

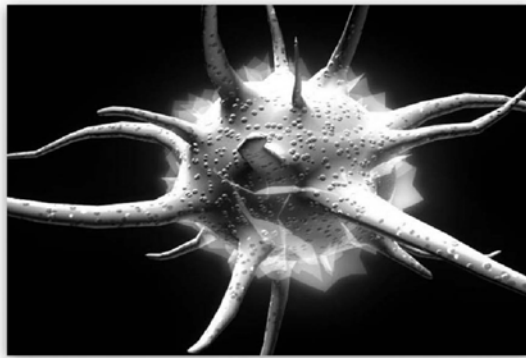


Curso de Biologia

Sinal DC: Mecanismos de escape para patógenos.

Monografia

Disciplina de Imunologia



Dendritic Cell on a black background by David Hunt

Elaborado por:
Cátia Cantante nº 17102
Sandra Trindade nº 15692
Sara Maridalho nº 16911

PREFÁCIO:

Esta monografia foi elaborada no âmbito da cadeira de Imunologia, leccionada pelo Professor Doutor Carlos Sinogas.

Neste trabalho pretende-se, que os alunos interajam entre si, como grupo, em termos de pesquisa e de conhecimentos adquiridos, de forma a elaborarem uma monografia que contempla ser uma possível abordagem teórica no âmbito de matérias específicas da área da Imunologia actual.

Assim sendo, o trabalho apresentado contém uma possível revisão dos conhecimentos, sobre um tema (*Sinal DC: Mecanismos de escape para patógenos*). Os **objectivos** deste trabalho são:

- Adquirir informação complementar sobre o tema em questão;
- Expor essa aprendizagem, como forma de conhecimento suplementar ao adquirido nas aulas de Imunologia;
- Suscitar a discussão de ideias sobre o tema, de modo a proporcionar a interacção de ideias sobre o mesmo e sobre outros temas relacionados ou não com esta temática.

Tópicos de resumo:

- As células dendríticas são cruciais na defesa contra patógenos;
- Os patógenos invasores são reconhecidos pelos receptores TLR e outros receptores, tais como as lectinas tipo C expressas na superfície das células dendríticas;
- Contudo, alguns patógenos como o HIV-1 e o *Micobacterium tuberculosis* subvertem as funções das DCs para escapar à vigilância imunitária, alvejando o sinal DC das lectinas tipo C;
- Para tal, estes patógenos podem desviar o sinal DC por mecanismos distintos que implicam uma adaptação do patógeno ao sinal DC, o que pode suportar a sobrevivência dos patógenos.

Células e órgãos do sistema imunitário

O sistema imunitário é constituído por vários tipos de órgãos e tecidos que se encontram ao longo do corpo. Os órgãos linfóides primários correspondem a órgãos nos quais se verificam as condições necessárias ao desenvolvimento e maturação dos linfócitos. No que respeita aos órgãos linfóides secundários, estes correspondem a órgãos que capturam antígenos para tecidos definidos ou espaços vasculares e a locais onde os linfócitos maduros podem interagir com os antígenos. Como elo de ligação entre estes dois tipos de órgãos, encontram-se as veias sanguíneas e o sistema linfático, tornando-os num todo funcional ⁽⁵⁾.

Transportados pelo sistema sanguíneo e linfático e povoando os órgãos linfóides, encontram-se entidades que participam na resposta imunitária, denominadas de leucócitos ⁽⁵⁾. Estas podem dividir-se em três grandes grupos: linfócitos, dos quais fazem parte as células B e T e as células “natural killer”, monócitos, grupo constituído por monócitos, macrófagos e células dendríticas e, finalmente granulócitos que se dividem em neutrófilos, eosinófilos e basófilos ⁽¹³⁾. Esta diferenciação é controlada pelo tipo e quantidade de factores de crescimento presentes numa célula estaminal (célula estaminal hematopoética), ou até mesmo pela célula progenitora (linfóide ou mielóide) ⁽⁵⁾.

De todas as células supracitadas, apenas os linfócitos apresentam aptidão para todos os requisitos necessários numa resposta imunitária adquirida: diversidade, especificidade, memória e reconhecimento “self e non-self”. Todas as outras células desempenham papéis menos relevantes, servindo para: activar linfócitos, aumentar a capacidade de eliminação de antígenos por fagocitose, entre outros ⁽⁵⁾.

Células dendríticas

As células dendríticas, assim denominadas devido à sua cobertura ser constituída por longas extensões de membrana semelhante à membrana das dendrites das células nervosas, contribuem no desenvolvimento de respostas imunitárias específicas a um patógeno. Actualmente são conhecidas quatro formas das referidas células com origem na medula óssea: células Langerhans, células dendríticas intersticiais, células mielóides e células dendríticas linfóides. Cada uma destas, como já mencionado, resulta de células estaminais hematopoéticas, via diferentes caminhos e em diferentes locais ⁽⁵⁾.

Não obstante as suas diferenças, todas elas apresentam elevados níveis de moléculas complexas de histocompatibilidade maior classe II (MHC II) e membros da família B7 co-estimulatórios (B7-1 e B7-2). Como tal, constituem células de apresentação antígenica mais potentes do que macrófagos ou até mesmo células B, os quais necessitam de activação prévia de modo a funcionarem como células de apresentação antígenica. Assim, as células dendríticas são potentes activadores de células T simples, de memória e efectivas. Contrariamente, macrófagos e células B, em descanso, não se encontram aptas a activar células T simples e são pobres activadoras de células T de memória e células T efectivas ⁽⁵⁾.

Formas imaturas ou precursoras de cada um dos quatro tipos de células dendríticas, localizadas ao longo do corpo, nos tecidos mucosos periféricos, adquirem antígenos por fagocitose ou endocitose. O antígeno é então processado, moléculas co-similares são expressas e as células dendríticas, já maduras apresentam o antígeno a linfócitos de forma a induzir uma resposta imunitária efectiva para eliminar o patógeno. A maturação verificada nas células dendríticas, aquando da captura do patógeno ocorre durante o processo de migração dos tecidos periféricos para os nódulos linfáticos drenantes ⁽⁵⁾.

Outro tipo de células dendríticas, ainda não mencionadas são as células dendríticas foliculares. Estas não têm a sua origem na medula óssea, sendo nomeadas pela sua localização exclusiva em estruturas organizadas de nódulos linfáticos, denominadas folículos, ricos em células B. Apresentam, também, uma função diferente das células dendríticas já referidas. O facto de não funcionarem como células de apresentação antigénica para activação de células T_H está relacionado com a ausência de expressão de moléculas MHC classe II. Expressam, contudo, elevados níveis de receptores membranares para anticorpo, o que permite a ligação de complexos antígeno-anticorpo ⁽⁵⁾.

Receptores específicos para reconhecimento de patógenos

As células dendríticas imaturas protegem-se da entrada de patógenos usando receptores para reconhecimento de patógenos ⁽¹⁾. Os receptores de imunidade adquirida diferem dos da imunidade inata. Por imunidade adquirida, entendem-se as defesas do hospedeiro que são mediadas por células B (anticorpos) e células T, seguidamente a exposição a antígeno e que exibem especificidade, diversidade, memória e reconhecimento “self e nonself”. No que respeita à imunidade inata, esta corresponde a defesas não específicas do hospedeiro que existem previamente à exposição ao antígeno e que envolvem mecanismos anatómicos, fisiológicos, endocíticos, fagocíticos e inflamatórios (mediada por interferões, células “natural killer” e complemento) ⁽⁵⁾.

Os anticorpos e células T reconhecem detalhes de estrutura molecular. Os receptores de imunidade inata reconhecem vários *motifs* estruturais que são altamente conservados no interior de espécies microbianas mas, normalmente não se encontram no hospedeiro. De uma forma geral, os receptores para reconhecimento de patógenos reconhecem: combinações de açúcares, algumas proteínas, moléculas que transportam particularmente lípidos e alguns *motifs* de ácido nucleico ⁽⁵⁾.

Têm sido identificados muitos receptores para reconhecimento de patógenos. Alguns estão presentes na corrente sanguínea e fluidos tecidulares como é o caso de proteínas circulantes solúveis, e outros encontram-se na membrana de células tais como, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Um exemplo de formas solúveis que se ligam à superfície microbiana e promovem a sua opsonização são a lectina ligada a manose e proteína C reactiva. Estes receptores, quando ligados à superfície microbiana, têm ainda a capacidade de desencadear o sistema complemento, tornando o invasor numa espécie de alvo de lise mediada por complemento ⁽⁵⁾.

Os receptores para o reconhecimento de patógenos encontrados na membrana celular incluem receptores Scavenger e receptores “Toll-like”. As células Scavenger, encontram-se em muitos macrófagos e células dendríticas

estando relacionados com a ligação e incorporação de bactérias Gram positivas e Gram negativas e com a fagocitose de células apoptóticas hospedeiras. No que respeita aos receptores “Toll-like”, estes são importantes na medida em que reconhecem muitas formas microbianas ^(1,5).

As lectinas tipo C correspondem a receptores para o reconhecimento de patógenos expressos por células dendríticas imaturas, presentes na pele ou nos tecidos da mucosa (células dendríticas derivadas de monócitos e células dendríticas intersticiais correspondem às células que expressam a maioria da lectinas tipo C), cuja maioria, são proteínas transmembranares tipo II (excepto receptor de manose e DEC205, que são ambos proteínas transmembranares tipo I). Todas as lectinas tipo C tipo II apresentam um domínio de reconhecimento de carbohidrato, enquanto que as lectinas tipo C tipo I apresentam oito ou dez domínios, consoante receptores de manose e DEC205, respectivamente. Após a maturação, a expressão das lectinas tipo C, tal como seria de esperar, é normalmente reduzida ⁽¹⁾.

Dependendo da sua localização no tecido e estado de diferenciação, as células dendríticas são especializadas para responder a microorganismos específicos através da expressão de grupos distintos de TLRs e lectinas tipo C ⁽¹⁾.

Receptores “Toll-Like”

Cada TLR reconhece componentes patogénicos específicos tais como, lipoproteínas, lipopolissacarídeos ou DNA bacteriano. Recebe e passa informação, através de uma cascata de sinais intracelulares, activada pela interacção patógeno-célula dendrítica, deduzindo processos celulares que levam à maturação da célula dendrítica e à indução de citocinas. Estas são responsáveis pela produção de resposta inflamatória e consequente transporte de macrófagos e neutrófilos aos locais de inflamação ⁽¹⁾.

O meio de citocina no qual as células T prontas por antígenos se diferenciam determina o subgrupo que se desenvolve. Especificamente, IL-4 é crucial para o desenvolvimento de uma resposta T_H2 e $IFN\gamma$, IL-12 e IL-18, são importantes no que respeita ao desenvolvimento de células T_H1 . Os macrófagos ou células dendríticas activadas por contacto com bactérias ou parasitas intracelulares, entre outros, correspondem à fonte de IL-12 responsável pela diferenciação de T_H1 , como previamente referido, da mesma forma que uma exposição inicial de células T_H simples ($CD4^+T$) a IL-4, numa resposta imunitária originará a sua diferenciação em células T_H2 . Apresenta ainda uma particular importância, o facto de as citocinas produzidas, quer por T_H1 , quer por T_H2 apresentarem dois efeitos característicos no que respeita ao desenvolvimento de subgrupos. Em primeiro lugar promovem o crescimento do subgrupo que as produz e posteriormente inibem o desenvolvimento e actividade do outro subgrupo, num processo denominado de “*cross regulation*”. Por exemplo, o $IFN\gamma$ inibe preferencialmente a proliferação de subgrupos T_H2 enquanto que o IL-4 e IL-10, regulam a secreção de IL-12, uma das principais citocinas no que diz respeito à diferenciação de T_H1 , por macrófagos e células dendríticas ⁽⁵⁾.

A sinalização do TLR pode ainda resultar no recrutamento e activação de agentes cruciais na apresentação de antígeno às células T, tais como, macrófagos, células “natural killer” e células dendríticas ⁽⁵⁾.

Uma investigação realizada no genoma humano resultou em 10 TLRs, cuja função de seis deles foi definida. Os TLR2, conjuntamente com o TLR6, ligam-se a uma vasta variedade de classes moleculares encontradas nos micróbios, incluindo peptidoglicanos e lipopéptidos bacterianos. O TLR4 é o receptor chave para a maioria dos lipopolissacarídeos bacterianos, embora o TLR 2 também se ligue a algumas variedades dos referidos lipopolissacarídeos. O TLR5 reconhece a flagelina (maior componente estrutural do flagelo bacteriano). O TLR3 reconhece a dupla cadeia de RNA presente nas infecções virais lideradas por vírus de RNA. Finalmente, o TLR9 reconhece e inicia a resposta a sequências CpG (citosina não metilada ligada a guanina) ⁽⁵⁾.

Lectinas tipo C

Contrariamente aos TLRs, as lectinas tipo C reconhecem carboidratos específicos presentes nos componentes da parede celular dos patógenos e incorporam-nos para degradação em compartimentos lisossomais para realçar o processamento antigénico e apresentação por células dendríticas ⁽⁵⁾. No caso das células dendríticas que apresentam complexo de histocompatibilidade maior classe II (MHC tipo II), o fragmento antigénico e o referido complexo formam uma estrutura na superfície das mesmas que pode ser reconhecida por células T (CD4⁺T) nos nódulos linfáticos de modo a que a produção de células capazes de reconhecer o antigénio em questão se inicie. No que respeita a células dendríticas que apresentam complexo de histocompatibilidade maior classe I, estes correspondem a alvos para inspeccionar células T (CD8⁺T) e, caso estejam reactivas, as células que transportam o antigénio serão destruídas. As lectinas tipo C, reconhecem também carboidratos em glicoproteínas de modo a permitir tolerância a antigénios e mediar processos celulares tais como sinalização e adesão celular e migração ⁽²⁾.

A ligação das lectinas tipo C ao patógeno, depende do cálcio, existindo dois locais de ligação de cálcio num loop responsável por uma saliência constatável na superfície proteica. Um destes locais de ligação é essencial para a conformação do domínio de reconhecimento de carboidrato, posteriormente referido, enquanto que o outro é essencial no que respeita à coordenação directa das estruturas de carboidratos. Quatro aminoácidos interagem com o cálcio neste local e determinam o reconhecimento de estruturas carboidratadas específicas ⁽¹⁾. A razão pela qual se designam de lectinas tipo C está também relacionada com o cálcio, pois, como referido, apresentam um domínio de reconhecimento de carboidratos dependente do cálcio ⁽²⁾.

Até à actualidade, têm sido descritas imensas lectinas tipo C, como é um exemplo o DC-SIGN. Este encontra-se envolvido na captura de diferentes patógenos e é frequentemente co-expresso com o receptor de manose. A sua expressão é maioritariamente induzida por IL-4 (apresenta uma expressão condutora preferencial de células T_H2 comparativamente com o receptor de manose). O domínio de reconhecimento de carboidrato, presente no DC-SIGN, é separado da região transmembranar por aquilo a que se designa de domínio neck. Este último é formado por sete a oito sequências repetidas em tandem que afectam a formação de oligómeros e consequentemente influenciam a especificidade para o carboidrato. Esta oligomerização dos

domínios da lectina é responsável pela alteração de afinidade e especificidade do reconhecimento do carboidrato. Como forma de incorporar patógenos, a maioria das lectinas tipo C contém motivos putativos de incorporação, tais como motivo di-leucina (Leu-Leu) e motivos tri-ácido-agrupados (Glu-Glu-Glu), naquilo a que designa de cauda citoplasmática. Este último tipo de leucinas, incorpora antígenos para lisossomas e endossomas tardios positivos MHC classe II. Existem no entanto, outro tipo de lectinas tipo C, como é o caso do receptor de manose, maioritariamente induzido pelo factor de estimulação granulócito-colónia de macrófagos, que recicla rapidamente mediante endossomas precoces, de modo a assegurar largas quantidades de entrada de antígeno. Adicionalmente, a carga que é transportada por lectinas tipo C também deve ser tomada em linha de conta aquando da determinação do compartimento intracelular para o qual estas se encaminham ⁽¹⁾.

Reconhecimento “Self” e “Non-Self” por Lectinas tipo C

Tipicamente, a capacidade das lectinas tipo C para distinguir entre self e non-self é perfeita devido ao facto de o alvo da forma molecular do receptor ser produzido apenas pelo patógeno e nunca pelo hospedeiro ⁽⁵⁾. Independentemente de tudo o supracitado, é de referir que as lectinas tipo C podem também contribuir para a captura e apresentação de antígenos auto-glicosilados ⁽¹⁾.

O DC-SIGN também funciona como receptor móvel nas células dendríticas para mediar migrações transendoteliais dos percursores destas do sangue para tecidos, ligando ICAM2 endoteliais ⁽¹⁾.

Reconhecimento de Carboidratos por Lectinas tipo C

Os carboidratos interagem especificamente com lectinas, motivo pelo qual, a glicosilação alterada de uma glicoproteína pode modificar o seu reconhecimento por lectina tipo C e consequentemente influenciar interações célula-célula ⁽⁵⁾. O receptor de manose conjuntamente com o DC-SIGN e Langerin, aparentam reconhecer carboidratos contendo manose. O receptor de manose reconhece extremidades simples de estruturas ramificadas de manose ou grupos de di-manose e o DC-SIGN reconhece estruturas ramificadas internas de manose com um mínimo de três manoses e di-manoses de extremidades. Conjuntamente, o reconhecimento de estruturas de carboidratos específicos por DC-SIGN parece depender do espaçamento das estruturas carboidratadas num glicoproteína ⁽¹⁾.

Estudos posteriores demonstraram que o DC-SIGN tem uma maior especificidade para carboidratos contendo fucose tais como Le^x, do que para carboidratos contendo manose. Contrariamente, o receptor de manose não reconhece estruturas Le^x. Pode então concluir-se que o DC-SIGN corresponde ao mais importante receptor expresso por células dendríticas para reconhecer estruturas carboidratadas contendo Le^x, enquanto que o reconhecimento de carboidratos de manose pode ser mediado por várias lectinas tipo C, nas células dendríticas. De referir o facto de estudos posteriores poderem revelar

uma afinidade de lectinas tipo C para outros carboidratos que não a manose⁽¹⁾.

Algumas considerações importantes sobre o HIV

O vírus: O HIV é um retrovírus de duas cadeias simples positivas de RNA, com 100-120 nm de diâmetro (figura 1). A sua estrutura genética básica engloba os genes *gag* (core de proteínas), *pol* (polimerase/transcriptase reversa) e *env* (proteínas do envelope) (figura 1)⁽³⁾. Os genes adicionais regulam a síntese de proteínas virais, que no caso do HIV-1, este impõe no seu próprio plano básico, um número de proteínas (*Tat*, *Ver*, *Vif*, *Vpr*, *Vpu* e *Nef*) com uma actividade reguladora positiva ou negativa. No total, o HIV-1 codifica para 16 proteínas. A *Nef* é uma proteína reguladora multifuncional complexa, pois modela a expressão dos CD4 e proteínas do MHC classe I na superfície celular e aumenta a infectiosidade do vírus. Também aumenta a expansão da infecção no organismo, infectando os macrófagos, causando a sua ligação às células T, o que resulta na activação posterior das mesmas, que se encontram em repouso, para as tornar capazes de replicar o vírus⁽⁴⁾.

Os antígenos CD4 são o receptor principal do vírus e encontram-se nos linfócitos T CD4⁺ e células da linhagem de monócitos/macrófagos⁽³⁾. Na parte distal do envelope, a glicoproteína 120 (gp120) possui 5 *loops* variáveis que tendem a variar em sequência. A gp120 viral liga-se aos CD4, mas os receptores de quimoquina estão envolvidos na subsequente fusão e internalização mediada pela gp41⁽³⁾. Tanto a gp41 como a gp120 possuem locais de neutralização, mas muitas das suas superfícies têm de se desenvolver para invadir a ligação ao anticorpo⁽⁴⁾.

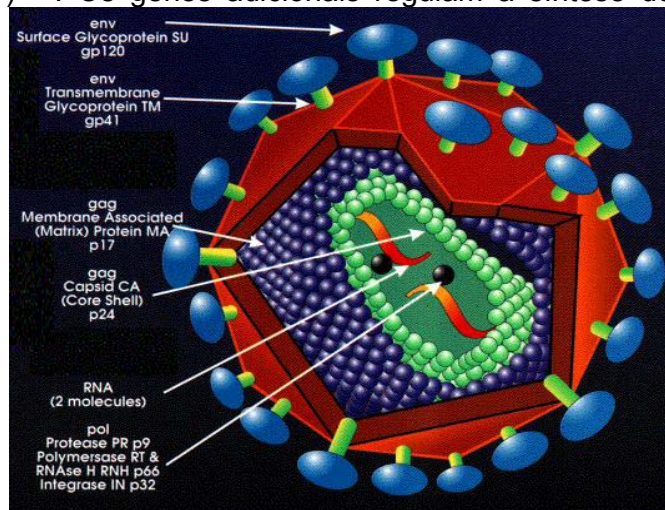


Figura 1 - Estrutura do virião do HIV-1 com algumas das proteínas identificadas (adaptado de (6))

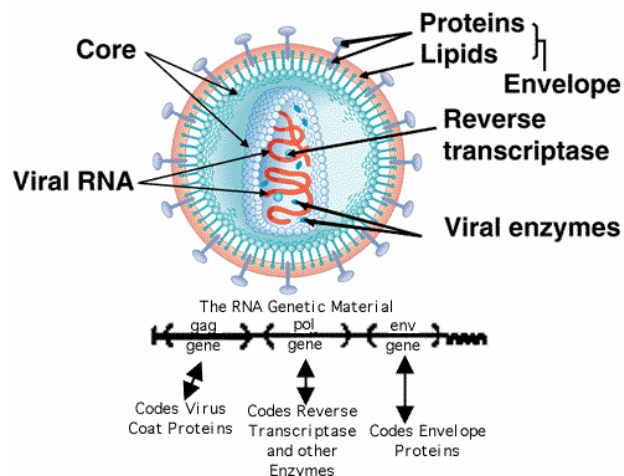


Figura 2 - Estrutura do vírus HIV-1, com os genes que codificam algumas das suas proteínas (adaptado de (11)).

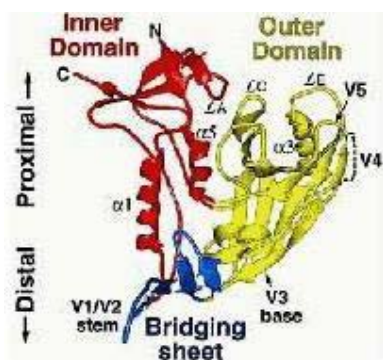


Figura 3 - Estrutura da gp120 com os domínios *inner* e *outer* e regiões variáveis (adaptado de (12)).

neutralização dos epitópos e os poucos que são produzidos têm apenas um pequeno alvo para se ligarem. Os *loops* V, que estão expostos aos anticorpos são capazes de acumular muitas mudanças nos aminoácidos e, deste modo, o vírus invade o anticorpo que é produzido contra si próprio (4).

Estrutura da gp120: A gp120 é uma molécula muito flexível (nas partes V₁, V₂ e V₃), que apresenta uma estrutura de *hairpin* em U que apresenta um domínio *inner* e outro *outer*, um local de ligação ao CD4 e locais de ligação aos receptores (figura 3). O local de ligação ao CD4 é uma região conformacional que permite ao vírus agregar-se às células T hospedeiras. Apenas uma pequena parte da gp120 está exposta às células B, o que faz com que os anticorpos não sejam produzidos para uma potencial

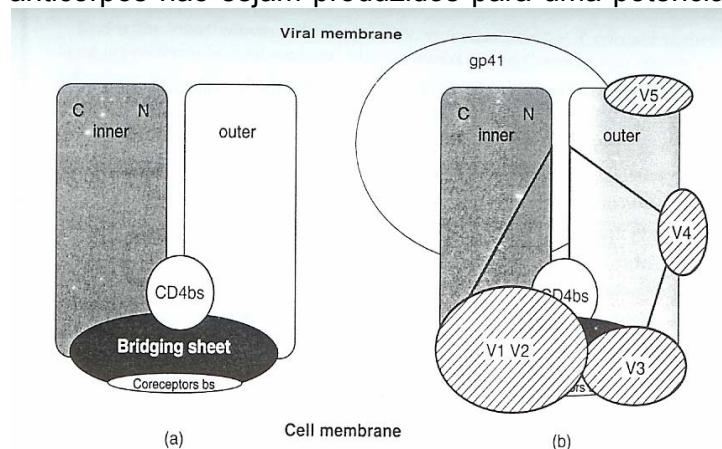


Figura 4 - Modelo do monômero da gp120 do HIV-1 baseado em estrutura atômica (adaptado de (4)).

Transmissão e infecção das células: As proteínas CD4 estão presentes na superfície das células T_H (T-helper) e nas da linhagem de monócitos/macrófagos. A sua função natural é reconhecer e interagir com os antígenos do complexo de histocompatibilidade (MHC – “*Major Histocompatibility Complex*”) de classe II nas células alvo, sendo o principal receptor através do qual o HIV-1 e HIV-2 iniciam a infecção. Uma infecção com sucesso por parte do HIV também requer a presença de receptores de quimoquina como o CCR5, encontrado nos macrófagos e o CXCR4, encontrado nas células T, que funcionam como co-receptores. Também se podem ligar a regiões específicas das gp120 (4).

Existem dois tipos de HIV classificados como M-trópico, cujas cadeias infectam principalmente macrófagos, mas também podem infectar células T, que usam os co-receptores CCR5 (“*CC Chemokine Receptor 5*”) e como T--trópico, cujas cadeias infectam eficientemente

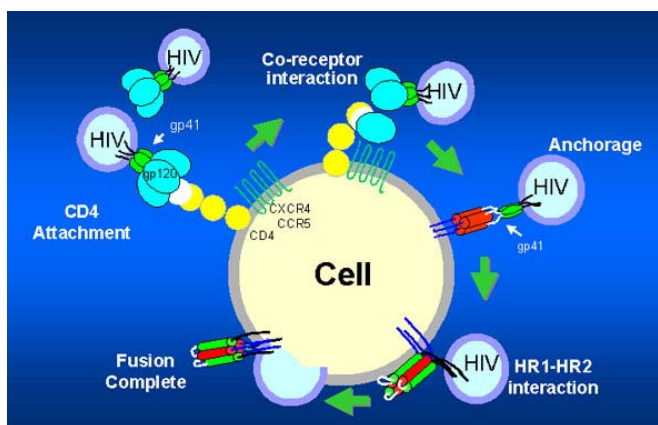


Figura 5 - Interação mediada por receptores específicos, entre o HIV-1 e as células T (adaptado de (10)).

os linfócitos T que usam os co-receptores CXCR4 ⁽⁴⁾. Estas propriedades dependem da sequência da gp120 e estão ligadas à patogenicidade da doença (SIDA). As cadeias M-trópicas são as mais importantes numa infecção inicial, quando os alvos do HIV são macrófagos, pois a função dos macrófagos é digerir qualquer cadeia na tentativa de processar as proteínas para a apresentação das células ao sistema imunitário. Os vírus T-trópicos fazem com que se processe a destruição das populações de células T do organismo, que conduzem à doença (SIDA). Os linfócitos T CD4⁺ que possuem o co-receptor CXCR4 ficam infectados nos nódulos e outros tecidos linfáticos. Assim, o HIV torna-se estável e é continuamente apresentado ao tecido linfático, onde as células T proliferam, numa tentativa de limitar a infecção e eliminar o vírus do hospedeiro ⁽²⁾.

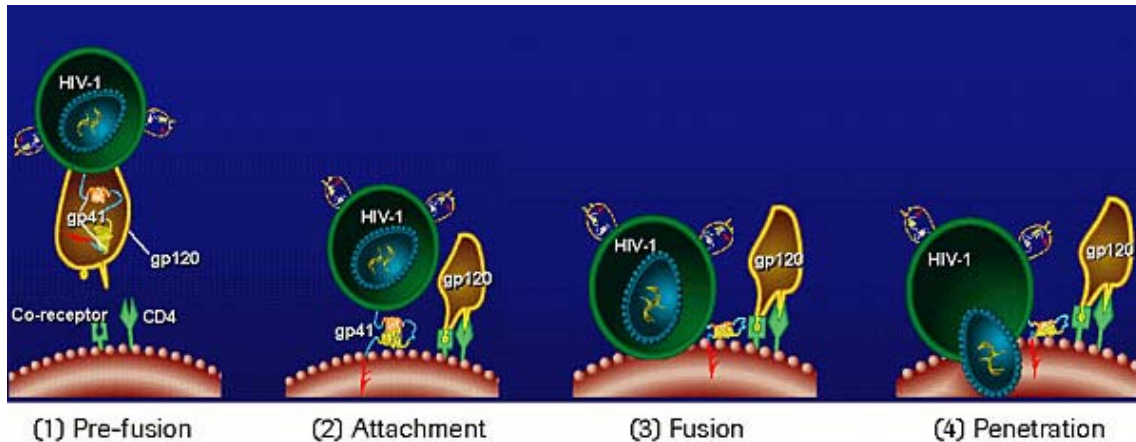


Figura 6 - Ligação do HIV-1 aos receptores e co-receptores das células T (adaptado de (10)).

Pensa-se que o HIV se liga à superfície das células dendríticas, mas que não as infecta. Estas migram e carregam o vírus para os nódulos linfáticos, para onde é transferido e infecta as células T CD4⁺ activadas. Os macrófagos CD4⁺ também podem ser infectados, mas são encontrados com pouca frequência no sangue e nódulos linfáticos. Embora as células T CD4⁺ sejam o alvo principal, existem outras células que não expressam as proteínas CD4 que também podem ser infectadas, o que sugere que o vírus pode usar diferentes receptores moleculares. O HIV também pode infectar células T CD4⁺ em repouso, devido ao seu DNA proviral poder ser transportado para o núcleo através de proteínas virais associadas que carregam sinais de localização nuclear ⁽⁴⁾.

Durante a infecção inicial/primária do HIV, as células T CD4⁺ específicas para o vírus são estimuladas pelos antígenos virais para proliferar. Como o vírus infecta e se replica nas células CD4⁺, estas são preferencialmente destruídas. Ao mesmo tempo, dá-se uma expansão dramática das células T CD8⁺ específicas do vírus, que coincide com a supressão da virémia. Contudo, a proliferação das células T CD8⁺ é dependente da ajuda das células T CD4⁺, existindo um balanço entre a destruição e a sobrevivência das células T CD4⁺ que ajuda a produzir as células CD8⁺ específicas do vírus e activadas ⁽⁴⁾.

Disfunção imune: A forma como o HIV mata as células alvo ainda não é bem compreendida. Existem vários mecanismos diferentes que têm sido propostos, que incluem a acumulação de RNA e não integração de DNA nas células do citoplasma e a ligação intracelular do CD4 às gp120. As células infectadas podem-se ligar a células não infectadas através das conexões gp120-CD4 com células gigantes

multinucleadas e formação do sincítio. As gp120 ligam-se à superfície não infectada das células T CD4⁺, o que as torna também vulneráveis à citotoxicidade mediada por células e dependente de anticorpos (ADCC – “*Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*”), quando as células infectadas podem ser mortas pela citotoxicidade específica para as gp120 nas células T. As proteínas do HIV actuam como super antígenos, o que resulta numa vasta expansão e, posteriormente, numa exaustiva depleção das células. Em conjunto, o HIV pode induzir a apoptose das células T e a ligação viral pode conduzir ao enfraquecimento da disfunção imune e lise das membranas celulares⁽³⁾.

O espectro da disfunção imune é caracterizado pela depleção dos subtipos de células T CD4⁺ e diminuição das respostas aos antígenos, mitógenos, alogénios e anticorpos anti-CD3, associados à diminuição da produção de IL-2 e outras mudanças na produção de citocinas⁽³⁾.

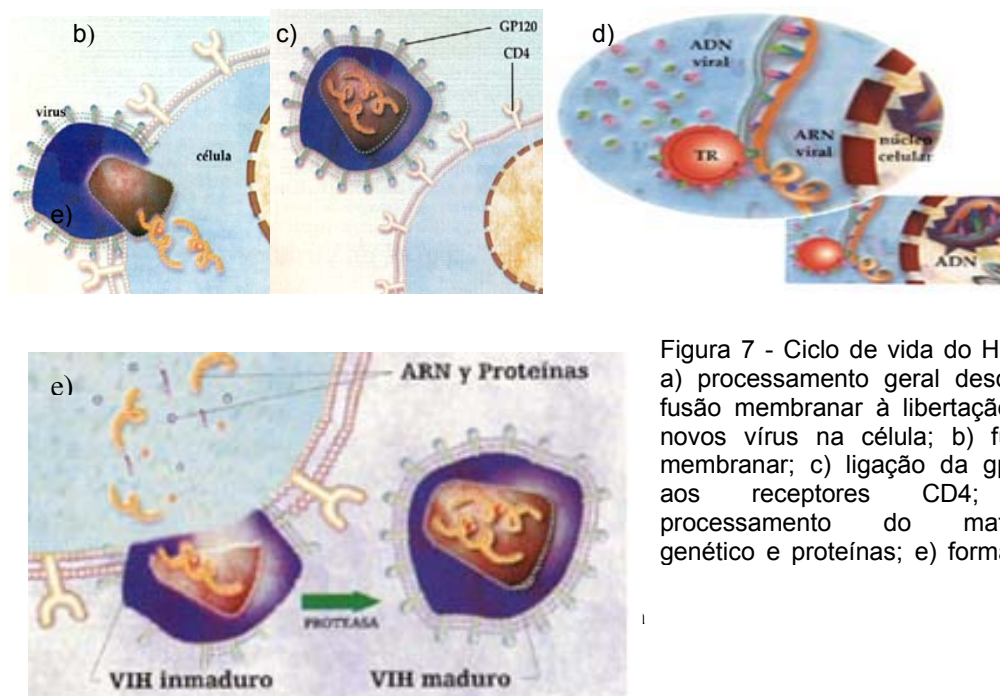
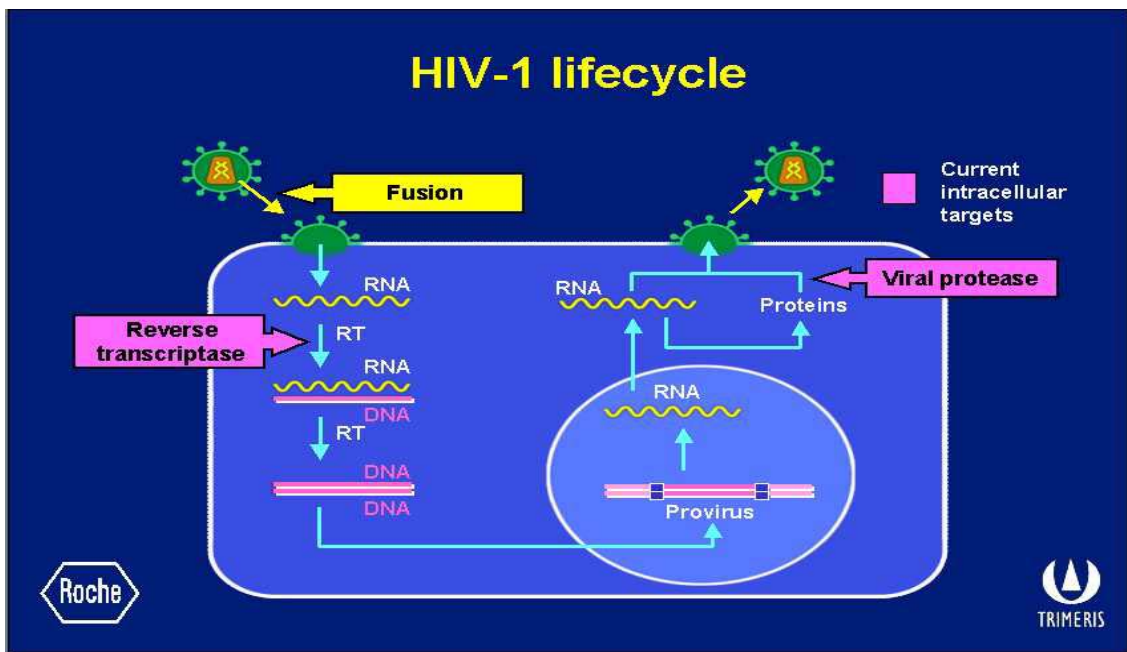


Figura 7 - Ciclo de vida do HIV-1: a) processamento geral desde a fusão membranar à libertação de novos vírus na célula; b) fusão membranar; c) ligação da gp120 aos receptores CD4; d) processamento do material genético e proteínas; e) formação

Sinal DC como novo tipo receptor de vírus

As células dendríticas (DC) imaturas são as primeiras células a interagir com o HIV-1 nos locais de infecção. Pensa-se que estas capturam o HIV-1 nos locais de entrada e o transportam para os tecidos linfóides, nos quais a ligação DC – HIV-1 é eficientemente transmitida às células T CD4⁺, o que resulta numa infecção produtiva das células T. O sinal DC, expresso pelas células dendríticas nos tecidos mucosos, captura o HIV-1 a baixos títulos através da alta afinidade interactiva com as gp120 do envelope do HIV-1. Este sinal não facilita o processamento do vírus, mas protege-o da degradação intracelular, processo esse que não é totalmente compreendido. O sinal DC realça também a infecção das células T, pois a baixos títulos virais, as células T não são infectadas sem a assistência da sinal DC em *trans* (figura 7a), o que indica que a sua presença é crucial para uma infecção rápida e eficiente das células T durante uma infecção precoce *in vivo*, onde os níveis de HIV-1 são baixos. A presença de células dendríticas que expressam o sinal DC nos tecidos mucosos e de precursores, de células dendríticas de sinal DC positivo, no sangue, que transmitem eficazmente para as células T, indicam também que o sinal DC é uma molécula fundamental na expansão do HIV-1, após transmissão sexual ou contaminação do sangue. Quando o HIV-1 se encontra a elevadas concentrações, pode infectar células dendríticas que co-expresssem os receptores CD4 e de quimoquinas. A quantidade inicial de vírus que entra nas mucosas deve determinar quando é que as células dendríticas se tornam infectadas pelo HIV-1 ou quando é que o vírus é capturado para uma infecção em *trans*, eficiente, das células T. O sinal DC pode também funcionar como um receptor em *cis* para o HIV-1 (apesar de haver a possibilidade das células que parecem infectadas em *cis*, serem, na verdade, infectadas em *trans*), assim como a co-expressão do sinal DC, CD4 e CCR5 que aumentam a infecção das células alvo ⁽¹⁾.

A função do sinal DC na infecção por HIV-1 tem sido, maioritariamente, baseada em modelos *in vitro*, mas os modelos de primatas podem ser usados para decifrar o mecanismo do sinal DC na transmissão e patogenicidade da infecção com vírus da imunodeficiência, para estudos *in vivo*. Deste modo, um estudo *in vivo* mostra um potencial aumento da transmissão mucosa do vírus quimérico SIV-HIV (SHIV), que contém um glicano adicional na base N-terminal do *loop* V₂ do SHIV que codifica para a gp120, o que resulta num aumento da ligação do sinal DC. O sinal DC do macaco *rhesus* é altamente homólogo ao do homólogo humano e o homólogo do macaco pode funcionar como um receptor em *trans* para o HIV-1, de forma semelhante ao sinal DC humano. Assim, como nos humanos, o sinal DC homólogo de primata é abundantemente expresso nos tecidos linfóides e nódulos linfáticos, bem como nos tecidos mucosos envolvidos na transmissão sexual, o que assegura o uso dos modelos de primatas para este tipo de estudos ⁽¹⁾.

Células dendríticas: Um esconderijo para o HIV-1

Todas as partículas de HIV-1 quando estão ligadas ao sinal DC, encontram-se estáveis e retêm a sua infecciosidade por períodos prolongados. O HIV-1 quando ligado ao sinal DC “esconde-se” nas células dendríticas, perto da membrana celular, sem ser degradado. De facto, O HIV-1 é incorporado após a ligação ao sinal DC em organelos lisossomais não ácidos, sendo esta incorporação crucial para o aumento da infecção das células T, mediada pelo sinal DC (figura 9a.). A neutralização do pH

nos compartimentos lisossomais que contêm o HIV-1 ou a prevenção da incorporação, por deleção da cauda citoplasmática do sinal DC, repelem o aumento da infecção em *trans* por parte das células T, mediada pelo sinal DC e indicam que a internalização de uma partícula viral de HIV-1 processada numa forma infecciosa, é essencial para a infecção das células T. As vias dependentes da clatrina, que, provavelmente, medeia a endocitose do sinal DC e recicla-o através do reconhecimento do motivo da di-leucina, e independentes, são usadas durante a incorporação do vírus induzido pelo sinal DC ⁽¹⁾.

A função do sinal DC na transmissão do HIV-1 dependendo do seu contexto celular. O sinal DC ou a linha celular monocítica THP-1, incorpora e retém o HIV-1 num elevado nível infeccioso por mais de 5 dias para infectar as células T em *trans*, o que indica que este vírus só se pode esconder durante períodos prolongados de tempo em células como as dendríticas, quando acompanhado por outra célula direccionadora endocítica alterada e induzida pelo HIV-1, quando alvejada pelo sinal DC ⁽¹⁾.

O processo através do qual o sinal DC promove uma infecção eficiente, protegendo os viriões do HIV-1 da degradação e processamento por parte dos lisossoma, das células em *trans*, através dos seus complexos receptores de quimoquina-CD4, ainda não é muito claro. A ligação da gp120 ao sinal DC pode induzir a uma alteração conformacional na mesma, o que proporciona uma interacção mais eficiente para os receptores CD4 e/ou quimoquina e uma subsequente fusão membranar com as células T. Alternativamente, a ligação de partículas virais ao sinal DC pode concentrar as partículas na sua superfície, o que talvez aumente a probabilidade de entrada, que ocorre após a ligação às CD4 e ao complexo co-receptor nas células alvo, o que pode acontecer em microdomínios seleccionados da membrana. Recentemente, tem sido mostrado que o HIV-1 e os seus receptores são recrutados para as junções entre as células dendríticas e células T, o que nos indica que através do contacto com as células T e para facilitar a sua transmissão às mesmas, as células dendríticas reciclam o HIV-1 para a membrana, para haver uma maior concentração local de CD4, co-receptores e moléculas de adesão leucócita de função associada a antígeno 1 (LFA1). Embora as partículas de HIV-1 sejam encontradas e incorporadas pelas células dendríticas, não existe nenhuma concentração de sinal na junção entre células dendríticas e células T, onde a sinapse infecciosa foi formada e o HIV-1 incorpora-se na margem célula-célula cerca de uma hora após o contacto com as células T ⁽¹⁾.

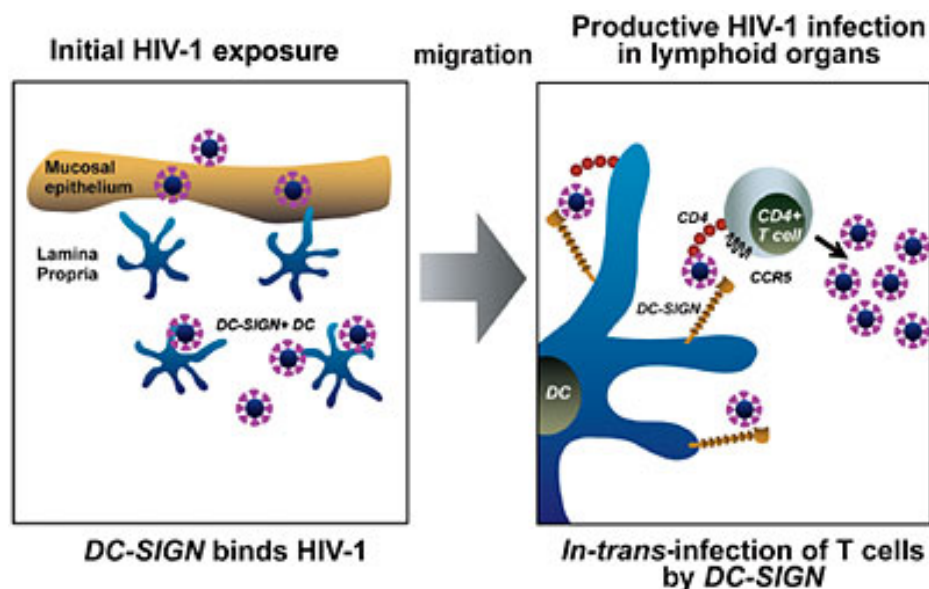


Figura 8 - Ligação da HIV-1 ao sinal DC e posterior infecção em *trans* das células T (adaptado de (7)).

Além das células T, o HIV-1 pode infectar as células dendríticas através da acção do vírus codificado pela proteína *Nef*. A expressão da *Nef*, após a infecção das células imaturas, reduz a incorporação de sinal DC e aumenta a sua expressão na superfície celular, facilitando a adesão celular e a transmissão do vírus às células T, o que ocorre em apenas alguns subtipos de células dendríticas imaturas. A elevada afinidade do sinal DC para a gp120 comparada com a das CD4 também pode levar à competição do HIV-1 pelos dois receptores da superfície celular. O facto das células dendríticas expressarem elevados níveis de sinal DC e baixos níveis de CD4 deve resultar em ligações eficientes ao sinal DC e reduzir a fusão do envelope viral ⁽¹⁾.

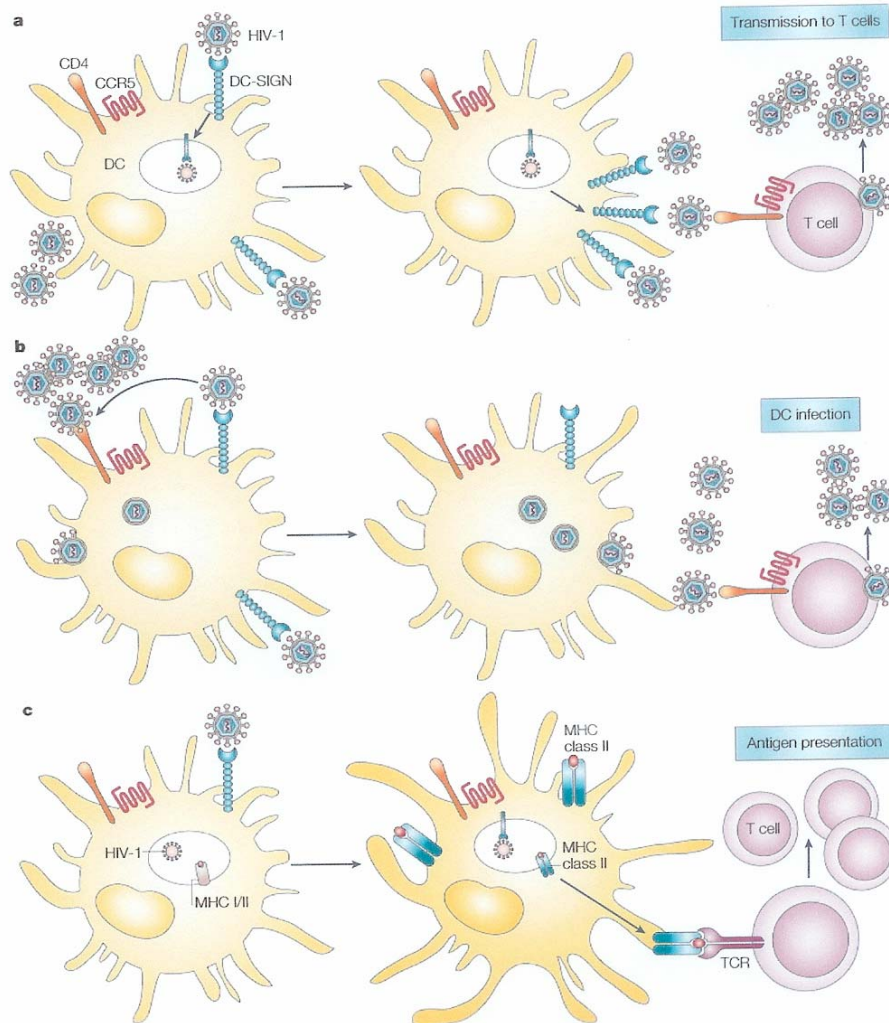


Figura 9 - **a)** O sinal DC é expresso pelas células dendríticas imaturas nos tecidos mucosos e nódulos linfáticos e pelas precursoras das células dendríticas no sangue. O HIV-1 é capturado pelo sinal DC que é expresso pelas precursoras das células dendríticas, no sangue, após a infecção ou pelas células dendríticas imaturas nos locais de entrada das mucosas, durante a transmissão sexual. O sinal DC liga-se ao HIV-1 e o conjunto, penetra na célula e escapa à internalização em compartimentos lisossomais e é reciclado, voltando à superfície celular. Escondendo-se intracelularmente nas células dendríticas, o HIV-1 fica protegido durante a migração para os tecidos linfáticos. Quando chega aos tecidos linfáticos, as células dendríticas transmitem o HIV-1 às células T CD4⁺ em *trans*, o que resulta na produtividade da infecção das mesmas. **b)** As elevadas concentrações de HIV-1, permitem uma infecção das células dendríticas, que resulta na produção do HIV-1 pelas células dendríticas, que subsequentemente infectam as células T. A incorporação do HIV-1 pelo sinal DC pode permitir uma infecção em ciclo das células dendríticas, pela apresentação do vírus infeccioso aos CD4 e co-receptores que proporcionam uma infecção eficiente das células

dendríticas. c) As lectinas tipo C funcionam como receptores de antígenos para internalizar os mesmos em lisossomas, de modo a aumentar a apresentação pelas moléculas dos MHCs classe I e II. Ainda permanece por determinar, quando é que a captura do HIV-1 pelas lectinas tipo C resulta na activação das células dendríticas e apresentação viral dos antígenos, pelas moléculas de MHC (adaptado de (1)).

Outros receptores em *trans* do HIV-1

➤ Lectinas tipo C como receptores em *trans*

As células dendríticas expressam muitas lectinas tipo C, tais como os receptores de Langerin e de manose, que têm uma especificidade para carboidratos que contêm manose, codificados pela gp120 presentes no HIV-1. O receptor de manose expresso por macrófagos é semelhante ao sinal DC e, assim como outras lectinas tipo C, está envolvido na captura e transmissão do HIV-1 em *trans* para as células T permissivas ⁽¹⁾.

A descoberta de que a longevidade do HIV-1, quando capturado pelo sinal DC excede os 5 dias, indica que as rotas de incorporação são diferentes para o receptor da manose e para o sinal DC, visto que quando o HIV-1 está ligado aos receptores da manose nos macrófagos, tem um tempo de “meia-vida” mais baixo do que o do HIV-1 não ligado, não ocorrendo nenhuma transmissão para lá das 24 horas, após a captura inicial do vírus. Esta mais baixa “meia-vida” do HIV-1, quando capturado pelos receptores da manose, pode também ser atribuída ao facto de os macrófagos expressarem elevados níveis de receptores de manose, mas não expressarem sinais DC e incorporarem e direccionarem partículas infecciosas de HIV-1, de forma diferente da das células dendríticas. Interessantemente, nas células dendríticas imaturas derivadas dos monócitos, o sinal DC é o receptor maioritário de HIV-1. Contudo, os níveis de expressão das diferentes lectinas tipo C expressos pelos subtipos de células dendríticas *in vivo*, devem ser instrumentais na determinação de qual o tipo de lectina tipo C que captura o HIV-1, de como é este direccionado intracelularmente e por quanto tempo irá sobreviver ou ser degradado nas células dendríticas, para a apresentação às células T. O sinal DC e os receptores da manose possuem uma diferente especificidade para os carboidratos, o que significa que ambos os receptores se ligam a locais das gp120. A descoberta de que o sinal DC e os receptores de manose negativos em células dendríticas *in vivo*, indica que outros receptores de lectinas tipo C podem ser usados pelo HIV-1 para este se esconder nas células dendríticas, apesar de que a ligação entre o HIV-1 e as lectinas tipo C possa ter uma função diferente na patogenicidade do HIV-1. Estes receptores devem ser requeridos na captura e processamento do HIV-1 e para uma apresentação eficiente do antígeno, durante a captura e apresentação de antígenos de HIV-1 por parte das células dendríticas às células CD4⁺ e CD8⁺ (figura 9b.) ⁽¹⁾.

➤ Proteoglicanos como receptores em *trans*

Existem receptores de adesão, tais como os LFA1, ICAM1 e HSPG (“Heparan-Sulphate Proteoglycan”), que são promotores de adsorção e infecciosidade do HIV-1, podendo a expressão de receptores de adesão facilitar a interacção célula-célula e aumentar a transmissão do vírus. A presença de ICAM1,

exposto à superfície do vírus e LFA1, exposto pelas células T, aumenta a ligação do HIV-1. O *syndecan* – que é um HSPG expresso pela parede endotelial vascular – pode capturar o HIV e funciona como um receptor em *trans* para a infecção das células T permissivas ingênuas, que interagem com as células endoteliais. Remover o HSPG da superfície celular, utilizando a heparitinase, diminui a ligação das gp120 a cadeias de sulfato-heparine de *syndecan*. A adsorção do HIV-1 é mediada pela ligação e infecciosidade do HIV às células permissivas. O *syndecan* promove a infecção em *trans* de uma ampla gama de lentivírus primários, numa forma análoga à do sinal DC, embora não substitua os receptores de entrada do HIV e também preserva a infecciosidade. Estes receptores de adesão, assim como as lectinas tipo C, devem ser também requeridos para a captura e processamento do HIV-1 ⁽¹⁾.

Micobactérias subvertem a função do sinal DC

Alguns patógenos não virais também atingem os sinais DC. Os mecanismos mais notáveis são aqueles que conseguem subverter a função do sinal das células dendríticas para escapar à vigilância imunitária. É salientada a interação da micobactéria com o sinal DC como exemplo dos acontecimentos da sinalização das lectinas tipo C, que alteram a activação das células dendríticas mediadas por TLR ⁽¹⁾.

A *Micobactéria tuberculosis*, responsável pela tuberculose, representa um elevado risco para a saúde mundial e a imunossupressão é um problema particular nas infecções causadas por esta micobactéria ^(1,3).

As micobactérias são indutoras das respostas das células T_H1 e componentes micobacterianos tem sido estudados como estimuladores da expressão das moléculas estimulatórias e produção de IL-12 por DCs através de TLR2 e TLR4. Enquanto o sistema imunitário não permanecer competente a *M. tuberculosis* é controlada. Quando a resposta imunitária é comprometida, pode desenvolver-se uma doença activa, normalmente através da reactivação do organismo em repouso ou em alguns casos através da re-infecção. Os macrófagos alveolares são os alvos principais da infecção por micobactérias, embora as células dendríticas sejam importantes para as respostas celulares imunitárias e DCs expressando o sinal DC têm sido identificadas na mucosa da via aérea, nas submucosas e locais intersticiais do tracto respiratório ^(1,3).

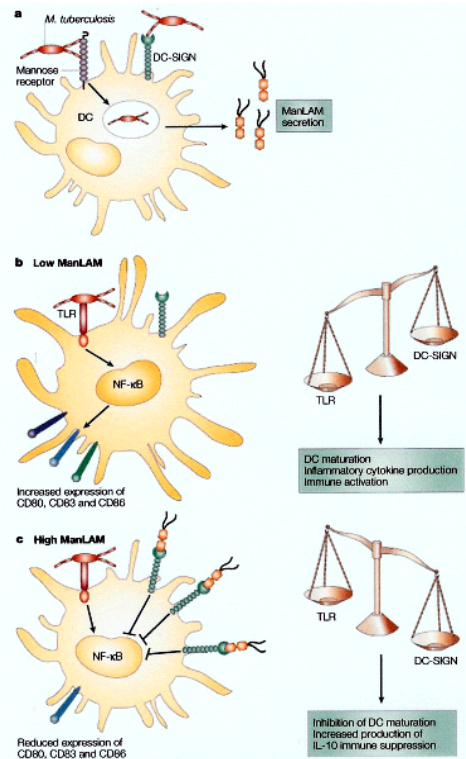


Figura 10- Esquematização da *Micobactéria tuberculosis* tendo como alvo do sinal DC através da supressão da resposta imunitária mediada por células dendríticas, ManLAM (adaptado de (1)).

O sinal DC liga-se fortemente a micobactérias como *M. tuberculosis* e *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) através da componente ManLAM escapando por manose da parede celular, não se liga ao LAM que não apresenta capa de manose (AraLAM)⁽¹⁾.

Este processo é intrigante porque a ManLAM é abundante em micobactérias virulentas de crescimento lento, tais como *M. tuberculosis* e *M. leprea*, enquanto a AraLam é abundante em micobactérias sem virulência, atípicas de crescimento rápido, tais como *M. smegmatis*, *M. fortuitum* e *M. chelonae*. O sinal DC liga-se especificamente a resíduos de manose diméricos e triméricos em LAM⁽¹⁾.

Para as células dendríticas o sinal DC é receptor maioritário para micobactérias. As DCs imaturas também expressão elevados níveis de receptores de manose, CD11b e CD11c, que tem função ao nível da ligação por macrófagos, anticorpos específicos de sinal Dc, ao contrário do que acontece aos anticorpos específicos de receptores de manose⁽¹⁾.

Estudos recentes indicam que a maioria das bactérias acabam nos compartimentos fagossomais, a função é modulada por *M. tuberculosis*. Se considerarmos as células dendríticas como células hospedeiras para *M. tuberculosis*, a *M. tuberculosis* é incorporada por um sinal DC para compartimentos lisossomais (LAMP1) positivas. Os fagossomas que contêm as micobactérias passam a endossomas/lisossomas tardios em DCs, resultando em degradação. Nos macrófagos, as micobactérias prendem a maturação fagossomal até esta se encontrar num estado endossomal antecipado, levando ao crescimento da micobactéria⁽¹⁾.

Interferência entre lectinas tipo C e TLRs.

O bombardeamento do sinal DC por ManLAM resulta numa resposta imunitária alterada através da sinalização entre lectinas tipo C e TLRs. (figura 11) As ligações de DCs imaturas a componentes ManLAM micobacterianos bloqueiam secreção de IL-12 induzidas por LPS. A ligação de ManLAM a células dendríticas imaturas interfere com a sinalização do TLR4, enquanto que a sinalização por LPS é mediada através do TLR4. O componente da parede celular ManLAM, que é mediada como factor de virulência (figura 10)⁽¹⁾.

Trabalhos recentes mostram que ManLAM inibe a maturação de DC induzida por LPs na presença de ManLAM é inteiramente restaurada através da inibição da interacção sinal DC-ManLAM com anticorpos específicos. Fisiologicamente para esta interacção foi usada a BCG de *M. bovis*. A BCG de *M. bovis* viável induz a maturidade de DCs, provavelmente através da sinalização de TLR2 e TLR4. Além disso, a ligação de ManLAM a sinal DC

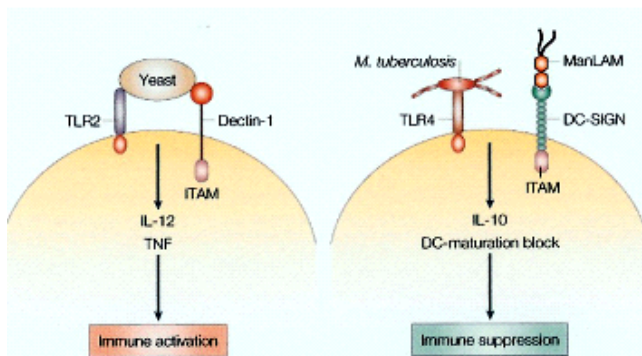


Figura 11 - Esquemática da interação entre lectinas de tipo C e TLRs (adaptado de (1)).

induz a produção de citocinas anti-inflamatórias IL-10 por DCs activados por LPS ⁽¹⁾.

Entre a activação e a supressão imunitárias, é fortemente regulado por o nível de activação de TLR e a ocupação de lectinas tipo C. A activação de TLRs por produtos patogénicos é benéfica para a actividade imunitária, mas pode ser dirigida para a supressão imunitária quando receptores de lectinas tipo C, tais como sinais DC, estão completamente ocupados ⁽¹⁾.

Alguns patógenos parecem hábeis a manipular este balanço, resultado em supressão imunitária, como por exemplo a secreção e produção de largas quantidades de factores solúveis, tais como ManLAM, que atingem os sinais DC ⁽¹⁾.

Considerações finais:

Alguns estudos recentes mostram, claramente, que o sinal DC expresso pelas células dendríticas é um receptor de patógenos, que pode estar envolvido na disseminação e imunossupressão de vários patógenos infecciosos. Embora funcione de forma semelhante à das lectinas tipo C, actua como um receptor de antígenos para antígenos alvo em compartimentos lisossomais para a apresentação às células T, os patógenos virais parecem alvejar o sinal DC para que ocorra a sua transmissão, enquanto que os não virais, tais como as micobactérias, modelam a activação imunitária induzida pelas células dendríticas, através do sinal DC ⁽¹⁾.

No caso dos patógenos virais, um dos exemplos estudados é o do HIV-1, com o qual as células dendríticas imaturas são das primeiras células a interagir nos locais de infecção, capturando-o nos locais de entrada e transportando-o para os tecidos linfóides, nos quais a sua ligação é eficientemente transmitida às células T CD4. O sinal DC é o responsável pela captura do HIV-1, através da grande afinidade interactiva que tem com as gp120 do envelope do vírus. O sinal DC realça também a infecção das células T, sendo a sua presença crucial para uma infecção precoce rápida e eficiente das mesmas, onde os níveis de HIV-1 são baixos. A função do sinal DC na infecção por HIV-1, tem sido, maioritariamente, baseada em modelos *in vitro*, mas os modelos de primatas podem também ser usados para decifrar o mecanismo do sinal DC na transmissão e patogenicidade da infecção com vírus da imunodeficiência, para estudos *in vivo*. O HIV-1 ligado ao sinal DC “esconde-se” nas células dendríticas, perto da membrana celular, sem ser degradado, sendo incorporado, após ligação, em organelos lisossomais não ácidos. Esta incorporação é fundamental para o aumento da infecção das células T mediada pelo sinal DC, fazendo com que as partículas de HIV-1 ligadas ao sinal DC, se mantenham estáveis e retenham a sua infecciosidade por períodos de tempo prolongados. Além do sinal DC, as lectinas tipo C e os proteoglicanos, funcionam também como receptores em *trans* do HIV-1 ⁽¹⁾.

Concluindo, a observação inicial de que o HIV-1 alveja o sinal DC para a disseminação do vírus, parece representar um mecanismo mais geral, utilizado por outros vírus e possivelmente outros patógenos não virais. Muitos estudos indicam que o sinal DC pode ser um alvo universal para estratégias designadas para combater infecções, tais como as do HIV-1, assim como as infecções provocadas por outros patógenos.

Trabalhos futuros:

Experiências futuras irão determinar o mecanismo molecular através do qual o HIV-1 e outros vírus, são capturados e se escondem em células dendríticas, escapando à maquinaria de processamento e subsequente activação imunitária. No caso particular do HIV-1, experiências futuras podem determinar o mecanismo molecular através do qual o sinal DC aumenta a infecção das células T e elucidar quando é que a diversidade na multimerização e organização da membrana do sinal DC é instrumental para a sua função como receptor em *trans* para o HIV-1. Estudos futuros também são necessários para dissecar o mecanismo através do qual os patógenos não virais alvejam o sinal DC, por exemplo, através do produto micobacteriano ManLAM, que induz o seu efeito imunossupressivo nas células dendríticas e a forma como deslocam o balanço entre a sinalização dos TLRs e lectinas tipo C. As propriedades de sinalização do sinal DC que resultam na inibição da sinalização intracelular de TLRs, também merecem estudos, pois será importante compreender que outras lectinas tipo C podem proceder neste sentido. Permanece também sem resposta, em adição ao HIV-1, quais os outros vírus que suprimem as funções das células dendríticas, alvejando o sinal DC. O conjunto imunossupressivo que caracteriza as interações dos CMV e HIV-1 indica que, possivelmente, exista um mecanismo imuno-modelado. De facto, a perda de glicoproteínas do envelope que são codificadas pelos vírus, deve reflectir a secreção de ManLAM e deve interferir com funções das células dendríticas espectadoras. Contrariamente, outros tipos de patógenos devem ser capturados pelo sinal DC para o processamento e apresentação de antígenos, o que, deste modo, facilita uma resposta imunitária contra estes patógenos. Um rato homólogo das funções do sinal DC *in vivo* como um receptor de patógenos para antígenos nascidos no sangue e futuras investigações sobre a função do sinal DC no rato homólogo, serão importantes na determinação da sua importância *in vivo* ⁽¹⁾.

O facto de outras lectinas tipo C poderem reconhecer patógenos semelhantes ao sinal DC e poderem funcionar como receptores em *trans*, abre uma nova área de pesquisa sobre como é que os diferentes subtipos de células dendríticas *in vitro* e *in vivo*, expressam diferentes tipos de receptores de lectinas tipo C e de TLRs que reconhecem e lidam com diferentes patógenos. É provável que a expressão das várias lectinas tipo C por parte dos subtipos de células dendríticas, esteja envolvida na captura de uma gama de diferentes antígenos e, através de diferentes vias de sinalização, as células T induzidas pelas células dendríticas, devem predispor-se para responder a tipos T_H1 ou T_H2. Será extremamente importante, para identificar a especificidade do carboidrato que cada tipo de lectina tipo C expressa através das células dendríticas e para compreender como é que as glicosilações diferenciais de patógenos, devem efectuar alvos para os subtipos de células dendríticas *in vivo* e conduzir à eliminação ou sobrevivência de patógenos. De forma similar, as glicosilações diferenciais específicas das células e tecidos, devem também ser importantes para o controlo do reconhecimento do próprio antígeno, migração de células dendríticas e adesão celular ⁽¹⁾.

Referências bibliográficas:

- 1) Kooyk, Y. & Geijtenbeek, T., 2003, **DC-SINAL: Escape Mechanism for Pathogens**, Nature Reviews/ Immunology, Vol.3/September, 697-709;
- 2) Wagner, E. & Hewlett, M., 2004, **Basic Virology**, Blackwell Science Inc., 2nd edition, UK, 440pp;
- 3) Roit, I., Brostoff, J. & Male, D., 2001, **Immunology**, Mosby, 6th edition, London, 480 pp.
- 4) Dimmock, N., Easton, A. & Leppard, K., 2001, **Introduction to Modern Virology**, Blackwell Science Ltd, 5th edition, UK, 449 pp;
- 5) Goldsby, R. A., Thomas, J. K., Osborne, B. A., Kuby, J.; **Immunology**, fifth edition; W. H. Freeman and Company, New York, 2003.
- 6) www.luc.edu/depts/biology/hiv.htm;
- 7) www.the-scientist.com;
- 8) www.roche-diagnostics.it/salute/HIV/HIV.html;
- 9) www.icb.ufmg.br/vlcd/grupo3.htm;
- 10) www.roche.com/pages/facets/16/fusinh.htm;
- 11) www.cwrv.edu/med/biochemistry/faculty/cho.html;
- 12) www.lions.odu.edu/~kkiburn/bio405-sample1/sld012.htm.
- 13) www.freeman.com.