas CD4, CCR5 e CXCR4.

Como todos retrovírus, o HIV deve integrar seu material genético no genoma da célula hospedeira sendo este processo muito influenciado pelo estado de ativação celular, fazendo-se necessário a saída do estado celular de repouso ou G₀ (Stevenson *et al.*, 1990). Recentemente, pesquisadores desvendaram o mecanismo, pelo qual o vírus infectaria os LT que se encontrava em repouso (Swingler *et al.*, 2003). Neste processo, a proteína viral Nef, produzida por macrófagos infectados, interagiria com a via de

sinalização mediada pelo receptor CD40L, promovendo a liberação das citocinas CD23 e ICAM, as que estimulariam os linfócitos B (LB) a expressarem moléculas co-estimulatórias nas suas superfícies. No caso dos LB serem estimulados pela interleucina CD23, esses passam a expressar a molécula CD22, e quando estimulados pela citosina ICAM, os mesmos passam a expressar as moléculas CD22, CD58 e CD80. Como consequência da interação destas moléculas com seus correspondentes co-receptores na superfície dos LT (CD22-CD45, CD58- CD2 e CD80-CD28), estes saem do estado G_0 , tornando-se permissivos à infecção (Swingler *et al.*, 2003).

Uma importante informação proporcionada por este estudo (Swingler *et al.*, 2003), foi a descoberta de um mecanismo para a formação de reservatórios virais, até então desconhecidos, já que aqueles linfócitos, que são estimulados pelas moléculas, CD22 e CD58, diferentemente dos que receberam o estímulo das interleucinas CD22, CD58 e CD80, permaneceriam num estágio de “latência”, não produzindo partículas virais.

Por outro lado, uma nova rota para a formação de reservatórios virais, foi recentemente sugerida por Swiggard e colaboradores (2005). Estes autores, mediante o uso de um sistema “in vitro”, mostraram que ao contrário das expectativas, o HIV poderia integrar seu DNA em LT em repouso sem necessidade de nenhum tipo de ativação e que uma porcentagem destas células poderia produzir partículas virais após estimulação (Swiggard *et al.*, 2005).

Seja por qualquer um dos fatores citados, logo após a infecção, o vírus garante sua permanência dentro dos linfócitos indefinidamente, onde seu material genético será mantido e principalmente fora do alcance do sistema imune e do coquetel anti-retroviral.

1.6.2 Resposta Imune.

No estágio agudo da infecção, que pode durar entre quatro a oito semanas, bilhões de virions são produzidos diariamente, principalmente pelos linfócitos T auxiliares ativados (LT-CD4) (Zhang *et al.*, 1999). Estas células possuem meia vida de aproximadamente um dia e, havendo diariamente em torno de 10 a 100 milhões de células mortas (Cavert *et al.*, 1997).

Na fase crônica ou assintomática, logo após o pico de viremia, a resposta imune celular dirigida principalmente pelos LT-CD8⁺ (LTc) consegue controlar parcialmente a

replicação viral diminuindo a carga viral consideravelmente. Esta se mantém por vários meses entre 10^3 e 10^6 cópias de RNA/mm³ de plasma. Estima-se que aproximadamente 0,1% do total de linfócitos do organismo são infectados e que uma quantidade 100 vezes maior possui o provírus integrado no genoma (Haase, 1999). Nesta fase, os LTc persistem em alta frequência: 1-2% do total dos LTc são específicos para epítomos virais, sendo que aproximadamente 10^9 destes podem ser específicos para um único epítomo.

A manutenção da intensidade desta resposta é dependente da persistência do estímulo antigênico, desde que, a redução da carga viral pela ação do coquetel anti-retroviral leve a declínio deste tipo celular (Gray *et al.*, 1999). Entretanto, quando não há tratamento, pode ser detectado, freqüentemente, grande número de LTc específico. Esta fase também se caracteriza pela presença de anticorpos específicos para as distintas proteínas virais e, principalmente, por uma gradual e constante queda do nível de LT-CD4 circulantes, o que leva ao desenvolvimento da síndrome num lapso em média de 10 anos (Figura 6).

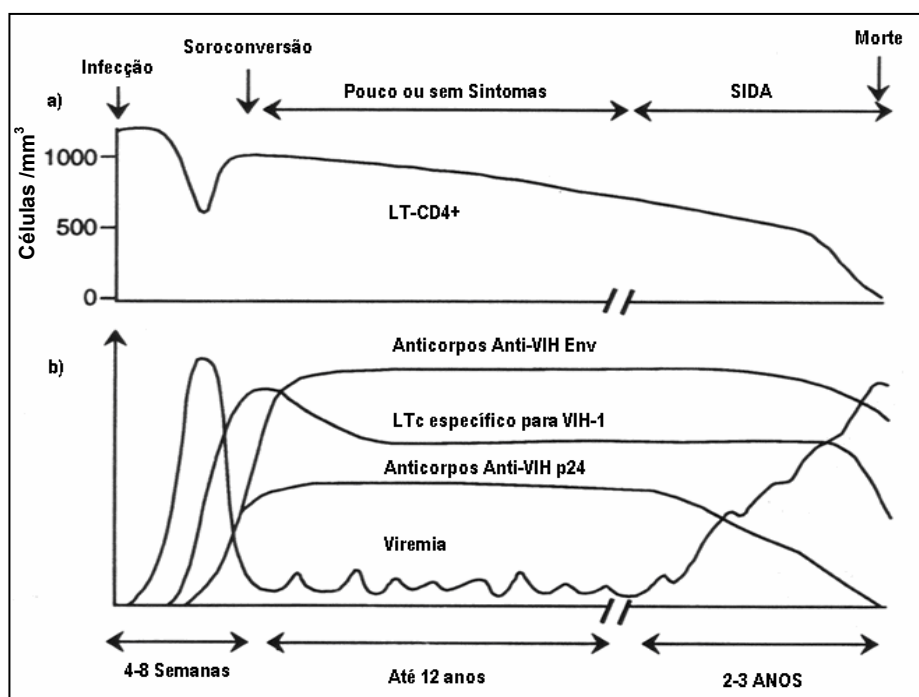


Figura 6. Resposta imunitária e estágios clínicos da infecção pelo HIV-1. a) Níveis de LT-CD4+ em sangue periférico e estágios clínicos durante a infecção pelo HIV-1. b) Resposta imune e carga viral durante a infecção pelo HIV-1. Resposta humoral (anti-env, anti-p24); resposta imune celular contra HIV-1 (níveis de LTc-específicos contra o HIV); níveis de vírus (viremia) em sangue periférico ao longo da infecção, encontram-se esquematizados (Charles *et al.*, 2002).

Na ausência do tratamento anti-retroviral, os níveis de viremia atingem um “platô” que persiste por vários anos. Diversos trabalhos sugerem um importante papel às células CD4⁺ e CD8⁺ (Altfeld e Rosenberg, 2000), (Emu *et al.*, 2005), entretanto é controversa, a participação do sistema imune, uma vez que em alguns indivíduos infectados, apesar de apresentarem forte e ampla resposta anti-HIV, observa-se aumento na replicação viral e uma acelerada perda de LT-CD4⁺. Dentre os possíveis mecanismos responsáveis pelo fracasso no controle da viremia por período de tempo prolongado, podem-se citar: diferenciação anormal de LT (CD4⁺ e CD8⁺), diminuição da produção de perforina, pobre apresentação antigênica e o surgimento de variantes virais mutantes que escapam ao controle do sistema imune.

O crucial papel dos LTc no controle da infecção fica evidente ao se observar a coincidência entre a brusca diminuição da viremia e o surgimento dos LTc no sangue periférico, prévio ao aparecimento de qualquer tipo de anticorpo neutralizante.

Os LTc cumprem papel importante no controle de muitas infecções virais, inclusive a ocasionada pelo HIV-1. Na fase aguda da infecção pelo HIV-1, de modo semelhante ao vírus Epstein Bar (EBV), a ativação dos LTc se restringe a poucos clones, permanecendo alguns destes em repouso como células de memória (Callan *et al.*, 2000). A importância na amplificação/diversidade da resposta na fase inicial fica evidente no prognóstico desfavorável em paciente onde a resposta mediada por LTc é monoclonal. Possivelmente, pelo fácil surgimento de variantes virais resistentes, que podem escapar a resposta imune pela mutação de apenas um único epítipo (Hazenberg *et al.*, 2000). Entretanto, a expansão inicial pode ser mantida se os virions persistirem, mas pode ocorrer rápido declínio se forem removidos (Kuroda *et al.*, 1999).

Dentre os diferentes mecanismos efetores, usados pelos LTc contra o HIV-1, pode se citar mecanismos líticos e a produção de citocinas, como a proteína perforina, (presentes em seus grânulos), o interferon- γ (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) que podem afetar a replicação viral (Bollinger *et al.*, 1993). Os LTc específicos também produzem quimiocinas como MIP-1- α , MIP- β e RANTES, que reprimem a replicação viral por competição ou modulação do co-receptor CCR5 (Cocchi *et al.*, 1995). Além destes fatores, existe um parcialmente caracterizado, denominado CD8⁺ *antiviral factor* (CAF), que bloqueia a transcrição dirigida pelo LTR nas células infectadas (Copeland *et al.*, 1995), que além de inibir a produção viral, pode vir a facilitar a geração de latência. Estudos “in vitro” mostraram que os LTc possuem a

capacidade de lisar as células infectadas, apesar da diminuição da expressão das moléculas do CPH-I por parte da proteína viral Nef, e por outro lado, que essa lise é predominantemente mediada por perforina e granzimas, sendo que, uma minoria o faz por uma ligação entre FasL expresso no LTc e a molécula Fas, expressa na célula hospedeira. Entretanto, estudos “ex vivo” mostraram baixos níveis de perforina nos grânulos das células citotóxicas, o que por sua vez, se traduz em pobre capacidade lítica. Similares resultados foram obtidos nos LTc presente em nódulos linfáticos (Andersson *et al.*, 1999). Apesar de, não se saber exatamente os motivos da diminuição da expressão de perforina, existem fortes evidências que esta deficiência está relacionada a interrupção no estágio de maturação dos LTc (Hamann *et al.*, 1997), que por sua vez poderia esta relacionado a um pobre efeito cooperador por parte dos LT-CD4⁺ (Zajac *et al.*, 1998), apesar, de não se poder descartar outros fatores.

Um outro fator envolvido, no fracasso em conferir um efetivo controle da infecção e o subsequente desenvolvimento da síndrome, se deve ao surgimento de variantes virais resistentes, em consequência da pressão imunológica exercida pelos LTc e anticorpos neutralizantes (Moore *et al.*, 2002; O'connor *et al.*, 2002).

Os altos e constantes níveis de replicação viral (10^{10} virions/dia), levam a produção de 140 novas gerações anuais (Perelson *et al.*, 1996; Koup *et al.*, 1994), combinados com a alta taxa de erro da transcrição reversa (Mccutchan, 2000), a freqüente recombinação (Fang *et al.*, 2004; Shriner *et al.*, 2004) e a pressão seletiva imposta pelo hospedeiro, levam a geração de grande diversidade genética viral (Shankarappa *et al.*, 1999). Entretanto, os níveis de diversidade entre indivíduos variam consideravelmente, podendo contribuir para isto fatores virais como: virulência, subtipo, imunogenecidade, composição do inoculo infectante (simples vs. múltiplas quasiespécies) e fatores genéticos do hospedeiro, tais como, receptor de quimiocinas, polimorfismo do CPH e gênero (Barbour *et al.*, 2004; Carrington e O'brien, 2003; Ritola *et al.*, 2004; Spira *et al.*, 2003; Trachtenberg *et al.*, 2003).

O surgimento destas variantes pode ter um importante impacto epidemiológico no desenvolvimento da doença, uma vez que, vírus transmitidos entre hospedeiros que compartilham os mesmos alelos do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (CPH-I), poderão ser mantidas no hospedeiro receptor, levando a infecção mais severa e com evolução mais rápida à doença (Leslie *et al.*, 2004). Entretanto, se a transmissão de variantes resistentes acontece para um hospedeiro com diferente CPH-I, a pressão

para manter estas variantes é perdida e a reversão para o tipo selvagem pode ocorrer (Friedrich *et al.*, 2004). De fato, a rápida reversão detectada nestes hospedeiros, poderia refletir no alto custo no desempenho viral ocasionadas por estas mutações (Fernandez *et al.*, 2005). Estes dados têm importantes implicações no desenvolvimento de vacinas, as quais poderiam estimular uma resposta de LTc capaz de induzir o surgimento de mutações, que possam levar a perda mais efetiva no desempenho viral.

Um outro dado importante, em favor da relevância da resposta celular é a existência de forte correlação entre o tipo de CPH-I e a progressão à doença. A presença de determinados alelos do CPH-I foi relacionada tanto na progressão, como na maior suscetibilidade, a desenvolver a doença em infecções ocasionadas por vírus do tipo B e C. Assim, os CPH-B27, B-57 / 58 e B-63 foram relacionados à lenta progressão (Kaslow *et al.*, 1996; Frahm *et al.*, 2005), e o CPH-B35 (Carrington *et al.*, 1999) relacionado a rápida progressão. Estes dados levantam a interessante hipótese, que a resposta a determinados tipos de peptídeos levaria ao surgimento de mutações, que por sua vez, levaria à perda no desempenho viral como o conseqüente impacto no prognóstico da infecção.

1.7 Patogênese.

1.7.1 A depleção de LT Auxiliares.

Logo após a descoberta da AIDS em 1981, ficou evidente que o número de LT-CD4⁺ decrescia à medida que a infecção progredia (Levy, 1993). Entretanto, mais de 20 anos depois e apesar dos enormes esforços realizados pela comunidade científica, os motivos para tal depleção e o porquê do HIV causar doença, continua sendo motivos das mais diversas especulações e hipóteses.

Dentre as diferentes linhas de raciocínio, pode-se citar as que se baseiam num mecanismo patogênico direto, onde a perda dos LT-CD4⁺ ocorreria devido à lise ocasionada pela infecção viral, hipótese esta, que encontra suporte na relação direta entre o grau de depleção de LT-CD4⁺, com a capacidade fusogênica do envelope viral; encontrada “in vivo” (Hammonds *et al.*, 2003). Uma outra hipótese sugere que a depleção de LT-CD4 obedeceria a uma resposta exagerada e principalmente descontrolada do sistema imune, o que levaria a total exaustão do sistema imunitário, tendo por base entre outras evidências, o fato que tanto as células infectadas como as não infectadas são depletadas durante a infecção (Kirchhoff *et al.*, 1995). Neste cenário,

diversas evidências obtidas nos últimos anos ajudaram a melhorar o entendimento dos possíveis mecanismos que levam a depleção do sistema imune. Assim, Douek e colaboradores, (Douek *et al.*, 2002) demonstraram que os LT-CD4⁺ específicos para o HIV-1, são preferencialmente infectados, e que após interrupção da terapia retroviral, a frequência de DNA viral em LT-CD4⁺ de memória específico para epítomos do HIV, era muito maior, que o presente em células de memória de outras especificidades. Este estudo proporciona uma possível explicação para a perda de LT-CD4⁺ HIV específico e conseqüentemente para a perda do controle da infecção (Douek *et al.*, 2002).

Embora exista ampla evidência em favor da capacidade do HIV em estimular e manter uma resposta imune, torna-se cada vez mais claro que os aspectos proinflamatórios desta resposta, podem ser prejudiciais.

Assim, muito provavelmente, a crescente ativação contribui diretamente para depleção das células CD4⁺, talvez como uma consequência da exaustão e acelerado “envelhecimento” do sistema imune (Appay *et al.*, 2002; Iyer *et al.*, 1998). Curiosamente, Emu e colaboradores (2005), há dados que sugerem, que o controle virológico está associado à preservação da produção de duas citocinas, IFN- γ e IL-2, produzidas por LT-HIV específico, mas incompletamente diferenciados e com baixos níveis de proliferação. Esse estado imunológico pode ser definido, como um estágio em que o sistema imune mantém a capacidade de responder ao HIV se expandindo, pela ação da IL-2, mas não chegando a se exaurir, ou seja, se manteria num estágio relativamente quiescente. Esses dados trazem um novo paradigma na regulação da resposta imune, onde a produção de IL-2 pode ser benéfica, já que diminuiria os níveis de reposição dos “LT naive”. Este novo modelo encontra sustentação no trabalho de Sereti e colaboradores (Sereti *et al.*, 2005), onde, a administração da IL-2, levou a um aumento no número de células T foxP3⁺, que poderia exercer uma leve supressão da ativação policlonal de “LT naive” (Emu *et al.*, 2005).

Em resumo, o controle da viremia na fase crônica requer manutenção duradoura de LT de memória, mas em ausência de ativação generalizada.

1.7.2 Diminuição da expressão do receptor viral CD4 e sua relevância na patogênese da infecção pelo HIV-1.

A proteína gp120 do envelope do HIV-1, após ligação a seu receptor, a molécula CD4, sofre mudanças conformacionais que culminam na fusão das membranas virais e

celulares (Lapham *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1997). Poucas horas depois, uma cascata de processos é iniciada com objetivo de assegurar a diminuição da expressão do receptor viral (Figura 7).

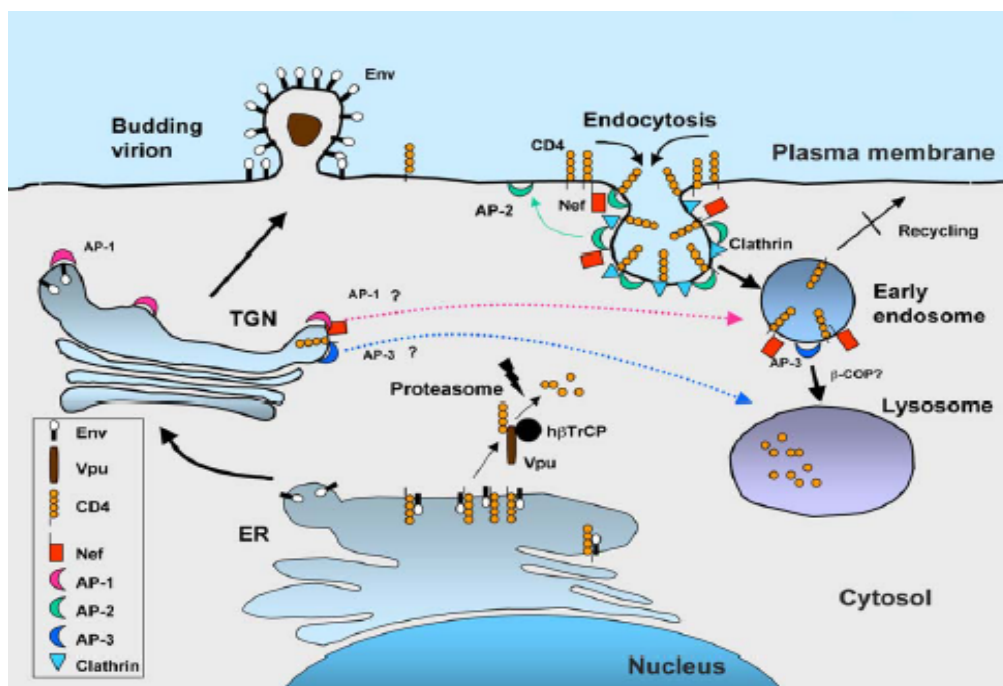


Figura 7. Mecanismos envolvidos na diminuição da expressão de CD4 da superfície da célula infectada pelo HIV-1. A modulação de CD4 ocorre em diferentes locais da célula infectada e envolve as proteínas virais Nef, que age como um conector na superfície da célula ligando o domínio citoplasmático de CD4 com o complexo protéico adaptador da clatrina AP-2, induzindo a formação de vesículas endocíticas, que posteriormente por recrutamento da proteína β -Cop, são direcionadas ao lisossoma para degradação. As moléculas CD4 recém sintetizadas presentes no RE, são direcionadas para degradação proteossômica pela ação das proteínas Env e Vpu (Lama, 2003).

Como mencionado anteriormente, a modulação da expressão do receptor CD4, é um dos mais importantes eventos durante a infecção pelo HIV-1, sendo conservada tanto no HIV-1, HIV-2, como no SIV (Guy *et al.*, 1987; Foster *et al.*, 1994) e (Marini e Showronski, 1993).

Das nove proteínas virais, somente Nef, Env e Vpu participam neste processo, demonstrando que a modulação do receptor viral da superfície celular, possui papel crítico no ciclo de replicação destes retrovírus. De fato, níveis de CD4 levemente superiores aos observados nos linfócitos primários podem vir a saturar a maquinária viral (Cortes *et al.*, 2002). Das três proteínas, Nef é a única empacotada no virion e expressa logo após a infecção, sendo seus transcritos os mais abundantes nesta fase, desempenhando o papel mais relevante na modulação de CD4 (Coleman *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 1996; Aiken e Trono, 1995). Assim seu efeito pode ser detectado entre 12-16

horas após a infecção (Cortes *et al.*, 2002), porém a contribuição de Env e Vpu na modulação de CD4 é detectada apenas em estágios tardios da infecção. Os efeitos de Nef (produto precoce) e Vpu/Env (produtos tardio) são quantitativamente e qualitativamente distintos (Chen *et al.*, 1996).

A modulação de CD4 (Figura 7) acontece em três diferentes níveis e ou localizações: na membrana plasmática, no retículo endoplasmático (ER) e em menor grau no aparelho de Golgi. Na membrana, Nef age como conector ligando o domínio citoplasmático do receptor viral CD4, ao complexo heterotetramérico adaptador de clatrina, AP-2 (Harper *et al.*, 1986). Esta interação leva à formação de vesículas endocíticas, que são direcionadas para o endossoma (Schwartz *et al.*, 1995); (Mangasarian *et al.*, 1997) e posteriormente, para degradação lisossômica por interação com a proteína β -COP (Piguet *et al.*, 1998). Também foi proposto, que Nef direcionaria as moléculas de CD4 presentes no trans-golgi para os endossomas precoce e tardio, por interação com as subunidades micro (μ) dos complexos AP-1 e AP-3, contribuindo assim, com a degradação das proteínas recém sintetizadas (Mangasarian *et al.*, 1997; Le Gall *et al.*, 1998; Craig *et al.*, 2000).

As outras duas proteínas virais, Vpu e Env, agem no RE, bloqueando o transporte das moléculas recém sintetizadas. Assim, e devido sua alta afinidade, a gp160 liga-se fortemente à molécula CD4, proporcionando a formação de agregados, que bloqueiam o transporte do receptor viral para superfície celular (Stevenson *et al.*, 1988; Geleziunas *et al.*, 1994).

Como consequência lógica, surge a pergunta: *por que o HIV precisaria diminuir a expressão do seu próprio receptor?* Dentre as diversas hipóteses formuladas para responder a esta pergunta temos: a) evitar a ligação cruzada da molécula CD4 na superfície de células infectadas, para evitar a transdução de sinais inibitórios, os quais podem inibir a transcrição do DNA viral a partir do “*Long Terminal repeat*” (LTR) ou induzir apoptose e efeitos citopáticos, antes que a liberação viral aconteça (Newell *et al.*, 1990; Wassmer *et al.*, 1985; Tobiume *et al.*, 2002); b) impedir a superinfecção, o que poderia por em perigo a produção viral (Potash e Volsky, 1998); c) favorecer a liberação de partículas virais (Benson *et al.*, 1993; Bour *et al.*, 1999); e finalmente, evitar a diminuição da infectividade das partículas virais liberadas (Lama *et al.*, 1999; Cortes *et al.*, 2002 ; Arganaraz *et al.*, 2003).

É importante ressaltar, que estas hipóteses não são mutuamente excludentes e que

muitas delas podem ter participação real na infecção pelo HIV-1.

Trabalhos realizados por nosso grupo têm se detido no estudo das conseqüências fisiológicas e as bases moleculares da diminuição da infectividade, mediada pela expressão da molécula CD4. Os primeiros trabalhos mostrando os efeitos inibitórios da expressão de CD4 na replicação viral foram de Marshall e colaboradores (1992). Posteriormente, trabalhos de Lama e colaboradores (1999), mostraram que a superexpressão do receptor viral CD4 levava a diminuição da infectividade e liberação das partículas virais e que as proteínas Nef e Vpu por meio da participação na diminuição da expressão do receptor da superfície viral, eram capazes de impedir os efeitos inibitórios mediados pelo CD4. Por outro lado, a eliminação dos efeitos inibitórios mediante o uso de partículas virais pseudotipadas, com as glicoproteínas dos vírus da estomatite vesicular (VSVg) ou com a do vírus da leucemia viral murina (MLV), mostraram claramente que este fenômeno requeria a interação da molécula CD4 e a glicoproteína de superfície viral, a gp120. Entretanto, estes estudos foram realizados em células 293T previamente transfectadas com vetores expressando a molécula CD4, o que pode levar a uma expressão maior das que se observa nas células infectadas naturalmente, e desse modo, estas células não expressam a proteína de transmembrana Lck, a qual se associa a CD4 na superfície viral. Com objetivo de abordar estas questões, Cortes e colaboradores (2002) realizaram os mesmos estudos de inibição em linhagem de células Jurkat, que expressam Lck, com altos e baixos níveis de expressão de CD4. Desta forma, foi possível observar diminuição da infectividade entre 75-85%, ainda em células com baixos níveis de CD4, o que mostrava que pequenas quantidades de CD4 eram prejudiciais para a infectividade viral. Já em células expressando altos níveis de CD4 os níveis de inibição atingiram 95% (Cortes *et al.*, 2002).

Estes estudos em conjunto, mostraram claramente que a inibição da infectividade podia acontecer em condições fisiológicas de expressão de CD4 e bem abaixo dos níveis de expressão requerida para inibir a liberação viral. A independência entre estes dois fenômenos foi demonstrada pelo mapeamento de domínios diferentes na molécula CD4, para a verificação de ambos os fenômenos (Bour *et al.*, 1999).

Evidências proporcionadas pelos trabalhos de (Cortes *et al.*, 2002) e posteriormente pelos de (Arganaraz *et al.*, 2003), onde foram detectados níveis de incorporação da molécula CD4 na superfície das partículas virais, levaram a sugerir inativação funcional da gp120 como conseqüência da co-expressão de ambas as proteínas

na superfície do vírus.

Baseado nestas evidências, e com o intuito de encontrar novas abordagens terapêuticas, trabalhos posteriores do nosso grupo, se focalizaram em expressar na superfície de células infectadas, moléculas CD4 insensíveis aos efeitos modulatórios das proteínas virais. Para isso, células 293T, assim como, diversas linhagens de células T e células mononucleares de sangue periférico (PBMC), foram transduzidas com vetores lentivirais, capazes de expressar moléculas recombinantes de CD4, sem a calda citoplasmática (CD4- Δ Cyt) ou fusionada com a proteína viral matriz em lugar da mesma (CD4-MA).

Dessa forma, virions produzidos a partir de células previamente transduzidas, apresentaram níveis de infectividade e replicação viral muito menor em relação aos vírus obtidos de células transduzidas com vetores lentivirais, expressando a molécula CD4 completa ou selvagem. No caso das células transduzidas com CD4- Δ Cyt, os níveis de infectividade das partículas virais foram atingindo níveis comparáveis aos obtidos a partir de células tratadas com a zidotimidina (AZT), em controle negativo (Pham *et al.*, 2004).

1.7.2.1 A modulação de CD4 mediada por Nef e sua influência no desenvolvimento da doença.

A proteína viral Nef é um dos principais fatores de patogênese descrito até o momento. Contudo, durante muito tempo não foi possível determinar quais das inúmeras funções seriam as responsáveis pelos efeitos patogênicos auferidos a esta proteína (Wei *et al.*, 2003). Assim, em primatas infectados com vírus carregando mutações no domínio relacionado à modulação de CD4, foi possível observar diminuição na viremia e capacidade de replicação “in vitro”, mas rapidamente observou-se reversão para forma selvagem da proteína (Iafrate *et al.*, 2000). Estes e outros estudos (Glushakova *et al.*, 2001; Lundquist *et al.*, 2002) mostraram a relação direta entre a modulação de CD4 e o aumento de infectividade, sugerindo fortemente uma ligação mecânica entre ambos os fenômenos. Posteriormente, Patel e colaboradores (2002) comparando isolados virais de primatas infectados em diferentes estágios da infecção, mostraram que variantes presentes no começo da infecção eram minimamente patogênicas e se replicavam pobremente, entretanto, as isoladas na fase tardia da infecção possuíam maiores índices de infectividade e capacidade replicativa. Interessantemente, as variantes tardias

apresentavam também maior capacidade de modular CD4 (Patel *et al.*, 2002).

Paralelamente, similares evidências foram obtidas em humanos, ao avaliar a capacidade de modulação das moléculas CD4 e CPH-I mediada pelos alelos de Nef, isolados na fase inicial e tardia da infecção. Desta forma, os alelos presentes na fase tardia ou terminal da doença apresentavam maior capacidade de modulação de CD4, maior infectividade e capacidade replicativa, que os presentes na fase inicial. Surpreendentemente, estes dados se inverteram quando foram analisados os efeitos moduladores do CPH-I (Carl *et al.*, 2001).

1.7.2.2 Importância de Vpu na patogênese do HIV-1.

A maioria dos estudos destinados a avaliar a influência de Vpu na patogênese “in vivo”, se focaliza na caracterização genética de alelos, presentes em isolados virais de pacientes assintomáticos e com AIDS. Estudos realizados por Zheng e colaboradores (2003) não revelaram deleções ou inserções importantes que possam ser correlacionadas com a falta de progressão à doença. Entretanto, há possibilidade, que sutis alterações possam afetar as funções de Vpu, como no caso de Vpr (Somasundaran *et al.*, 2002), ainda por ser investigada (Lum *et al.*, 2003).

Estudos “in vivo” mostraram uma forte associação entre a presença de uma seqüência intacta de Vpu, com um aumento na carga viral, perda de LT-CD4⁺ e imunocompetência (Li *et al.*, 1995; McCormick-Davis *et al.*, 1998; Stephens *et al.*, 2002). Já o desenvolvimento da síndrome parece acontecer se mutações compensatórias ocorrerem nos genes de *env* e *nef* (Singh *et al.*, 2001).

Como mencionado anteriormente, um outro fator extremamente importante na patogênese é a manutenção das duas serinas. Isto ficou claro ao se observar, que dos quatro primatas inoculados com uma variante de uma cepa quimérica (SHIV_{SS2, 56G}), só com uma serina, apenas um desenvolveu a síndrome. Análises da seqüência dos genes de *vpu*, presente neste macaco mostraram uma reversão da Gly56 para uma Ser.

Finalmente, é interessante destacar que um outro lentivírus estreitamente relacionado, o HIV-2, cuja principal diferença está no gene *vpu*, apresenta efeitos patogênicos muito menos severos.

2. Relevância da Pesquisa & Objetivos

2.1 Relevância da Pesquisa

Talvez um dos mais intrigantes fenômenos relacionados à AIDS, se deve ao fato, de uma pequena porcentagem de indivíduos infectados, poderem se manter livres dos sintomas característicos desta doença por períodos maiores que dez anos, tempo médio de desenvolvimento da AIDS. Por outro lado, estudos descritos anteriormente mostram claramente a relação entre a capacidade de diminuir a expressão do receptor viral e o nível de patogenicidade apresentado pelo HIV-1, o que sugere a participação deste fenômeno na falta de progressão à doença.

Neste contexto, e como objetivo geral deste trabalho, foi proposto a análise nas mesmas amostras utilizadas no estudo com a proteína Nef (Carl *et al.*, 2000; Arganaraz *et al.*, 2003), a busca da presença de possíveis variações na seqüência da proteína Vpu que possam, assim como no estudo realizado com a proteína Nef, explicar a maior capacidade modulatória de CD4, apresentada pelos isolados virais presentes na fase tardia da infecção pelo HIV-1.

2.2 Objetivo Geral.

Analisar as seqüências dos alelos do gene *vpu* presente em linfócitos de sangue periférico de pacientes HIV-1 positivos em diferentes estágios clínicos da infecção.

2.3 Objetivos Específicos.

1. Determinar a seqüência de nucleotídeos do pool de alelos de *vpu*, exon 1 de *rev* e da seqüência do peptídeo sinal de *env* presentes nas diferentes fases da infecção em pacientes HIV positivos.

2. Analisar a presença de mutações no pool de alelos de *vpu*, exon 1 de *rev* e da seqüência do peptídeo sinal de *env* presentes nas diferentes fases da infecção.

3. Realizar uma análise comparativa da freqüência e localização dos possíveis pontos de mutação e sua relação com a progressão à doença.

3. Materiais e Métodos

3.1 Material de Estudo.

Neste estudo, foram utilizadas amostras de células mononucleares de sangue periférico, “buff coat”, pertencentes a uma coorte de 12 pacientes infectados com o HIV-1, não submetidos a nenhum tratamento. Duas amostras por paciente, uma no estágio inicial e outra no estágio final da infecção foram coletadas. Os pacientes pertencentes a esta corte, foram monitorados durante o período de 1983 a 1996, no New England Comprehensive Hemophilia Center do UMass / Memorial Health Center, Worcester, Massachusetts. As amostras foram cedidas gentilmente pelo Dr. Frank Kirchhoff, da Universidade de Ulm, Alemanha. A coleta das amostras foi oportunamente aprovada pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos do UMass / Memorial Health Center.

As amostras de 12 pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) acompanhados no período de 1983 a 1996 no New England Comprehensive Hemophilia Center do UMass / Memorial Health Center, Worcester, Massachusetts, os quais, não foram submetidos à terapia anti-retroviral.

As diferentes amostras de cada paciente (P) foram classificadas como: iniciais e tardias, em base aos seguintes critérios: a) Contagem de linfócitos T CD4⁺ em sangue periférico; b) Percentual de células CD4⁺. Dessa forma, aquelas amostras com uma contagem de linfócitos acima de 400/mm³ e um percentual de células CD4⁺ maior que 20%, foram consideradas como amostras provenientes de estágios iniciais da infecção. Entretanto, aquelas com contagem de linfócitos T CD4⁺, inferiores a 200/mm³ e um percentual de células CD4⁺ inferior a 10%, foram consideradas como provenientes de estágios tardios da infecção pelo HIV-1, estágio este, caracterizado também pelo desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Esses pacientes foram acompanhados por um período de aproximadamente 10 anos na ausência de terapia anti-retroviral, (Tabela 2) (Kirchhoff *et al.*, 1999).

3.2 Extração de DNA genômico de células mononucleares de sangue periférico.

As 24 amostras de DNA genômico de sangue periférico correspondentes aos 12 pacientes, foram extraídos segundo o protocolo descrito por Kirchhoff e colaboradores (1999). Aproximadamente 150µl de células brancas “buff coat” ou creme leucocitário correspondente a cada amostra, foram submetidos à lise com acréscimo de 500µl de

tampão de extração (10mM Tris-HCl pH 8.0; 0.1M EDTA pH 8.0; 0.5% SDS e 100µg/ml de RNase). Posteriormente a mistura foi incubada à 37°C por 1h. Após a incubação, foram adicionados 200µg/ml de proteinase “K” e incubada à 56°C por 3h. Posteriormente, a solução foi centrifugada e separada o sobrenadante para um tubo novo, onde acrescentou se dois volumes de clorofane (25mL de fenol equilibrado, 24mL de clorofórmio e 1mL de álcool isoamílico), seguido de um volume de clorofil (24mL de clorofórmio, 1mL de álcool isoamílico). O DNA foi precipitado acrescentando-se dois volumes de acetato de amônio 10M; dois volumes de etanol absoluto e incubado à – 20°C durante a noite. Após esse procedimento o precipitado foi centrifugado a 12000g, lavado com 1ml de etanol 70% e eluído em 300µl de água bidestilada milli-Q e estocado à 4°C.

3.3 Quantificação das amostras de DNA e Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).

As amostras de DNA genômico foram quantificadas por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) comparando-as com um marcador de peso molecular de 100ng/µl, (Invitrogen Corporation) e também por espectrofotometria, para determinar o grau de pureza, as quais foram avaliadas em uma absorbância, que compreende os comprimentos de ondas entre 260nm e 280nm.

a) Amplificação do gene da β -globina.

No primeiro momento e com objetivo de determinar a qualidade das amostras de DNA para a realização da PCR, uma alíquota de cada amostra foi usada para amplificar o gene estrutural da β -globina. Dessa forma os 268 pb correspondentes ao gene da β -globina foram amplificados nas seguintes condições de PCR: 1,5 mM de CaCl₂, 250µM de cada um dos quatro deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs), 100nM de cada “primer” e uma unidade de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas life science). As reações de amplificação foram realizadas num termociclador (PTC 200 – Peltier Thermal Cycler MJ Research).

➤ “Primers” para amplificação do gene de β -globina (nº de acesso NM_000518) foram:

GH20 – 5`-GAA-GAG-CCA-AGG-ACA-GGT-AC-3`

PC04 – 3`-CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-TCA-CC-5`

➤ **Programa de PCR.**

94°C – 5 min

94°C – 30 seg	} 32 ciclos
58°C – 45 seg	
72°C – 40 seg	

72°C – 10 min

b) Amplificação dos alelos do gene *vpu*.

Os alelos de *vpu* foram amplificados usando a técnica de “nested PCR” (Singh *et al.*, 2001). Na primeira PCR foi usado um primeiro par de “primers” (111 / 114). Posteriormente, 1 μ l da reação foi utilizado para a realização da segunda PCR “nested PCR”, usando o par de “primers” (112 / 113). Os dois pares de “primers” utilizados foram desenhados a partir da seqüência do clone tipo selvagem (TS) NL4.3 pertencente ao subtipo B do HIV-1 (Singh *et al.*, 2001).

Os sítios de anelamento dos diferentes “primers” no genoma do HIV-1 NL4.3 assim como, o tamanho dos fragmentos de amplificação esperados são mostrados (Figura 8).

c) Condições da PCR:

Com objetivo de garantir que o pool dos alelos de *Vpu* amplificados seja representativo do pool presente em cada estágio da infecção, foram tomados os seguintes cuidados: a) o DNA genômico de células de sangue periférico, foi extraído sem passagem prévia das células mononucleares, por qualquer tipo de cultura “in vitro”; b) foi usada uma alta quantidade de DNA, 750 ng, o que garante a presença de

aproximadamente uma média de 130 integrações de DNA proviral por amostra (Connor *et al.*, 1995).

A 1ª PCR foi realizada nas seguintes condições: 1.5 mM de CaCl₂; 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato; 100nM de cada oligonucleotídeo e uma unidade (0.2µl) de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas).

➤ “primers” para amplificação dos alelos de *Vpu* (Singh *et al.*, 2001).

111 - 5'-CCT-AGA-CTA-GAG-CCC-TGG-AAG-CAT-CC-3'

114 - 3'-ATG-CTA-AAG-CAT-ATG-ATA-CAG-AGG-TAC-5'

112 - 5'-TTA-GGC-ATC-TCC-TAT-GGC-AGG-AAG-AAG-3'

113 - 3'-AGG-AAG-CAA-CCA-CCA-CTC-TAT-TTT-GTG- 5'

➤ Programa de PCR:

94°C – 5 min

94°C – 45 seg

65°C – 1 min

72°C – 1 min

72°C – 10 min

} 35 ciclos

1 µl da 1ª PCR foi utilizado para a realização da 2ª PCR (Nested), nas mesmas condições, com objetivo de aumentar o número de cópias da região em estudo e garantir a especificidade dos fragmentos amplificados.

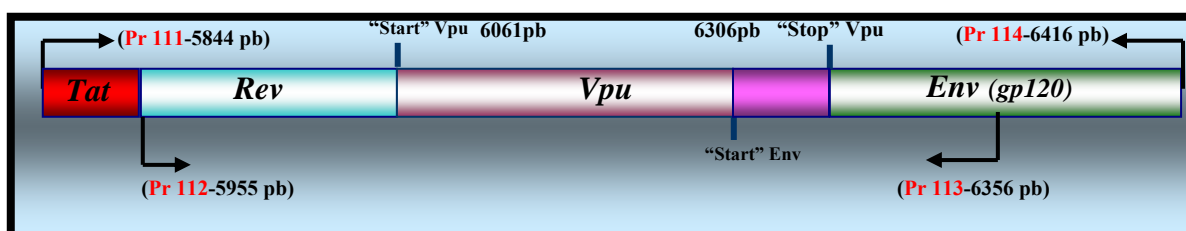


Figura 8. Representação esquemática da abordagem de PCR para amplificação dos alelos de *vpu*, do exon 1 de *rev* e do peptídeo sinal da proteína Env.

3.4 Ligação e Clonagem.

Os fragmentos amplificados, com aproximadamente 428pb, foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a amplificação dos diferentes produtos de PCR, 5µl de cada reação foram usados para a

ligação no vetor. Posteriormente, 5 µl do volume de ligação foram usados para transformar 70µl de bactérias *E. coli* (DH5α) competentes, como descrito em Kirchoff e colaboradores (1999). Brevemente, após incubação no gelo por 30 min, a reação de transformação foi submetida a um choque térmico por 2 min a 42°C, seguido de incubação a 0°C por 2 min. Posteriormente, as bactérias transformadas foram ressuspensas em 950µl de meio LB (Gibco) e incubadas a 37°C por 1h sob agitação a 225 rpm. Finalmente, as bactérias contendo os clones recombinantes foram plaqueadas em meio LB-ágar (1,5% de ágar bacteriológico, suplementado com 100 µg/ml de ampicilina e 50 µg/ml de x-gal) e incubadas à 37°C durante toda noite.

3.5 Obtenção de DNA plasmidial e análise dos recombinantes.

As bactérias contendo os vetores recombinantes, colônias brancas, foram palitadas e incubadas em aproximadamente 7ml meio LB líquido, suplementado com 100 µg/ml de ampicilina e incubadas a 37°C durante toda noite. Posteriormente, as amostras incubadas foram centrifugadas a 2250g por 6 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspense em 100µl de solução I de lise alcalina gelada (50mM de glucose, 25mM de tris-cl pH 8.0 e 10mM de EDTA pH 8.0). Após forte agitação (vortex), adicionou-se 200µl de solução de lise alcalina II (0,2 N NaOH e 1% de SDS) preparada no momento do experimento (à fresco), misturando-se os tubos suavemente por inversão, posteriormente, acrescentou-se 150µl de solução de lise alcalina III (60ml de acetato de potássio 5M e 11,5ml de ácido acético) e novamente inverteram-se os tubos várias vezes e incubou-se no gelo por 5 min. Após esse procedimento o lisado foi centrifugado a 20.000 g a 4°C por 5 min e o sobrenadante transferido para um tubo novo devidamente identificado. O DNA plasmidial foi precipitado pelo acréscimo de um volume de etanol absoluto gelado e centrifugado por 15 min a 4°C, após esse procedimento o sobrenadante foi descartado e acrescido de 1 ml de etanol 70% gelado, centrifugou-se novamente a 20.000 g a 4°C por 2 min. Esse DNA foi então ressuspense em 40µl de água mili-Q e estocado a -20°C.

Após extração do DNA plasmidial, a presença do inserto foi confirmada por digestão com a enzima de restrição *Eco* RI e por PCR usando os “primers” (112 / 113) (dados não mostrados).

3.6 Sequenciamento.

Os clones recombinantes identificados foram seqüenciados em ambas as direções. A realização das PCR com os diferentes fluorocromos foram realizadas segundo o protocolo DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit. Brevemente, usou-se 100ng/ μ l de DNA plasmidial, 1pmol de oligonucleotídeo Sp6 no sentido “forward e reverse” e 1,5 μ l de “premix” (marcado com fluorocromo). Após amplificação, os produtos da PCR foram purificados e posteriormente seqüenciados. Para cada 10 μ l de reação acrescentou-se 1 μ l de acetato de sódio/EDTA (3M pH 4,6), 20 μ l de etanol absoluto (temperatura ambiente) e se deixou por 20 min em repouso, posteriormente centrifugou-se a 1500x g por 40 min, após esse procedimento o sobrenadante foi descartado por inversão e acrescido de 150 μ l de etanol 70%, centrifugou-se novamente à 1500x g, desprezando-se o sobrenadante e deixando secar o precipitado por 1h. Finalmente, as amostras foram ressuspensas em 4 μ l de tampão de carga e corridas em gel de poliacrilamida usando-se o seqüenciador ABI (Amersham Biosciences) 377.

3.7 Análises de homologia e estudo estatístico.

A qualidade das seqüências obtidas, "phred" acima de 20%, foi verificada pela análise dos eletroferogramas correspondentes ao programa de sequenciamento. As homologias das seqüências de nucleotídeos foram determinadas pelo programa BLAST (Basic Local Aligment Search Toll) (Altschul *et al.*, 1990), onde as mesmas foram alinhadas com as seqüências do HIV-1 disponíveis no banco genômico dos Los Alamos (HIV, 2005). Posteriormente, procedeu-se à tradução dos nucleotídeos com o programa transeq (European, 2005). O alinhamento das seqüências em ambas as direções, foi realizado pelo programa "software" clustalw (Clustalw, 2005) e otimizado pela inspeção visual. As seqüências de aminoácidos de um dos consensos do subtipo B do HIV-1, a cepa NL4.3 (Altschul *et al.*, 1990), subtipo viral presente no norte da América, local de origem das amostras, foi utilizada como referência para que se definisse a presença de mutações nos clones seqüenciados.

A análise estatística das variações nas seqüências dos alelos em estudo foi realizada pelo teste “t” pareado. Para o cálculo deste teste, foi usada a ferramenta “GraphPad Prism”, disponível on line no site (Graphpad, 2006), acesso em 15/01/2006, e as seqüências consenso dos diferentes clones de cada pacientes, foram geradas a

partir da utilização do programa on line bioedit (Bioedit, 2006), acesso em 15,18 e 20/01/2006; e 20/02/2006).

3.8 Gráfico de regressão

Com objetivo de verificar a existência de uma possível correlação entre as mutações encontradas nas diferentes regiões analisadas e os níveis de LT-CD4 presentes nos diferentes estágios da infecção, foi realizado um gráfico de regressão. Primeiramente foi obtido um escore para cada paciente e estágio, baseando-se na similaridade entre as mutações apresentadas pela seqüência consenso de cada paciente em cada estágio, com as seqüências consenso correspondente aos estágios inicial e final da infecção. Dessa forma, para um dado paciente e estágio, exemplo P1 inicial, a presença de mutações idênticas na seqüência consenso do estágio inicial receberam um valor negativo, no entanto, aquelas mutações idênticas na seqüência consenso correspondente ao estágio tardio receberam um valor positivo, sendo que, os valores do escore para cada paciente e cada estágio, foram obtidos a partir da somatória de ambos os valores.

Finalmente, a partir dos valores do escore e os correspondentes aos níveis de LT-CD4 para cada paciente e estágio, foi criado um gráfico de regressão usando-se o programa Microsoft Excel.

4. Resultados

Tabela 2. Dados laboratoriais das amostras de pacientes infectados pelo HIV-1 – banco de sangue New England Comprehensive Hemophilia Center do UMass / Memorial Health Center, Worcester, Massachusetts (Kirchhoff *et al.*, 1999).

Código	Data da Coleta <i>(Estágio inicial e tardio).</i>	Idade <i>(ano)</i>	Contagem de CD4⁺ (Nº. /mm³)	% de Linfócitos
P1	11/02/1983	24	451	27
	15/10/1992	33	15	05
P2	12/12/1984	12	616	27
	27/11/1996	24	39	04
P3	16/05/1984	6	1622	53
	28/04/1993	14	66	06
P4	30/05/1984	27	657	36
	26/09/1990	33	59	03
	11/09/1983	11	616	25
P5	24/01/1985	22	11	01
P6	24/01/1985	22	771	27
	07/11/1990	27	89	02
P7	15/12/1982	8	1000	48
	27/01/1993	18	07	01
P8	12/12/1984	16	1017	23
	18/05/1988	19	15	01
P9	13/02/1985	9	598	16
	12/06/1995	20	11	02
P10	21/09/1983	43	526	26
	14/06/1989	49	12	01
P11	19/12/1984	45	636	37
	14/01/1998	58	95	09
	11/07/1984	3	1021	40
P12	17/09/1996	14	09	01

4.2 Amplificação do gene da β -globina em amostras de DNA de sangue periférico de pacientes HIV-1 positivos.

Com objetivo de testar a qualidade das amostras de DNA genômico, obtidas de células mononucleares de sangue periférico de pacientes HIV-1 positivo, para posterior realização da PCR, foi amplificado o gene de β -globina (Figura 9), usando oligonucleotídeos específicos. Dessa forma, foi possível amplificar em todas as amostras um fragmento de 268 pb, correspondente ao tamanho esperado (nº de acesso NM_000518 - genebank), confirmando assim, a qualidade das amostras, para que posteriormente fosse feita a amplificação dos diferentes alelos do gene *vpu*.

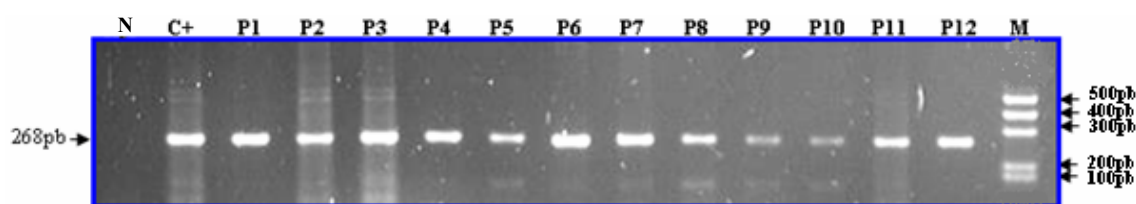


Figura 9. Amplificação do gene da β -globina dos pacientes infectados pelo HIV-1. N, controle negativo (água); C+, controle positivo 100ng de DNA genômico humano de paciente não infectado; P1-P12, 100ng de DNA genômico de células mononucleares de sangue periférico de pacientes HIV positivo; M, marcador de peso molecular, 1 Kb ladder.

4.3 Amplificação dos alelos de *vpu* presentes em células de sangue periférico em diferentes estágios da infecção.

Posteriormente, o pool de alelos de *vpu* dos 12 pacientes HIV-1 positivo, integrados no genoma das células mononucleares de sangue periférico presentes nas fases iniciais e tardias da infecção, foi amplificado mediante uma “nested” PCR, como descrito em materiais e métodos.

Após a realização da segunda PCR, foram gerados fragmentos de aproximadamente 428 pb correspondentes ao gene de *vpu* e suas regiões franqueadoras, contendo o exon 1 do gene *rev* e os primeiros 55 aminoácidos, que inclui o peptídeo sinal codificado por Env (Figura 10 e 11).

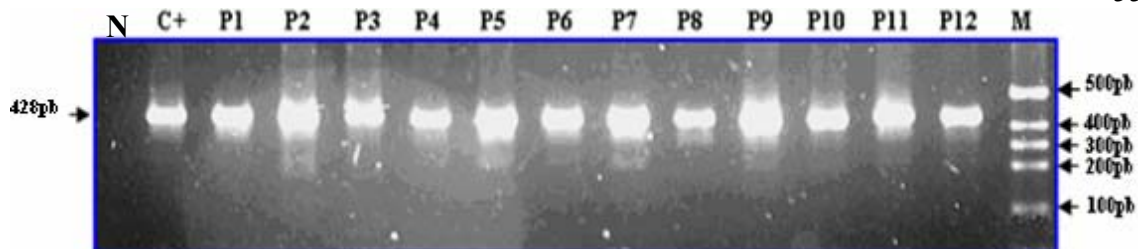


Figura 10. Amplificação do pool de alelos de *vpu* presentes nos estágios iniciais da infecção de pacientes HIV positivos. N, controle negativo (750 ng de DNA genômico de células de sangue periférico de paciente não infectado com HIV-1); C+, controle positivo (750 ng de DNA genômico de células de sangue periférico de paciente infectado com HIV-1); P1-P12, amplificação dos alelos de Vpu a partir de 750 ng de DNA genômico de células de sangue periférico de pacientes no estágio inicial da infecção; M, marcador de peso molecular 1 Kb ladder plus.

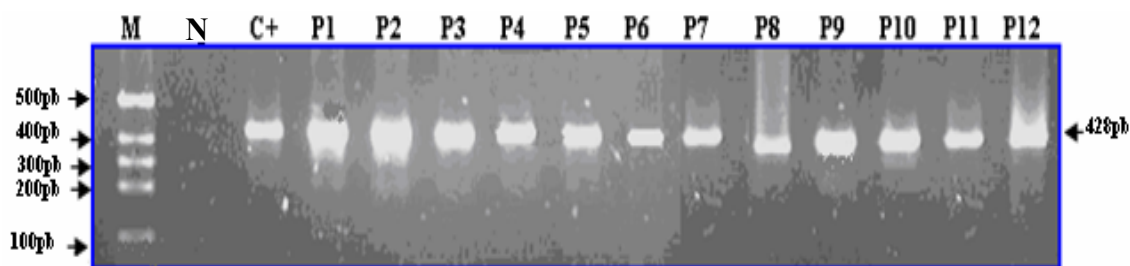


Figura 11. Amplificação do pool de alelos de *vpu* presente nos estágios tardios da infecção de pacientes HIV positivos. N, controle negativo (750 ng de DNA genômico de células de sangue periférico de paciente não infectado com HIV-1); C+, controle positivo (750 ng de DNA genômico de células de sangue periférico de paciente infectado com HIV-1); P1-P12, amplificação de alelos de Vpu a partir de 750 ng de DNA genômico de células de sangue periférico dos pacientes no estágio tardio da infecção; M, marcador de peso molecular 1 Kb ladder plus.

4.4 Análise mutacional de alelos do gene *vpu*, presentes nos estágios iniciais e tardios da infecção em pacientes HIV positivos.

Dez clones recombinantes correspondentes a cada paciente e cada estágio da infecção (inicial e tardio), foram seqüenciados em ambas as direções e suas seqüências de nucleotídeos (Apêndice 1) foram usadas para análise de homologia em banco de dados (BLAST- Basic Local Alignment Search Tool e Los Alamos (Altschul *et al.*, 1990), confirmando a origem viral das amostras amplificadas. Posteriormente, as seqüências de nucleotídeos correspondentes aos alelos dos genes *vpu*, foram transformadas para seqüência de aminoácidos e em seguida, as diferentes seqüências de aminoácidos, foram comparadas e alinhadas com a seqüência do vírus selvagem NL4.3 do subtipo B (Singh *et al.*, 2001).

Na primeira análise, e como mostrado nas figuras 12 e 13, o total das mutações encontradas nos 10 clones seqüenciados correspondentes a cada paciente e cada estágio, em relação ao tipo selvagem (TS) NL4.3, independentemente de sua freqüência foram consideradas.

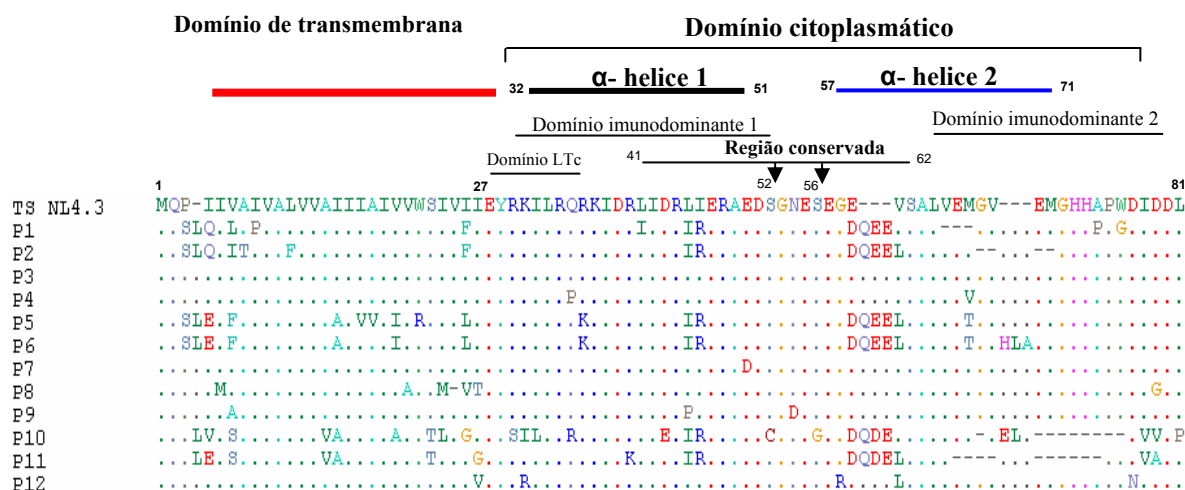


Figura 12. Alinhamento das seqüências dos alelos de *vpu* de cada paciente no estágio inicial da infecção, em relação à seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1 subtipo “B”. Os pontos indicam similaridade na seqüência de aminoácidos e as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido e as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço. Os domínios de transmembrana, citoplasmático e as duas alfas hélices encontram-se representados. As setas indicam as serinas que são fosforiladas pela caseína cinase II celular (Gomez *et al.*, 2005). O domínio conservado envolvido na degradação proteossômica de CD4 assim como, os domínios imunodominantes um e dois, reconhecido por LTc, encontram-se baseados na figura.

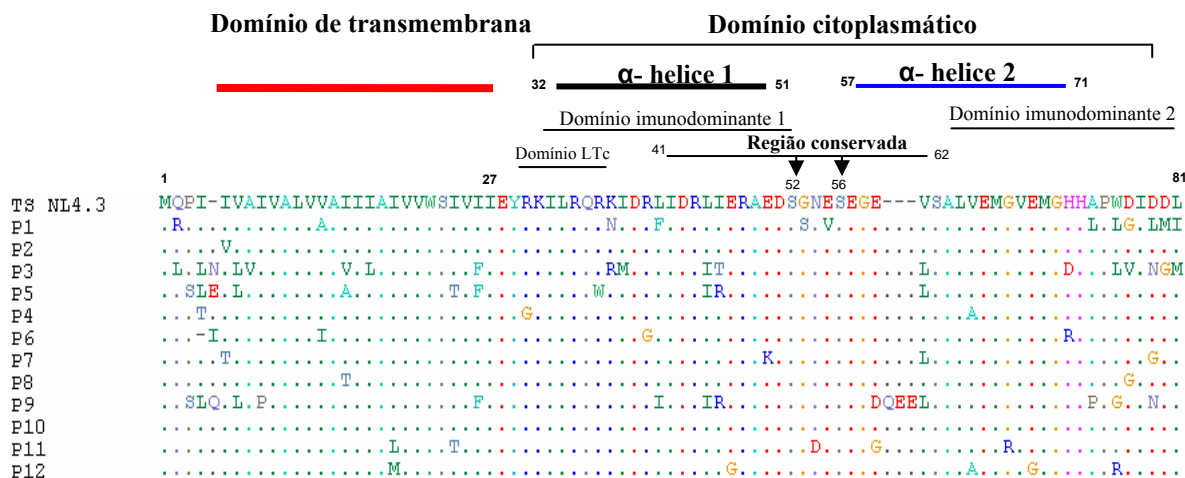


Figura 13. Alinhamento das seqüências dos alelos de *vpu* de cada paciente no estágio tardio da infecção, em relação à seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1 subtipo “B”. Os pontos indicam similaridade na seqüência de aminoácidos e as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido e as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço. Os domínios de transmembrana, citoplasmático e as duas alfas hélices encontram-se representados. As setas indicam as serinas que são fosforiladas pela caseína cinase II celular (Gomez *et al.*, 2005). O domínio conservado envolvido na degradação proteossômica de CD4 assim como, os domínios imunodominantes um e dois, reconhecido por LTc, encontram-se baseados na figura.

Tabela 4. Frequência das mutações e valor de “p” (teste t) encontrado nos alelos de *vpu*, presente no estágio inicial e tardio da infecção pelo HIV-1.

<i>Mutações</i>	<i>Estágio inicial</i>	<i>Estágio tardio</i>	Valor de “P”
P3S	120 (18,33%)	120 (0%)	$p = 0,041$
-L	120 (37,50%)	120 (0%)	$p = 0,006$
I4Q	120 (14,16%)	120 (0%)	$p = 0,079$
V6L	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
I8P	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
I26F	120 (14,16%)	120 (0%)	$p = 0,079$
L41I	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
L45I	120 (39,16%)	120 (0%)	$p = 0,005$
I46R	120 (39,16%)	120 (0%)	$p = 0,005$
E59D	120 (37,50%)	120 (0%)	$p = 0,006$
-QEE	120 (37,50%)	120 (0%)	$p = 0,006$
A74P	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
W76G	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
V6I	120 (5,83%)	120 (0%)	$p = 0,164$
A7T	120 (5,83%)	120 (0%)	$p = 0,164$
V60L	120 (12,50%)	120 (0%)	$p = 0,076$
I4E	120 (12,50%)	120 (0%)	$p = 0,076$
V6F	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
I15A	120 (25,00%)	120 (0%)	$p = 0,034$
V20I	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
I26L	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$

Tabela 4 continuação. Frequência das mutações e valor de “p” (teste t) encontrado nos alelos de *vpu*, presente no estágio inicial e tardio da infecção.

<i>Mutações</i>	<i>Estágio inicial</i>	<i>Estágio tardio</i>	Valor de “P”
R36K	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
M66T	120 (23,33%)	120 (0%)	$p = \mathbf{0,035}$
E50D	120 (5,83%)	120 (0%)	$p = 0,164$
-V	120 (5,83%)	120 (0%)	$p = 0,164$
I4V	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
V6S	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
A14V	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
S23T	120 (16,66%)	120 (0%)	$p = \mathbf{0,076}$
I24L	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
I26G	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
R29S	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
M69L	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
I78V	120 (16,66%)	120 (0%)	$p = \mathbf{0,076}$
D79V	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
I27G	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$
D79A	120 (8,33%)	120 (0%)	$p = 0,164$

4.5 Análise da correlação entre as mutações presentes nos alelos de *vpu* e os diferentes estágios clínicos da infecção pelo HIV-1.

Como explicado em materiais e métodos, e com objetivo de verificar possível correlação entre as mutações presentes em cada estágio e os níveis de LT-CD4⁺ detectados em sangue periférico, foi primeiramente criado um escore baseado na similaridade entre as mutações apresentadas pela seqüência consenso de cada paciente com as seqüências consenso de cada estágio. Dessa forma, para um dado paciente e estágio, exemplo P1 inicial, a presença de mutações idênticas, presente na seqüência consenso do estágio inicial recebeu um valor negativo, no entanto, aquelas idênticas presentes na seqüência consenso correspondente ao estágio tardio receberam um valor positivo, sendo que, os valores do escore para cada paciente e cada estágio, foram obtidos a partir da somatória de ambos os valores.

Finalmente, a partir dos valores do escore e os correspondentes aos níveis de LT-CD4 para cada paciente e estágio, foi criado um gráfico de regressão (Figura 16).

Dessa forma, e com base no gráfico, foi possível observar uma forte correlação negativa (-0,84) entre o número de células CD4⁺ e o valor do escore para cada paciente e estágio, ou seja, quanto maior o número do escore, menor é o número LT-CD4⁺. O valor de p, que indica a correlação, foi extremamente baixo (< 0,0001), indicando que este resultado é altamente significativo, além de possuir um alto valor para r², o que indica que o escore se aplica a mais de 71% do número de CD4 nos indivíduos estudados.

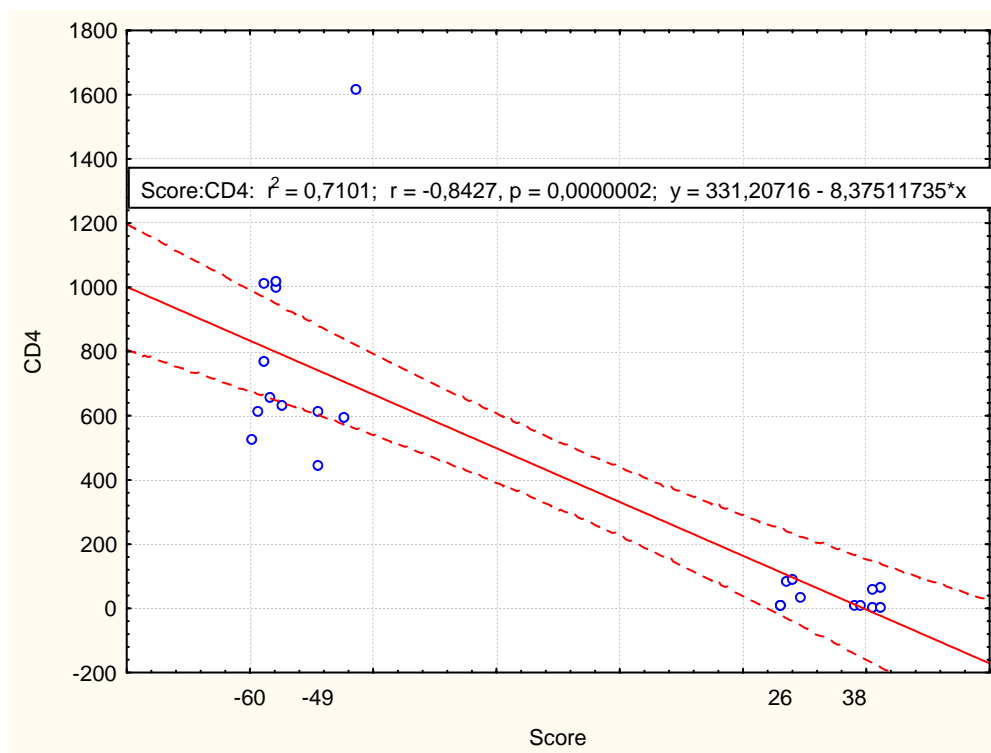


Figura 16. Correlação entre os escores das seqüências dos diferentes estágios e a contagem de células CD4⁺ nos 12 pacientes. O círculo representa o número de células CD4 e o escore correspondente. O coeficiente de correlação (r), o coeficiente de determinação (r^2), e a significância do teste (p), baseado no gráfico, são descritos no texto.

4.6 Análise mutacional de alelos do exon 1 do gene *rev*, presentes nos estágios iniciais e tardios da infecção em pacientes HIV positivos.

Baseado na amplificação do exon 1 do gene *rev* como parte da seqüência flanqueadora 5', amplificada por nossa abordagem de PCR, foi realizada a análise mutacional da seqüência de aminoácidos, dos alelos desta região, presente no genoma das células de sangue periférico dos pacientes HIV-1 positivos.

O total das mutações presentes nos 10 clones seqüenciados correspondentes a cada paciente em cada estágio, foram alinhadas em relação ao tipo selvagem (TS) NL4.3, independentemente de sua freqüência, Figura 17 e 18.

TS	NL4.3	MAGRSGDSDEEELI RTVRLIKLL YQS
P1	LK...V..F.....
P2	
P3	T.....
P4	LK...F.....
P5	D.LK...F.....
P6	GD.LK.....
P7	LK.....P.
P8	G.....C.
P9	G.....
P10	R.....LT.A...F.....
P11	Q.LK...F.....
P12	R.....LT...F.....

Figura 17. Alinhamento das seqüências dos alelos do exon 1 de *rev* de cada paciente no estágio inicial da infecção, em relação à seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1 subtipo “B”. Os pontos indicam similaridade na seqüência de aminoácidos e as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido. A barra em preto acima da seqüência tipo selvagem indica a região imunodominante para LTc e a barra em cinza indica a região de maior importância no primeiro domínio de multimerização (Ramakrishnan *et al.*, 2005).

TS	NL4.3	MAGRSGDSDEEELI RTVRLIKLL YQS
P1	K.....
P2	
P3	D.LK...F..F.....
P4	K...P..G
P5	D.LK.....
P6	PT.....
P7	T.....
P8	
P9	T.....
P10	A.....
P11	G.T...R.
P12	

Figura 18. Mutações presentes nas seqüências dos alelos do exon 1 de *rev* de cada paciente no estágio tardio da infecção, em relação à seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1 subtipo “B”. Os pontos indicam similaridade na seqüência de aminoácidos e as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido. A barra em preto acima da seqüência tipo selvagem indica a região imunodominante para LTc e a barra em cinza indica a região de maior importância no primeiro domínio de multimerização (Ramakrishnan *et al.*, 2005).

Da mesma maneira, que as seqüências dos alelos de *vpu* foram analisadas, foi deduzida uma seqüência consenso para cada paciente em cada estágio, colocando-se apenas as mutações mais freqüentes, (>50%). Dessa forma e após alinhamento das diferentes seqüências consenso em relação à seqüência do tipo selvagem foi possível detectar sete mutações, sendo seis mutações no estágio inicial (S5R, E11D, I13L, R14K, L18V e L21F) (Figura 19 e tabela 5) e uma mutação no estágio tardio (I19T). (Figura 20 e tabela 6), Entretanto, apenas três mutações apresentaram diferenças estatisticamente significativas com valor de “p” < 0,05 (I13L, R14K, L21F), (Tabela 7).

TS	NL4.3	MAGRSGDSDEEELIRTVRLIKLLYQS
P1	ConsensoLK...V..F.....
P2	ConsensoL.....V.....F.....
P3	ConsensoL.....V.....F.....
P4	ConsensoL.....V.....F.....
P5	ConsensoD.LK.....F.....
P6	ConsensoL.....V.....F.....
P7	ConsensoL.....V.....F.....
P8	ConsensoL.....V.....F.....
P9	ConsensoL.....V.....F.....
P10	ConsensoR.....LT.....F.....
P11	ConsensoL.....V.....F.....
P12	ConsensoR.....LT.....F.....
P1-P12	ConsensoLK.....V.....F.....

Figura 19. Alinhamento das seqüências consenso dos alelos do exon 1 de *rev* presente no estágio inicial da infecção, com relação à seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1. As seqüências consensos dos alelos de cada paciente foram obtidas a partir das mutações mais freqüentes (>50%) presentes nos 10 clones seqüenciados quando comparadas com a seqüência do TS, da mesma forma, foram obtidas a seqüência consenso correspondente aos alelos dos 12 pacientes no estágio inicial da infecção. Os pontos indicam similaridade na seqüência de aminoácidos, as mutações, estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido. A barra em preto acima da seqüência tipo selvagem indica a região imunodominante para LTc e a barra em cinza indica a região de maior importância no primeiro domínio de multimerização (Ramakrishnan *et al.*, 2005).

TS	NL4.3	MAGRSGDSDEEELIRTVRLIKLLYQS
P1	ConsensoL.....V.....F.....
P2	ConsensoL.....V.....F.....
P3	ConsensoL.....V.....F.....
P4	ConsensoL.....V.....F.....
P5	ConsensoL.....V.....F.....
P6	ConsensoL.....V.....F.....
P7	ConsensoT.....
P8	ConsensoL.....V.....F.....
P9	ConsensoL.....V.....F.....
P10	ConsensoL.....V.....F.....
P11	ConsensoL.....V.....F.....
P12	ConsensoL.....V.....F.....
P1-P12	ConsensoL.....V.....F.....

Figura 20. Alinhamento das seqüências consenso dos alelos do exon 1 de *rev*, com relação à seqüência tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1, presente no estágio final da infecção. As seqüências consensos dos alelos de cada paciente foram obtidas a partir das mutações mais freqüentes (>50%) presentes nos 10 clones seqüenciados quando comparadas com a seqüência do TS, da mesma forma, foram obtidas a seqüência consenso correspondente aos alelos dos 12 pacientes no estágio tardio da infecção. Os pontos indicam similaridade na seqüência de aminoácidos, e as mutações, estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido. A barra em preto acima da seqüência do tipo selvagem indica a região imunodominante para LTc e a barra em cinza indica a região de maior importância no primeiro domínio de multimerização (Ramakrishnan *et al.*, 2005).

Tabela 5. Frequência das mutações encontradas no exon 1 de *rev*, presente no estágio inicial da infecção pelo HIV-1.

Estágio inicial	S5R	E11D	I13L	R14K	L18V	L21F	I19T
P1	-	-	100%	100%	100%	100%	-
P2	-	-	-	-	-	-	-
P3	-	-	-	-	-	-	-
P4	-	-	50%	60%	-	50%	-
P5	-	60%	60%	50%	-	50%	-
P6	-	-	-	-	-	-	-
P7	-	-	-	-	-	-	-
P8	-	-	-	-	-	-	-
P9	-	-	-	-	-	-	-
P10	100%	-	100%	100%	-	100%	-
P11	-	-	-	-	-	-	-
P12	90%	-	90%	90%	-	90%	-

Tabela 6. Frequência das mutações encontradas no exon 1 de *rev*, presente no estágio tardio da infecção pelo HIV-1.

Estágio tardio	S5R	E11D	I13L	R14K	L18V	L21F	I19T
P1	-	-	-	-	-	-	-
P2	-	-	-	-	-	-	-
P3	-	-	-	-	-	-	-
P4	-	-	-	-	-	-	-
P5	-	-	-	-	-	-	-
P6	-	-	-	-	-	-	-
P7	-	-	-	-	-	-	50%
P8	-	-	-	-	-	-	-
P9	-	-	-	-	-	-	-
P10	-	-	-	-	-	-	-
P11	-	-	-	-	-	-	-
P12	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 7. Freqüência das mutações e valor de “p” (teste t) encontrados no exon 1 de rev, presente no estágio inicial e tardio da infecção pelo HIV-1.

<i>Mutações</i>	<i>Estágio inicial</i>	<i>Estágio tardio</i>	Valor de “P”
S5R	120 (16,66%)	120 (0%)	$p=0,076$
E11D	120 (5%)	120 (0%)	$p=0,164$
I13L	120 (33,33%)	120 (0%)	$p=0,007$
R14K	120 (33,33%)	120 (0%)	$p=0,006$
L18V	120 (8,33)	120 (0%)	$p=0,164$
L21F	120 (32,5%)	120 (0%)	$p=0,007$
I19T	120 (0%)	120 (4,16%)	$p=0,164$

4.7 Análise da relação entre as variações da seqüência de Rev e os níveis de LT-CD4⁺.

Assim como na análise realizada para Vpu, foi definida uma seqüência consenso para cada estágio (inicial e tardio). A partir destas seqüências consenso, foi determinado um escore referente às mutações encontradas em cada paciente e em cada estágio, o qual foi baseado na similaridade mutacional da seqüência consenso dos diferentes estágios. Dessa forma, pacientes que apresentaram mutações na seqüência consenso do estágio inicial receberam um valor negativo, e aqueles que apresentaram mutações na seqüência consenso correspondente ao estágio tardio receberam um valor positivo, sendo que, os valores do escore para cada paciente e cada estágio, foram obtidos a partir da somatória de ambas as mutações presentes, criando-se um gráfico de regressão com os valores do escore para cada paciente e cada estágio e os correspondentes níveis de CD4 (Figura 21).

Dessa forma, com base na figura (21), foi possível observar forte correlação negativa (-0,82) entre o número de células CD4⁺ e o escore correspondente, mostrando que, quanto maior o número do escore, menor será o número das células CD4⁺. O valor de “p” foi extremamente baixo ($< 0,0001$), indicando que este resultado é altamente significativo, além de possuir um alto valor para r^2 , o que indica que o escore se aplica a mais de 68% do número de CD4 nos indivíduos estudados.

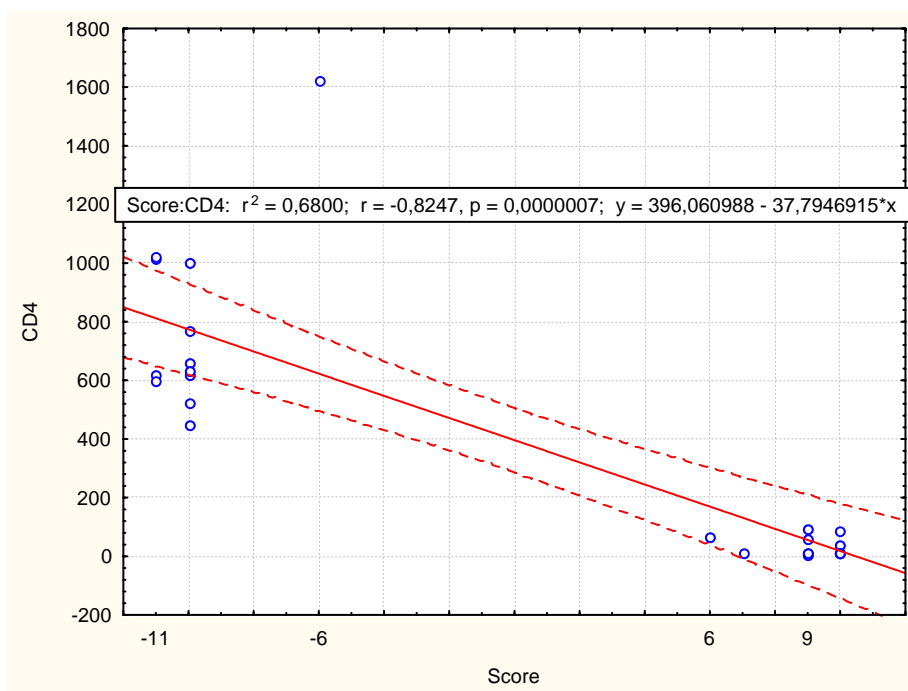


Figura 21. Correlação entre os escores das seqüências dos diferentes estágios e a contagem de células CD4⁺ nos 12 pacientes. O círculo representa o número de células CD4 e o escore referente às mutações entre os diferentes estágios nos alelos de gene *rev*. O coeficiente de correlação (r), o coeficiente de determinação (r^2), e a significância do teste (p), baseado no gráfico, são descritos no texto.

Adicionalmente, foi descrito nos primeiros 33 nucleotídeos do exon 1 do gene *rev* uma seqüência altamente conservada, denominada de GAR-ESE, a qual estaria relacionada ao aumento do “splicing” dos RNAs virais mediados pela proteína Rev (Caputi *et al.*, 2004). Baseado nesta informação, as seqüências correspondentes a este aumentador de “splicing” presentes nos alelos iniciais e tardios de diferentes pacientes foram analisadas com o intuito de verificar a presença de possíveis alterações nesta região e que possam vir a se correlacionar com os diferentes estágios clínicos da doença. Após alinhamento e comparação com a seqüência do tipo selvagem correspondente ao NL4.3, não foi possível detectar nenhuma mutação relevante, mostrando que esta região é altamente conservada, o que vem a confirmar a alta conservação desta região nas diferentes cepas do HIV-1 (Caputi *et al.*, 2004); (dados não mostrados).

4.8 Análise mutacional de alelos dos primeiros 55 aminoácidos do gene *env*, presentes nos estágios iniciais e tardios da infecção em pacientes HIV positivos.

Como consequência da nossa abordagem de PCR, 165 nucleotídeos localizados no extremo 3' do gene *vpu*, correspondente aos primeiros 55 aminoácidos da glicoproteína de superfície do HIV-1, a gp120, foram amplificados. Dentro desta região localiza-se a sequência do peptídeo sinal representado pelos primeiros 30 aminoácidos.

Dessa forma, o total das mutações presentes nos 10 clones seqüenciados correspondentes a cada paciente e cada estágio, foram alinhadas em relação ao tipo selvagem (TS) NL4.3, independentemente de sua frequência, Figura 22 e 23.



Figura 22. Alinhamento das seqüências dos alelos correspondentes aos primeiros 55 aminoácidos da proteína Env de cada paciente no estágio inicial da infecção, em relação à seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1. Os pontos indicam similaridade na seqüência de aminoácidos e as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido e as inserções ou deleções encontram-se indicadas com um traço. A barra preta indica o peptídeo sinal da proteína Env e a seta indica o local de clivagem por uma peptidase celular (Li *et al.*, 2000).

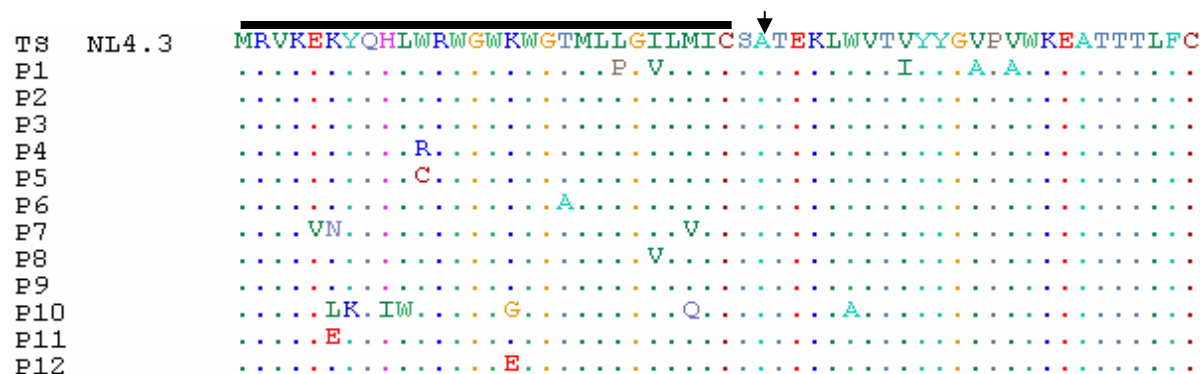


Figura 23. Alinhamento das seqüências dos alelos correspondentes aos primeiros 55 aminoácidos da proteína Env de cada paciente no estágio tardio da infecção, em relação à seqüência do tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1. Os pontos indicam similaridade na seqüência de aminoácidos e as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido. A barra em preto acima da seqüência do tipo selvagem indica o peptídeo sinal e a seta indica o local de clivagem por uma peptidase celular (Li *et al.*, 2000).

Após alinhamento e comparação de todas as seqüências, foi deduzida uma seqüência consenso para cada paciente em cada estágio, colocando-se apenas as mutações mais freqüentes, (>50%). Dessa forma, após alinhamento das diferentes seqüências consenso em relação à seqüência do tipo selvagem, foi possível detectar seis mutações por inserção no estágio inicial da infecção (IRKN, IRRNC, IKKNC, IRMSC, IRKNC e TLL) (Figura 24 e Tabela 8) e uma mutação por substituição (K16E) (Figura 25 e Tabela 9) no estágio tardio da infecção. No entanto, estas mutações não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, tendo um valor de “p” >0,05 (Tabela 10).

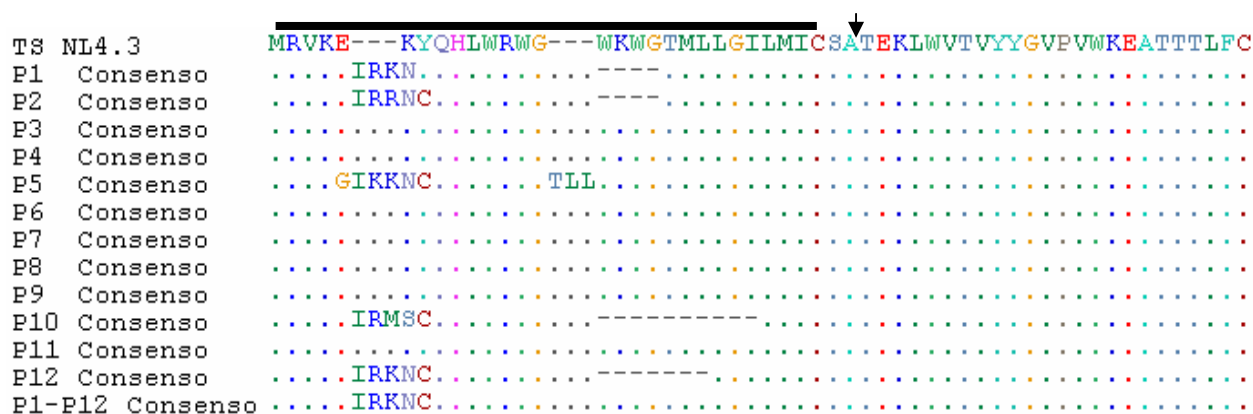


Figura 24. Alinhamento das seqüências consenso dos alelos correspondentes aos 55 primeiros aminoácidos da proteína Env, presente no estágio inicial da infecção, com relação à seqüência tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1. As seqüências consensos dos alelos de cada paciente foram obtidas a partir das mutações mais freqüentes (>50%) presentes nos 10 clones seqüenciados quando comparadas com a seqüência do TS, da mesma forma, foram obtidas a seqüência consenso correspondente aos alelos dos 12 pacientes no estágio tardio da infecção. Os pontos indicam similaridade na seqüência de aminoácidos, e as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido. A barra em preto acima da seqüência do tipo selvagem indica o peptídeo sinal e a seta indica o local de clivagem por uma peptidase celular (Li *et al.*, 2000).



Figura 25. Alinhamento das seqüências consenso dos alelos correspondentes aos 55 primeiros aminoácidos da proteína Env, presentes no estágio tardio da infecção com relação à seqüência tipo selvagem (TS) NL4.3 do HIV-1. As seqüências consensos dos alelos de cada paciente foram obtidas a partir das mutações mais freqüentes (>50%) presentes nos 10 clones seqüenciados quando comparadas com a seqüência do TS, da mesma forma, foram obtidas a seqüência consenso correspondente aos alelos dos 12 pacientes no estágio tardio da infecção. Os pontos indicam similaridade na seqüência de aminoácidos, e as mutações estão indicadas com a letra correspondente ao aminoácido. A barra em preto acima da seqüência do tipo selvagem indica o peptídeo sinal e a seta indica o local de clivagem por uma peptidase celular (Li *et al.*, 2000).

Tabela 8. Freqüência das mutações encontradas no peptídeo sinal de Env, presente no estágio inicial da infecção pelo HIV-1.

Estágio inicial	IRKN	IRRNC	IKKNC	IRMSC	IRKNC	TLL	K16E
P1	70%	-	-	-	-	-	-
P2	-	60%	-	-	-	-	-
P3	-	-	-	-	-	-	-
P4	-	-	-	-	-	-	-
P5	-	-	70%	-	-	100%	-
P6	-	-	-	-	-	-	-
P7	-	-	-	-	-	-	-
P8	-	-	-	-	-	-	-
P9	-	-	-	-	-	-	-
P10	-	-	-	80%	-	-	-
P11	-	-	-	-	-	-	-
P12	-	-	-	-	80%	-	-

Tabela 9. Frequência das mutações encontradas no peptídeo sinal de Env, presente no estágio tardio da infecção pelo HIV-1.

Estágio tardio	IRKN	IRRNC	IKKNC	IRMSC	IRKNC	TLL	K16E
P1	-	-	-	-	-	-	-
P2	-	-	-	-	-	-	-
P3	-	-	-	-	-	-	-
P4	-	-	-	-	-	-	-
P5	-	-	-	-	-	-	-
P6	-	-	-	-	-	-	-
P7	-	-	-	-	-	-	-
P8	-	-	-	-	-	-	-
P9	-	-	-	-	-	-	-
P10	-	-	-	-	-	-	-
P11	-	-	-	-	-	-	-
P12	-	-	-	-	-	-	70%

Tabela 10. Frequência das mutações e valor de “p” (teste t) encontrado no peptídeo sinal de Env, presente nos estágios inicial e tardio da infecção pelo HIV-1.

<i>Mutações</i>	<i>Estágio inicial</i>	<i>Estágio tardio</i>	Valor de “P”
IRKN	120 (5,83%)	120 (0%)	$p=0,164$
IRRNC	120 (5,00%)	120 (0%)	$p=0,164$
IKKNC	120 (5,83%)	120 (0%)	$p=0,164$
IRMSC	120 (6,66%)	120 (0%)	$p=0,164$
IRKNC	120 (6,66%)	120 (0%)	$p=0,164$
TLL	120 (8,33%)	120 (0%)	$p=0,164$
K16E	120 (0%)	120 (5,83%)	$p=0,164$

O gráfico de regressão para o peptídeo sinal da proteína Env, não foi gerado em decorrência da presença de apenas uma alteração, representada pela inserção de um grupo de aminoácidos, logo após o quarto aminoácido do peptídeo sinal. A ocorrência de apenas essa alteração fez com que os escores obtidos sejam de -3, para estágio inicial, e de zero, para o estágio tardio, o que impossibilita a correlação entre os níveis de linfócitos CD4⁺ e os escores.

5. Discussão

Como nos processos infecciosos, os diferentes níveis de progressão à AIDS observados em pacientes infectados pelo HIV-1, são determinados por complexa interação entre fatores genéticos do hospedeiro e do próprio vírus (Willey *et al.*, 1992; Weiss, 1993). Embora a maioria dos indivíduos HIV-1 positivos, desenvolvem a AIDS no lapso de 10 anos, aproximadamente 5% permanecem assintomáticos, com níveis estáveis de CD4⁺ por mais de uma década (Buchbinder *et al.*, 1994).

Para o HIV-1 o ambiente nunca é o mesmo, tendo que enfrentar flutuações constantes no tempo e no espaço. Dentre os principais fatores do hospedeiro, encontram-se os mecanismos de defesa, que tentam “eliminar” o vírus para evitar o estabelecimento de uma infecção crônica. As principais linhas de defesa estão representadas pela ação do sistema imune, basicamente linfócitos T citotóxicos (LTc), anticorpos neutralizantes (imunidade adaptativa) (Moore *et al.*, 2002; O'connor *et al.*, 2002) e por fatores celulares, que tem função de restringir a replicação viral (imunidade inata), alguns deles já identificados, (Sheehy *et al.*, 2002; Stremlau *et al.*, 2004) e outros ainda por serem descobertos (Varthakavi *et al.*, 2003). Finalmente, além de ter que “driblar” todos estes obstáculos, freqüentemente o vírus é submetido também à pressão exercida pelo coquetel anti-retroviral.

Estas forças exercidas pelo hospedeiro impõem enorme pressão seletiva que levam a alterações no material genético e conseqüentemente ao “fitness” viral, o que finalmente define a habilidade de um dado genótipo produzir progênie infecciosa em um determinado microambiente.

Dessa forma, o estudo das mudanças genéticas e suas conseqüências biológicas, são fundamentais ao entendimento da dinâmica evolucionária dos parâmetros de patogênese na população viral ao longo da infecção.

Usualmente, os níveis de replicação e infectividade são usados para medir o “fitness” viral, desde que, estes permitam dimensionar a completa realização do ciclo viral dentro da célula hospedeira. Entretanto, os diferentes isolados virais podem ser distinguidos pelo tropismo celular e efeitos citopáticos (Albini *et al.*, 1998). Dessa forma, estudos longitudinais com vírus isolados seqüencialmente ao longo da infecção, mostraram claramente que partículas virais isoladas logo após a infecção são predominantemente macrófago-trópico, não formam sincícios e se replicam lentamente (Friedler *et al.*, 1999; Henriksson e Bosch, 1998). No entanto, isolados linfotrópicos, formadores de sincícios e com elevada capacidade de se replicar, surgem em

aproximadamente 50% dos pacientes assintomáticos e estão associados a rápido declínio das células T e progressão à AIDS (Price *et al.*, 1998). Estes estudos levaram a proposição de duas principais hipóteses, que ainda continuam sem resposta, a primeira, que o surgimento das variantes mais infecciosas levaria o sistema imune a uma disfunção, e a segunda, que o surgimento das mesmas, seja uma consequência da progressiva depleção do sistema imune.

Dentro deste contexto, recentes estudos realizados pelo grupo do Dr. Kirchhoff e o nosso (Arganaraz *et al.*, 2003; Carl *et al.*, 2001; Kirchhoff *et al.*, 1999; Lama *et al.*, 1999) mostraram claramente a relação direta, entre o estado do sistema imune do hospedeiro e as mudanças específicas no genoma viral, que se traduzem em importantes alterações nas propriedades biológicas do vírus. Estes estudos mostraram que mutações ocorridas ao longo da infecção, no gene que codifica a proteína acessória Nef, levam à alteração de importantes funções para o ciclo viral. Assim, à medida que a infecção progride, as partículas virais parecem perder a capacidade de modular a expressão da proteína CPH-I, e passam a ter maior capacidade inibitória da expressão do receptor viral CD4. Finalmente, estes autores estabeleceram uma relação “causa-efeito”, entre a maior capacidade moduladora de CD4, o aumento de infectividade e replicação das partículas virais, características estas, observadas em populações virais presentes no estágio tardio da infecção e relacionadas ao desenvolvimento da AIDS.

Baseado nesses dados, nosso grupo tem como hipótese de trabalho, a existência de um “relógio biológico”, encarregado de disparar em determinado momento do processo infeccioso mudanças genéticas, que redundam em alterações fenotípicas cruciais à viabilidade do vírus no organismo, e fundamentalmente na sua propagação para um novo hospedeiro. Entretanto, esta hipótese levanta as seguintes questões: a) *Quais seriam as peças que compõem esse “relógio biológico”?* b) *Qual é a inter-relação entre elas?* e c) *Como este “relógio biológico” seria disparado?*

5.1 Análise mutacional da proteína Vpu.

Dada a importância da diminuição da expressão do receptor viral CD4 na patogênese e desenvolvimento da doença, propusemos como objetivo geral, avaliar o grau de participação da proteína viral Vpu neste fenômeno, devido ao importante papel desempenhado por esta proteína, junto com a proteína do envelope (Env) viral, na degradação das moléculas de CD4 sintetizadas pela célula hospedeira no retículo endoplasmático.

Na primeira etapa deste trabalho, analisamos a sequência de aminoácidos desta proteína, no pool de alelos presentes nos estágios iniciais e tardios da infecção.

Apesar de se ter progredido muito no conhecimento a respeito das diferentes funções de Vpu, a maioria destes dados, foram obtidos basicamente por meio de sistemas “in vitro” desconhecendo-se o exato papel desta proteína na patogênese do HIV-1 “in vivo”. A falta de informação a este respeito se deve principalmente a falta de um modelo animal adequado, uma vez que, esta proteína encontra-se presente apenas no HIV-1, SIV isolados de chimpanzés e em três espécies de macacos do gênero *Cercopithecus*. Além disso, diferentes laboratórios desenvolveram clones recombinantes patogênicos, onde genes de algumas proteínas acessórias como Tat, Rev, Vpu e Env do HIV-1, foram introduzidos no genoma de clones de SIV com objetivo de investigar o real papel de Vpu na patogênese da doença (Stephens *et al.*, 2002).

É importante ressaltar que para nosso conhecimento, não existem estudos que tenham abordado a participação da proteína Vpu no aumento da modulação do receptor viral CD4 e conseqüente aumento na infectividade e replicação viral observados em isolados presentes na fase tardia da infecção.

Após clonagem e sequenciamento dos alelos do gene *vpu*, as seqüências de nucleotídeos foram traduzidas para uma seqüência de aminoácidos e posteriormente comparadas com a seqüência do tipo selvagem do subtipo B, cepa NL4.3.

Numa primeira análise foi possível observar uma maior ocorrência de mutações nos alelos do estágio inicial em relação às mutações presente no estágio tardio (Figura 12 e 13). Posteriormente, ao comparar as seqüências consenso de cada paciente em cada estágio com a do tipo selvagem, pode-se observar que estas diferenças foram mais evidentes, assim, foi possível detectar 37 mutações presentes, sendo evidenciadas apenas no estágio inicial da infecção (P3S, -L, I4Q, V6L, I8P, I26F, L41I, L45I, I46R, E59D, -QEE, A74P, W75G, V6I, A7T, V60L, I4E, V6F, I15A, V20I, I26L, R36K, M66T, E50D,

-V, I4V, V6S, A14V, S23T, I24L, I26G, R29S, M69L, I78V, D79V, I27G e D79A) (Figura 14 e 15 e Tabela 3). Sendo que destas, oito mutações apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os estágios inicial e tardio, com valor de “p” < 0,05 (P3S, -L, L45I, I46R, E59D, -QEE, I15A, M66T) e outras seis apresentaram um valor de “p” = 0,07 (I4Q I26F V60L, I4E, S23T e I78V), o que levanta a possibilidade de serem mutações também relevantes (Tabela 4). As mutações com “p” < 0.05 ou “p” = 0,07 foram encontradas nos alelos do estágio inicial dos pacientes P1, P2, P5, P10 e P11 (Figura 14).

Entre as principais características das mutações presentes no estágio inicial da infecção, encontra-se a presença da seqüência DQEEL, DQDE e DQDEL a partir do aminoácido 60, localizada no domínio conservado (figura 14). Um dado de interesse é que a presença destes aminoácidos é característica marcante da cepa miotrópica SF162 (Willbold *et al.*, 1997), o que poderia vir a confirmar dados da literatura a respeito da presença de cepas predominantemente miotrópicas no início da infecção. Por outro lado, a coexistência das inserções acima citadas, como a inserção -L3 e as mutações L45I, I46R em cinco de 12 pacientes indicam a presença de dois principais fenótipos virais distintos.

A presença de três aminoácidos carregados negativamente inseridos nos motivos na posição 60 sugere a possibilidade que estas inserções possam ter importante influência na modulação de CD4 mediada por Vpu, como sugerido em Gomez e colaboradores (2005). Estes autores ao analisarem a seqüência da proteína Vpu em várias cepas de primatas não-humanos, observaram que a falta da segunda serina (Ser 56), em algumas cepas, como SIVcpzANT e SIVcpzTAN1 presente em chimpanzés, eram compensadas pela presença de um motivo com cinco aminoácidos carregados negativamente (EEDEE). Isto sugere a possibilidade que a inserção destes aminoácidos poderiam conferir alguma vantagem evolutiva aos vírus presentes no estágio inicial da infecção, como torná-los mais modulador da expressão de CD4, entretanto, isto precisa ser investigado mediante experimentos de expressão da proteína (Gomez *et al.*, 2005).

Outras alterações de interesse são as observadas pela inserção -L3 juntamente com as substituições P3S e I4Q no extremo amino terminal da proteína. Isto vai ao encontro de estudos realizados com diferentes cepas, onde foi mostrada uma alta variabilidade na seqüência compreendida entre os aminoácidos M1 e I6 (Sharpe *et al.*, 2006). Apesar de não se encontrar descrito na literatura a importância dos primeiros

aminoácidos presentes no extremo amino terminal, nem da ocorrência de tais mutações, existe a possibilidade, na qual, estas possam a influenciar o processo de oligomerização da proteína, dada sua proximidade ao domínio de transmembrana, região essencial à oligomerização da proteína e formação dos canais seletivos de cátions e liberação da progênie viral (Hsu, 2004).

Finalmente, as mutações L45I e I46R, encontradas nos alelos iniciais, na primeira α -hélice e dentro do domínio conservado na ligação à proteína β -TrCP, poderiam vir a afetar a ligação da proteína viral à molécula CD4, pois uma mutação similar à detectada em nosso estudo, (I47K), onde um aminoácido apolar é substituído por um polar com carga positiva mostrou que afetaria a interação de ambas as proteínas (Willbold *et al.*, 1997). O fato de estas mutações estarem também localizadas no primeiro domínio imunodominante pode ter implicações em mecanismos de evasão ao sistema imune nas primeiras fases da infecção.

É importante ressaltar a conservação de algumas regiões e aminoácidos descritos na literatura como essenciais para as funções desta proteína. Entre as regiões mais conservadas encontram-se a região de “dobradiça” entre as duas α -hélices compreendida entre os aminoácidos Glu50 e a Ser56, região esta, de vital importância na ligação de Vpu à proteína celular β -TrCP. Esta região possui duas serinas, que ao serem fosforiladas pela caseína cinase II adquirem carga negativa permitindo a interação entre ambas as proteínas (Hout *et al.*, 2004). Outra região altamente conservada, é a compreendida entre o domínio de transmembrana e a primeira α -hélice (EYRK), a exceção do paciente P10 (EYRK- EYRS no P10) (McCormick-Davis *et al.*, 2000). Dentre os aminoácidos altamente conservados neste domínio encontram-se, V9, V13, I20, W22 e I24 (I24L no P10), sendo que os aminoácidos I20 e W22 foram descritos como importantes na modulação de CD4 (Tiganos *et al.*, 1998).

Em relação à cepa linfotrópica, NL4.3, escolhida como molde para o alinhamento das seqüências, os alelos do estágio tardio apresentaram maior homologia em relação aos alelos do estágio inicial. Esse achado sugere a presença predominante de cepas linfotrópicas no estágio tardio da infecção, o que se correlaciona com os menores níveis de linfócitos CD4⁺ detectados neste estágio e conseqüentemente com o desenvolvimento da AIDS (Price *et al.*, 1998). Em apoio a essa hipótese, e com base no gráfico de regressão correlacionando à presença de mutações nos diferentes estágios com os níveis de linfócitos CD4⁺ presentes em cada paciente, foi mostrada uma clara correlação entre

ambos os parâmetros ($r = -82$, $r^2 = 71\%$ e $p < 0,0001$). Seguindo esta linha de raciocínio, a semelhança destes alelos com uma cepa linfotrópica NL4.3, poderia vir a proporcionar aos vírus presentes nesta fase, maior poder infeccioso e maior capacidade na replicação, os quais são necessários nesta fase, uma vez que o número de linfócitos $CD4^+$ circulantes se tornam escassos (Kirchhoff *et al.*, 1999; Lama *et al.*, 1999; Carl *et al.*, 2001; Arganaraz *et al.*, 2003).

É importante salientar que a relevância fisiológica das mutações detectadas nos alelos de Vpu presentes nos pacientes HIV-1 positivos, só poderá ser determinada por testes “in vitro” mediante a expressão desses alelos em linhas de células T, seja a partir de vetores de expressão ou de provírus, onde o gene *vpu* do tipo selvagem NL4.3 será substituído pelos alelos presentes nos diferentes estágios clínicos da infecção. Dessa forma, as principais propriedades funcionais da proteína, como degradação da molécula CD4 e a participação na liberação viral, poderão ser avaliadas comparando os alelos iniciais e tardios em relação ao tipo selvagem.

5.2 Análise mutacional do exon 1 de *rev*.

A seqüência de aminoácidos correspondentes aos alelos do exon 1 do gene *rev*, foi obtida após tradução da região 5' do gene *rev* dos fragmentos amplificados. Posteriormente e seguindo o modelo das análises de Vpu, as seqüências foram alinhadas tomando como padrão a seqüência da cepa NL4.3.

A partir das seqüências consenso de cada paciente em cada estágio, foram encontradas sete mutações, sendo seis mutações presentes no estágio inicial (S5R, E11D, I13L, R14K, L18V e L21F), pacientes P1, P4, P5, P10 e P12 (Figura 19 e tabela 5) e apenas uma no estágio tardio (I19T), paciente P7 (Figura 20 e tabela 6). Entretanto apenas três mutações apresentaram diferenças estatisticamente significativas, entre os estágios inicial e tardio da infecção, com valor de “p” $< 0,05$ (I13L, R14K, L21F) e uma com “p” = 0,07 (S5R), que sugere ser uma mutação relevante (Tabela7).

As mutações I13L, R14K e L18V, estão presentes na região compreendida entre os aminoácidos 12 e 20, a que conjuntamente com uma outra presente no exon 2 correspondente aos aminoácidos 52 e 60 são de extrema importância no processo de multimerização da proteína (Jain e Belasco, 2001). Por outro lado, as mutações R14K, L18V e L21F, se localizaram numa região imunodominante para reposta de LTC₄, o que

sugere, que mutações ocorridas nessa região permitiria ao vírus evasão do sistema imunitário (Ramakrishnan *et al.*, 2005).

As mutações descritas nesta região da proteína Rev se assemelham as presentes na seqüência do tipo selvagem HBX-3, o que pode indicar uma mudança no fenótipo viral, mas provavelmente não na atividade funcional da mesma, desse modo, os aminoácidos mutados por substituição apresentam as mesmas características físico-químicas. Por outro lado, apesar de serem bastante consistentes na população dos alelos virais, estas substituições não foram correlacionadas a nenhum efeito biológico direto, corroborando assim, com os dados previamente descritos (Ramakrishnan *et al.*, 2005).

Embora as seqüências dos alelos do exon 1 do gene de *rev* tenham apresentado mutações, nossos dados, não são suficientes para que se possa chegar a uma conclusão a respeito do possível papel destas mutações na função da proteína e sua relevância nos diferentes estágios clínicos da infecção, fazendo-se necessária também uma análise da seqüência do exon 2 do gene de *rev*.

Ao término das análises das seqüências dos aminoácidos dos alelos exon 1 do gene *rev* e embora esta proteína não participe diretamente na diminuição da expressão da molécula de CD4, foi feito um gráfico de regressão, igual ao de Vpu, com o intuito de investigar a existência de possível correlação entre as mutações detectadas e os níveis de linfócitos CD4⁺ de cada paciente em cada estágio. Curiosamente, e baseado no gráfico de regressão igual a Vpu, encontrou-se clara correlação entre ambos os parâmetros, com um ($r = -84$, $r^2 = 68\%$ e $p < 0,0001$). Isto sugere que esta proteína poderia estar relacionada a mecanismos envolvidos na progressão à doença. Esta hipótese encontra sustentação no papel crucial desta proteína na regulação da expressão gênica viral, permitindo a exportação de transcritos parcialmente ou incompletamente processados, o que é de importância vital na fase tardia do ciclo viral (Thomas *et al.*, 1998).

5.3 Análise mutacional da seqüência do peptídeo sinal do gene *env*.

Os primeiros 163 nucleotídeos da seqüência do gene *env* presente na região 3' dos fragmentos amplificados, foram também analisados. Após a tradução e com objetivo de detectar possíveis mutações nesta região, a correspondente seqüência de aminoácidos foi alinhada em comparação à seqüência da cepa NL4.3.

Após alinhamento das seqüências consenso, foi possível detectar sete mutações, sendo seis por inserção nos alelos presentes no estágio inicial da infecção (-IRKN, -

IRRNC, -GIKKNC, -IRMSC, -IRKNC e TLL), paciente P1, P2, P5 e P10 (Figura 24 e Tabela 8) e apenas uma por substituição nos alelos do estágio tardio (K16E), paciente 12 (Figura 25 e Tabela 9). Embora essas mutações, não tenham apresentado diferenças estatisticamente significativas entre os estágios iniciais e tardios ($p > 0,05$) (Tabela 10), é possível observar clara diferença na frequência destas mutações entre os estágios iniciais e tardios, já que as inserções citadas anteriormente foram encontradas apenas nos alelos do estágio inicial, isso sugere que estas mutações podem estar relacionadas à pressão seletiva que o vírus enfrenta no começo da infecção, frente ao sistema imunitário.

A presença destas inserções pode ter importantes consequências biológicas no transporte, processamento e consequente expressão da gp120. A presença de dois aminoácidos carregados positivamente na sequência inserida pode retardar ainda mais, o já lento processamento desta glicoproteína, como reportado por Li e colaboradores (1994 e 2000). Um peptídeo sinal raramente maior, constituído pelos 30 primeiros aminoácidos da proteína e a presença de cinco aminoácidos carregados positivamente foram apontados como os principais fatores responsáveis pela menor velocidade no processamento e expressão da glicoproteína (Li *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000).

Esses dados nos permitem levantar a hipótese, que a inserção desses aminoácidos nas sequências dos alelos na fase inicial, pode levar a uma diminuição na expressão da glicoproteína do envelope viral na superfície das células infectadas. Esta hipótese encontra sustentação em dois processos biológicos de extrema importância para a sobrevivência do vírus no hospedeiro. O primeiro está relacionado à necessidade do vírus evitar o reconhecimento das células infectadas pelo sistema imunitário, principalmente na fase inicial da infecção, onde a menor expressão da glicoproteína gp120 poder vir a ajudar na evasão imunológica. O segundo está relacionado ao empacotamento e liberação das partículas virais em macrófagos, principal tipo celular infectado no começo da infecção, o qual acontece nos corpos multivesiculares (MBVs) localizados no citoplasma, e não na superfície celular, como ocorre nos linfócitos T (Pornillos *et al.*, 2003).

Finalmente é de interesse destacar, que as mutações detectadas nas três regiões analisadas do genoma viral aconteceram principalmente em alelos dos mesmos pacientes e no mesmo estágio da infecção, paciente P1, P2, P5 e P10 do estágio inicial. O que sustentaria nossa hipótese, a respeito da existência de mecanismo molecular, responsável pela mudança coordenada do genoma viral em um determinado momento da infecção.

Como consideração final deste estudo, espera-se que as informações obtidas a respeito das mutações presentes em alelos dos estágios inicial e final da infecção pelo HIV-1 nos permitam posteriormente junto com testes funcionais "in vitro", determinar a relevância fisiológica da proteína Vpu, assim como, das outras regiões analisadas, nos mecanismos patogênicos da AIDS.

6. Perspectivas

Em base aos dados obtidos neste trabalho a respeito da caracterização das seqüências de aminoácidos dos alelos *vpu*, do exon 1 do gene de *rev* e do peptídeo sinal de Env, presentes nos diferentes estágios clínicos da infecção, propomos como principais objetivos futuros:

1. Clonar e expressar os diferentes alelos de *vpu* em linhas de células T e linfócitos de sangue periférico, com objetivo de analisar comparativamente a capacidade modulatória de CD4 e liberação de partículas virais entre os alelos presentes nos estágios inicial e tardio da infecção.
2. Clonar e expressar os diferentes alelos de *vpu* no provírus NL4.3 com objetivo de analisar a modulação de CD4 e liberação viral no contexto da infecção viral.
3. Clonar e expressar os diferentes alelos do peptídeo sinal da proteína Env num sistema de secreção “in vitro” com objetivo de caracterizar a influencia dos diferentes alelos na expressão de uma proteína “reporter”.
4. Clonar e sequenciar os alelos do exon 2 do gene de *rev* presentes nos estágios inicial e final da infecção pelo HIV-1, como objetivo de detectar a ocorrência de possíveis mutações.

7. Referências Bibliográficas:

AbcdAids. *www.abcdAids.com.br* 2005.

Aiken, C. e D. Trono. Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *Journal of virology*, v.69, n.8, p.5048-56. 1995.

Akari, H., S. Bour, *et al.* The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors. *The Journal of experimental medicine*, v.194, n.9, p.1299-311. 2001.

Albini, A., S. Ferrini, *et al.* HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.95, n.22, p.13153-8. 1998.

Alkhatib, G., C. Combadiere, *et al.* CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*, v.272, p.1955-1958. 1996.

Altfeld, M. e E. S. Rosenberg. The role of CD4(+) T helper cells in the cytotoxic T lymphocyte response to HIV-1. *Current Opinion in Immunology*, v.12, n.4, p.375-80. 2000.

Altschul, S. F., W. Gish, *et al.* Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v.215, n.3, p.403-10. 1990.

Anderson, J. e R. Akkina. HIV-1 resistance conferred by siRNA cosuppression of CXCR4 and CCR5 coreceptors by a bispecific lentiviral vector. *AIDS Research Therapy*, v.2, n.1, Jan 13, p.1. 2005.

Andersson, J., H. Behbahani, *et al.* Perforin is not co-expressed with granzyme A within cytotoxic granules in CD8 T lymphocytes present in lymphoid tissue during chronic HIV infection. *AIDS*, v.13, n.11, p.1295-303. 1999.

Andreo, S. M., L. A. Barra, *et al.* HIV type 1 transmission by human bite. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v.20, n.4, Apr, p.349-50. 2004.

Annan, K. A. In Africa, AIDS has a woman's face. *New York Times*, p.9. 2002.

Appay, V., P. R. Dunbar, *et al.* Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature medicine*, v.8, n.4, p.379-85. 2002.

Arganaraz, E. R., M. Schindler, *et al.* Enhanced CD4 down-modulation by late stage HIV-1 nef alleles is associated with increased Env incorporation and viral replication. *The Journal of biological chemistry*, v.278, n.36, p.33912-9. 2003.

Baba, T. W., A. M. Trichel, *et al.* "Infection and AIDS in adult macaques after nontraumatic oral exposure to cell-free SIV. *Science*, v.272, p.1486-1489. 1996.

Barbour, J. D., F. M. Hecht, *et al.* Higher CD4+ T cell counts associated with low viral pol replication capacity among treatment-naive adults in early HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases*, v.190, n.2, p.251-6. 2004.

Barlow, K. L., A. O. Ajao, *et al.* Characterization of a novel simian immunodeficiency virus (SIVmonNG1) genome sequence from a mona monkey (*Cercopithecus mona*). *Journal of Virology*, v.77, n.12, p.6879-88. 2003.

Benson, R. E., A. Sanfridson, *et al.* Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *The Journal of experimental medicine*, v.177, n.6, p.1561-6. 1993.

Binette, J. e E. A. Cohen. Recent advances in the understanding of HIV-1 Vpu accessory protein functions. *Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders*, v.4, n.4, p.297-307. 2004.

Bioedit. www.mbio.ncsu.edu/BioEdit 2006.

Bohne, J., H. Wodrich, *et al.* Splicing of human immunodeficiency virus RNA is position-dependent suggesting sequential removal of introns from the 5' end. *Nucleic Acids Research*, v.33, n.3, p.825-37. 2005.

Bollinger, R. C., T. C. Quinn, *et al.* Cytokines from vaccine-induced HIV-1 specific cytotoxic T lymphocytes: effects on viral replication. *AIDS research and human retroviruses*, v.9, n.11, p.1067-77. 1993.

Bour, S., C. Perrin, *et al.* The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein inhibits NF-kappa B activation by interfering with beta TrCP-mediated degradation of Ikappa B. *The Journal of biological chemistry*, v.176, n.19, p.15920-8. 2001.

Bour, S., C. Perrin, *et al.* Cell surface CD4 inhibits HIV-1 particle release by interfering with Vpu activity. *The Journal of biological chemistry*, v.274, n.47, p.33800-6. 1999.

Bour, S., U. Schubert, *et al.* The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *Journal of Virology*, v.69, n.3, p.1510-20. 1995.

Bour, S. e K. Strebel. HIV accessory proteins: multifunctional components of a complex system. *Advances in pharmacology* (San Diego, Calif), v.48, p.75-120. 2000.

Bour, S. e K. Strebel. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes and Infection*, v.5, n.11, Sep, p.1029-39. 2003.

Buchbinder, M. H., S. P. Katz, *et al.* Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS*. *AIDS*, v.8, n.8, p.1123-8. 1994.

Butler, D. Nigerian states disrupt campaign to eradicate polio. *Nature*, v.428, n.6979, p.109. 2004.

Callahan, M. A., M. A. Handley, *et al.* Functional interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vpu and Gag with a novel member of the tetratricopeptide repeat protein family. *Journal of Virology*, v.8461, n.10, p.72. 1998.

Callan, M. F., C. Fazou, *et al.* CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo. *The Journal of clinical investigation*, v.106, n.10, p.1251-61. 2000.

Campbell, S. M., S. M. Crowe, *et al.* Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *Journal of Clinical Virology*, v.22, n.3, p.217-27. 2001.

Caputi, M., M. Freund, *et al.* A Bidirectional SF2/ASF- and SRp40-Dependent Splicing Enhancer Regulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 rev, env, vpu, and nef Gene Expression. *Journal of virology*, v.78, n.12, p.6517-6526. 2004.

Carl, S., R. Daniels, *et al.* Partial "repair" of defective NEF genes in a long-term nonprogressor with human immunodeficiency virus type 1 infection. *The Journal Infectious Diseases*, v.181, n.1, p.132-40. 2000.

Carl, S., T. C. Greenough, *et al.* Modulation of different human immunodeficiency virus type 1 Nef functions during progression to AIDS. *Journal of Virology*, v.75, n.8, p.3657-65. 2001.

Carrington, M., G. W. Nelson, *et al.* HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science*, v.283, n.5408, p.1748-52. 1999.

Carrington, M. e S. J. O'brien. The influence of HLA genotype on AIDS. *Annual review of medicine*, v.54, p.535-51. 2003.

Cartier, C., P. Sivard, *et al.* Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection. *The Journal of biological chemistry*, v.274, n.27, p.19434-19440. 1999.

Cavert, W., D. W. Notermans, *et al.* Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection. *Science*, v.276, n.5314, p.960-4. 1997.

Chakraborty, H., P. K. Sen, *et al.* Viral burden in genital secretions determines male-to-female sexual transmission of HIV-1: a probabilistic empiric model. *AIDS*, v.15, n.5, p.621-7. 2001.

Chan, D. C., D. Fass, *et al.* Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, v.89, n.2, p.263-73. 1997.

Charles, A. J., T. Pool, *et al.* Imunobiologia O sistema imune na saúde e na doença. *Imunobiologia*, v.5ª edição. 2002.

- Chen, B. K., R. T. Gandhi, *et al.* CD4 down-modulation during infection of human T cells with human immunodeficiency virus type 1 involves independent activities of vpu, env, and nef. *Journal of Virology*, v.70, n.9, p.6044-53. 1996.
- Chen, H., S. Q. Wei, *et al.* Multiple integrase functions are required to form the native structure of the human immunodeficiency virus type I intasome. *The Journal of Biological Chemistry*, v.274, n.24, p.17358-64. 1999.
- Chertova, E., J. W. Bess Jr, *et al.* Envelope glycoprotein incorporation, not shedding of surface envelope glycoprotein (gp120/SU), Is the primary determinant of SU content of purified human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, v.76, n.11, p.5315-25. 2002.
- Clapham, P. R. e A. Mcknight. Cell Surface Receptor, Virus entry and Tropism of Primate Lentiviruses. *Journal of Genetic Virology*, v.83, p.1809-1829. 2002.
- Clustalw. www.ebi.ac.uk EBI server for multiple sequence alignment on the web. www.ebi.ac.uk. 2005.
- Coadou, G., J. Gharbi-Benarous, *et al.* NMR studies of the phosphorylation motif of the HIV-1 protein Vpu bound to the F-box protein beta-TrCP. *Biochemistry*, v.42, n.50, p.14741-51. 2003.
- Cocchi, F., A. L. Devico, *et al.* Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*, v.270, n.5243, p.1811-5. 1995.
- Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, *et al.* Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature*, v.334, n.6182, p.532-4. 1988.
- Cohen, G. B., V. S. Rangan, *et al.* The human thioesterase II protein binds to a site on HIV-1 Nef critical for CD4 down-regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, v.275, n.30, p.23097-105. 2000.
- Coleman, S. H., J. R. Day, *et al.* The HIV-1 Nef protein as a target for antiviral Therapy. *Emerging Therapeutic Targets*, v.5, n.1, p.1-22. 2001.
- Connor, R. I., B. K. Chen, *et al.* Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology*, v.206, n.2, p.935-44. 1995.
- Copeland, K. F., P. J. Mckay, *et al.* Suppression of activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by CD8+ T cells is not lentivirus specific. *AIDS research and human retroviruses*, v.11, n.11, p.1321-6. 1995.
- Cortes, M. J., F. Wong-Staal, *et al.* Cell surface CD4 interferes with the infectivity of VIH-1 particles released from T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v.277, p.1770-1779. 2002.

Cournaud, V., M. Salemi, *et al.* Characterization of a novel simian immunodeficiency virus with a vpu gene from greater spot-nosed monkeys (*Cercopithecus nictitans*) provides new insights into simian/human immunodeficiency virus phylogeny. *Journal of virology*, v.76, n.16, p.8298-309. 2002.

Craig, H. M., T. R. Reddy, *et al.* Interactions of HIV-1 nef with the mu subunits of adaptor protein complexes 1, 2, and 3: role of the dileucine-based sorting motif. *Virology*, v.271, n.1, p.9-17. 2000.

Cullen, B. R. Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends in biochemical sciences*, v.28, n.8, p.419-24. 2003.

Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, *et al.* The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, v.312, n.5996, p.763-7. 1984.

De Clercq, E. Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of Virology*, v. 30, p.115-133. 2004.

Deora, A. e L. Ratner. Viral protein U (Vpu)-mediated enhancement of human immunodeficiency virus type 1 particle release depends on the rate of cellular proliferation. *Journal of Virology*, v.75, n.18, p.6714-8. 2001.

Deschambeault, J., J. P. Lalonde, *et al.* Polarized human immunodeficiency virus budding in lymphocytes involves a tyrosine-based signal and favors cell-to-cell viral transmission. *Journal of virology*, v.73, n.6, p.5010-7. 1999.

Deshaies, R. J. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annual review of cell and developmental biology*, v.15, p.435-67. 1999.

Dodds, J. P., N. A., *et al.* Increasing high risk sexual behaviour among homosexual men in London 1996-8: cross sectional, questionnaire study. *British Medical Journal*, v.320, n.7248, p.1510-1511. 2000.

Domingo, E., E. Baranowsky, *et al.* Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerging Infectious Diseases*, v.4, p.521-527. 1998.

Douek, D. C., J. M. Brenchley, *et al.* HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*, v.417, n.6884, p.95-8. 2002.

Emu, B., E. Sinclair, *et al.* Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. *Journal of Virology*, v.79, n.22, p.14169-78. 2005.

European, B. I. www.ebi.ac.uk. 2005.

Ewart, G. D., K. Mills, *et al.* Amiloride derivatives block ion channel activity and enhancement of virus-like particle budding caused by HIV-1 protein Vpu. *European Biophysics Journal: EBJ*, v.31, n.1, p.26-35. 2002.

- Fackler, O. T. e B. M. Peterlin. Endocytic entry of HIV-1. *Current Biology*, v.10, n.16, p.1005-8. 2000.
- Fang, G., B. Weiser, *et al.* Recombination following superinfection by HIV-1. *AIDS*, v.18, n.2, p.153-9. 2004.
- Feng, Y., C. C. Broder, *et al.* HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, v.272, n.5263, p.872-7. 1996.
- Fernandez, C. S., I. Dtrатов, *et al.* Rapid viral escape at an immunodominant simian-human immunodeficiency virus cytotoxic T-lymphocyte epitope exacts a dramatic fitness cost. *Journal of Virology*, v.79, n.9, p.5721-5731. 2005.
- Foster, J. L., S. J. Anderson, *et al.* Specific suppression of human CD4 surface expression by Nef from the pathogenic simian immunodeficiency virus SIVmac239open. *Virology*, v.201, n.2, p.373-9. 1994.
- Frahm, N., S. Adamas, *et al.* HLA-B63 presents HLA-B57/B58- restricted cytotoxic T-Lymphocyte epitopes and is associated with low human immunodeficiency virus load. *Journal of Virology*, v.79, n.16, p.10218-10225. 2005.
- Franke, E. K., H. E. Yuan, *et al.* Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature*, v.372, n.6504, p.359-62. 1994.
- Freedman, B. D., Q. H. Liu, *et al.* HIV-1 gp120 chemokine receptor-mediated signaling in human macrophages. *ImmunologicResearch*, v.27, n.2-3, p.261-76. 2003.
- Friberg, J., A. Ladha, *et al.* Functional analysis of the phosphorylation sites on the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology: Official Publication of the International Retrovirology Association*, v.8, n.1, p.10-22. 1995.
- Friedler, A., I. Blumenzweig, *et al.* Peptides derived from HIV-1 Vif: a non-substrate based novel type of HIV-1 protease inhibitors. *Journal Molecular Biology*, v.287, n.1, p.93-101. 1999.
- Friedrich, T. C., E. J. Dodds, *et al.* Reversion of CTL escape-variant immunodeficiency viruses in vivo. *Nature Medicine*, v.10, p.275-281. 2004.
- Furtado, M. R., D. S. Callaway, *et al.* Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *The New England Journal of Medicine*, v.340, n.21, p.1614-22. 1999.
- Gallay, P., S. Swingler, *et al.* HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell*, v.83, n.4, p.569-76. 1997.

Gao, F., E. Bailes, *et al.* Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, v.397, n.6718, p.436-41. 1999.

Garcia, J. V. e A. D. Miller. Serine phosphorylation- independent downregulation of cell-surface CD4 by Nef. *Nature*, v.350, p.508-511. 1991.

Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, v.100, n.5, p.587-97. 2000.

Geleziunas, R., S. Bour, *et al.* Correlation between high level gp160 expression and reduced CD4 biosynthesis in clonal derivatives of human immunodeficiency virus type 1-infected U-937 cells. *The Journal of General Virology*, v.75, n.4, p.857-65. 1994.

Glushakova, S., J. Munch, *et al.* CD4 down-modulation by human immunodeficiency virus type 1 Nef correlates with the efficiency of viral replication and with CD4(+) T-cell depletion in human lymphoid tissue *ex vivo*. *Journal of Virology*, v.76, n.21, p.10113-7. 2001.

Gomez, L. M., E. Pacyniak, *et al.* Vpu-mediated CD4 down-regulation and degradation is conserved among highly divergent SIV(cpz) strains. *Virology*, v.335, n.1, Apr 25, p.46-60. 2005.

Gotlieb, M. S., R. Schroff, *et al.* Pneumocystis carinii pneumonia and mucosa candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *New England Journal of Medicine*, v.305, p.1425-1431. 1981.

Gottlinger, H. G., T. Dorfman, *et al.* Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.90, p.7381-5. 1993.

Grant, A. D. e K. M. D. Cock. ABC of AIDS – HIV infection and AIDS in the developing world. *British Medical Journal*, v.322, p.1475-1478. 2001.

Graphpad, P. www.graphpad.com/prism 2006.

Gray, C. M., J. Lawrence, *et al.* Frequency of class I HLA-restricted anti-HIV CD8+ T cells in individuals receiving highly active antiretroviral therapy (HAART). *Journal of Immunology*, v.162, n.3, p.1780-8. 1999.

Greene, W. C. The brightening future of HIV therapeutics. *Nature Immunology*, v.5, n.9, Sep, p.867-71. 2004.

Greene, W. C. e B. M. Peterlin. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nature Medicine*, v.8, n.7, p.673-80. 2002.

Guy, B., M. P. Kieny, *et al.* HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature*, v.330, n.6145, p.266-9. 1987.

Haase, A. T. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annual Review of Immunology*, v.17, p.625-56. 1999.

Hahn, B. H., G. M. Shaw, *et al.* AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*, v.287, n.5453, p.607-14. 2000.

Hamann, D., P. A. Baars, *et al.* Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *Journal of Experimental Medical Sciences*, v.186, n.9, p.1407-18. 1997.

Hammonds, J., X. Chen, *et al.* Gp120 stability on HIV-1 virions and Gag-Env pseudovirions is enhanced by an uncleaved Gag core. *Virology*, v.314, n.2, p.636-49. 2003.

Hanna, G. 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. www.pubmed.com, p.141. 2004.

Harper, M. E., L. M. Marselle, *et al.* Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.83, n.3, p.772-6. 1986.

Hazenber, M. D., S. A. Otto, *et al.* Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nature medicine*, v.6, n.9, p.1036-42. 2000.

Healthy, O. W. <http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/epi2002/en/Who/AIDS>. Geneva: World Health Organization 2002.

Henriksson, P. e V. Bosch. Inhibition of cellular glycoprotein incorporation into human immunodeficiency virus-like particles by coexpression of additional cellular interaction partner. *Virology*, v.251, n.1, p.16-21. 1998.

Heyndrickx, L., W. Janssens, *et al.* Differential diagnosis of HIV typi 1 group O and M infection by polymerase chain reaction and PstI restriction analysis of the pol gene fragment. *AIDS Research Human Retroviruses*, v.14, p.973-977. 1998.

HIV, D. www.hiv-web.lanl.gov HIV and related genetic sequence data and computer analyses - from the Los Alamos Natl. Lab. 2005.

Hope, T. J. The ins and outs of HIV Rev. *Archives of biochemistry and biophysics*, v.365, n.2, p.186-91. 1999.

Hout, D. R., E. R. Mulcahy, *et al.* Vpu: a multifunctional protein that enhances the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1. *Current HIV Research*, v.2, n.3, Jul, p.255-70. 2004.

Hsu, K. S. J., Dong P, Bour S, Marban E. Mutual functional destruction of HIV-1 Vpu and host TASK-1 channel. *Molecular Cell*, v.14, n.2, p.259-67. 2004.

Huet, T., R. Cheynier, *et al.* Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature*, v.345, n.6273, p.356-359. 1990.

Iafrate, A. J., S. Carl, *et al.* Disrupting surfaces of nef required for downregulation of CD4 and for enhancement of virion infectivity attenuates simian immunodeficiency virus replication in vivo. *Journal of Virology*, v.74, n.21, p.9836-44. 2000.

Iyer, S. B., L. E. Hultin, *et al.* Quantitation of CD38 expression using QuantiBRITE beads. *Cytometry*, v.33, n.2, p.206-12. 1998.

Jabbar, M. A. e D. P. Nayak. Intracellular interaction of human immunodeficiency virus type 1 (ARV-2) envelope glycoprotein gp160 with CD4 blocks the movement and maturation of CD4 to the plasma membrane. *Jonsson Comprehensive Cancer Center, University of California, Los Angeles, School of Medicine 90024-1747*, v.64, n.12, p.6297-304. 1990.

Jacobson, J. M., R. J. Israel, *et al.* Treatment of advanced human immunodeficiency virus type 1 disease with the viral entry inhibitor PRO 542. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, p.423-429. 2004.

Jain, C. e J. G. Belasco. Structural model for the cooperative assembly of HIV-1 Rev multimers on the RRE as deduced from analysis of assembly-defective mutants. *Cell*, v.7, n.3, p.603-14. 2001.

Kaslow, R. A., M. Carrington, *et al.* Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nature Medicine*, v.2, n.4, p.405-11. 1996.

Kilby, J. M. e J. J. Eron. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *New England Journal of Medicine*, v.348, n.22, May 29, p.2228-38. 2003.

Kimura, T., M. Nishikawa, *et al.* Intracellular membrane traffic of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins: vpu liberates Golgi-targeted gp160 from CD4-dependent retention in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biochemistry*, v.115, n.5, p.1010-20. 1994.

Kirchhoff, F., P. J. Easterbrook, *et al.* Sequence variations in human immunodeficiency virus type 1 Nef are associated with different stages of disease. *Journal of Virology*, v.73, n.7, p.5497-508. 1999.

Kirchhoff, F., T. C. Greenough, *et al.* Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *The New England Journal of Medicine*, v.332, n.4, p.228-32. 1995.

Kjems, J. e P. Askjaer. Rev protein and its cellular partners. *Advances in Pharmacology*, v.48, p.251-98. 2000.

Klenk, H. D. e W. Garten. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends in Microbiology*, v.2, n.2, p.39-43. 1994.

Klimkait, T., K. Strebel, *et al.* The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *Journal of Virology*, v.64, n.2, p.621-9. 1990.

Komoto, S., S. Tsuji, *et al.* The vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 plays a protective role against virus-induced apoptosis in primary CD4(+) T lymphocytes. *Journal of Virology*, v.77, n.19, Oct, p.10304-13. 2003.

Koup, R. A., J. T. Safrit, *et al.* Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *Journal of Virology*, v.68, n.7, p.4650-5. 1994.

Kozak, S. L., J. M. Heard, *et al.* Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, v.76, n.4, p.1802-15. 2002.

Kuhmann, S. E., E. J. Latt, *et al.* Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, v.74, n.15, p.7005-15. 2000.

Kuroda, M. J., J. E. Schmitz, *et al.* Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *Journal of Immunology*, v.162, n.9, p.5127-33. 1999.

Kwon, D. S., G. Gregorio, *et al.* DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity*, v.16, n.1, p.135-44. 2002.

Lama, J. The Physiological Relevance of CD4 Receptor Down-Modulation During HIV Infection. *Current HIV Research*, v.1, p.167-184. 2003.

Lama, J., A. Mangasarian, *et al.* Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Current Biology*, v.9, n.12, p.622-31. 1999.

Lapham, C. K., J. Ouyang, *et al.* Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science*, v.274, n.5287, p.602-05. 1996.

Larsson, M. HIV-1 and the hijacking of dendritic cells: a tug of war. *Springer Seminars in Immunopathology*, v.26, n.3, p.309-28. 2005.

Lassot, I., E. Segeral, *et al.* ATF4 degradation relies on a phosphorylation-dependent interaction with the SCF(betaTrCP) ubiquitin ligase. *Molecular and Cellular Biology*, v.21, n.6, p.2192-202. 2001.

Le Gall, S., L. Erdtmann, *et al.* Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity*, v.8, n.4, p.483-95. 1998.

Lee, M. T., G. A. Coburn, *et al.* Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages by using Tat- or CCR5-specific small interfering RNAs expressed from a lentivirus vector. *Journal of Virology*, v.77, n.22, Nov, p.11964-72. 2003.

Lenburg, M. E. e N. R. Landau. Vpu-induced degradation of CD4: requirement for specific amino acid residues in the cytoplasmic domain of CD4. *Journal of Virology*, v.67, n.12, p.7238-45. 1993.

Leslie, A. J., K. J. Pfafferott, *et al.* VIH evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nature Medicine*, v.10, p.282-289. 2004.

Levesque, K., Y. S. Zhao, *et al.* Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells. *The Journal Biological Chemistry*, v.278, n.30, Jul 25, p.28346-53. 2003.

Levy, J. A. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiological Reviews*, v.57, n.1, p.183-289. 1993.

Li, J. T., M. Halloran, *et al.* Persistent infection of macaques with simian-human immunodeficiency viruses. *Journal of Virology*, v.69, n.11, p.7061-7. 1995.

Li, Y., L. Luo, *et al.* Control of expression, glycosylation, and secretion of HIV-1 gp120 by homologous and heterologous signal sequences. *Virology*, v.204, n.1, p.266-78. 1994.

Li, Y., L. Luo, *et al.* The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. *Virology*, v.272, n.2, p.417-28. 2000.

Liao, Z., L. M. Cimakasky, *et al.* Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Research Human Retroviruses*, v.17, n.11, p.1009-19. 2001.

Lin, Y. L., C. Mettling, *et al.* Cell surface CCR5 density determines the postentry efficiency of R5 HIV- 1 infection. *Proceeding of the National Academy Sciences of the USA*, v.99, n.24, p.15590-5. 2002.

Lodge, R., H. Gottlinger, *et al.* The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *Journal of Virology*, v.68, n.8, p.4857-61. 1994.

Lodge, R., J. P. Lalonde, *et al.* The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *The EMBO journal*, v.16, n.4, p.695-705. 1998.

Lum, J. J., O. J. Cohen, *et al.* Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation*, v.111, n.10, p.1547-54. 2003.

Lundquist, C. A., M. Tobiume, *et al.* Nef-mediated downregulation of CD4 enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in primary T lymphocytes. *Journal of Virology*, v.76, n.9, p.4625-33. 2002.

Malim, M. H., S. Bohnlein, *et al.* Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell*, v.58, n.1, p.205-14. 1998.

Malim, M. H., L. S. Tiley, *et al.* HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell*, v.60, n.4, p.675-83. 1990.

Mangasarian, A., M. Foti, *et al.* The HIV-1 Nef protein acts as a connector with sorting pathways in the Golgi and at the plasma membrane. *Immunity*, v.6, n.1, p.67-77. 1997.

Margottin, F., S. P. Bour, *et al.* A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Molecular Cell*, v.1, n.4, p.565-74. 1998.

Marini, R. e J. Showronski. CD4 down-regulation by nef and p56lck protein-tyrosin kinase interact with a commun element in CD4 cytoplamic tail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.90, n.12, p.54449-55533. 1993.

Marshall, W., Diamond Dc, Kowalski Mm, Finberg Rw. High level of surface CD4 prevents stable human immunodeficiency virus infection of T-cell transfectants. *Journal of Virology*, v.66, n.9, p.5492-9. 1992.

Mastro, T. D. e D. Kitayaporn. HIV type 1 transmission probabilities: estimates from epidemiological studies. *AIDS Research Human Retroviruses*, p.223-7. 1998.

Mccormick-Davis, C., S. B. Dalton, *et al.* Comparison of Vpu sequences from diverse geographical isolates of HIV type 1 identifies the presence of highly variable domains, additional invariant amino acids, and a signature sequence motif common to subtype C isolates. *AIDS Research Human Retroviruses*, v.16, n.11, Jul 20, p.1089-95. 2000.

Mccormick-Davis, C., L. J. Zhao, *et al.* Chronology of genetic changes in the vpu, env, and Nef genes of chimeric simian-human immunodeficiency virus (strain HXB2) during acquisition of virulence for pig-tailed macaques. *Virology*, v.248, n.2, p.275-83. 1998.

Mccutchan, F. E. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS*, v.14, n.Suppl 3, p.S31-44. 2000.

Miller, M. D., C. M. Farnet, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *Journal of Virology*, v.71, n.7, p.5382-90. 1997.

- Miller, M. D., M. T. Warmerdam, *et al.* Intravirion generation of the C-terminal core domain of HIV-1 Nef by the HIV-1 protease is insufficient to enhance viral infectivity. *Virology*, v.234, n.2, Aug 4, p.215-25. 1997.
- Moore, C. B., M. John, *et al.* Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science*, v.296, n.5572, p.1439-43. 2002.
- Morita, E. e W. I. Sundquist. Retrovirus budding. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v.20, p.395-425. 2004.
- Moulard, M. e E. Decroly. Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1469, n.3, p.121-32. 2000.
- Newell, M. K., L. J. Haughn, *et al.* Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature*, v.347, n.6290, p.286-9. 1990.
- Nguyen, D. H. e J. E. Hildreth. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *Journal of Virology*, v.74, n.7, p.3264-72. 2000.
- O'connor, D. H., T. M. Allen, *et al.* Acute phase cytotoxic T lymphocyte escape is a hallmark of simian immunodeficiency virus infection. *Nature Medicine*, v.8, n.5, p.493-9. 2002.
- O'Brien, S. J. e G. W. Nelson. Human Genes that Limite AIDS. *Nature Genetic*, v.36, p.565-574. 2004.
- Ohagen, A. e D. Gabuzda. Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *Journal of Virology*, v.74, n.23, p.11055-66. 2000.
- Pacyniak, E., M. L. Gomez, *et al.* Identification of a region within the cytoplasmic domain of the subtype B Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that is responsible for retention in the golgi complex and its absence in the Vpu protein from a subtype C HIV-1. *AIDS Research Human Retroviruses*, v.21, n.5, p.379-94. 2005.
- Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, v.18, n.49, p.6853-66. 1999.
- Patel, P. G., M. T. Yu Kimata, *et al.* Highly pathogenic simian immunodeficiency virus mne variants that emerge during the course of infection evolve enhanced infectivity and the ability to downregulate CD4 but not class I major histocompatibility complex antigens. *Journal of Virology*, v.76, n.13, p.6425-34. 2002.
- Perelson, A. S., A. U. Neumann, *et al.* HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, v.271, n.5255, p.1582-6. 1996.

Pham, H. M., E. R. Arganaraz, *et al.* Lentiviral vectors interfering with virus-induced CD4 down-modulation potently block human immunodeficiency virus type 1 replication in primary lymphocytes. *Journal of Virology*, v.78, n.23, p.13072-81. 2004.

Piguet, V., Y. L. Chen, *et al.* Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. *The EMBO journal*, v.17, n.9, p.2472-81. 1998.

Pornillos, O., D. S. Higginson, *et al.* HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *The Journal of Cell Biology*, v.162, n.3, p.425-34. 2003.

Potash, M. J. e D. J. Volsky. Viral interference in HIV-1 infected cells. *Reviews in Medical Virology*, v.8, n.4, p.203-211. 1998.

Powell, D. M., M. C. Amaral, *et al.* HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.94, n.3, p.973-8. 1997.

Prevention, C. D. C. www.cdc.gov. 1994.

Price, D. A., U. C. Meier, *et al.* The influence of antigenic variation on cytotoxic T lymphocyte responses in HIV-1 infection. *Journal Molecular Biology*, v.76, n.10, p.699-708. 1998.

Price, D. H. P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Molecular and Cellular Biology*, v.20, n.8, p.2629-34. 2000.

Pulkkinen, K., G. H. Renkema, *et al.* Nef associates with p21-activated kinase 2 in a p21-GTPase-dependent dynamic activation complex within lipid rafts. *Journal of Virology*, v.78, n.23, Dec, p.12773-80. 2004.

Quinn, T. C. Global burden of the HIV pandemic. *Lancet*, v.348, p.99-106. 1996.

Ramakrishnan, R., M. Hussain, *et al.* Evaluations of HIV type 1 rev gene diversity and functional domains following perinatal transmission. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v.21, n.12, p.1035-45. 2005.

Reeves, J. D., S. Hibbitts, *et al.* Primary Human Immunodeficiency Virus type 2 (HIV-2) Isolates Infect CD4-negative Cells via CCR5 and CXCR4: Comparison with HIV-1 and Simian Immunodeficiency Virus and Relevance Cell Tropism in vivo. *Journal of Virology*, v.73, p.7795-7804. 1999.

Ritola, K., C. D. Pilcher, *et al.* Multiple V1/V2 env variants are frequently present during primary infection with human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*, v.78, n.20, Oct, p.11208-18. 2004.

Robertson, D. L., J. P. Anderson, *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. *Science*, v.288, p.55-57. 2000.

Rohr, O., C. Marban, *et al.* Regulation of HIV-1 gene transcription: from lymphocytes to microglial cells. *Journal of Leukocyte Biology*, v.74, n.5, p.736-49. 2003.

Rothemberg, R. B., M. Scarlett, *et al.* "Oral transmission of HIV". *AIDS*, v.12, p.2095-2105. 1998.

Ruprecht, R. M., T. W. Baba, *et al.* Oral SIV, SHIV, and HIV type I infection AIDS. *Research Human Retroviroses*, v.14, p.S97-S103. 1998.

Santiago, M. L., C. M. Rodenburg, *et al.* SIVcpz in wild chimpanzees. *Science*, v.295, n.5554, p.465. 2002.

Saúde, M. www.saude.gov.br 2005.

Schaeffer, E., R. Geleziunas, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Nef functions at the level of virus entry by enhancing cytoplasmic delivery of virions. *Journal of Virology*, v.75, n.6, p.2993-3000. 2001.

Schroder, A. R., P. Shinn, *et al.* HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, v.110, n.4, Aug 23, p.521-9. 2002.

Schubert, U., L. C. Anton, *et al.* CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *Journal of Virology*, v.72, n.3, p.2280-8. 1998.

Schubert, U., L. A. V. Ferrer-Montie, *et al.* Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS letters*, v.398, n.1, p.12-8. 1996.

Schubert, U. e K. Strebel. Differential activities of the human immunodeficiency virus type 1-encoded Vpu protein are regulated by phosphorylation and occur in different cellular compartments. *Journal of Virology*, v.68, n.4, p.2260-71. 1994.

Schwartz, O., A. Dautry-Varsat, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Nef induces accumulation of CD4 in early endosomes. *Journal of Virology*, v.69, n.1, p.528-33. 1995.

Selik, R. M., S. Y. Chu, *et al.* Trends in infectious diseases and cancers among persons dying of HIV infection in the United States from 1987 to 1992. *Annals of Internal Medicine*, v.123, n.12, p.933-6. 1995.

Sereti, I., H. Imamichi, *et al.* In vivo expansion of CD4CD45RO-CD25 T cells expressing foxP3 in IL-2-treated HIV-infected patients. *The Journal of Clinical Investigation*, v.115, n.7, p.1839-47. 2005.

Shankarappa, R., J. B. Margolick, *et al.* Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*, v.73, n.12, p.10489-502. 1999.

Sharpe, S., W. M. Yau, *et al.* Structure and Dynamics of the HIV-1 Vpu Transmembrane Domain Revealed by Solid-State NMR with Magic-Angle Spinning. *Biochemistry*, v.45, p. 918-933. 2006.

Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, *et al.* Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, v.418, n.6898, p.646-50. 2002.

Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, *et al.* The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nature Medicine*, v.9, p.1404-1407. 2003.

Sherman, M. P., C. M. De Noronha, *et al.* Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *Journal of Virology*, v.75, n.3, p.1522-32. 2001.

Sherman, M. P. e W. C. Greene. Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes and Infection*, v.4, n.1, Jan, p.67-73. 2002.

Shriner, D., A. G. Rodrigo, *et al.* Pervasive genomic recombination of HIV-1 in vivo. *Genetics*, v.167, n.4, p.1573-83. 2004.

Simmons, G., J. D. Reeves, *et al.* CXCR4 as a functional coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages. *Journal of Virology*, v.72, n.10, p.8453-7. 1998.

Simmons, G., D. Wilkinson, *et al.* Primary, Syncytium-inducing Human Immunodeficiency Virus type 1 Infection of Primary Macrophages. *Journal of Virology*, v.70, p.8355-8360. 1996.

Singh, D. K., C. McCormick, *et al.* A simian human immunodeficiency virus with a nonfunctional Vpu (deltavpuSHIV(KU-1bMC33)) isolated from a macaque with neuroAIDS has selected for mutations in env and nef that contributed to its pathogenic phenotype. *Virology*, v.282, n.1, Mar 30, p.123-40. 2001.

Skehel, J. J. e D. C. Wiley. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry*, v.69, p.531-69. 2000.

Somasundaran, M., M. Sharkey, *et al.* Evidence for a cytopathogenicity determinant in HIV-1 Vpr. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.99, n.14, p.9503-8. 2002.

Spira, S., M. A. Wainberg, *et al.* Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.51, n.2, p.229-40. 2003.

Stephens, E. B., C. McCormick, *et al.* Deletion of the vpu sequences prior to the env in a simian-human immunodeficiency virus results in enhanced Env precursor synthesis but is less pathogenic for pig-tailed macaques. *Virology*, v.293, n.2, Feb 15, p.252-61. 2002.

- Stevenson, M. HIV-1 pathogenesis. *Nature Medicine*, v.9, n.7, Jul, p.853-60. 2003.
- Stevenson, M., C. Meier, *et al.* Envelope glycoprotein of HIV induces interference and cytolysis resistance in CD4+ cells: mechanism for persistence in AIDS. *Cell*, v.53, n.3, p.483-96. 1988.
- Stevenson, M., T. L. Stanwick, *et al.* HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *The EMBO journal*, v.9, n.5, p.1551-60. 1990.
- Strebel, K. e S. Bour. Molecular interactions of HIV with host factors. *AIDS*, v.A, n.S, p.13:14. 1999.
- Stremlau, M., C. M. Owens, *et al.* The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*, v.427, n.6977, Feb 26, p.848-53. 2004.
- Stuart, J. D., M. I. Neil, *et al.* The Promiscuous CC Chemokine Receptor D6 Is a Functional Coreceptor for Primary Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) and HIV-2 on Astrocytes. *Journal of Virology*, v.79, August, p.9618-9624. 2005.
- Sun, L., C. M. Finnegan, *et al.* Human β -defensinas suppress Human Immunodeficiency virus infections: potential role in mucosal protection. *Journal of Virology*, v.79, n.22, p. 14318-14329. 2005.
- Swiggard, W. J., C. Baytop, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 can establish latent infection in resting CD4+ T cells in the absence of activating stimuli. *Journal of Virology*, v.79, n.22, p.14179-88. 2005.
- Swingler, S., B. Brichacek, *et al.* HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection. *Nature*, v.424, n.6945, Jul 10, p.213-9. 2003.
- Tanaka, M., T. Ueno, *et al.* Downregulation of CD4 is required for maintenance of viral infectivity of HIV-1. *Virology*, v.311, n.2, Jul 5, p.316-25. 2003.
- Thomas, S. L., M. Oft, *et al.* Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein oligomerization interface. *Journal of Virology*, v.72, n.4, p.2935-44. 1998.
- Tiganos, E., J. Friborg, *et al.* Structural and functional analysis of the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *Virology*, v.251, n.1, p.96-107. 1998.
- Tobiume, M., M. Takahoko, *et al.* Inefficient enhancement of viral infectivity and CD4 downregulation by human immunodeficiency virus type 1 Nef from Japanese long-term nonprogressors. *Journal of Virology*, v.76, n.12, p.5959-65. 2002.

Trachtenberg, E., B. Korber, *et al.* Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. *Nature Medicine*, v.9, n.7, p.928-35. 2003.

Tristem, M., C. Marshall, *et al.* Evolution of the primate lentiviruses: evidence from *vpx* and *vpr*. *The EMBO journal*, v.11, n.9, p.3405-12. 1992.

Turelli, P., V. Doucas, *et al.* Cytoplasmic recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication. *Molecular Cell*, v.7, n.6, p.1245-54. 2001.

Turner, B. G. e M. F. Summers. Structural biology of HIV. *Journal of Molecular Biology*, v.285, p.1-32. 1999.

Unaid. www.unaids.org 2000.

Varthakavi, V., R. M. Smith, *et al.* Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, n.25, p.15154-9. 2003.

www.cdc.gov Cluster of HIV infected adolescents and young adults 2000.

Wassmer, P., C. Chan, *et al.* Role of the L3T4-antigen in T cell activation. II. Inhibition of T cell activation by monoclonal anti-L3T4 antibodies in the absence of accessory cells. *Journal of Immunological*, v.135, n.4, p.2237-42. 1985.

Wei, B. L., V. K. Arora, *et al.* In vivo analysis of Nef function. *Current HIV Research*, v.1, n.1, p.41-50. 2003.

Wei, P., M. E. Garber, *et al.* A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*, v.92, n.4, p.451-62. 1998.

Weiss, R. How does HIV cause AIDS? *Science*, v.260, n.5112, p.1273-9. 1993.

Wigg, M. D., M. T. V. Romanos, *et al.* *Introdução à Virologia Humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. 183-197 p.

Wiktor, S. Z., E. Ekpini, *et al.* Prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Africa. *AIDS*, v.11, p. 79-87. 1997.

Willbold, D., S. Hoffmann, *et al.* Secondary structure and tertiary fold of the human immunodeficiency virus protein U (Vpu) cytoplasmic domain in solution. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, v.245, n.3, p.581-8. 1997.

Willey, R. L., F. Maldarelli, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *Journal of Virology*, v.66, n.12, p.7193-200. 1992.

Worobey, M., M. L. Santiago, *et al.* Origin of AIDS: contaminated polio vaccine theory refuted. *Nature*, v.428, n.6985, p.820. 2004.

Wu, Y. e J. W. Marsh. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science*, v.293, n.5534, p.1503-6. 2001.

Yang, C., D. Pieniazek, *et al.* Detection of Phylogenetically Diverse Human Immunodeficiency Virus Type 1 Groups M and O from Plasma by Using Highly Sensitive and Specific Generic Primers. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.8, p.2581-2586. 1999.

Yang, S., Y. Sun, *et al.* The Multimerization of Human Immunodeficiency Virus Type I Vif Protein. A REQUIREMENT FOR Vif FUNCTION IN THE VIRAL LIFE CYCLE. *The Journal of Biological Chemistry*, v.276, n.7, p.4889-4893. 2001.

Yerly, S., L. Kaiser, *et al.* Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. *Lancet*, v.354, n.9184, p.729-33. 1999.

Younai, F. S. J. "Oral HIV transmission". *Journal - California Dental Association*, v.29, p.142-148. 2001.

Yu, X., Y. Yu, *et al.* Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*, v.302, p.1056-1060. 2003.

Zajac, A. J., J. N. Blattman, *et al.* Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *The Journal of Experimental Medicine*, v.188, n.12, p.2205-13. 1998.

Zhang, Z., T. Schuler, *et al.* Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science*, v.286, n.5443, p.1353-7. 1999.

Zheng, S., J. Strzalka, *et al.* Comparative structural studies of Vpu peptides in phospholipid monolayers by x-ray scattering. *Biophysical Journal*, v.84, n.4, p.2393-415. 2003.

Zhu, P. C., E., J. J. Bess, *et al.* Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, n.26, p.15812-7. 2003.

8. Apêndice

Apêndice 1a.

Seqüências de nucleotídeos de fragmentos amplificados a partir de DNA genômico de células de sangue periférico isolados de pacientes no estágio inicial da infecção pelo HIV-1.

➤ **Paciente 1 Inicial – clone 1.1**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA GCGGAGACAGCGACGAAGTGCTCCTCAAGACAGTCAGAGTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATATTAGCACCAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTATAGAATATAGGAAAAATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGATA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGAAGAATTATCAGCGCTTG
TGGAGATGGGGCACCATCCTCCTGGGGACATTAATGATCTGTAGTGCTGCAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTAT
GGGGTACCTGTGTGGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGGTG

➤ **Paciente 1 Inicial - clone 1.2**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCCTCAAGACAGTCAGAGTCATCAAGTTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATATTAGCACCAGTAGCATTAGTAGTAGCAATA
ATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTATAGAATATAGGAAAAATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGAT
AATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGAAGAATTATCAGCGCT
TGTGGAGATGGGGCACCATCCTCCTGGGGACATTAATGATCTGTAGTGCTGCAGAAAAATTGTGGGCCACAGTCTAT
TATGGGGTACCTGTGTGGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGGTG

➤ **Paciente 1 Inicial – clone 1.5**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCCTCAAGACAGTCAGAGTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATATTAGCACCAGTAGCGTTAGTAGTAGCAATAA
TAGTAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTATAGAATATAGGAAAAATTAAGACAAAGAAAAATAGGCAGGATA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCGGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGAAGAATTATCAGCGCTT
GTGGAGATGGGGCACCATCCTCCTGGGGACATTAATAATCTGTAGTGCTGCAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGGTG

➤ **Paciente 1 Inicial – clone 1.7**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA GCGGAGACAGCGACGAAGTGCTCCTCAAGACAGTCAGAGTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATATTAGCACCAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTATAGAATATAGGAAAAATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGATA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGCGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGAAGAATTATCAGCGCTT
GTGGAGATGGGGCACCATCCTCCTGGGGACATTAATGATCTGTAGTGCTGCAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGGTG

➤ **Paciente 1 Inicial – clone 1.10**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA GCGGAGACAGCGACGAAGTGCTCCTCATGACAGTCAGAGTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAGTATTAGCACCAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTATAGAATATAGGAAAAATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGATA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGAAGAATTATCAGCGCTT
GTGGAGATGGGGCACCATCCTCCTGGGGACATTAATGATCTGTAGTGCTGCAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGGTG

➤ **Paciente 1 Inicial – clone 1.11**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCCTCAAGACAGTCAGAGTCATCAAATTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTGATATATCAGCACTAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTACTCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGATA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCTGGAAGAATTATCAGCGCTTG
TGGAGATGGGGCACCATCCTCTGGGGATATTAATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTAT
GGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Inicial – clone 1.14**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGTGACGAAGAGCTCCTCAAGACAGTCAGAGTCTCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATATTAGCACCAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGATA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGAAGAATTATCAGCGCTT
GTGGAGATGGGGCACCATCCTCTGGGGACATTAATGATCTGTAGTGCTGCAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Inicial – clone 1.15**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGTGCTCCTCAAGACAGTCAGAGTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATATTAGCACCAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGATA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGAAGAATTATCAGCGCTT
GTGGAGATGGGGCACCATCCTCTGGGGACATTAACGATCTGTAGTGCTGCAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Inicial – clone 1.16**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACCAGCGACGAAGAACTCCTCAAGACAGTCAGAGTCATCAAATT
TCTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTGATATATCAGCACTAGTAGCATTAGTAGTAGCAATA
ATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTACTCATAGAATATAGGAAAATATCAAGACAAAGAAAAATAGACAGGA
TAATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCTGGAAGAATTATCAGCGCT
TGTGGAGATGGGGCACCATCCTCTGGGGATATTAATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Inicial – clone 1.3**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCCTCGAGACAGTCAGAGTCATCAAGTT
TCTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATATTAGCACCAGTAGCATTAGTAGTAGCAAT
AATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGA
TAATTGATAGAGTAAGAGAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGAAGAATTATCAGCGC
TTGTGAAAATGGGGCACCATCCTCTGGGGACATTAATGATCTGTAGTGCTGCAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTAT
TATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCAACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Inicial – clone 1.21**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGTGCTCCTCAAGACAGTCAGAGTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATATTAGCACCAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGATA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGAAGAATTATCAGCGCTTG
TGGAGATGGGGCACCATCCTCTGGGGACATTAATGATCTGTAGTGCTGCAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTAT
GGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACACTCTATTTTGGTG

➤ **Paciente 1 Inicial - clone 1.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCCTCAAGACAGTCAGAGTCATCAAGTTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATATTAGCACCAGTAGCATTAGTAGTAGCAATA
 ATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTTATAGAATATAGGAAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGAT
 AATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGAAGAATTATCAGCGCT
 TGTGGAGATGGGGCACCATCCTCCTGGGGACATTAATGATCTGTAGTGCTGCAAAAAATTGTGGGCCACAGTCTAT
 TATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Inicial - clone 1.23**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCCTCAAGACAGTCAGAGTCATCAAGTTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATATTAGCACCAGTAGCGTTAGTAGTAGCAATA
 ATAGTAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTTATAGAATATAGGAAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGGCAGGAT
 AATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCGGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGAAGAATTATCAGCGCT
 TGTGGAGATGGGGCACCATCCTCCTGGGGACATTAATAATCTGTAGTGCTGCAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Inicial - clone 1.24**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA GCGGAGACAGCGACGAAGTGCTCCTCAAGACAGTCAGAGTCATCAAGTTT
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATATTAGCACCAGTAGCATTAGTAGTAGCAATA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTTATAGAATATAGGAAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGATA
 ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGCGGCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGAAGAATTATCAGCGCT
 GTGGAGATGGGGCACCATCCTCCTGGGGACATTAATGATCTGTAGTGCTGCAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Inicial - clone 4.13**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCCTCAAGACAGTCAGACTCATCAAGTTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATAATAACAATAGTAGCATTGTAGTAGCAATA
 ATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTCATAGAATATAGGAAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGATT
 AATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGCGAGGGAGATCAGGAGGAATTGTCAGCACT
 TGTGGAGATGGGGCACCATGCTCCTAGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTGCAGAACAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCGGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Inicial - clone 4.15**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCCTCAAGACAGTCAGACTCATCAAGTTT
 ACTATCAAAGTAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATAACAACAATAGTAGCATTGTAGTAGCAATA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTCATAGAATATAGGAAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTA
 ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGAGGGATTGTCAGCACT
 GTGGAGATGGGGCACCATGCTCCTGGGATGTTGATGATCTGTAGTGCTGCAGAACAAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Inicial - clone 4.17**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCCTCAAGACAGTCAGACTCATCAAGTTT
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATAATAACAATAGTAGCATTGTAGTAGCAATA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTCATAGAATATAGGAAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTA
 ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGCGAAGGAGATCAGGAGGAATTGTCAGCACT
 GTGGAGATGGGGCACCATGCTCCTGGGATGTTGATGATCTGTGGTGCTGCAGAACAAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
 TGGGGTGCCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Inicial – clone 4.20**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCCTCAAGACAGTCAGACTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATAATAACAATAGTAGCATTGTAGTAGCAATAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGATTA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGCGAGGGAGATCAGGAGGAATTGTCAGCACTT
GTGGAGATGGGGCACCATGCTCCTAGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTGCAGAACAATTGTGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCGGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Inicial – clone 4.21**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCCTCAAGACAGTCAGACTCATCAAGTTTC
ACTATCAAAGTAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATAACAACAATAGTAGCATTGTAGTAGCAATAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGAGGGATTGTCAGCACTT
GTGGAGATGGGGCACCATGCTCCTGGGATGTTGATGATCTGTAGTGCTGCAGAACAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Inicial – clone 4.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCCTCAAGACAGTCAGACTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATAATAACAATAGTAGCATTGTAGTAGCAATAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGCGAAGGAGATCAGGAGGAATTGTCAGCACTT
GTGGAGATGGGGCACCATGCTCCTGGGATGTTGATGATCTGTGGTGCTGCAGAACAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
TGGGGTGCCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Inicial – clone 4.23**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCCTCAAGACAGTCAGACTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATAATAACAATAGTAGCATTGTAGTAGCAATAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGATTA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGCGAGGGAGATCAGGAGGAATTGTCAGCACTT
GTGGAGATGGGGCACCATGCTCCTAGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTGCAGAACAATTGTGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCGGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 3 Inicial – clone 7.12**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 3 Inicial - clone 7.13**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 3 Inicial – clone 7.5**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCACCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 3 Inicial – clone 7.21**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 3 Inicial – clone 7.10**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCCAGACTCCACCAAGCT
 TTCTATATCCAAGCAGTTAGTAGTACCATGTC AATGCCAACCTATAATAGTAGCAATTAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAAT
 AATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTNATCATAGGATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTG
 ATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGGGTGAA
 ATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCT
 GTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 3 Inicial – clone 7.15**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCACCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 3 Inicial – clone 7.20**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 3 Inicial - clone 7.21**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 3 Inicial – clone 7.23**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCACCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 3 Inicial – clone 7.24**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 4 Inicial – clone 15.2**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATNATTAGTAGCCATTAGTTGCCATTAGTAGTAGCAATA
 ACAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTT
 AATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATG
 GGGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCT
 ATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 4 Inicial – clone 15.7**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 TCTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATTAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTT
 AATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATG
 GGGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCT
 ATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 4 Inicial – clone 15.9**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGGTGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGCGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 4 Inicial – clone 15.12**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 4 Inicial – clone 15.16**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 4 Inicial – clone 15.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 4 Inicial – clone 15.20**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATTAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTT
 AATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATG
 GGGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCT
 ATATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 4 Inicial – clone 15.21**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGGTGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGCGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 4 Inicial – clone 15.24**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 5 Inicial – clone 18.1**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAGAACAGTGAGGCTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTATATGTAATGCAATCCTTACAGATATTTGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAGCA
 ATAATAGCAATAATTGTTTGGTCCATAGTACCTATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGATAGGTT
 AATTGATAGAAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGAT
 GGGGGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCT
 TATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 5 Inicial – clone 18.3**

TTAGGCATCTCCTTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGACAGTGAGGCTCATCAAGCTT
CTGTATCAAAGCAGTAAGTAGTATATGTAATGCAATCCTTAGAGATATTTGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAGCA
ATAGTAGCAATAATTGTTCCGTCCATAGTACTTATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAATAGATAGGTT
AATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGCGCAATGAGAGTGAGGGGGATCAAGAAGAATTATCAGCACT
TGTGGAGACGGGGCACCTTGCTGTGGAGATGGGGCATCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAA
AAATTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 5 Inicial – clone 18.4**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGATCCTCAAGACAGTGAGACTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCCTTAGAGATATTTGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAGCAA
TAATAGTAATAATTGTTTGGTCCATAGTACTTATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAATAGATAGGTTA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGGGATCAAGAAGAATTGTCAGCACTT
GTGGAGACGGGGCACCTTGCTGTGGAGATGGGGCATCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAA
AATTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 5 Inicial – clone 18.20**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAGAACAGTGAGGCTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTATATGTAATGCAATCCTTACAGATATTTGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAGCA
ATAATAGCAATAATTGTTTGGTCCATAGTACTTATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAATAGATAGGTT
AATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGAT
GGGGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAATTGTGGGTCACAGTC
TATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 5 Inicial – clone 18.21**

TTAGGCATCTCCTTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGACAGTGAGGCTCATCAAGCTT
CTGTATCAAAGCAGTAAGTAGTATATGTAATGCAATCCTTAGAGATATTTGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAGCA
ATAGTAGCAATAATTGTTCCGTCCATAGTACTTATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAATAGATAGGTT
AATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGCGCAATGAGAGTGAGGGGGATCAAGAAGAATTATCAGCACT
TGTGGAGACGGGGCACCTTGCTGTGGAGATGGGGCATCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAA
AAATTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 5 Inicial – clone 18.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGATCCTCAAGACAGTGAGACTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCCTTAGAGATATTTGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAGCAA
TAATAGTAATAATTGTTTGGTCCATAGTACTTATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAATAGATAGGTTA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGGGATCAAGAAGAATTGTCAGCACTT
GTGGAGACGGGGCACCTTGCTGTGGAGATGGGGCATCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAA
AATTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 5 Inicial – clone 18.23**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGATCCTCAAGACAGTGAGACTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCCTTAGAGATATTTGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAGCAA
TAATAGTAATAATTGTTTGGTCCATAGTACTTATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAATAGATAGGTTA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGGGATCAAGAAGAATTGTCAGCACTT
GTGGAGACGGGGCACCTTGCTGTGGAGATGGGGCATCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAA
AATTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Inicial – clone 21.A**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTATATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Inicial – clone 21.B**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTGAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Inicial – clone 21.13**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTA
 TTATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Inicial – clone 21.10**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Inicial – clone 21.8**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATAG
 CAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAATGA
 TAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGGT
 GGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATTATG
 GGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Inicial – clone 21.9**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGACAGTGAGGCTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTATATGTAATGCAATCCTTAGAGATATTTGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAGCA
 ATAATAGCAATAATTGTTTGGTCCATAGTACTTATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGATAGGTT
 AATTGATAGAAATAAGAGAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAGGGGGATCAAGAAGAATTATCAGCACT
 TGTGGAGACGGGGCACCCTTGTGTGGAGATGGGGCATATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAA
 AAATTGTGGGTACAGTCTATTATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Inicial – clone 21.14**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Inicial – clone 21.29**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTATATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Inicial – clone 21.20**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTGAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Inicial – clone 21.25**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGGTACAGTCTA
 TTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Inicial – clone 21.21**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Inicial – clone 21.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATAG
 CAATAGTTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTGA
 TAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGGT
 GGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATTATG
 GGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Inicial – clone 24.5**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAACGGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTTAATGCAACCTATAATTAGTAGCCATTAGTAGCATTAGTAGCAATAA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTA
 ATTGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGG
 GGGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTA
 TTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Inicial – clone 24.6**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAACGGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTTATTCACCTAATATTATTANCATTAGTACCATTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGGCAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGCCACAGTCTAT
 TATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Inicial – clone 24.7**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAACGGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTTATTCACCTAATATTGTTACCATTATNACCATTATTAGTAGCAATAATA
 TAGCGATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 GATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGCGAAGGAGAAGTATCAGCACGTGTGGAGATGGGG
 GTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Inicial – clone 24.8**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAACGGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTTATGCGCACCTATTATTATAACCATTAAACCATTATTAGTACCAATAATA
 TAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 GATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGG
 GTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Inicial – clone 24.9**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAACGGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCCAAGCAGTAAGTAGTACATGTTAATGCAACCTATAATAGTAGCTATTAGTAGCATTATTAGTAGCAATA
 ATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTT
 AATTGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGG
 GGGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCT
 ATATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Inicial – clone 24.10**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAACGGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Inicial – clone 24.1**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGNCAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Inicial – clone 24.2**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTA
TCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATAATAGCAATA
GTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTGATAGACTAATA
GAAAGAGCAGGAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGGTGGAAATGGGGCACC
TGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGA
AGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Inicial – clone 24.4**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCCTCAAGACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTA
TCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTTTACAAATATTAGCACCAGTAGCATTAGTAGTAGCAGCAATAATAGCA
ATAGTTGTGTGGACCATAGTATTCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTGATAGAATA
AGAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGCGAAGGAGACCAGGAAGAATTATCAGCGTTGTGGAGATGGGGCACC
ATGCTCCTTGGGATGTTGATGATTTGTAGTGCAGACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGA
AAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Inicial – clone 24.26**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATTAGTAGCCATTAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTA
ATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGG
GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTA
TTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Inicial – clone 24.23**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTTATCCACCTAATATTATTANCATTAGTACCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGGCAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGCCACAGTCTAT
TATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Inicial – clone 24.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTTATCCACCTAATATTGTTACCATTATNACCATTATTAGTAGCAATAATA
TAGCGATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
GATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGCGAAGGAGAAGTATCAGCACGTGTGGAGATGGGG
GTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATTA
TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Inicial – clone 24.27**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTTATGCCACCTATTATTATAACCATTAAACCATTATTAGTACCAATAATAA
 TAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAATT
 GATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGG
 GTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Inicial – clone 24.21**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCCAAGCAGTAAGTAGTACATGTTAATGCCACCTATAATAGTAGCTATTAGTAGCATTAGTAGTAGCAATA
 ATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTT
 AATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATG
 GGGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCT
 ATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Inicial – clone 29.2.11**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACCAGCGAACGAAGAGCTTCATCAGAACAGTCAGACTTCACC
 CAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACCATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAG
 CAATAATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGAC
 AGGTTAATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGG
 AGATGGGGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCAC
 AGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Inicial – clone 29.1.14**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCAATCAAGCT
 TCTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAAT
 AATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTA
 ATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGG
 GGGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTA
 TTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Inicial – clone 29.3**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTACCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGCGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Inicial – clone 29.4**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATGGTAATCACAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Inicial – clone 29.15**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAACGGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Inicial – clone 29.14**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAACGGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTACCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGCGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Inicial – clone 29.1**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAACGGGAGACAGCGACGAAGGGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTACCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATGGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGACAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGGTCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Inicial – clone 29.2**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAACGGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTA
 TCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATAATAGCAATA
 GTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTGATAGACTAATA
 GAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGGTGGAAATGGGGCACC
 TGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGA
 AGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Inicial – clone 29.10**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAACGGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTGTCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATACTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Inicial – clone 29.23**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAACGGGAGACCAGCGAACGGAAGAGCTTCATCAGAACAGTCAGACTTCACC
 CAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACCATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAG
 CAATAATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGAC
 AGGTTAATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGG
 AGATGGGGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCAC
 AGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Inicial – clone 29.26**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCAATCAAGCT
TCTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAAT
AATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTA
ATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGG
GGGTGAAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTA
TTATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Inicial – clone 29.24**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTACAAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGCGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
ATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Inicial – clone 29.27**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
ATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Inicial – clone 29.29**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
ATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Inicial – clone 32.14**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACCAGCGACGAAGAGCTTCATCAGGACCAGTCAGACTTCATCAA
GCTTTTTTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATA
AATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGG
TTAATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGA
TGGGGTGGAAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGT
CTATTATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Inicial – clone 32.2.1**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACCAGCGACGAAGAGCTCAATCAGGACCAGTCCAGACTCATCC
AAGCTTTTTTATCAAAGCCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAG
CAATAATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGAC
AGGTTAATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGG
AGATGGGGTGGAAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAGTTGTGGGTCAC
AGTCTATTATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Inicial – clone 32.2.6**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACCAGTCAGACTCATCAAGCT
TTTTTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGCAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAAT
AATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTA
ATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGG
GGGTGAAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTA
TTATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Inicial – clone 32.2.7**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGGAGAGCTCATCAGAACCAGTCAGACTCATCAAGCT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATT
ATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Inicial – clone 32.2.8**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACCAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATT
ATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Inicial – clone 32.2.9**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACCAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCGATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGGATGGATCTGGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAG
TCTATTATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Inicial – clone 32.2.10**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACCAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGGATGGATCTGGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTC
TATTATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Inicial – clone 32.1**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACCAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATT
ATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Inicial – clone 32.15**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACCAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
ATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Inicial – clone 32.21**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACCAGCGACGAAGAGCTTCATCAGGACCAGTCAGACTTCATCAA
GCTTTTTTTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAAT
AATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGG
TTAATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGA
TGGGGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGT
CTATTATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Inicial – clone 32.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACCAGCGACGAAGAGCTCAATCAGGACCAGTCCAGACTCATCC
AAGCTTTTTTTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAG
CAATAATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGAC
AGGTTAATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGG
AGATGGGGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTAC
AGTCTATTATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Inicial – clone 32.23**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCT
TTTTTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGCAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAAT
AATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTA
ATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGG
GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTA
TTATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Inicial – clone 32.20**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGGAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGCAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
ATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Inicial – clone 35.1**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAAGCTCCTCACGACAGTCCGACTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAATGCATGTAATGCAACCTTTAGTAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGTAGCAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCCTAGTAGGCATAGAATATAGCATAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGATTA
ATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGATGAGTTGTCAGCACTTG
TTCCTTTGGATGTTGTTGATCCGTAGTGCTGCAGAAAGTTGTGGGTACAGTCTATTATGGGTACCTGTGTGGAAG
GAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Inicial – clone 35.2**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCCGACTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGTAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGTAGCAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCCTAGTAGGCATAGAATATAGCAAAATATTAAGACAAGGAAAAATAGACAGATTA
ATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGCTCAGGATGAGTTGTCAGCACTTG
TTCCTTTGGATGTTGTTAATCTGTAGTGCTGCAGAAGAGTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAG
GAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Inicial – clone 35.3**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCCGACTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGTAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGTAGCAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCATAGTAGGCATAGAATATAGGAACTATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGATT
AATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGGGTGAAGGAGATCAGGATGAGTTGTCAGCACT
GTTTCCTTTGGATGTTGTTGATCTGTAGTGCTGCAGAAGAGTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGA
GGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Inicial – clone 35.4**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCCGACTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGTAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGTAGCAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCCTAGTAGGCATAGAATATAGCAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGATT
AATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGATGAGCTGTAGCACT
TGTTTCCTTTGGATGTTGTTGATCTGTAGTGCTGCAGAAGAGTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGA
AGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Inicial – clone 35.6**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCCGACTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGTAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGTAGCAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCCTAGTAGGCATAGAATATAGCAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGATT
AATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGATGAGTTGTCAGCACT
GTTTCCTTTGGATGTTGTTGATCTGTAGTGCTGCAGAAGAGCTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGCACCTGTGTGGA
GGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Inicial – clone 35.8**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCCGACTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGTAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGTAGCAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCCTAGTAGGCATAGAATATAGCAAAATATTAAGACGAAGAAAAATAGACAGATT
AATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGATGAGTTGTCAGCACC
TGTTTCCTTTGGATGTTGTTGATCTGTAGTGCTGCAGAAGAGTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGA
AGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Inicial – clone 35.9**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCCGACTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGTAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGCAATAA
TAGCAATAGTTGTGTGGACCCTAGTAGGCATAGAATATAGCAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGATTAATT
GACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGATGAGTTGTCAGCACTTGTT
CTTTGGATGTTGTTGATCTGTAGTGCTGCAGAAGAGTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAA
GCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Inicial – clone 35.10**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCCGAATCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGTGATATCAGCAATAGTAGCTCTAGTAGTAGTAGCAA
TAATAGCAATAGCTGTGTGGACCTTAGTAGGCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGATT
AATTGAAAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACTGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGATCAAGATGATTTGGCAGCACTT
GTTCCCTTGGGATGTTGTTGATCTGTAGTGCTGCAGAACAGTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGA
GGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Inicial – clone 35.24**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCCGACTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGTAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGTAGCAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCTTAGTAGGCATAGAATATAGCAAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGATTA
ATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGCTCAGGATGAGTTGTCAGCACTTG
TTCCTTTGGATGTTGTTAATCTGTAGTGCTGCAGAAGAGTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGA
GAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Inicial – clone 35.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCCGACTCATCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGTAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGTAGCAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCATAGTAGGCATAGAATATAGGAACTATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGATT
AATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGGGTGAAGGAGATCAGGATGAGTTGTCAGCACTT
GTTCCCTTGGATGTTGTTGATCTGTAGTGCTGCAGAAGAGTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGA
GGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 11 Inicial – clone 38.2.2 (faltou AT)**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAACAGCTCCTCAAGACAGTCAGACTCATCAAGTTTC
TCTACCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTTTACAGATAGTAGCAGTAGTAGCATTAGTAGTAGGAGCAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCATAGTATTCATAGAATATAAGAAAATATTAAGACAAAAAATAGACAGGTTAA
TTGATAGAATAATAGAAAAGAGCGGAAGATAGTGGCAATGAAAGCGAAGGAGACCAGGAAGAATTATCAGCACTTGT
GGAGATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATGTTGATGATCTGTAGTGCTGCAGAACAATTGTGGGTCACAGTCTATTATG
GGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 11 Inicial – clone 38.2.3**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGACAGTCAGACTCATCAAGCTTCT
CTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATAAT
AGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTG
ATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGG
TGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTNCAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTAT
GGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 11 Inicial – clone 38.2.4**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAATGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 11 Inicial – clone 38.2.6**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 11 Inicial – clone 38.4**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAACAGCTCCTCAAGACAGTCAGACTCATCAAGTTTC
 TCTACCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTTTACAGATAGTAGCAGTAGTAGCATTAGTAGTAGGAGCAA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCATAGTATTCATAGAATATAAGAAAATATTAAGACAAAAAATAGACAGGCTA
 ATTGATAGAATAATAGAAAAGAGCAGAAGATAGTGCCAATGAAAGCGAAGGAGACCAGGAAGAATTATCAGCACTTG
 TGGAGATGAGGCACCATGCTCCTTGGGATGTTGATGATCTGTAGTGCTGCAGAACAACTGTGGGTCACAGTCTATT
 GGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 11 Inicial – clone 38.27**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGGGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 11 Inicial – clone 38.2.9**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTGGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 11 Inicial – clone 38.2.10**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATGGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 11 Inicial – clone 38.2.1 (faltou AT)**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAACAGCTCCTCAAGACAGTCAGACTCATCAAGTTTC
 TCTACCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTTTACAGATAGTAGCAGTAGTAGCATTAGTAGTAGGAGCAA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCATAGTATTCATAGAATATAAGAAAATATTAAGACAAAAAATAGACAGGTTA
 ATTGATAGAATAATAGAAAAGAGCAGAAGATAGTGCCAATGAAAGCGAAGGAGACCAGGAAGAATTATCAGCACTTG
 TGGAGATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATGTTGATGATCTGTAGTGTTGCAGAACAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 GGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 12 Inicial – clone 41.46**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAGAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 12 Inicial – clone 41.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCGGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 12 Inicial – clone 41.5**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 12 Inicial – clone 41.11**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCGTAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATTAGCACTTGTGGAGATGGG
 GTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 12 Inicial – clone 41.15**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 12 Inicial – clone 41.3**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 12 Inicial – clone 41.4**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAAGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 12 Inicial – clone 41.13**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAGGGAGAAGTATTAGCACTTGTGGAGATGGG
 GTGAAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 12 Inicial – clone 41.21**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAGAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 12 Inicial – clone 41.23**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCGGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 12 Inicial – clone 41.26**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGAAATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACTCTATTTGTG

Apêndice 1a: **Seqüência de nucleotídeos amplificados.** A cor verde representa o “*primer forward*” e o **ATG** na cor verde representa o início do exon-1 da proteína Rev. A cor em preto após o **ATG**, em azul claro representa o início da proteína Vpu e a **ATG**, na cor azul escuro representa uma pequena porção da proteína Env.

Apêndice 1b.

Seqüências de nucleotídeos de fragmentos amplificados a partir de DNA genômico de células de sangue periférico isolados de pacientes no estágio inicial da infecção pelo HIV-1.

➤ **Paciente 1 Tardio – clone 3.1.3**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAATGGGGCACCATCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGGGGTCACAATCTATTA
TGGGGTACCTGCGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Tardio – clone 3.1.4**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Tardio – clone 3.1.8**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCT
CTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATACTAGCATTAGTAGTAGCAATAATAAT
AGCAATAGTTGTGTGGTCCAAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTG
ATAGACTAATAGAAAGAGCTGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGGT
GGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGGGGTTACAGTCTATTATG
GGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Tardio - clone 3.1.10**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCGACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTCGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGGGGTCACAGTCTAT
TATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Tardio – clone 3.1.11**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAGACTC
ATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTA
GCAATAATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCAAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGA
CAGGTTAATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTG
GAGATGGGGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGGGGTCA
CAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Tardio – clone 3.2.1**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 GATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGG
 TGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATT
 TGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Tardio – clone 3.1.1**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATT
 ATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Tardio – clone 3.1.2**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTTAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTAGCAATGAGAGTGTAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGG
 GTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATTA
 TGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Tardio – clone 3.2.2**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAAAACCTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATT
 ATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Tardio – clone 3.2.11**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGCGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATT
 ATGGGGCACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Tardio – clone 3.2.0**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAACTCTATTA
 TGGGTACCTGCGTGGAAGGAAGCAACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Tardio – clone 3.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Tardio 1 – clone 3.25**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGACAGTCAGACTCATCAAGCTTCT
 CTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATACTAGCATTAGTAGTAGCAATAATAAT
 AGCAATAGTTGTGTGGTCCAAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTG
 ATAGACTAATAGAAGGAGCTGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGGT
 GGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTTACAGTCTATTATG
 GGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 1 Tardio - clone 3.28**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCGACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTCGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTAT
 TATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Tardio – clone 6.26**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAGTATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCGGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Tardio – clone 6.15**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Tardio – clone 6.27**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Tardio – clone 6.2**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTACCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Tardio – clone 6.3**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGCAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Tardio – clone 6.4**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGCAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Tardio – clone 6.11**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 NTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Tardio – clone 6.13**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Tardio – clone 6.14**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTCGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Tardio – clone 6.21**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAGTATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCGGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Tardio – clone 6.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Tardio – clone 6.23**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 2 Tardio – clone 6.24**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTACCAAAGCAGTAAGTGGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 3 Tardio – clone 9.1**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 3 Tardio - clone 9.3**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGATCTCCTCAAGACAGTGAGATTCATCAAGTTCC
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTGCATGTAATGCTGCCTTTAAATATATTAGTAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAGTAAT
 ACTAGCAATAGTTGTGTGGTCTATAGTATTCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAGAAATAGACAGGTTAA
 TTGATAGAATAACAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGGGATCAGGAAGAATTGTAGCACTGGT
 GGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGTATTAATGGTATGTAGTGCTGCAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTATG
 GGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 3 Tardio – clone 9.14**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATGGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCCGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 3 Tardio – clone 9.15**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 3 Tardio – clone 9.8**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 3 Tardio – clone 9.11**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 3 Tardio – clone 9.13**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGATCTCCTCAAGACAGTGAGATTCATCAAGTTCC
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTGCATGTAATGCTGCCTTTAAATATATTAGTAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAGTAAT
 ACTAGCAATAGTTGTGTGGTCTATAGTATTCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAGAAATAGACAGGTTAA
 TTGATAGAATAACAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGGGATCAGGAAGAATTGTAGCACTGGT
 GGAAATGGGGGACCATGCTCCTTGGTTATTAATGGTATGTAGTGCTGCAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATTATG
 GGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 3 Tardio – clone 9.12**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGATCTCCTCAAGACAGTAGATTCATCAAGTTCC
 CTATCAAAGCAGTAAGTAGTGCATGTAATGCTGCCTTTAAATATATTAGTAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAGTAAT
 ACTAGCAATAGTTGTGTGGTCTATAGTATTCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAGAAATAGACAGGTTAA
 TTGATAGAATAACAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGGGATCAGGAAGAATTGTAGCACTGGT
 GGAAATGGGGGACCATGCTCCTTGGTTATTAATGGTATGTAGTGCTGCAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATTATG
 GGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 4 Tardio – clone 17.5**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAGAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 4 Tardio – clone 17.6**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTACAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 4 Tardio – clone 17.9**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 4 Tardio – clone 17.12**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAAAACAGTCAGACTCATCAAGCCT
 CTCTATCAAAGCAATAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 4 Tardio – clone 17.40**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAGATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 4 Tardio – clone 17.43**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTC
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 TAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATGGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 GATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGG
 GTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 5 Tardio – clone 20.C**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 5 Tardio – clone 20.F**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCACAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCT
 ATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 5 Tardio – clone 20.H**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGATCTCCTCAAGACAGTCAGACTCATCAAGCTTC
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTAGAAAATATTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAGCAA
 TAATAGCAATAGTTGTTTGGTCCATAGTATTCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAATGGAAAATAGACAGGTTA
 ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGGGATCAAGAAGAATTGTCAGCACTT
 GTGGAGATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 5 Tardio – clone 20.20**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 5 Tardio – clone 20.25**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCACAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCT
 ATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 5 Tardio – clone 20.26**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGATCTCCTCAAGACAGTCAGACTCATCAAGCTTC
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTAGAAAATATTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAGCAA
 TAATAGCAATAGTTGTTTGGTCCATAGTATTCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAATGGAAAATAGACAGGTTA
 ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGGGATCAAGAAGAATTGTCAGCACTT
 GTGGAGATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 5 Tardio – clone 20.23**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCACAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCT
 ATTAGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 5 Tardio – clone 20.24**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGATCTCCTCAAGACAGTCAGACTCATCAAGCTTC
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAGCAA
 TAATAGCAATAGTTGTTGGTCCATAGTATTCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAATGGAAAATAGACAGGTTA
 ATTGATAGAATAAGAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGGGATCAAGAAGAATTGTCAGCACTT
 GTGGAGATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Tardio – clone 23.5**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Tardio – clone 23.12**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCACCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAATAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Tardio – clone 23.1**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACGGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Tardio – clone 23.2**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGGCCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Tardio – clone 23.15**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACCCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Tardio – clone 23.16**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Tardio – clone 23.21**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Tardio – clone 23.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCACCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAATAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Tardio – clone 23.25**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACGGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Tardio – clone 23.26**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 6 Tardío – clone 23.29**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACCCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Tardío – clone 26.2**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAATTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GTGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Tardío – clone 26.3**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCACCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTACAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Tardío – clone 26.4**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCACCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACTACAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 TAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 GATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGG
 GTGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Tardío – clone 26.5**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAATTATCAGCACTTGTGGAGATGGGG
 GTGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Tardío – clone 26.10**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCACCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTACAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Tardio – clone 26.11**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGGTGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Tardio – clone 26.12**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAAAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGTGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGGTGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Tardio – clone 26.20**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAATTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Tardio – clone 26.23**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCACCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTACAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Tardio – clone 26.24**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCACCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACTACAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 TAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 GATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 7 Tardio – clone 26.27**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAATTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACACAGTCTATTA
 TGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Tardio – clone 31.1**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGCACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTT
TATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATAATA
GCAATAGTTGTGTGNTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTGA
TAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGGGT
GGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGGTATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTATG
GGGTGCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Tardio – clone 31.7**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCACCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCNACAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Tardio – clone 31.11**

TTAGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCT
CTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATAAT
AGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTG
ATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGGG
TGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTAT
GGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Tardio – clone 31.20**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGCACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTTATC
AAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATAATAGCAATAGT
TGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTGATAGACTAATAGA
AAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGGGTGGAAATGGGGCACCATG
CTCCTTGGGGTATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTGCCTGTGTGGAAGGAAG
CAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Tardio – clone 31.21**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCACCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCNACAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Tardio – clone 31.25**

TTAGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCT
CTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATAAT
AGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTG
ATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGGG
TGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTAT
GGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 8 Tardío – clone 31.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGCACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTTTATC
AAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATAATAGCAATAGT
TGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTGATAGACTAATAGA
AAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGGGGTGAAAATGGGGCACCATG
CTCCTTGGGGTATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTTGGGGTCACAGTCTATTATGGGGTGCTGTGTGGAAGGAAG
CAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 early – clone 32.15**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACCAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTTGGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Tardío – clone 34.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGTGACGAAGAGCTCCTCAAGACAGTCAGAGTCTTCAAGTTTC
TCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTACAAATATTAGCACCAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAA
TAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTATTATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGATA
ATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGAAGAATTATCAGCGCTT
GTGGAGATGGGGCACCATCCTCCTGGGGACATTAATGATCTGTAGTGCTGCAGAAAAATTTGGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Tardío – clone 34.23**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACCAGCGACGAAGAACTCCTCAANACAGTCAGAGTCATCAAATT
TCTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAATCTTTTGATATATCAGCACTAGTAGCATTAGTAGTAGCAATA
ATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTACTCATAGAATATAGGAAAATATCAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGA
TAATTGATAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGATCTGGAAGAATTATCAGCGCT
TGTGGAGATGGGGCACCATCCTCCTGGGGATATTAATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTTGGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Tardío – clone 34.20**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTACCAAAGCAGTAAGTGGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTTGGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Tardío – clone 34.25**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGCAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
GGTGGAAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTTGGGGTCACAGTCTATT
ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Tardio – clone 34.27**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Tardio – clone 34.24**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 9 Tardio – clone 34.21**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Tardio – clone 37.1**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCCGACTCATCAAGTTTC
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGTAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGTAGCAA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCCTAGTAGGCATAGAATATAGCAAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGATT
 AATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGATGAGCTGTACAGCACT
 TGTTCCCTTGGATGTTGTTGATCTGTAGTGCTGCAGAAGAGTTGTGGGTACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGA
 AGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Tardio – clone 37.4**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCAGACTCATCAAGTTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGAAAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGTAGCAA
 ATAATAGCAATAGTTGTGTGGACCATAGTAGGCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAAAT
 TAATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGCGAAGGAGATCAGGAAGAATTGTCAGCAC
 TTATTCCTTGGGATGTTGCTGATCTGTAGTGCTGCAGAAGAGTTGTGGGTACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGG
 AAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Tardio – clone 37.6**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCAGACTCATCAAGTTTC
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGAAAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGTAGCAA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCATAGTAGGCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGATT
 AATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGCGAAGGAGATCAGGAAGAATTGTCAGCACT
 TATTCCTTGGGATGTTGCTGATCTGTAGTGCTGCAGAAGAGTTGCGGGTACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGA
 AAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Tardio – clone 37.12**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCAGACTCATCAAGTTTC
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGAAATATCAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGTAGCAA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCATAGTAGGCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGATT
 AATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGGTGAATTGTCAGCACC
 TGTTCCCTGGGATGTTGCTGATCTGTAGTGTGCAGAAGAGTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGA
 AGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Tardio – clone 37.17**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCAGACTCATCAAGTTTC
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGAAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGTAGCAA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCATAGTAGGCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGATT
 AATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGCGAAGGAGATCAGGAAGAATTGTCAGCACT
 TATTCCTTGGGATGTTGCTGATCTGTAGTGTGCAGAAGAGTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGA
 AGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Tardio – clone 37.18**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCAGACTCATCAAGTTTC
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGAAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGTAGCAA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCATAGTAGGCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGATT
 AATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGATGAATTGTCAGCACT
 GTTCCTTGGGATGTTGCTGATCTGTAGTGTGCAGAAGAGTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGCGTGGA
 GGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Tardio – clone 37.19**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCAGACTCATCAAGTTTC
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGAAATATCAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGTAGCAA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCATAGTAGGCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGATT
 AATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGATGAATTGTCAGCACT
 GTTCCTTGGGATGTTGCTGATCTGTAGTGTGCAGAAGAGTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGA
 GGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Tardio – clone 37.20**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCAGACTCATCAAGTTTC
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGAAATATCAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGTAGCAA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCATAGTAGGCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGATT
 AATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGATCAGGATGAATTGTCAGCACT
 GTTCCTTGGGATGTTGCTGATCTGTAGTGTGCAGAAGAGTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGA
 GGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Tardio – clone 37.23**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCAGACTCATCAAGTTTC
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGAAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGTAGCAA
 TAATAGCAATAGTTGTGTAGACCATAGTAGGCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGATT
 AATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGCGAAGGAGATCAGGAAGAATTGTCAGCACT
 TATTCCTTGAGATGTTGCTGATCTGTAGTGTGCAGAAGAGTTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGA
 AGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Tardio – clone 37.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGCCAGACTCATCAAGTTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGAAAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGCA
 ATAATAGCAATAGTTGTGTGGACCATAGTAGGCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAAAT
 TAATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGCGAAGGAGATCAGGAAGAATTGTCAGCAC
 TTATTCCTTGGGATGTTGCTGATCTGTAGTGCTGCAGAAGAGTTGTGGGTACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGG
 AAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 10 Tardio – clone 37.24**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGAGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCACGACAGTCAGACTCATCAAGTTTC
 TCTATCAAAGCAGTAAGTAATACATGTAATGCAACCTTTAGAAAATATCAGCAATAGTAGCACTAGTAGTAGCAA
 TAATAGCAATAGTTGTGTGGACCATAGTAGGCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGATT
 AATTGACAGAATAAGAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGCGAAGGAGATCAGGAAGAATTGTCAGCACT
 TATTCCTTGGGATGTTGCTGATCTGTAGTGCTGCAGAAGAGTTGCGGGTACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGA
 AAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 11 Tardio – clone 40.4**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCTATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 11 Tardio – clone 40.5**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCGAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCGATGAGAGTGAAGGAGGAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 11 Tardio – clone 40.6**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCGGACTCACCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAGATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 11 Tardio – clone 40.7 (faltou TG)**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAACGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 11 Tardio – clone 40.8**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAGGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGAG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 11 Tardio – clone 40.10**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCATTAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGGAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 11 Tardio – clone 40.3**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTACCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCACAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 11 Tardio – clone 40.9**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 11 Tardio – clone 40.12**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 11 Tardio – clone 40.20**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCTATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTGTG

➤ **Paciente 11 Tardio – clone 40.21**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCGATGAGAGTGAAGGAGGAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 11 Tardio – clone 40.22**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCGGACTCACCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAGATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 12 Tardio – clone 43.1.1**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGGAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 12 Tardio – clone 43.4**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTCGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGGAATGGGGCACCATGCTCCTCGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTAT
 TATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 12 Tardio – clone 43.2.9**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 12 Tardio – clone 43.47**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGACAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 12 Tardio – clone 43.48**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTA
 TTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 12 Tardio – clone 43.28**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATGGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTAT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 12 Tardio – clone 43.27**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTCGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGTGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTCGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTAT
 TATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACACTCTATTTTGTG

➤ **Paciente 12 Tardio – clone 43.25**

TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTT
 CTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTAATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATA
 ATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAAATAGACAGGTTAAT
 TGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGCCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTATCAGCACTTGCGGAGATGGG
 GGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTAT
 ATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACACTCTATTTTGTG

Apêndice 1b: **Seqüência de nucleotídeos amplificados.** A cor verde representa o “*primer forward*” e o **ATG** na cor verde representa o início do exon-1 da proteína Rev. A cor em preto após o **ATG**, em azul claro representa o início da proteína Vpu e a **ATG**, na cor azul escuro representa uma pequena porção da proteína Env.