

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec  
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação da resposta imune celular induzida pelo antígeno  
HIVBr18 utilizando diferentes adjuvantes

**João Paulo Mesquita Luiz**

Pelotas, 2013

**JOÃO PAULO MESQUITA LUIZ**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR INDUZIDA PELO ANTÍGENO  
HIVBr18 UTILIZANDO DIFERENTES ADJUVANTES**

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador do Estágio: Prof<sup>o</sup>. Dr. Edécio Cunha-Neto  
Orientador Acadêmico: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Pinho Hartleben

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

L953a Luiz, João Paulo Mesquita

Avaliação da resposta imune celular induzida pelo antígeno HIVBr18 utilizando diferentes adjuvantes / João Paulo Mesquita Luiz. – 70f. – Monografia (Conclusão de curso) Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2013. – Orientador Cláudia Pinho Hartleben ; co-orientador Edécio Cunha Neto.

1.Biotecnologia. 2.HIV. 3.AIDS. 4.Vacinas. 5.Células T CD4. 6.Adjuvantes.  
7.Antígeno HIVBr18. I.Hartleben, Cláudia Pinho. II.Cunha Neto, Edécio.  
III.Título.

CDD: 616.979205

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Alan John McBride, Universidade Federal de Pelotas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Pinho Hartleben

Dr. Leonardo García Monte, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin, Universidade Federal de Pelotas

*“O primeiro pecado da humanidade foi a fé; a primeira virtude foi a dúvida”.*

Carl Sagan

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Paulo Edgar Silveira Luiz e Ilaine de Mesquita Luiz, minha eterna gratidão e respeito. Jamais teria chegado até aqui sem seu amor, educação, apoio, dedicação, paciência e incentivo incondicional. Agradeço muito a vocês pela ótima vida que me deram.

À minha irmã Juliane pelo carinho, críticas e companhia. Ao meu avô Olindor, pelo incentivo, sabedoria e pelos bons momentos de alegria que passamos juntos. Aos meus tios, Antônio e Marizel, pelo apoio e força que me deram durante o tempo que estudei em Pelotas.

À minha namorada Vanessa, pelo amor, amizade, paciência e companheirismo.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Cláudia Pinho Hartleben, meu reconhecimento e gratidão pela orientação, amizade, paciência e dedicação na minha iniciação científica.

Ao meu orientador Dr. Edécio Cunha-Neto, pela oportunidade de estágio, amizade e conhecimento.

Ao amigo Dr. Leonardo Gárcia Monte, pela confiança, ensinamentos e parceria.

Aos amigos e supervisores Rafael Ribeiro Almeida e Vinicius Canato Santana, pelos ensinamentos, grande amizade, e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Lucas, Wallace, Cristian e demais colegas pelo convívio, amizade, parceria e pelos bons momentos vividos durante a faculdade.

Aos meus familiares e amigos que sempre apoiaram e torceram por mim.

Aos colegas do Laboratório de Imunodiagnóstico pela amizade e pelos momentos agradáveis.

Ao colegas do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia/USP e do Laboratório de Imunologia/InCor pela parceria e boa convivência.

Ao CNPq por me conceder bolsa de iniciação tecnológica.

## Resumo

LUIZ, João Paulo Mesquita. **Avaliação da resposta imune celular induzida pelo antígeno HIVBr18 utilizando diferentes adjuvantes**. 2013. 70f. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Muitos esforços têm sido empregados em pesquisas buscando o desenvolvimento de uma vacina eficaz, capaz de induzir imunidade duradoura, prevenir a aquisição da doença e/ou reduzir a replicação viral em pacientes infectados. Recentemente foi desenhado um antígeno composto por uma sequência de 18 epítomos para células T CD4<sup>+</sup> conservados e promíscuos do subtipo B do HIV-1, chamado de HIVBr18, capaz de induzir respostas amplas e fortes de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, em um contexto de múltiplas moléculas de HLA classe II. Esta pesquisa tem como finalidade aumentar a imunogenicidade da vacina de DNA HIVBr18 e da vacina de vírus recombinante Ad5-HIVBr18 em camundongos BALB/c. Este documento descreve a construção do plasmídeo gDh-HIVBr18.2, desenvolvido a partir da inserção da sequência gênica HIVBr18.2 no interior da sequência gDh de HSV-1. Avaliou-se o efeito da coadministração de plasmídeos codificando as citocinas IL-2, IL-15 e GM-CSF sobre a imunogenicidade da vacina de DNA HIVBr18. Pelo ensaio de ELISPOT e citometria de fluxo observou-se uma concentração quatro vezes menor de HIVBr18 coadministrada com o plasmídeo codificando GM-CSF induziu respostas imunes similares às induzidas pela vacina na quantidade original, em termos de amplitude, magnitude, proliferação celular e produção de citocinas pelas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Diferentes doses da vacina Ad5-HIVBr18 foram testadas e observou-se que a dose de  $2 \times 10^7$  ufp induziu maiores respostas imunes celulares. De forma inesperada, observou-se que a coadministração da citocina GM-CSF reduziu as respostas imunes induzidas pela vacina Ad5-HIVBr18. Os resultados sugerem que as formulações vacinais avaliadas são imunogênicas em camundongos BALB/c, mas ainda necessitam de repetição para confirmar os dados e posteriormente serem testadas em primatas não-humanos.

**Palavras-chave:** HIV, AIDS, vacinas, células T CD4<sup>+</sup>, adjuvantes.

## Abstract

LUIZ, João Paulo Mesquita. **Avaliação da resposta imune celular induzida pelo antígeno HIVBr18 utilizando diferentes adjuvantes**. 2013. 70f. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Many efforts have been made in research looking for the development of an effective vaccine capable of inducing long lasting immunity, preventing disease acquisition and/or reducing viral replication in infected patients. Recently was designed an antigen comprising a sequence of 18 conserved, promiscuous B-subtype HIV-1 CD4 epitopes, called HIVBr18, capable of inducing broad and strong CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses, in the context of multiple HLA class II molecules. This research aims to enhance the immunogenicity of HIVBr18 and Ad5-HIVBr18 vaccines in BALB/c mice. This document reports the construction of the plasmid gDh-HIVBr18.2, which is based on the insertion of the HIVBr18.2 gene sequence within the sequence of HSV-1 gDh. BALB/c mice will be immunized with this construct to assess the effect of the protein gDh on the HIVBr18 immunogenicity. It was evaluated the effects of the coadministration of plasmids encoding the cytokines IL-2, IL-15 and GM-CSF on the cellular immune responses induced by HIVBr18. By ELISPOT assay and flow cytometry was observed that four times less HIVBr18 co-administered with GM-CSF plasmid induced immune responses similar to those observed with the vaccine in the original concentration. The differences were observed in terms of breadth, magnitude, cell proliferation and cytokine production by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Different doses of Ad5-HIVBr18 were tested and found that the  $2 \times 10^7$  pfu dose induced the highest cellular immune responses. Unexpectedly, saw up that the coadministration of the cytokine GM-CSF reduced the immune responses induced by Ad5-HIVBr18. The results suggests that the evaluated vaccine formulations are immunogenic in BALB/c mice, but still require repetition to confirm the data and subsequently be tested in nonhuman primates.

**Key-words:** HIV, AIDS, vaccine, CD4<sup>+</sup> T cell, adjuvants.

## Lista de Figuras

Figura 1. Análise da integridade do gene HIVBr18.2 clonado no pVAX1.	42
Figura 2. Secreção de IFN- $\gamma$ em resposta a estimulação com peptídeos individuais do HIV-1.	44
Figura 3. Secreção de IFN- $\gamma$ (A), proliferação celular (B) e produção de citocinas (C) em resposta a estimulação com o <i>pool</i> de peptídeos do HIV-1.	46
Figura 4. Secreção de IFN- $\gamma$ (A) e IL-2 (B) em resposta a estimulação com peptídeos individuais do HIV-1.	48
Figura 5. Secreção de IFN- $\gamma$ (A) e IL-2 (B) em resposta a estimulação com o <i>pool</i> de peptídeos do HIV-1.	49
Figura 6. Proliferação celular e produção de citocinas em resposta a estimulação com o <i>pool</i> de peptídeos do HIV-1.	50

## Lista de Abreviaturas e Siglas

Ad5 - Adenovírus tipo 5

AEC - 3-amino-9-ethylcarbazole

APC - Allophycocyanin (aloficocianina)

APOBEC3G - Apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G

ART - antiretroviral therapy (Terapia antiretroviral)

BTLA - B- and T-lymphocyte attenuator (Atenuador de linfócitos B e T)

CCR5 - C-C chemokine receptor type 5 (receptor de quimiocina C-C do tipo 5)

CD - Cluster of Differentiation (designação de grupos)

CDC - Centers for disease control and prevention (Centro para Controle e Prevenção de Doenças)

CFSE - Carboxyfluorescein succinimidyl ester (Carboxifluoresceína succinimidil éster)

Con A - Concanavalina A

CRF - Circulating recombinant forms (Formas recombinantes circulantes)

CTL - Cytotoxic T lymphocytes (Linfócito T citotóxico)

CXCR4 - CXC chemokine receptor type 4 (receptor de quimiocina CXC do tipo 4)

Cy7 - Cianina 7

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido tetracético etilenodiamínico)

ELISPOT - Enzyme-linked immunospot assay

GALT - Gut-associated lymphoid tissue (Tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal)

gDh - glicoproteína D com códon otimizado para expressão em mamíferos

GM-CSF - Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)

gp - glicoproteína

H-2<sup>d</sup> - MHC de classe I murino

HEK - Human Embryonic Kidney (Rim embrionário humano)

HLA-DR - Human leukocyte antigen, subclass DR (Antígeno Leucocitário Humano, subclasse DR)

HRP - Horseradish peroxidase

HVEM - Herpes virus entry mediator (Mediador de entrada para herpes vírus)

KIR - Killer immunoglobulin-like receptors (Receptores da família das imunoglobulinas de células NK)

LNTF - Long term non progressors (Não progressores por longo tempo)

m/v - razão massa por volume

MHC - Major histocompatibility complex (Complexo principal de histocompatibilidade)

MIP-1 $\alpha$  - Macrophage Inflammatory Protein alpha (Proteína inflamatória de macrófagos alfa)

MIP-1 $\beta$  - Macrophage Inflammatory Protein beta (Proteína inflamatória de macrófagos beta)

NHP - Non-human primates (Primatas não-humanos)

PE - Phycoerithrin (Ficoeritrina)

PerCP - Peridinin chlorophyll protein (Proteína clorofila peridina)

R-10 – RPMI (10% de Soro fetal bovino)

SDS - Dodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio)

SHIV - Simian-human immunodeficiency virus (Vírus da imunodeficiência humana-símia)

SIV - Simian immunodeficiency virus (Vírus da imunodeficiência símia)

SPF - Specific pathogen free (livre de patógenos específicos)

ssRNA - RNA fita simples

TLR - Toll-like receptor (Receptor do tipo Toll)

UFP - Unidade formadora de placa

UFS - Unidade formadora de *spot*

UNAIDS - Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS

v/v - razão volume por volume

WHO - World Health Organization

$\beta$ gal - Beta-galactosidase

## SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
2.1 Epidemiologia	16
2.2 Estrutura e genoma do HIV	17
2.3 Origem do vírus	19
2.4 Patogênese do HIV	20
2.5 Mecanismo da resposta imune contra o HIV	22
2.5.1 Imunidade Inata	22
2.5.2 Imunidade Adquirida Humoral	23
2.5.3 Imunidade Adquirida Celular	24
2.6 Desenvolvimento de vacinas contra o HIV	27
2.7 Vacinas HIVBr18 e Ad5-HIVBr18	30
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>34</b>
4.1 Construção do plasmídeo gDhHIVBr18.2	34
4.2 Transformação de bactérias DH5 $\alpha$ por choque térmico	35
4.3 Animais e imunizações	36
4.4 Isolamento de esplenócitos e suspensão celular	37

	13
4.5 ELISPOT para IFN- $\gamma$ e IL-2	38
4.6 Marcação intracelular de citocinas e proliferação celular	40
4.7 Análises estatísticas	41
<b>5. RESULTADOS</b>	42
5.1 Construção do plasmídeo gDhHIVBr18.2	42
5.2 Avaliação da resposta imune induzida pela vacina de DNA HIVBr18 coadministrada com plasmídeos que codificam as citocinas IL-2, IL-15 e GM-CSF em camundongos BALB/c	44
5.3 Avaliação da resposta imune induzida pela vacina viral recombinante Ad5- HIVBr18 coadministrada com a citocina GM-CSF em camundongos BALB/c	46
<b>6. DISCUSSÃO</b>	49
<b>7. CONCLUSÕES</b>	56
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	56

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As atividades descritas nesse relatório foram realizadas no período de agosto a novembro de 2012 como parte da disciplina de Estágio Supervisionado de Conclusão do curso de graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). As atividades laboratoriais foram desenvolvidas no Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia da Universidade de São Paulo (USP), no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração (InCor) e no Biotério de Experimentação Animal do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da USP, todos localizados no Complexo da Saúde na cidade de São Paulo-SP.

A primeira parte deste trabalho traz uma revisão bibliográfica dos principais tópicos de pesquisa sobre o HIV e a AIDS, incluindo a epidemiologia, ciclo de vida do HIV, a patogenia da doença, os aspectos imunológicos da infecção e o desenvolvimento de vacinas contra o HIV-1. A segunda parte descreve as atividades laboratoriais realizadas durante o período de estágio, que foi realizado sobre orientação do Prof. Dr. Edécio Cunha-Neto, pesquisador da USP. O trabalho desenvolvido faz parte dos projetos de doutorado dos alunos de pós-graduação em Alergia e Imunopatologia, Vinicius Canato Santana e Rafael Ribeiro Almeida, que trabalham com desenvolvimento de vacinas contra o HIV-1 e foram responsáveis diretos pela supervisão deste trabalho de conclusão de curso. Os ensaios e experimentos realizados durante o estágio foram a manipulação e imunização de camundongos, clonagem gênica e transformação de bactérias, cultivo celular, ELISPOT de IFN- $\gamma$  e IL-2, marcação intracelular de citocinas e citometria de fluxo, PCR em tempo real, imunofluorescência e análise estatística.

As atividades desempenhadas envolveram a utilização de diferentes estratégias adjuvantes para aumentar a resposta imune celular induzida pela vacina HIVBr18, como a fusão de antígenos à proteína gD do HSV-1 e a coadministração

das citocinas IL-2, IL-15 e GM-CSF, e pela vacina Ad5-HIVBr18, utilizando diferentes doses desse antígeno e coadministrando com GM-CSF.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Epidemiologia

Em 2011 a UNAIDS estimou que cerca de 34 milhões de pessoas vivem com infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV) e que 2,7 milhões foram recentemente infectadas (UNAIDS, 2011). A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é o estágio final da doença causada pelo HIV, a qual emergiu na população humana em 1981 (CDC, 1981) como um surto de pneumonia por *Pneumocystis carinii* em homens homossexuais e usuários de drogas nos EUA e que até hoje já matou mais de 25 milhões de pessoas (UNAIDS, 2011). O HIV é um retrovírus do gênero dos lentivírus e é transmitido por contato sexual, injeção de sangue ou de produtos derivados de sangue infectados e de mãe para filho (COHEN, *et al.*, 2008).

Os principais sintomas e sinais da infecção aguda por HIV-1 aparecem dentro de dias a semanas após a exposição e incluem: febre, fadiga, dor de cabeça, linfadenopatia, faringite, mialgia, perda de peso, úlceras genitais e orais entre outros (WHO, 2007). A AIDS é caracterizada pela depleção gradual das células T auxiliares (células T CD4<sup>+</sup>), o alvo principal do vírus, que torna o organismo mais suscetível a infecções oportunistas, como tuberculose e diversas outros tipos de infecções virais, bacterianas e parasíticas, e também cânceres como sarcoma de Kaposi e linfoma não-Hodgkin de células B (GELDMACHER e KOUP, 2012).

No Brasil, de 1980 a junho de 2011 foram notificados 608.230 casos de AIDS, com 34.218 novos casos só em 2010 e uma razão de incidência de 1,7 novos casos em homens para cada caso em mulheres. No país ocorreram 241.469 óbitos tendo como causa básica a AIDS. Entretanto, nos últimos 10 anos tem se observado uma estabilização da taxa de incidência e redução na mortalidade por AIDS (Ministério da Saúde, 2011).

Há diversas maneiras de reduzir o risco de infecção por HIV-1, como a seleção de doadores de sangue, campanhas de aconselhamento, monogamia, uso de preservativo, terapia antirretroviral imediata pós-exposição e circuncisão em homens. O uso de terapia antirretroviral tem tido um impacto muito benéfico na vida dos indivíduos infectados. A terapia é capaz de reduzir a carga viral a níveis indetectáveis, aumentar a contagem de células T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico e diminuir o risco de transmissão (BUNNELL, *et al.*, 2006; CASTILLA, *et al.*, 2005). Em ensaios clínicos o uso do gel vaginal tenofovir (KARIM, *et al.*, 2011) reduziu 54 % o risco de infecção por transmissão sexual em mulheres e o medicamento oral Truvada™ (tenofovir/emtricitabine) reduziu 44% o risco em homens homossexuais (GRANT, *et al.*, 2010).

Apesar da redução no número de novos casos de infecção e mortes relacionadas à AIDS em comparação à anos anteriores (UNAIDS, 2011), a morbidade e os altos custos associados ao tratamento antiretroviral demandam novas estratégias de controle da pandemia, como o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o HIV-1.

## **2.2 Estrutura e genoma do HIV**

O genoma do HIV consiste de duas cópias idênticas de RNA fita simples de 9,5 kb de comprimento que codifica 9 genes diferentes, dentre eles genes estruturais como *gag*, *pol* e *env* e uma complexa combinação de outros genes acessórios e regulatórios como *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*, que modulam a replicação viral . O gene *gag* codifica proteínas estruturais do capsídeo (p24, p7 e p6) e da matriz (p17) e o gene *env* codifica a glicoproteína gp160, que é clivada em uma subunidade externa gp120 e uma subunidade transmembrana gp41 (FANALES-BELASIO, *et al.*, 2010), que juntas formam um componente trimérico no envelope viral que reconhece

e se liga a receptores na superfície da célula do hospedeiro, como o CD4, CCR5 e CXCR4 (BERGER, *et al.*, 1999). O gene *pol* codifica enzimas envolvidas na replicação viral incluindo a transcriptase reversa, que converte o RNA viral em DNA, a integrase, que facilita a incorporação do DNA viral no genoma do hospedeiro e a protease, que cliva as proteínas precursoras Gag e Pol em subunidades (FANALES-BELASIO, *et al.*, 2010).

A proteína Tat aumenta mais de cem vezes a produção de mRNA viral (EMERMAN e MALIM, 1998) e a proteína Rev permite a expressão das proteínas estruturais Gag, Pol e Env. A proteína Rev é essencial para expressão dos genes estruturais e para replicação eficiente do HIV-1 (POMERANTZ, *et al.*, 1992). O maior fator de virulência é a proteína Nef, que contribui para os altos níveis de carga viral e para a depleção de células T CD4<sup>+</sup> (JAMES, *et al.*, 2004). Essa proteína também contribui para a redução da expressão de moléculas CD4 e de proteínas do MHC classe I (CASARTELLI, *et al.*, 2003), um importante mecanismo de evasão da célula infectada da resposta imune celular. Vif previne a inativação do HIV-1 pela APOBEC3G, um importante fator da imunidade inata envolvido na resistência a infecção por HIV-1 (YU, *et al.*, 2003). A poliproteína Gag é clivada pela protease após a emergência dos vírus imaturos das células infectadas, tornando o vírus maduro e infeccioso (BRIGGS, *et al.*, 2006). O vírus HIV-1 é composto por um capsídeo interno formado por moléculas da proteína p24 (Gag), rodeado pela matriz de proteínas p17 (Gag) e coberto por envelope viral lipídico contendo trimeros da proteína gp160 (gp120 + gp41) altamente glicosilada (LIU, *et al.*, 2008; ZHU, *et al.*, 2006).

### 2.3 Origem do vírus

Evidências indicam que o HIV foi transmitido a população humana através de múltiplas infecções zoonóticas por primatas não-humanos infectados com o vírus da imunodeficiência símia (SIV). O vírus HIV é subdividido em 2 tipos, HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 é mais intimamente relacionado ao SIVcpz isolado de subespécies de chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* na África central (GAO, *et al.*, 1999) e o HIV-2 ao SIVsm isolados de macacos africanos mangabey-fuligento (*Cercocebus atys*) no oeste africano (FULTZ, *et al.*, 1986). Evidências indicam que os SIVs ancestrais do HIV foram introduzidos na população humana não mais do que sete vezes e o grupo M parece ter surgido de apenas um evento de transmissão cruzada entre espécies (GAO, *et al.*, 1999). Análises filogenéticas moleculares estimam que a transmissão do HIV-1 ocorreu por volta de 1930 (KORBER, *et al.*, 2000).

O HIV-1 pode ser dividido entre o grupo pandêmico M (*Major*) e os grupos menos prevalentes O (*Outlier*), N (*Non M, Non O*) e P. Mais de 90% das infecções por HIV são do grupo M do HIV-1 e esse grupo pode ser subdividido em 11 clados, chamados de subtipos (A-K) (MCCUTCHAN, 2000). Existe também vírus recombinantes entre subtipos, que são chamados de formas circulantes recombinantes (CRFs). O grupo M do HIV-1 tem distribuição mundial, sendo o subtipo C o mais prevalente mundialmente. Todos os subtipos são encontrados com alta prevalência na África subsaariana, assim como o subtipo B na América do Sul e do Norte e na Europa Ocidental, o subtipo A na Europa Oriental, o subtipo C no sul da África e Índia e o subtipo A/E(CRF01) no sudeste asiático (UNAIDS/WHO).

O vírus replica-se muito rápido e possui uma alta taxa de mutação, o que favorece o surgimento de quasispécies variantes genéticas do HIV. Aquelas capazes de evadir o reconhecimento pelas células T citotóxicas (CTLs) e anticorpos neutralizantes podem ser selecionadas (ALTMAN e FEINBERG, 2004). A

diversidade em um único indivíduo infectado pode chegar a 3% e é maior ainda entre diferentes pessoas infectadas. A variação genética dentro de um subtipo é de 8 a 17%, enquanto que a variação entre subtipos é de 17 a 35% (KORBER, *et al.*, 2001).

## 2.4 Patogênese do HIV

O principal modo de transmissão do HIV-1 é pela via sexual na mucosa genital, onde os primeiros alvos celulares são as células de Langerhans. Estudos mostram que há uma depleção significativa e preferencial das células T CD4<sup>+</sup> na mucosa do trato gastrointestinal durante infecção primária por HIV-1 (MEHANDRU, *et al.*, 2004). A maioria das células T CD4<sup>+</sup> residem no trato gastrointestinal, linfonodos e em outros tecidos linfáticos em vez do sangue periférico. Infecções por HIV-1 e SIV induzem uma perda massiva de células T CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> de memória do tecido linfóide do trato genital e associado ao intestino (GALT) (VEAZEY, *et al.*, 1998). As células T CD4<sup>+</sup> específicas para epítomos do HIV-1 (HIV-1-específicas) são preferencialmente infectadas pelo HIV *in vivo*, o que pode explicar a perda do controle imunológico da replicação viral (DOUEK, *et al.*, 2002).

Em humanos o tempo entre a infecção da mucosa e viremia inicial pode variar de 4 a 11 dias. A infecção começa de forma aguda, com duração de apenas algumas semanas. A glicoproteína gp120 do envelope viral liga-se a molécula CD4 das células, mas necessita da presença de um co-receptor como o CCR5 ou CXCR4, que definem o tropismo do vírus principalmente por macrófagos ou células T, respectivamente. Os vírus transmitidos são tipicamente macrófagos-trópicos, pois as células de Langerhans, os primeiros alvos do vírus, expressam CCR5 e não CXCR4 (BERGER, *et al.*, 1999). O RNA viral pode ser detectado no sangue periférico 10 dias após a infecção por HIV com o pico da viremia chegando a mais

de 100 milhões de cópias/mm<sup>3</sup> (FIEBIG, *et al.*, 2003). Após a infecção há um rápido aumento da carga viral, com ampla disseminação do vírus nos órgãos linfoides, queda acentuada na contagem de células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico, estabelecimento de um reservatório de células T CD4<sup>+</sup> de memória latentemente infectadas e desenvolvimento de resposta imune HIV-1-específica (DOUEK, *et al.*, 2003). O conjunto de células T CD4<sup>+</sup> latentemente infectadas é estabelecido durante o início da infecção primária e a integração do genoma do HIV-1 nessas células torna a erradicação do HIV-1 um grande obstáculo, pois permite a persistência viral apesar da presença de resposta imune e terapia antirretroviral (ALEXAKI, *et al.*, 2008). O pico da viremia é reduzido significativamente de 12 a 20 semanas depois da infecção, enquanto ocorre um aumento parcial na contagem de células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico, o surgimento de células T citotóxicas HIV-1-específicas, estabelecendo o *set point* viral, que marca o início da fase crônica da doença (KAHN e WALKER, 1998). O *set point* da carga viral de um indivíduo é um forte indicador da velocidade da progressão e desenvolvimento para AIDS (MELLORS, *et al.*, 1995; MELLORS, *et al.*, 1996).

O período entre o início da infecção e surgimento de anticorpos em níveis detectáveis é chamado de janela imunológica e a soro-conversão pode ocorrer de três a cinco semanas após a infecção (WEBER, 2006). Apenas poucos indivíduos infectados, chamados de não-progressores por longo tempo (LTNPs), são capazes de controlar eficientemente a viremia sem terapia antirretroviral por longos períodos (SAEZ-CIRION, *et al.*, 2007). A fase assintomática, que dura em média dez anos, é caracterizada por uma lenta queda na contagem de células T CD4<sup>+</sup> e por um aumento da viremia. Com a contagem de 200 células T CD4<sup>+</sup>/μL infecções oportunistas e tumores tornam-se frequentes caracterizando a AIDS em indivíduos infectados (PANTALEO, *et al.*, 1993). Estudos mostram que altos níveis de ativação

de células T CD8<sup>+</sup> após a infecção de células T CD4<sup>+</sup> da mucosa estão relacionados com progressão clínica mais rápida e declínio de células T CD4<sup>+</sup>, causando colapso dos mecanismos de imunidade protetora que levam à AIDS (HUNT, *et al.*, 2008).

## **2.5 Mecanismo da resposta imune contra o HIV**

O principal desafio no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o HIV é ausência de conhecimento suficiente sobre os componentes do sistema imune necessários para proteger contra a infecção por HIV-1. A resistência natural ao HIV é multifatorial e resulta da interação entre as respostas imunes inatas e adaptativas como polimorfismos em genes relacionados com a imunidade inata, elementos anti-retrovirais e algumas moléculas HLA.

### **2.5.1 Imunidade Inata**

Componentes da imunidade inata tais como peptídeos antimicrobianos, fagócitos, células *natural killer*, células dendríticas e o sistema complemento, agem rapidamente e tem um importante papel no controle inicial de infecções virais agudas. Estudos mostram que ssRNAs do HIV-1 codificam múltiplos ligantes de TLR7/8 que podem mediar diretamente a ativação do sistema imune *in vitro* (MEIER, *et al.*, 2007), desencadeando uma potente ativação de células dendríticas e induzindo a produção de várias citocinas antivirais e imunomodulatórias como o IFN- $\alpha$  durante infecções agudas em infecções por HIV-1 e SIV (DIOP, *et al.*, 2008; MALLERET, *et al.*, 2008). O IFN- $\alpha$  aumenta a expressão de fatores de restrição do hospedeiro como TRIM-5 $\alpha$ , que foi associado com a proteção contra infecção por HIV-1 em profissionais do sexo (PRICE, *et al.*, 2010) e APOBEC3G, relacionada com baixa viremia e contagem alta de células T CD4<sup>+</sup> em indivíduos infectados (JIN, *et al.*, 2005). Além do TLR7/8, os receptores TLR2, TLR4 e TLR9 estão envolvidos

no reconhecimento e modulação da replicação do HIV. Evidências apontam um papel central para células *natural killers* (NK) na contenção viral rapidamente após a infecção, enquanto a resposta imune adaptativa se desenvolve. As células NK compõem mais da metade das células produtoras de IFN- $\gamma$  do sangue periférico de pacientes infectados (LOO, *et al.*, 2009) e diferentes alelos dos genes KIRs (Killer Immunoglobulin-like Receptors) podem estar associados com altas ou baixas cargas virais e com a taxa de progressão para AIDS (ALTER, *et al.*, 2009).

### 2.5.2 Imunidade Adquirida Humoral

A imunidade adquirida consiste de respostas humorais e celulares mediadas por linfócitos B e T antígeno-específicos, respectivamente, que se expandem clonalmente e se diferenciam, reconhecendo uma enorme variedade de patógenos e a geração de memória imunológica que protege contra reexposição do antígeno (MURPHY, *et al.*, 2010). A imunidade humoral é considerada um componente chave no desenvolvimento de vacinas eficazes contra o HIV-1 (HUBER e TRKOLA, 2007). O HIV se replica e sofre mutações continuamente frente a resposta de anticorpos neutralizantes dando origem ao escape de mutantes que são rapidamente selecionados pelos altos níveis de replicação viral. A resposta humoral contra HIV é geralmente robusta e predominantemente direcionada contra as proteínas estruturais do vírus (AASA-CHAPMAN, *et al.*, 2004). Os primeiros anticorpos detectados reconhecem determinantes lineares nas proteínas estruturais do HIV-1 codificados por *gag* e depois epítomos por codificados por *env* e *pol*, e também proteínas regulatórias e acessórias. Dentro de poucas semanas é possível detectar anticorpos no plasma de indivíduos HIV-positivos contra as proteínas do envelope gp120 e gp41, do capsídeo (p24) e da matriz (p17) (AASA-CHAPMAN, *et al.*, 2004; DEMBERG, *et al.*, 2007; RICHMAN, *et al.*, 2003). Pacientes com infecção aguda por

HIV-1 normalmente tem declínio significativo da viremia primária antes dos anticorpos neutralizantes serem detectáveis (KROUP, *et al.*, 1994).

A maioria dos anticorpos direcionados contra a glicoproteína do envelope viral (Env) reconhece epitopos não-neutralizantes dos monômeros da glicoproteína e são ineficazes (BURTON, 1997; WYATT, *et al.*, 1998). Env é altamente glicosilada, e os glicanos pouco ou não-imunogênicos previnem o acesso dos anticorpos à estrutura protegida dos peptídeos (JOHNSON e DESROSIERS, 2002). A trimerização da estrutura gp120-gp41 pode proteger epitopos vulneráveis que são mais bem expostos em subunidades monoméricas individuais. Anticorpos que neutralizam o HIV-1 antes de entrar nas células (anticorpos neutralizantes) são principalmente direcionados contra o envelope viral, como a região hipervariável da subunidade de Env gp120 (alça V3) e contra as regiões com sítio de ligação para CD4 e para os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 (PARREN, *et al.*, 1999). Embora alguns indivíduos com controle de longo prazo da viremia do HIV-1 sem uso de ART tenham fortes respostas de anticorpos neutralizantes, essas respostas não estão presentes em outros pacientes que controlam o vírus (HARRER, *et al.*, 1996).

### **2.5.3 Imunidade Adquirida Celular**

As células T CD4<sup>+</sup> tem um papel importante em auxiliar a diferenciação completa e manutenção de células B e células T citotóxicas. A principal característica da infecção do HIV-1 é a depleção progressiva das células T CD4<sup>+</sup> e diminuição da função das células T auxiliares que está associado com um declínio na atividade das CTLs (MURRAY, *et al.*, 1984; MUSEY, *et al.*, 1999). Diversos estudos em humanos e animais sugerem que as respostas das células T auxiliares são necessárias para manter a atividade dos CTLs, e portanto, a diminuição dessas células em pacientes com infecção crônica por HIV-1 podem explicar porque o

sistema imunológico não pode controlar o vírus apesar da presença dos CTLs (GANDHI e WALKER, 2002). Respostas proliferativas fortes de células T CD4<sup>+</sup> contra as proteínas do HIV-1 tem demonstrado boa correlação com o controle imune da carga viral (ROSENBERG, *et al.*, 1997). Por isso é extremamente desejável para uma vacina contra o HIV-1 induzir respostas robustas de células T CD4<sup>+</sup> e de células T CD8<sup>+</sup> a fim de controlar a replicação viral e reduzir chances de transmissão subsequentes (RIBEIRO, *et al.*, 2010).

Evidências do papel das células T CD4<sup>+</sup> no controle do HIV-1 vieram de diversos estudos sobre indivíduos infectados. Pacientes não-progressores por longo tempo possuem fortes respostas linfoproliferativas de células T contra os antígenos do HIV. Indivíduos que conseguem controlar a viremia sem a ajuda da terapia antirretroviral possuem respostas policlonais, persistentes e vigorosas de células T CD4<sup>+</sup> HIV-1-específicas. Indivíduos com as maiores respostas de células T CD4<sup>+</sup> tinham as menores cargas virais, enquanto os indivíduos com as menores respostas de células T CD4<sup>+</sup> tinham as maiores cargas virais (ALTFELD, *et al.*, 2001; KALAMS, *et al.*, 1999). Um estudo demonstrou que mulheres profissionais do sexo expostas ao HIV-1, mas soronegativas, possuíam forte proliferação de células T CD4<sup>+</sup> p24-específicas e baixos níveis de ativação imune e apoptose (ALIMONTI, *et al.*, 2005). Respostas fortes de células T auxiliares foram associadas com respostas de CTLs fortes, pois células T CD4<sup>+</sup> podem coordenar a resposta imune contra o HIV-1 pela manutenção efetiva das funções dos CTLs. Evidências indicam que células T CD4<sup>+</sup> HIV-1-específicas são cruciais para geração de respostas de células T CD8<sup>+</sup> eficazes contra SIV/HIV-1 e contribuem para proteção contra AIDS (VACCARI, *et al.*, 2008).

Trabalhos demonstram que macacos cronicamente infectados com SIV $\Delta$ nef possuem alta frequência de resposta de células T CD4<sup>+</sup> vírus-específicas com

fenótipo de memória efetora do que macacos cronicamente infectados com SIVs do tipo selvagem (GAUDUIN, *et al.*, 2006). Macacos imunizados com SIV $\Delta$ nef desenvolvem fortes respostas imunes celulares que protegem contra o rápido declínio de células T CD4<sup>+</sup> e o desenvolvimento da doença após desafio com SIVs patogênicos (WYAND, *et al.*, 1999). Evidências indicam que a indução de altas frequências de células T CD4<sup>+</sup> vírus-específicas por vacinação pode ser a chave para atingir a contenção da viremia por SIV (HEL, *et al.*, 2002). Células T CD8<sup>+</sup> são um componente importante da resposta imune adaptativa no controle da replicação HIV-1 tanto na infecção aguda e quanto na crônica. Esta resposta é dirigida pela apresentação dos epítomos do HIV-1 pelas moléculas do HLA classe I na superfície das células infectadas do hospedeiro (BORROW, *et al.*, 1994; CARMICHAEL, *et al.*, 1993; GOULDER e WATKINS, 2008). Na infecção por HIV-1, as células T CD8<sup>+</sup> vírus-específicas aparecem pela primeira vez no sangue antes do pico da viremia, depois se expandem e contraem, e a carga viral diminui. As células T CD8<sup>+</sup> HIV-1-específicas são detectáveis antes da soroconversão e muito antes dos anticorpos neutralizantes (KOUPEL, *et al.*, 1994). A ausência de CTLs HIV-1-específicos detectáveis ou a geração de resposta CD8 estreitamente oligoclonal a infecção primária por HIV-1 tem sido associados com mau resultado clínico (WILSON, *et al.*, 2000).

Estudos mostram a importância da diversidade do reconhecimento das células T no controle da doença (GOULDER e WATKINS, 2008). Homozigose para HLA de classe I são associadas a uma acelerada progressão para doenças (CARRINGTON, *et al.*, 1999) e mais especificamente, algumas classes de HLA classe I são associados com uma progressão para a doença mais lentamente (GOULDER, *et al.*, 1996; KASLOW, *et al.*, 1996) ou de forma mais agressiva (KASLOW, *et al.*, 1990).

Pessoas infectadas com HIV-1 desenvolvem fortes respostas de CTLs vírus-específica contra genes estruturais e regulatórios do HIV-1. Os CTLs vírus-específicos podem controlar o HIV-1 lisando as células infectadas que apresentam peptídeos virais na superfície celular associados com moléculas do MHC classe I, eliminando-as antes da liberação de novos vírions (YANG, *et al.*, 1996). Além disso, logo após o encontro dos CTLs com seus antígenos alvos no contexto do HLA adequado, estes inibem a replicação viral nas células infectadas e secretam quimiocinas como MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES que se ligam a co-receptores para o HIV-1 na superfície de células T CD4<sup>+</sup> e bloqueiam a entrada do vírus nas células vizinhas (WAGNER, *et al.*, 1998).

O papel dos CTLs no controle do HIV-1 é fortemente suportado por estudos utilizando macacos-rhesus infectados com o SIV. Uma série de experimentos indica que CTLs são importantes em determinar o *set point* da carga viral em um estado estacionário e assim controlar a infecção viral (HANSEN, *et al.*, 2009).

Acredita-se que vacinas baseadas na indução de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> HIV-1-específicas sejam capazes de controlar a replicação viral e, conseqüentemente, proteger contra a depleção precoce de células T CD4<sup>+</sup> pós-infecção.

## **2.6 Desenvolvimento de vacinas contra o HIV**

Devido às dificuldades de estimular a produção de anticorpos capazes de neutralizar o HIV, muito tem se investido a fim de desenvolver uma vacina indutora de resposta imune celular contra os antígenos do HIV. Acredita-se que essas vacinas não protejam contra a infecção, mas controlam a replicação do vírus, retardam a progressão da doença e diminuem transmissões subseqüentes. Vacinas preventivas experimentais contra o HIV-1 já foram administradas em mais de 44.000 voluntários em mais de 187 ensaios clínicos desde 1987 (O'CONNELL, *et al.*, 2012).

Para uma vacina candidata contra o HIV-1 ser testada na fase clínica I em humanos geralmente ela necessita ser avaliada em animais não-primatas e em seguida primatas não-humanos. A infecção de primatas não-humanos (NHP) com SIVs patogênicos recapitula os efeitos do HIV-1 em humanos, e por isso são os melhores modelos animais para teste de terapias antirretrovirais e de vacinas contra o HIV-1. Se for comprovada a imunogenicidade e segurança uma vacina análoga contra o SIV deve ser utilizada para avaliar a eficácia de proteção em NHPs contra o desafio com SIVs patogênicos (ex. SIVmac239). Com proteção significativa da replicação viral em NHPs a vacina contra o HIV-1 pode ser liberada para iniciar o ensaio de fase clínica I em humanos (MORGAN, *et al.*, 2008).

Imunizações com as subunidades de Env induzem anticorpos neutralizantes contra região hipervariável V3 da gp120 e protegem NHPs contra cepas homologas do HIV-1, SIV, SHIV (BARNETT, *et al.*, 2008; MOOIJ, *et al.*, 1998), mas não contra heterólogas (STOTT, *et al.*, 1998). Imunizações passivas contra a mesma região mostraram os mesmos resultados. Entretanto, recentemente mostrou-se que o uso do conjunto dos mais potentes anticorpos anti-HIV-1 conhecidos pode efetivamente controlar a infecção por HIV-1 e suprimir a carga viral em camundongos humanizados (KLEIN, *et al.*, 2012). Diferentes tipos de vacinas candidatas contra o HIV foram desenvolvidas e testadas em NHPs, incluindo vacinas vivas atenuadas, vacinas inativadas e principalmente de subunidades, demonstram incapacidade de induzir respostas protetoras de anticorpos neutralizantes.

Os ensaios clínicos de eficácia fase III da vacina (Vaxgen) AIDSVAX B/E (VAX003) e AIDSVAX B/B (VAX 004) foram conduzidos após mostrar segurança e imunogenicidade no ensaio de fase I/II na Tailândia e na América do Norte e Europa, respectivamente. Usuários de drogas injetáveis (VAX003) e indivíduos com alto risco de contrair HIV-1 via transmissão sexual (VAX004) receberam as vacinas que

consistiam de dois antígenos recombinantes da gp120 do envelope do HIV-1, uma do envelope do subtipo B (MN) e a outra do envelope do subtipo E(A244) ou do subtipo B(GNE8). As vacinas não preveniram a infecção por HIV-1, não foram capazes de retardar a progressão da doença, nem mostraram diferença significativa nas cargas virais entre o grupo vacinado e placebo (FLYNN, *et al.*, 2005; PITISUTTITHUM, *et al.*, 2006).

Vacinas de DNA, vacinas baseadas em vetores vivos recombinantes e regimes *prime/boost* heterologos induzem fortes respostas imunes celulares, que se acredita serem capazes de proteger contra a progressão da doença, controlando a replicação e a carga viral, mas não protegendo contra a infecção. Vários estudos mostram que essas vacinas induzem proteção em NHPs controlando a viremia, diminuindo a queda de células T CD4<sup>+</sup> e prolongando a sobrevivência após desafio com SIV e SHIV (DEMBERG, *et al.*, 2007; ROSATI, *et al.*, 2009; SUN, *et al.*, 2006; WILSON, *et al.*, 2009) e são seguras e bastante imunogênicas nos ensaios clínicos de fase I e II em humanos (FREEL, *et al.*, 2010; GOEPFERT, *et al.*, 2011; KIBUUKA, *et al.*, 2010).

Dois ensaios de fase IIb, Step e Phambili, com a vacina de adenovírus tipo 5 (Ad5) com replicação defeituosa MRK gag/pol/nef tiveram de ser encerrados recentemente, pois um sub-grupo de vacinados mostrou maior número de infecção por HIV-1 que o grupo placebo. Os ensaios foram conduzidos em homens e mulheres com alto risco de transmissão sexual do HIV-1 nas Américas, Caribe e Austrália (Step) e na África do Sul (Phambili). O estudo demonstrou que a pré-existência de imunidade contra Ad5 nos homens não-circuncidados vacinados aumentou a frequência de infecção nesse grupo (BUCHBINDER, *et al.*, 2008; GRAY, *et al.*, 2010).

O ensaio clínico de fase III RV144 utilizando o regime *prime-boost* heterólogo foi conduzido na Tailândia envolvendo heterossexuais com risco de infecção por HIV-1. Os indivíduos receberam a vacina vetorizada Canarypox recombinante [ALVAC-HIV-1 (vCP1521)] que expressa os antígenos antígeno Gag e Pol do subtipo B e o antígeno gp120 do subtipo CRF01\_AE ligado a porção de ancoramento à membrana da gp41 do subtipo B como o *prime* e a vacina bivalente de subunidade gp120 MN/A244 recombinante (AIDSVAX B/E) como *boost*. A vacinação reduziu a taxa de aquisição da infecção do HIV-1 com uma eficácia de 31,2%, mas não houve efeito na carga viral inicial nem na contagem de células T CD4<sup>+</sup> dos indivíduos imunizados que adquiriam a infecção (DOLIN, 2009; HAYNES, *et al.*, 2012; RERKS-NGARM, *et al.*, 2009).

Atualmente há apenas um ensaio clínico de fase III em curso e cinco já foram concluídos. Desenvolver uma vacina eficaz contra o HIV-1 ainda é um grande desafio para os cientistas, pois não se sabe ao certo qual tipo de imunidade é a mais importante para proteção contra infecção e controle da replicação viral e os animais modelos não predizem a eficácia da vacina em humanos. Os resultados já obtidos sobre vacinas candidatas desenvolvidas contra o HIV-1 oferecem compreensão sobre quais rumos a pesquisa deve tomar para que possamos alcançar uma vacina eficaz nos próximos anos.

## **2.7 Vacinas HIVBr18 e Ad5-HIVBr18**

Com o intuito de desenvolver uma nova estratégia vacinal contra o HIV-1, foi identificado, usando o algoritmo TEPITOPE (STURNIOLO, *et al.*, 1999), um conjunto de 18 epítopos para células T CD4<sup>+</sup> conservados, derivados do consenso de todo o proteoma do subtipo B do HIV-1, capaz de se ligar a múltiplas moléculas HLA-DR e com potencial de estimular uma ampla resposta de células T em uma alta proporção

de indivíduos com diferentes moléculas HLA de classe II (FONSECA, *et al.*, 2006). Uma vacina de DNA que codifica os 18 epítomos (HIVBr18) induziu amplas respostas de células T CD4<sup>+</sup> em camundongos transgênicos para moléculas HLA de classe II comuns em humanos (HLA-DR2, -DR4, -DQ6, -DQ8) e foi observado reconhecimento de 16 dos 18 epítomos codificados pela vacina (RIBEIRO, *et al.*, 2010). Camundongos BALB/c imunizados com a vacina de DNA HIVBr18 mostraram respostas de células T CD4<sup>+</sup> e de células T CD8<sup>+</sup> de alta magnitude e amplitude, com capacidade proliferativa e de produção simultânea de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ) e geração de células T CD4<sup>+</sup> de memória central e efetora de longa duração (ROSA, *et al.*, 2011b). Imunização subcutânea com adenovírus recombinante sorotipo 5 codificando os 18 epítomos do HIV-1 (Ad5-HIVBr18) induziram maior proliferação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> HIV-1-específicas e aumentou produção das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , demonstrando a imunogenicidade superior do vetor viral Ad5-HIVBr18 comparado à vacina de DNA HIVBr18 (ROSA, *et al.*, 2011a).

A imunogenicidade de vacinas de DNA pode ser melhorada através da utilização de genes sintéticos com códons otimizados (GRAHAM, *et al.*, 2006), repetição de três imunizações sucessivas, co-expressão de citocinas IL-15, GM-CSF e outras, como adjuvante de vacinas (KUTZLER, *et al.*, 2005; SCHADECK, *et al.*, 2006). Vacinas de DNA ou vetores virais recombinantes que expressam proteínas geneticamente fusionadas a proteína gD do HSV-1 ativam fortemente uma resposta imune adaptativa, principalmente respostas de células T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas (LASARO, *et al.*, 2008). A gD liga-se a proteína HVEM nos linfócitos T (mediador de entrada para herpesvirus - *herpesvirus entry mediator*) no mesmo sítio que a proteína BTLA. A interação entre HVEM e BTLA fornecem sinais inibitórios para ativação de células T (COMPAAN, *et al.*, 2005), e a ligação da gD ao HVEM bloqueia essa interação (CHEUNG, *et al.*, 2005) e promove um aumento substancial

na resposta imune de células T e B antígeno-específicas. Antígenos de papilomavirus humano tipo-16 (HPV-16) fusiado a gD induzem imunidade mediada por células T e proteção contra desafio tumoral (DINIZ, *et al.*, 2010; LASARO, *et al.*, 2005).

A coadministração da citocina IL-2 como adjuvante promove aumento respostas imunes induzidas por vacinas de DNA em murinos e primatas (BAROUCH, *et al.*, 2000; TRYNISZEWSKA, *et al.*, 2002), principalmente estimulando a proliferação de células T e *natural killers* e a diferenciação e sobrevivência de células T (CANTRELL e SMITH, 1984; SMITH, 1988). Plasmídeos que codificam a IL-15 coadministrados com vacinas de DNA contra o HIV-1 aumentam respostas citotóxicas (KUTZLER, *et al.*, 2005) e a supressão da replicação viral (BOYER, *et al.*, 2007), e são importantes para a estimulação, proliferação e sobrevivência de células T CD8<sup>+</sup> de memória antígeno-específicas (BECKER, *et al.*, 2002; ZHANG, *et al.*, 1998). Outra citocina que tem sido amplamente utilizada como adjuvante para aumentar a imunidade de diferentes vacinas é o GM-CSF (BAROUCH, *et al.*, 2002; LAI, *et al.*, 2007; WEISS, *et al.*, 1998), capaz de promover intensamente o recrutamento, maturação e sobrevivência das células dendríticas e macrófagos e potencializar a apresentação de antígenos (BOWNE, *et al.*, 1999). Baseado nesses estudos, o presente trabalho tem como objetivo testar essas diferentes estratégias a fim de melhorar a imunogenicidade de nossas construções vacinais.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar diferentes estratégias a fim de aumentar a imunogenicidade de duas vacinas que codificam 18 peptídeos do HIV-1.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Construir um plasmídeo que codifica o antígeno HIVBr18.2 fusionado a glicoproteína gDh de HSV-1.
2. Avaliar a amplitude e magnitude da resposta imunológica induzida pela vacina de DNA HIVBr18 coadministrada com plasmídeos que codificam as citocinas IL-2, IL-15 e GM-CSF.
3. Avaliar o efeito da coadministração de um plasmídeo que codifica a citocina GM-CSF na amplitude e magnitude da resposta imunológica induzida pelo vetor viral recombinante Ad5-HIVBr18.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Construção do plasmídeo gDhHIVBr18.2

A amplificação do inserto HIVBr18 e15e16t\_P05 foi feita por PCR na qual foram utilizados como DNA molde o plasmídeo pUC57HIVBr18e15\_e16t\_P05 sintetizado pela GenScript. A sequência de nucleotídeos do gene sintético foi otimizado com códons preferencialmente utilizados por mamíferos. Na reação de PCR foram utilizados os seguintes iniciadores: *forward* com sítio de restrição para *ApaI* ttggggcccgaggaactcaggtcactc e *reverse* como sítio de restrição para *XbaI* ttgtctagacacatggtgaaagccagggc.

As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 50  $\mu$ L, compreendendo 0,2  $\mu$ M de cada *primer*, 40 ng de DNA molde, dNTPs (0,2 mM cada), tampão High Fidelity PCR (1X), MgSO<sub>4</sub> 2 mM e uma unidade da enzima Platinum® Taq DNA Polimerase High Fidelity. Para a amplificação foram utilizadas várias etapas: desnaturação a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos térmicos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, e extensão por 10 min a 72 °C. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), corados com brometo de etídeo 0,1% (v/v) e purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®). Em seguida 2  $\mu$ g do amplicon e 5  $\mu$ g do vetor pVAX1-gDhHIVBr18 foram digeridos com as enzimas de restrição *XbaI* e *ApaI* (Fermentas®) por 1 h a 37 °C, seguindo orientações do fabricante. Após a digestão, vetor e inserto foram analisados em gel de agarose, as bandas foram excisadas do gel, purificadas e quantificadas utilizando-se o equipamento Nanodrop Spectrophotometer ND-1000. Posteriormente foi feita uma reação de ligação (100 ng do vetor e 300 ng do inserto digeridos) com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen®) por 20 min a 16 °C. O plasmídeo gerado foi denominado gDhHIVBr18.2.

#### 4.2 Transformação de bactérias DH5 $\alpha$ por choque térmico

Para transformação, aproximadamente 200 ng do plasmídeo gDhHIVBr18.2 foram adicionados a alíquotas de 150  $\mu$ L de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. Após incubação no gelo por 30 min, as amostras foram colocadas a 42 °C por 2 min e recolocadas no gelo por 5 min. Em seguida, acrescentou-se 800  $\mu$ L de meio LB e as amostras foram incubadas a 37 °C por 1-2 h. Em um tubo com 3 mL de LB líquido contendo 50  $\mu$ g/mL de canamicina (Sigma<sup>®</sup>) foi adicionado 6  $\mu$ L de inóculo (1:500) e incubado 18 h sob agitação (200 rpm) a 37 °C. As culturas bacterianas transformadas com cada plasmídeo foram centrifugadas a 400 rpm por 4 min, ressuspensas em 100  $\mu$ L em meio LB e plaqueadas em meio LB sólido contendo 50  $\mu$ g/mL de canamicina. As placas foram incubadas por 18 h a 37 °C. Os clones resultantes foram coletados, incubados em meio LB líquido a 37 °C por 12 h, centrifugados a 10.000 rpm por 5 min e submetidos ao processo de extração e purificação de DNA plasmidial. O sobrenadante foi desprezado e o pellet de bactérias foi ressuspenso em 150  $\mu$ L de tampão P1 (Tris-HCl 50mM pH 8,0; EDTA 10 mM; RNase 100  $\mu$ g/mL) e esperou-se 5 min. Posteriormente, foram adicionados 150  $\mu$ L de tampão P2 (NaOH 200 mM; SDS 1%) e esperou-se 5 min para a completa lise celular. Em seguida, adicionou-se 150  $\mu$ L de tampão P3 (acetato de potássio 3 M pH 5,5) e esperou-se 5 min de incubação no gelo para neutralização da reação. Em seguida, foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 min a 4 °C, transferidos 400  $\mu$ L do sobrenadante para outro tubo e adicionado 320  $\mu$ L de isopropanol. Os tubos foram incubados no gelo por 5 min, centrifugados e o sobrenadante foi removido. Adicionou-se 200  $\mu$ L de etanol 75%, incubou-se por 5 min e os tubos foram novamente centrifugados, por 5 min. Removeu-se o sobrenadante e finalmente o pellet foi ressuspenso em 40  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril livre de

endotoxinas. Os plasmídeos purificados foram então digeridos com a enzima *XbaI* e *ApaI* para confirmação da clonagem, e analisados em gel de agarose 1%.

### 4.3 Animais e imunizações

Camundongos isogênicos fêmeas de 6 a 8 semanas de idade da linhagem BALB/c (H-2<sup>d</sup>) foram utilizados para os experimentos de imunização. Os animais foram mantidos e manipulados em condições SPF no biotério do Laboratório de Imunologia do InCor, localizado no prédio do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IMT/FMUSP). Os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com o guia do comitê ético da Universidade de São Paulo. Os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>.

Experimento 1: Uma vacina de DNA contendo a sequência de nucleotídeos com códons otimizados dos 18 epítomos para células T CD4<sup>+</sup> do HIV-1 descritos por (FONSECA, *et al.*, 2006): p17 (73-89), p24 (33-45), p24 (131-150), p6 (32-46), pol (63-77), pol (136-150), pol (785-799), gp41(261-276), gp160 (19-31), gp160 (174-185), gp160 (188-201), gp160 (481-498), rev (11-27), vpr (58-72), vpr (65-82), vif (144-158), vpu (6-20) and nef (180-194) foi construído e produzido como descrito em (RIBEIRO, *et al.*, 2010; ROSA, *et al.*, 2011b). Os números em parênteses representam a posição dos aminoácidos no genoma da cepa HXB2 do HIV-1. Foram utilizados 24 animais divididos em 8 grupos experimentais: DNA pVAX1 $\phi$ , DNA HIVBr18 100  $\mu$ g, DNA HIVBr18 25  $\mu$ g, DNA HIVBr18 25  $\mu$ g coadministrado com 25  $\mu$ g de plasmídeo codificando as diferentes citocinas: IL-2, IL-15, GM-CSF, GM-CSF e IL-2, GM-CSF e IL-15. A imunização foi realizada em 3 doses, administradas nas semanas 0, 2 e 4. Os animais do grupo pVAX1 $\phi$  e HIVBr18 100  $\mu$ g receberam 50  $\mu$ L de DNA plasmidial em cada quadríceps na concentração de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L). Os

animais dos outros grupos receberam 50  $\mu$ L de DNA em cada quadríceps contendo 25  $\mu$ g de cada DNA plasmidial na concentração de 0,25  $\mu$ g/ $\mu$ L (HIVBr18 e IL-2 ou IL-15 ou GM-CSF ou GM-CSF/IL-2 ou GM-CSF/IL-15) em PBS. Os animais foram sacrificados duas semanas após a última imunização.

Experimento 2: O vetor viral recombinante adenovírus sorotipo 5 (Ad5) E1-deletado com replicação defeituosa que codifica a sequência HIVBr18 (Ad5-HIVBr18) (ROSA, *et al.*, 2011a) foi comercialmente adquirido (ViraQuest, Inc.®) e um adenovírus recombinante carreador da sequência codificadora da galactosidase gentilmente fornecido pelo Dr. Maurício Rodrigues (UNIFESP) foi usado como controle. Foram utilizados 12 animais divididos em 4 grupos experimentais: Ad5- $\beta$ gal ( $2 \times 10^8$  ufp), Ad5-HIVBr18 ( $2 \times 10^8$  ufp), Ad5-HIVBr18 ( $2 \times 10^7$  ufp) e Ad5-HIVBr18 ( $2 \times 10^7$  ufp)/GM-CSF. A imunização foi realizada em 3 doses, administradas nas semanas 0, 2 e 4. Para as imunizações com adenovírus, foram administradas intramuscularmente 100  $\mu$ L de suspensões virais (Ad5-HIVBr18 ou Ad5- $\beta$ gal) contendo  $2 \times 10^8$  ou  $2 \times 10^7$  ufp com ou sem coadministração de DNA plasmidial que codifica GM-CSF na concentração de 0,25  $\mu$ g/ $\mu$ L em PBS. Os animais foram sacrificados duas semanas após a última imunização.

#### **4.4 Isolamento de esplenócitos e suspensão celular**

Os camundongos imunizados nos experimentos 1 e 2 foram sacrificados 2 semanas após a última dose e seus baços foram retirados assepticamente. Os esplenócitos foram retirados após maceração do órgão e foram lavados com 10 mL de meio RPMI (Gibco®) e centrifugadas a 1800 rpm por 5 min a 4 °C. Em seguida, as células foram tratadas com tampão hemolítico ACK ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,15 M,  $\text{KHCO}_3$  1 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,1 mM) e lavadas duas vezes com 10 mL de meio RPMI (Gibco®) suplementado com L-glutamina 2 mM (Life Technologies®), piruvato de sódio 1 mM

(Life Technologies<sup>®</sup>), 1% v/v de solução de aminoácidos não-essenciais (Gibco<sup>®</sup>), 1% v/v solução de vitaminas (Life Technologies<sup>®</sup>), Gentamicina 40 mg/mL, Peflacina 20 mg/mL e 2β-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M (Life Technologies<sup>®</sup>). Ao fim das lavagens, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio R-10 (RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco<sup>®</sup>)). A viabilidade celular foi avaliada usando o corante de exclusão Trypan Blue 0,2% para discriminar entre células vivas e mortas. A concentração celular foi estimada com ajuda de uma câmara de Neubauer e ajustada com meio de cultivo celular. As suspensões celulares de ambos experimentos 1 e 2 foram utilizados posteriormente nos ensaio de ELISPOT e citometria de fluxo.

#### **4.5 ELISPOT para IFN-γ e IL-2**

Os esplenócitos dos camundongos imunizados nos experimentos 1 e 2 foram avaliados quanto a sua habilidade de secretar IFN-γ e/ou IL-2 depois da estimulação *in vitro* com 5 μM dos peptídeos do HIV-1, codificados pela HIVBr18, de forma individual ou em *pool*. Os ensaios de ELISPOT foram realizados utilizando-se de anticorpos anti-IFN-γ e anti-IL-2 murinos (BD<sup>®</sup>). O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Em síntese, o anticorpo de captura anti-IFN-γ ou anti-IL-2 murinos foram adicionados às placas na concentração de 5 μg/mL em volume final de 100 μL e incubados por 18 h à 4 °C. Em seguida os poços foram lavados com 200 μL de R-10 e bloqueados também com 200 μL de R-10 por 2 h à temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados os estímulos: meio RPMI, como controle negativo, Con A (2,5 μg/poço) (Sigma<sup>®</sup>), como controle positivo e os 18 peptídeos sintéticos do HIV-1 (5 μM) em um volume final de 100 μL, assim como as suspensões celulares na concentração de  $3 \times 10^5$  células/poço, também em volume final de 100 μL, sendo todos preparados em meio R-10. As placas foram

novamente incubadas por 18 h a 37 °C na estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente as placas foram lavadas 2x com água deionizada e 3x com PBS-T (Tween 20 0,05%). Os anticorpos de detecção (anti-IFN- $\gamma$  ou anti-IL-2 biotinizado) foram diluídos em PBS-10% SFB e adicionados aos poços (volume 100  $\mu$ L/poço) na concentração final de 2  $\mu$ g/mL. As placas foram incubadas novamente durante 2 h à temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS-T, foi adicionado 100  $\mu$ L por poço de conjugado enzimático (estreptavidina-HRP) na concentração final de 1x diluído em PBS-10% SFB, seguido de mais uma etapa de incubação de 1 h à temperatura ambiente. Para revelação, os poços foram lavados 4x com PBS-T e posteriormente 2x com PBS. Foram adicionados então 100  $\mu$ L/poço da solução final de substrato AEC (3-amino-9-etilcarbazol - BD) e a formação de spots foi monitorada de 5 a 60 min, levando em consideração o aumento do *background* nos poços do controle negativo. Após esse período o substrato foi removido e a reação interrompida com 5 lavagens das placas com água deionizada. Os *spots* foram contados utilizando o aparelho AID Elispot Reader (Autoimmun Diagnostika GmbH). O número de células T antígeno-específicas, expressos como unidades formadoras de *spot* (UFS)/10<sup>6</sup> células, foi calculado depois de subtrair os valores da média dos controles negativos. Foram considerados positivos os estímulos cujo número de *spots* por 10<sup>6</sup> células foi superior ao *cutoff* do experimento em questão. O *cutoff* foi calculado como a média de *spots* + 3 desvios padrões obtidos da análise do grupo imunizado com pVAX1 $\phi$  (experimento 1) ou com Ad5- $\beta$ gal (experimento 2), estimulados com os peptídeos individuais. O *cutoff* para IFN- $\gamma$  ou IL-2 foi de 15 UFS/10<sup>6</sup> células.

#### 4.6 Marcação intracelular de citocinas e proliferação celular

Para realização dos ensaios de proliferação celular os esplenócitos recém isolados (concentração de  $100 \times 10^6$  células/mL) foram ressuspensos em PBS pré-aquecido ( $37^\circ\text{C}$ ) e marcados com  $1,25 \mu\text{M}$  de CFSE durante 10 min a  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida o material foi centrifugado a 1800 rpm por 5 min a  $4^\circ\text{C}$  e a reação foi interrompida pela adição de meio R10. Após 3 lavagens com 5 mL de R10, as células foram ressuspensas em meio R10 na concentração de  $1,5 \times 10^6/\text{mL}$ . As células foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo U (Nunc<sup>®</sup>) na quantidade de  $3 \times 10^5$  células/poço em volume final de 200  $\mu\text{L}$  de RPMI. Os esplenócitos dos animais foram estimulados com o *pool* dos 18 peptídeos sintéticos do HIV-1. O primeiro estímulo foi realizado no primeiro dia de cultura com  $5 \mu\text{M}$  do *pool* de peptídeos. Os controles positivos foram estimulados com  $2,5 \mu\text{g/mL}$  de Con A e os controles negativos apenas com RPMI. As células foram mantidas em cultura por 4 dias, a  $37^\circ\text{C}$  na estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ . No quarto dia de cultura as células foram reestimuladas com os mesmos estímulos. As células foram mantidas em estufa por 1h na presença dos estímulos e então foram adicionados  $0,2 \mu\text{L}$  de Brefeldina A (BD GolgiPlug<sup>™</sup>) por poço. As placas de cultura foram novamente colocadas na estufa e as células foram incubadas por mais 12 h. Todas as culturas foram realizadas em triplicatas. As placas de cultura de fundo U (Nunc<sup>®</sup>) foram centrifugadas a 1800 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e foi então adicionado  $150 \mu\text{L}$  de MACS *buffer* (PBS com 0,5% de BSA e 2 mM de EDTA) no primeiro poço de cada triplicata, a fim de se juntar o conteúdo celular de cada triplicata em um único poço. As células foram transferidas para placas de cultura de 96 poços de fundo V (Nunc<sup>®</sup>), centrifugada, o sobrenadante foi descartado e as células foram marcadas em volume final de  $50 \mu\text{L}$  de MACS *buffer*, contendo os anticorpos anti-CD4-PerCP (BD Pharmingen<sup>®</sup>) e anti-CD8-Alexa fluor 700 (BD Pharmingen<sup>®</sup>), ao abrigo da luz por 40

min a 4 °C. As células foram lavadas duas vezes com 150 µL de MACS *buffer* e depois incubadas com 100 µL/poço de BD Cytotfix/Cytoperm™, durante 15 min a 4 °C. Posteriormente as células foram lavadas duas vezes com 150µL de BD Perm/Wash™ *buffer* e foram marcadas, ao abrigo da luz, em volume final de 50 µL de BD Perm/Wash™ *buffer*, contendo os anticorpos monoclonais (BD Pharmingen®) anti-CD3-APC-Cy7, anti-TNF-α-PE-Cy7, anti-IL-2-PE e anti-IFN-γ-APC por 30 min a 4 °C. As células foram lavadas mais duas vezes com 150 µL de MACS *buffer* e ressuspensas em volume final de 200 µL de MACS *buffer*. As amostras foram adquiridas usando-se o citômetro FACScanto (BD Biosciences®) e analisadas com o auxílio do *software* FlowJo (versão 8.7.1, Tree Star). Para ajuste das voltagens foram utilizadas *beads* marcadas com os fluorocromos individualmente. Para avaliar a proliferação e o perfil de produção de citocinas das células, foram adquiridos  $5 \times 10^5$  eventos no “*gate*” dos linfócitos. A porcentagem proliferativa de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (células CFSE<sup>baixo</sup>) foi determinada na população celular CD3<sup>+</sup> e calculada depois de subtrair os valores da média dos controles negativos de cada grupo experimental.

#### 4.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0. A significância estatística (valores *p*) foi calculada usando o teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Valores de *p* <0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

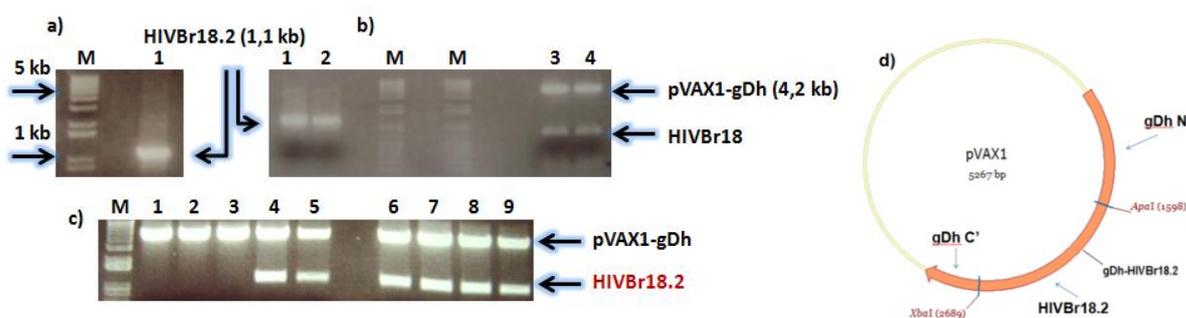
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Construção do plasmídeo gDhHIVBr18.2

Para a construção do plasmídeo pVAX1-gDhHIVBr18.2 utilizamos outro plasmídeo construído anteriormente (dados não-publicados), o plasmídeo pVAX1-gDhHIVBr18, do qual o inserto HIVBr18 foi substituído por HIVBr18.2. Esse plasmídeo codifica o antígeno HIVBr18 fusionado à proteína gD (glicoproteína D do HSV-1), com códons otimizados para expressão em células de mamíferos (gDh). A gD e a gDh possuem uma região transmembrana que permite seu ancoramento à membrana da célula, expondo-a quase totalmente ao exterior celular. A sequência nucleotídica da gDh possui sítios de restrição para as enzimas *ApaI* e *XbaI* próximos a sua região C' terminal, permitindo que sequências gênicas possam ser inseridas neste local para produzir proteínas fusionadas a gDh (região N' gDh – sequência alvo – região C' gDh). Células HEK 293 T foram transfectadas com o plasmídeo pVAX1-gDhHIVBr18 anteriormente por nosso grupo (dados ainda não-publicados) para avaliar expressão *in vitro* da proteína gDhHIVBr18 e sua localização celular. Ensaios de imunofluorescência mostraram que a proteína estava localizada no citoplasma e não na parte externa da célula, devido ao caráter hidrofóbico de alguns peptídeos. Utilizando o *software* TMHMM Server v. 2.0 foi possível confirmar esses dados e fazer rearranjos na ordem de alguns dos 18 epítopos do HIVBr18 (gDhHIVBr18.2) de uma maneira que a proteína pudesse se direcionar e se expor de forma adequada na membrana celular.

A sequência de DNA que codifica esse novo rearranjo dos 18 epítopos (HIVBr18.2) foi amplificado por PCR, removendo-se o códon de parada e adicionando sítios de restrição *ApaI* e *XbaI* nas extremidades 5' e 3', respectivamente. Podemos observar que o tamanho do fragmento amplificado (HIVBr18.2) corresponde ao tamanho esperado, de aproximadamente 1,1 kb (o

amplicon possui 1089 pb) (Fig. 1A). O amplicon HIVBr18.2 e o vetor pVAX1-gDhHIVBr18 foram digeridos com as enzimas *ApaI* e *XbaI* e analisados por eletroforese (Fig. 1B) e as bandas referentes ao amplicon HIVBr18.2 e ao vetor pVAX1-gDh foram excisados do gel e submetidos a ligação, originando o plasmídeo pVAX1-gDhHIVBr18.2. Para confirmação da clonagem alguns clones de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformados foram analisados quanto ao padrão de restrição e como esperado, o inserto liberado corresponde ao tamanho do fragmento amplificado por PCR e o vetor digerido possui um tamanho aproximado de 4,2 kb (pVAX1-gDh) (Fig. 1C).



**Figura 1.** Análise da integridade do gene HIVBr18.2 clonado no pVAX1. Os plasmídeos extraídos de alguns clones de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas foram digeridos para confirmação da clonagem. a) 1 - Eletroforese da amplificação do inserto HIVBr18.2. b) 1 e 2 - Digestão do amplicon HIVBr18.2 purificado; 3 e 4 - Digestão pVAX1-gDhHIVBr18 para substituição de insertos. c) Digestão dos plasmídeos extraídos dos clones transformados. 1 a 3 - Vetor sem HIVBr18.2; 4 a 9 - Vetor com HIVBr18.2. O vetor pVAX1-gDh possui 4,2 kb e o gene HIVBr18.2 possui 1,1 kb. O padrão molecular (M) utilizado foi o Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder. d) Ilustração do plasmídeo pVAX1-gDhHIVBr18.

## **5.2 Avaliação da resposta imune induzida pela vacina de DNA HIVBr18 coadministrada com plasmídeos que codificam as citocinas IL-2, IL-15 e GM-CSF em camundongos BALB/c**

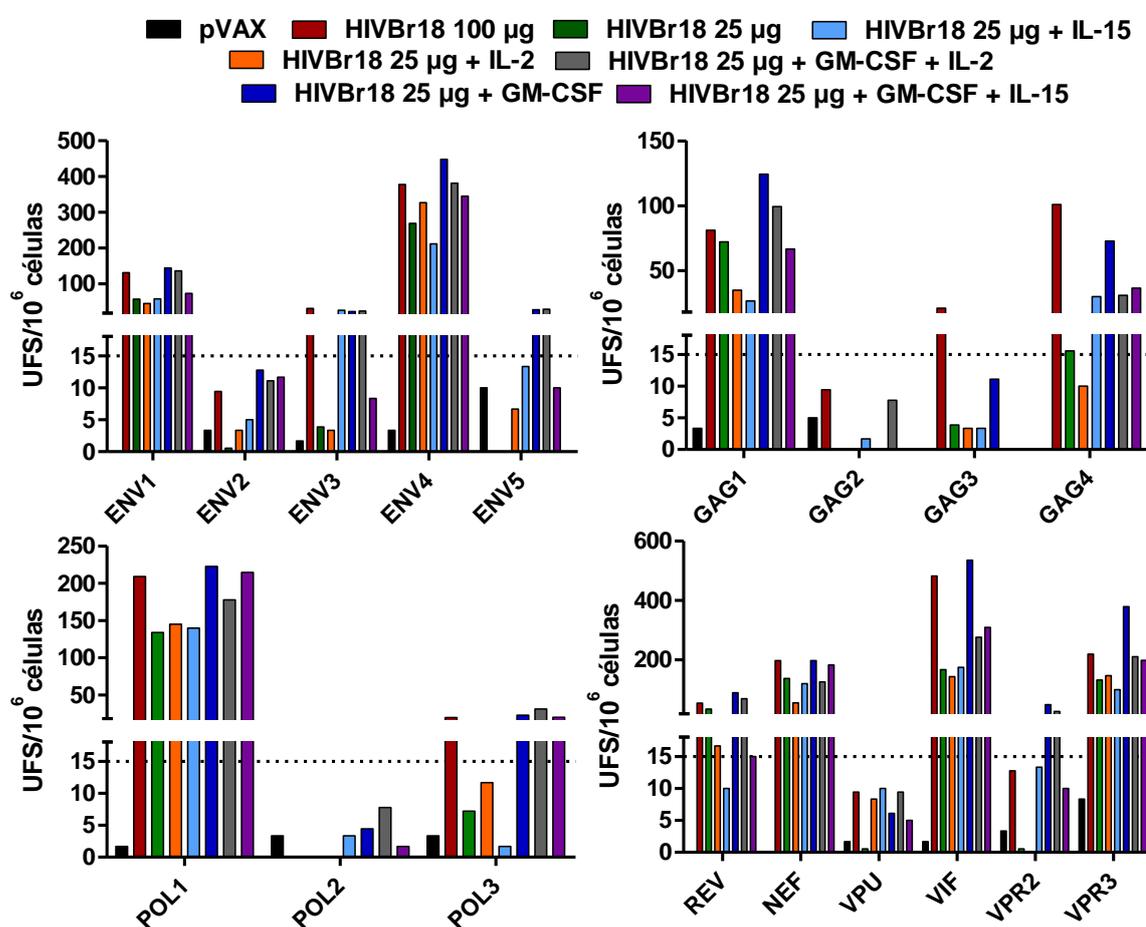
O ensaio de ELISPOT de IFN- $\gamma$  nos permite avaliar a amplitude (número de peptídeos reconhecidos pelos esplenócitos dos animais imunizados) e a magnitude da resposta imune induzida quando estimulada por diferentes formulações vacinais através da contagem de *spots*. Nesse trabalho relatamos a utilização de diferentes adjuvantes vacinais a fim de aumentar a imunogenicidade de dois protótipos vacinais desenvolvidos anteriormente, a vacina de DNA HIVBr18 e a vacina recombinante viral Ad5-HIVBr18.

Foi avaliado se mesmo reduzindo a quantidade da vacina de DNA HIVBr18 quatro vezes e coadministrando citocinas (IL-2, IL-15, GM-CSF, GM-CSF/IL-2 e GM-CSF/IL-15) seria possível igualar ou até aumentar a resposta imune específica induzida pela vacina HIVBr18 na concentração padrão de uso (100  $\mu$ g/dose). Para avaliar o efeito da coadministração das citocinas na amplitude da resposta imune específica, esplenócitos dos camundongos BALB/c imunizados no experimento 1 foram incubados individualmente com cada um dos 18 peptídeos do HIV codificado pela vacina de DNA e desta forma foi possível caracterizar o perfil de produção de citocinas pelas células T HIV-1-específicas induzidas pela diferentes formulações vacinais.

Utilizando o ensaio de ELISPOT IFN- $\gamma$ , observou-se que os esplenócitos dos animais imunizados com HIVBr18 (25  $\mu$ g)+GM-CSF e HIVBr18(25  $\mu$ g) +GM-CSF/IL-2 tiveram aumento na amplitude (número de peptídeos reconhecidos) de resposta imune induzida comparado com nossa formulação vacinal padrão HIVBr18(100  $\mu$ g) (Fig. 2). Os esplenócitos dos animais imunizados com HIVBr18+GM-CSF ou HIVBr18+GM-CSF/IL-2 foram capazes de reconhecer 13 peptídeos enquanto os

imunizados com HIVBr18(100  $\mu$ g) reconheceram 12 peptídeos, sendo que a maioria dos peptídeos reconhecidos foram os mesmos entre os diferentes grupos.

Avaliamos também a magnitude da resposta imune através da estimulação dos esplenócitos dos camundongos imunizados com o *pool* de peptídeos sintéticos do HIV-1. Nenhuma citocina proporcionou aumento no número de *spots* de IFN- $\gamma$ , porém os grupos coimunizados com GM-CSF e GM-CSF/IL-2 mostraram quantidade de *spots* semelhantes ao grupo imunizado com 100  $\mu$ g de HIVBr18 (Fig. 3A).



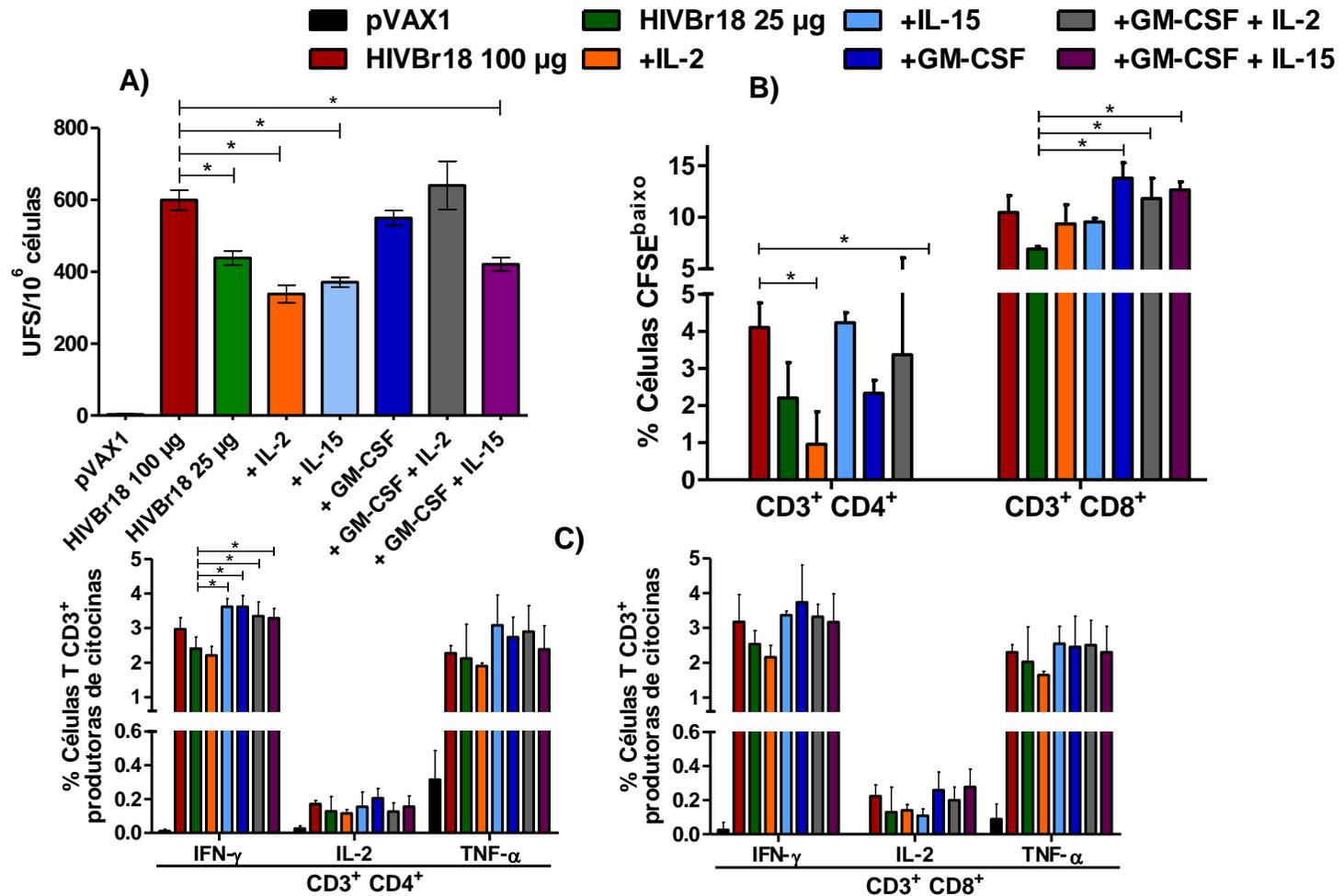
**Figura 2.** Secreção de IFN- $\gamma$  em resposta a estimulação com peptídeos individuais do HIV-1. O número de células T antígeno-específicas (UFS)/10<sup>6</sup> células, foi calculado depois de subtrair os valores da média dos controles negativos de cada grupo experimental. O cutoff foi calculado como a média de spots + 3 desvios padrões obtidos da análise do grupo imunizado com pVAX1 $\phi$ , estimulados com os peptídeos individuais. Respostas acima do limiar de 15 spots/10<sup>6</sup> células foram consideradas positivas.

Através de citometria de fluxo multiparamétrica observamos que nenhuma citocina foi capaz de aumentar a proliferação (CFSE<sup>baixo</sup>) de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> HIV-específicas comparadas com 100 µg de HIVBr18, enquanto que a coadministração de IL-2 e GM-CSF/IL-15 diminuiu significativamente a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> HIV-1-específicas (Fig. 3B). Foi possível observar aumento significativo na proliferação de células T CD8<sup>+</sup> HIV-1-específicas nos esplenócitos dos grupos que receberam GM-CSF, GM-CSF/IL-2 e GM-CSF/IL-15 apenas quando comparados com o grupo que recebeu somente 25 µg de HIVBr18. Observamos que não houve redução estatisticamente significativa na proliferação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> HIV-1-específicas no grupo imunizado com 25 µg de HIVBr18 comparado ao que recebeu 100 µg de HIVBr18 (Fig. 3B).

Analisamos a polifuncionalidade (perfil de produção de citocinas) das células T HIV-1-específicas que proliferaram quando estimuladas com o *pool* de peptídeos derivados do HIV-1. Nenhuma citocina coadministrada no momento da imunização mostrou-se capaz de aumentar significativamente a produção de citocinas IFN-γ, IL-2 e TNF-α pelas células T HIV-1-específicas *in vitro* (Fig. 3C) comparado ao grupo imunizado com 100 µg de HIVBr18. Foi possível ver aumento significativo na produção de IFN-γ pelas células T CD4<sup>+</sup> nos grupos que foram coadministrados com IL-15, GM-CSF, GM-CSF/IL-2 e GM-CSF/IL-15 apenas quando comparados ao grupo que recebeu 25 µg de HIVBr18. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na produção das 3 citocinas pelas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> HIV-1-específicas no grupo imunizado com 25 µg de HIVBr18 comparado ao que recebeu 100 µg de HIVBr18 (Fig. 3C).

### **5.3 Avaliação da resposta imune induzida pela vacina viral recombinante Ad5-HIVBr18 coadministrada com plasmídeo que codifica a citocina GM-CSF em camundongos BALB/c**

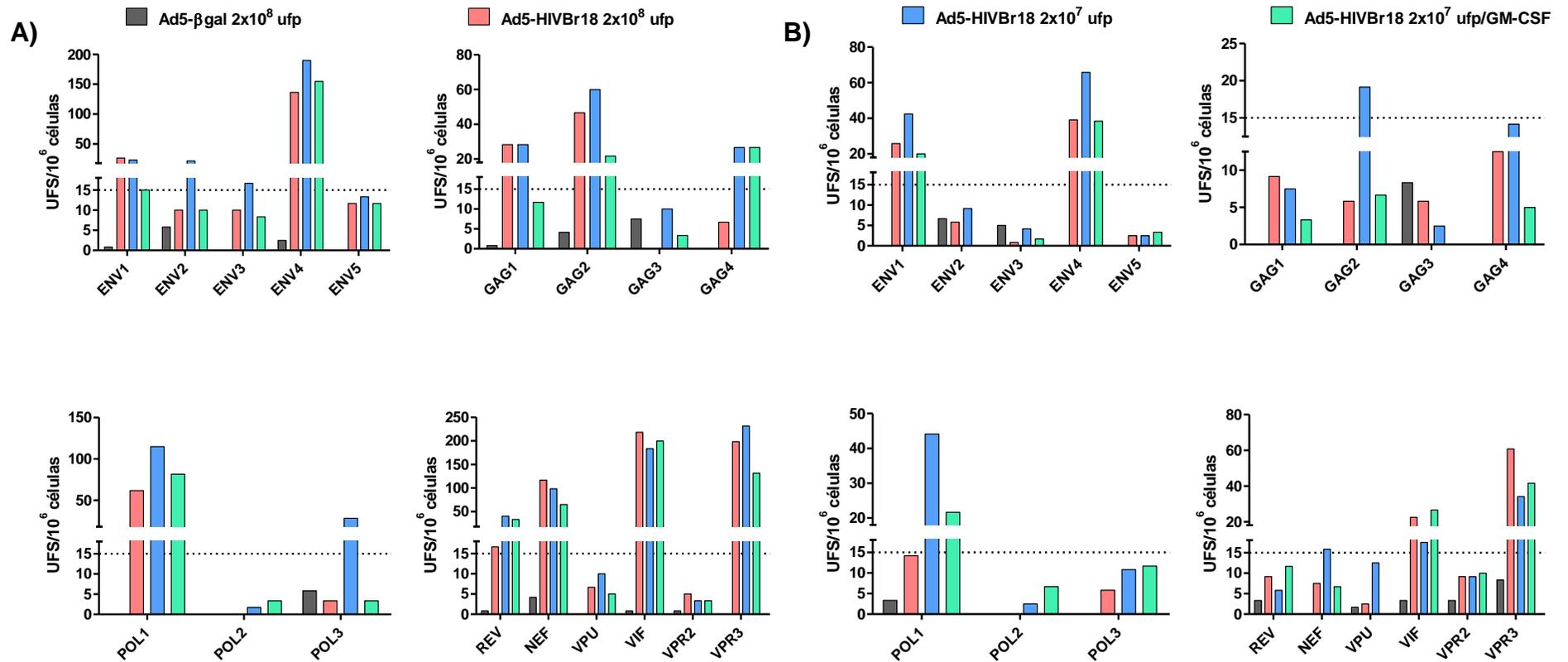
Camundongos foram imunizados com a vacina viral Ad5-HIVBr18 numa quantidade 10 vezes reduzida ( $2 \times 10^7$  ufp) coadministrada ou não com o plasmídeo que codifica GM-CSF para comparar à formulação vacinal padrão ouro a vacina



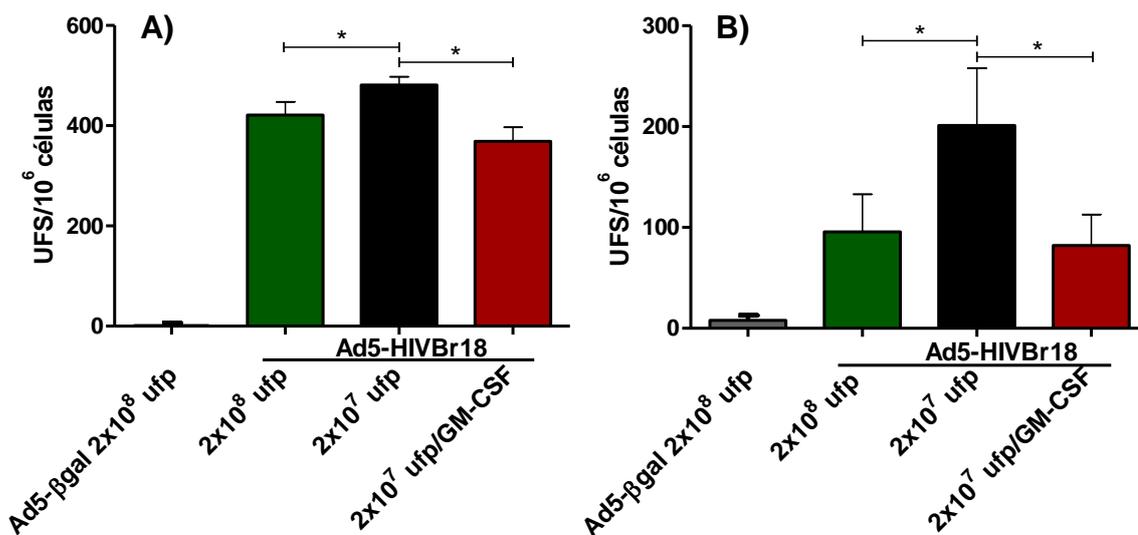
**Figura 3.** Secreção de IFN- $\gamma$  (A), proliferação celular (B) e produção de citocinas (C) em resposta a estimulação com o *pool* de peptídeos do HIV-1. O número de células T antígeno-específicas (UFS)/10<sup>6</sup> células (A), a frequência de proliferação antígeno-específica de células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup> (B) e a frequência de células T CD4<sup>+</sup> (esquerda) e CD8<sup>+</sup> (direita) (C) produtoras de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ) em resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1 foi calculada depois de subtrair os valores da média dos controles negativos de cada grupo experimental. Os dados são a média  $\pm$  desvio padrão (d.p.), n = 3 camundongos por grupo e são representativos de um experimento. \*  $p < 0.05$ .

Ad5-HIVBr18 ( $2 \times 10^8$  ufp). Para avaliar o efeito da coadministração das citocinas na amplitude e magnitude da resposta imune específica, esplenócitos dos camundongos imunizados no experimento 2 foram incubados individualmente ou com *pool* dos 18 peptídeos do HIV-1 para caracterização do perfil de produção de citocinas pelas células T HIV-1-específicas induzidas pelas diferentes formulações vacinais. Primeiro foi avaliado a amplitude e a magnitude da resposta imune por ELISPOT de IFN- $\gamma$ . Observamos que os esplenócitos dos animais imunizados com Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^7$  ufp reconheceram 13 peptídeos derivados do HIV-1, enquanto os esplenócitos dos grupos imunizados com Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^8$  ufp e Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^7$  ufp/GM-CSF reconheceram 9 peptídeos e 8 peptídeos, respectivamente (Fig. 4A). Também avaliamos a amplitude e a magnitude da resposta imune por ELISPOT de IL-2. Observamos que os esplenócitos dos animais imunizados com Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^7$  ufp reconheceram 7 peptídeos derivados do HIV-1 enquanto os esplenócitos dos grupos imunizados com Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^8$  ufp e Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^7$  ufp/GM-CSF reconheceram 4 peptídeos e 5 peptídeos, respectivamente (Fig. 4B). A magnitude de resposta imune induzida pela imunização com Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^7$  ufp, avaliada no ensaio de ELISPOT de IFN- $\gamma$  e IL-2, foi significativamente maior comparada à dos grupos que receberam Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^8$  ufp ou Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^7$  ufp/GM-CSF (Fig. 5A e B).

Usando citometria de fluxo para realizar análises multiparamétricas observou-se que o grupo imunizado com Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^7$  ufp teve aumento significativo na proliferação de células T CD4<sup>+</sup> HIV-1-específicas comparado aos grupos que receberam Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^8$  ufp ou Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^7$  ufp/GM-CSF (Fig. 6A). Não houve diferença significativa na proliferação de células T CD8<sup>+</sup> HIV-1-específicas entre os 3 grupos, embora seja possível observar uma leve redução no grupo imunizado com Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^7$  ufp/GM-CSF (Fig. 6A). Observamos que o grupo imunizado com Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^7$  ufp/GM-CSF teve uma redução significativa na frequência de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> CFSE<sup>baixo</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  quando comparado aos grupos que receberam Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^8$  ufp ou Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^7$  ufp e não houve diferença significativa na frequência de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtoras de IL-2 entre os 3 grupos (Fig. 6B). Observamos leve aumento na frequência de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  no grupo que recebeu Ad5-HIVBr18  $2 \times 10^7$  ufp comparado ao que recebeu Ad5-HIVBr18



**Figura 4.** Secreção de IFN- $\gamma$  (A) e IL-2 (B) em resposta a estimulação com peptídeos individuais do HIV-1. O número de células T antígeno-específicas (UFS)/ $10^6$  células, foi calculado depois de subtrair os valores da média dos controles negativos de cada grupo experimental. O *cutoff* foi calculado como a média de *spots* + 3 desvios padrões obtidos da análise do grupo imunizado com Ad5- $\beta$ gal, estimulados com os peptídeos individuais. Respostas acima do limiar de 15 *spots*/ $10^6$  células foram consideradas positivas.



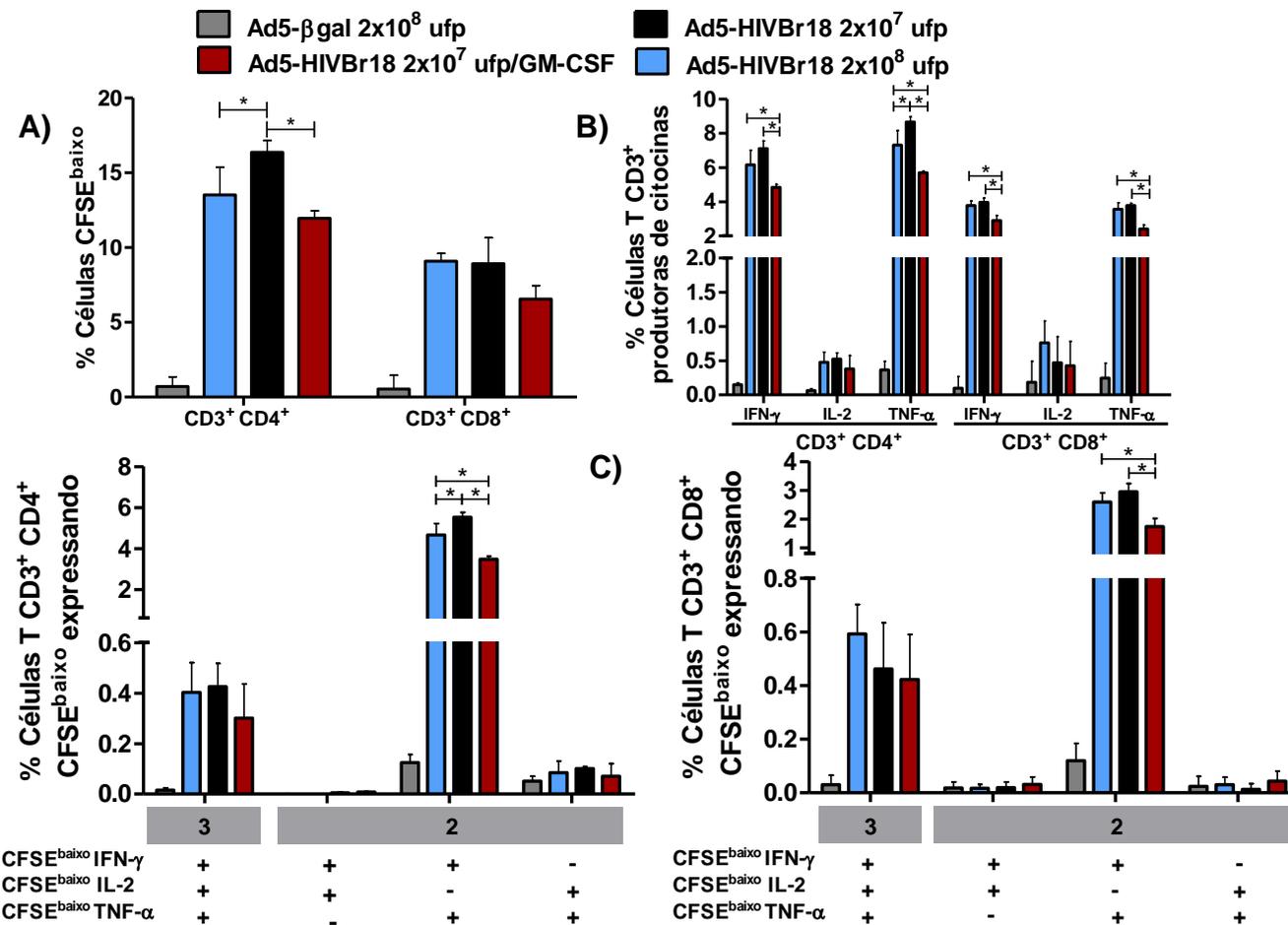
**Figura 5.** Secreção de IFN- $\gamma$  (A) e IL-2 (B) em resposta a estimulação com o *pool* de peptídeos do HIV-1. O número de células T antígeno-específicas (UFS)/10<sup>6</sup> células, foi calculado depois de subtrair os valores da média dos controles negativos de cada grupo experimental. Os dados são a média  $\pm$  desvio padrão (d.p.), n = 3 camundongos por grupo e são representativos de um experimento. \*  $p < 0.05$ .

2x10<sup>8</sup> ufp. Entretanto, só houve aumento significativo na frequência de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de TNF- $\alpha$  (Fig. 6B).

Foram geradas diferentes combinações de produção concomitante das 3 citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ ) no *software* FlowJo. Observou-se que o grupo que recebeu Ad5-HIVBr18 2x10<sup>7</sup> ufp teve aumento significativo na frequência de células T CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>baixo</sup> HIV-1-específicas produtoras concomitantes de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  comparado aos grupos que receberam Ad5-HIVBr18 2x10<sup>8</sup> ufp (Fig. 9C). Também observamos que o grupo imunizado com Ad5-HIVBr18 2x10<sup>7</sup> ufp/GM-CSF teve redução significativa na frequência de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> CFSE<sup>baixo</sup> HIV-1-específicas produtoras concomitantes de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  comparado aos grupos que receberam Ad5-HIVBr18 2x10<sup>8</sup> ufp ou Ad5-HIVBr18 2x10<sup>7</sup> ufp (Fig. 6C).

## 6. DISCUSSÃO

Neste trabalho construímos com auxílio do *software* TMHMM Server v. 2.0 um plasmídeo que codifica o antígeno HIVBr18.2 inserido no interior da proteína gDh, com um novo rearranjo na ordem dos 18 epítomos. Essa estratégia foi desenvolvida a fim de se direcionar o antígeno gDh-HIVBr18.2 para a face externa da membrana celular, com o intuito de aumentar a imunogenicidade da vacina, especialmente promovendo a ativação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Além disso, avaliamos os efeitos



**Figura 6.** Proliferação celular e produção de citocinas em resposta a estimulação com o *pool* de peptídeos do HIV-1. A frequência de proliferação antígeno-específica de células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup> (a), a frequência de células T CD4<sup>+</sup> (esquerda) e CD8<sup>+</sup> (direita) CFSE<sup>baixo</sup> produtoras de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ) (b) e a frequência de células T CD4<sup>+</sup> (esquerda) e CD8<sup>+</sup> (direita) CFSE<sup>baixo</sup> produtoras de 1, 2 ou 3 citocinas simultaneamente (c) em resposta ao estímulo com os *pools* de peptídeos do HIV-1 foi calculada depois de subtrair os valores da média dos controles negativos de cada grupo experimental. Os dados são a média  $\pm$  desvio padrão (d.p.), n = 3 camundongos por grupo e são representativos de um experimento. \*  $p < 0.05$ .

adjuvantes de plasmídeos codificando citocinas sobre a imunogenicidade da HIVBr18, bem como a imunogenicidade de diferentes doses da vacina Ad5-HIVBr18. A imunização de camundongos BALB/c com 25 µg de HIVBr18 coadministrado com GM-CSF induziu respostas imunes celulares similares às obtidas com 100 µg de HIVBr18, concentração padrão previamente utilizada por nosso grupo. A imunização com a dose de  $2 \times 10^7$  ufp de Ad5-HIVBr18 induziu maiores respostas imunes celulares do que  $2 \times 10^8$  ufp. A coadministração de GM-CSF juntamente com  $2 \times 10^7$  ufp de Ad5-HIVBr18 levou a um efeito negativo sobre a indução de resposta imune pela vacina.

O novo rearranjo dos 18 epítopos do antígeno HIVBr18.2 foi obtido por análises de bioinformática buscando por uma ordem nos epítopos que possibilitasse a localização da gDh-HIVBr18 na superfície celular e permitisse a interação com o HVEM. No arranjo anterior dos epítopos da gDh-HIVBr18 havia alguns epítopos com muitos aminoácidos hidrofóbicos localizados proximamente e isso dificultava sua localização na membrana externa, o que não proporcionou a melhora na resposta imune induzida pela vacina. Nesse trabalho, esses epítopos próximos com alta hidrofobicidade foram redistribuídos ao longo da cadeia peptídica, desfazendo essas regiões hidrofóbicas, com o intuito de solucionar o problema previamente observado. De fato, trabalhos demonstram que vacinas de DNA ou vetores virais recombinantes que expressam a proteínas geneticamente fusionadas a proteína gD do HSV-1 ativam fortemente uma resposta imune adaptativa, principalmente respostas de células T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas (LASARO, *et al.*, 2008). Antígenos de papilomavirus humano tipo-16 (HPV-16) fusionados a gD induzem imunidade mediada por células T e proteção contra desafio tumoral (DINIZ, *et al.*, 2010; LASARO, *et al.*, 2005). Por esta razão, pretendemos avaliar futuramente por transfecção de células embrionárias de rim humano a expressão do antígeno HIVBr18.2 pela vacina de DNA e sua devida localização na membrana externa celular por microscopia de imunofluorescência. Após isso será analisado se essa nova construção plasmidial será capaz de melhorar a resposta imune celular induzida pela vacina assim como nos trabalhos anteriormente descritos.

Respostas imunes antígenos-específicas podem ser desencadeadas por imunização com DNA (LADDY e WEINER, 2006; LUCKAY, *et al.*, 2007), mas até agora os níveis dessas respostas mostraram-se poucos satisfatórios. Respostas imunes celulares induzidas por vacinas de DNA podem ser melhoradas através da

coadministração de DNA plasmidial que codificam imunomoduladores (BOYER, *et al.*, 2007; EGAN, *et al.*, 2005). A imunogenicidade de vacinas de DNA pode ser melhorada através da utilização de genes sintéticos com códons otimizados (GRAHAM, *et al.*, 2006), repetição de três imunizações sucessivas, co-expressão de citocinas IL-15, GM-CSF e outras, como adjuvante de vacinas (KUTZLER, *et al.*, 2005; SCHADECK, *et al.*, 2006). Neste trabalho relatamos a utilização de diferentes estratégias para aumentar a imunogenicidade do imunogeno HIVBr18.

A imunização com 25 µg da vacina HIVBr18, como esperado, foi menos imunogênica que a imunização com 100 µg, diminuindo a quantidade de epítomos reconhecidos, a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> HIV-1 e a produção de citocinas pelas células T, além de reduzir significativamente a magnitude da resposta imune induzida. Baseado nisso coadministramos plasmídeos que codificam as citocinas IL-2, IL-15 e GM-CSF, que são amplamente utilizadas como adjuvantes de vacinas, na quantidade de 25 µg por dose juntamente com os 25 µg da vacina HIVBr18 para tentar recuperar a resposta imune induzida pela quantidade de 100 µg da vacina ou até mesmo aumentar essa resposta.

Estudos mostram que o uso de IL-2 como adjuvante promove aumento de respostas imunes induzidas por vacinas de DNA em murinos e primatas (BAROUCH, *et al.*, 2000; TRYNISZEWSKA, *et al.*, 2002) e que a coadministração de plasmídeos que codificam a IL-15 com vacinas de DNA contra o HIV-1 aumenta respostas citotóxicas (KUTZLER, *et al.*, 2005) e a supressão da replicação viral (BOYER, *et al.*, 2007). Ao contrário desses resultados, nosso trabalho demonstrou que a coadministração de IL-2, IL-15 e a combinação GM-CSF/IL-15 não induziram aumento da amplitude e magnitude de resposta imune comparado a imunização de HIVBr18 (25 µg) somente. Entretanto, observou-se que a coadministração do plasmídeo codificando GM-CSF com 25 µg da vacina HIVBr18 induziu respostas imunes celulares, como amplitude, magnitude, proliferação celular e produção de citocinas em níveis semelhantes às observadas na imunização com a concentração original de HIVBr18. Acreditamos que esse fato ocorreu devido à capacidade da citocina GM-CSF em facilitar o recrutamento, maturação e sobrevivência das células dendríticas e macrófagos, aumentando a apresentação de antígenos (BOWNE, *et al.*, 1999). De fato, trabalhos mostram que essa citocina é um forte adjuvante capaz de potencializar a imunogenicidade de diversas vacinas e aumentar proteção e sobrevivência contra desafios (BAROUCH, *et al.*, 2002; LAI, *et al.*, 2007; WEISS, *et*

*al.*, 1998). Esses resultados são promissores, pois a redução pela metade na quantidade de DNA (25 µg de HIVBr18 e 25 µg de GM-CSF, totalizando 50 µg) utilizada nas imunizações possibilitaria uma grande diminuição em termos de custo de produção caso esta vacina venha a ser utilizada em ensaios clínicos futuramente.

As frequências de proliferação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e de células T produtoras de citocinas não tiveram diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam 25 µg de HIVBr18 coadministrado com as diferentes citocinas em relação ao grupo de 100 µg de HIVBr18, exceto os grupos que receberam IL-2 e GM-CSF/IL-15 que tiveram diminuição significativa na proliferação de células T CD4<sup>+</sup> HIV-1-específicas. Os grupos que receberam GM-CSF e GM-CSF/IL-2 foram os que obtiveram as melhores respostas imunes induzidas pela imunização. Trabalhos demonstram que a co-administração de IL-2 pode aumentar respostas imune induzidas por vacinas de DNA em camundongos, até mesmo quando coadministradas com GM-CSF (KUSAKABE, *et al.*, 2000). Entretanto, outro trabalho mostrou que a coadministração de IL-2 não aumenta a resposta imune, como por exemplo, contra uma proteína da superfície do vírus da hepatite B (GEISLER, *et al.*, 1999). Da mesma forma, nosso trabalho mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos que recebem GM-CSF e GM-CSF/IL-2, indicando que a adição de IL-2 não aumenta mais a imunogenicidade da vacina HIVBr18 obtida pela coadministração de GM-CSF somente.

A formulação vacinal padrão ouro de nosso grupo, a vacina viral recombinante Ad5-HIVBr18 (2x10<sup>8</sup> ufp), é mais imunogênica, induz resposta de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> mais amplas, polifuncionais, duradouras do que a vacina de DNA HIVBr18 (ROSA, *et al.*, 2011a). Foi avaliada a resposta imune induzida pela vacina Ad5-HIVBr18 numa quantidade 10 vezes menor (2x10<sup>7</sup> ufp) e a coadministração de GM-CSF plasmidial, depois que este mostrou-se um bom adjuvante para a vacina HIVBr18. Curiosamente a imunização com Ad5-HIVBr18 (2x10<sup>7</sup> ufp) induziu maior amplitude e magnitude de resposta imune do que com Ad5-HIVBr18 (2x10<sup>8</sup> ufp). Estudos mostram que diversos fatores determinam a indução de resposta imune ou tolerância após a exposição a um antígeno, como sua forma física, a rota de administração, a dose do antígeno, entre outros. Evidências mostram que grandes doses ou até mesmo pequenas doses podem favorecer a tolerância a um determinado antígeno (SCHWARTZ, 1990; SUZUKI, *et al.*, 1988). Acima da dose mínima de antígeno para desencadear resposta imune, o aumento gradual da dose

de antígeno induz aumento da resposta até atingir um platô que é seguido por um declínio induzido por doses muito altas (MURPHY, *et al.*, 2010). Um estudo mostrou que a indução de imunidade ou tolerância de um determinado antígeno era dependente da dose de adenovírus recombinante que o codificava e do nível de expressão do antígeno (KELLY, *et al.*, 2009; TENBUSCH, *et al.*, 2012). Esses dados fornecem suporte aos nossos resultados, nos quais a imunização com a dose de  $2 \times 10^8$  ufp foi menos imunogênica do que a dose de  $2 \times 10^7$  ufp da vacina Ad5-HIVBr18. É provável que o limiar de imunogenicidade máxima da vacina seja entre as doses contendo  $2 \times 10^7$  e  $2 \times 10^8$  ufp, e a partir disso, doses mais altas favorecerão a tolerância ao antígeno HIVBr18. A imunização com Ad5-HIVBr18 ( $2 \times 10^7$  ufp) induziu significativamente maior proliferação de células T CD4<sup>+</sup> HIV-1-específicas, maior quantidade células T CD4<sup>+</sup> produtoras de TNF- $\alpha$  e conseqüentemente maior quantidade de células T CD4<sup>+</sup> HIV-1-específicas produtoras simultâneas de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

Observamos que o grupo coimunizado com GM-CSF e Ad5-HIVBr18 ( $2 \times 10^7$  ufp) apresentou diminuição na amplitude e redução significativa na magnitude da resposta induzida quando comparado ao grupo imunizado com Ad5-HIVBr18 ( $2 \times 10^7$  ufp), mostrando níveis similares ao do grupo que recebeu Ad5-HIVBr18 ( $2 \times 10^8$  ufp). A citocina GM-CSF usada como adjuvante de vacina de DNA, potencializa respostas imunes humorais e celulares (BAROUCH, *et al.*, 2002; LAI, *et al.*, 2007), mas pode também reduzir respostas imunes (LECHNER, *et al.*, 2010; WUNDERLICH, *et al.*, 2000). Um estudo mostrou que a adição de um vetor expressando GM-CSF não aumentou respostas de anticorpos e de células T CD8<sup>+</sup> contra antígenos do SIV e quase anulou completamente a proteção de uma vacina viral contra desafio com uma alta dose de SIV (SCHELL, *et al.*, 2012). Nossos resultados mostram que a coadministração de GM-CSF plasmidial induziu menor proliferação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e induziu uma quantidade significativamente menor de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> HIV-1-específicas produtoras de IFN- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$ . O excesso de GM-CSF expresso pelo plasmídeo pode ter causado imunossupressão (LECHNER, *et al.*, 2010) ou ter tido efeito direto sobre a função e sobrevivência das células T (SCHELL, *et al.*, 2012). Estudos demonstram que vírus recombinantes que expressam GM-CSF levam à redução de respostas de células CD8<sup>+</sup> em camundongos (BUKREYEV, *et al.*, 2001; WANJALLA, *et al.*, 2012).

Baseado em nossos resultados, as formulações vacinais avaliadas neste trabalho mostraram-se imunogênicas em camundongos BALB/c. Contudo, os experimentos ainda precisam ser repetidos para confirmar os dados e posteriormente testar o conceito dessas vacinas em fase pré-clínica utilizando primatas não-humanos.

## 7. CONCLUSÕES

Em camundongos BALB/c a coadministração de um plasmídeo codificando GM-CSF juntamente com 25 µg de HIVBr18 induz respostas imunes celulares como amplitude, magnitude, proliferação celular e produção de citocinas pelas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> similares à obtida com 100 µg de HIVBr18. Isto deve ser explorado como uma estratégia adjuvante para formulações vacinas, principalmente para reduzir os custos de produção da vacina caso futuramente passe para fase clínica em humanos. Além disso, a dose de 2x10<sup>7</sup> ufp de Ad5-HIVBr18 induz maiores respostas celulares do que a dose de 2x10<sup>8</sup> ufp, indicando que estas doses estão no limiar entre quantidade indutora de imunidade ou tolerância ao imunógeno HIVBr18. O resultados ainda sugerem que GM-CSF pode exercer um efeito negativo sobre a imunogenicidade de vacinas virais, o que deve ser levado em consideração em novas formulações vacinais que aliem vírus recombinantes à citocinas. Contudo, os experimentos ainda precisam ser repetidos para confirmar os dados e posteriormente testar o conceito dessas vacinas em fase pré-clínica utilizando primatas não-humanos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASA-CHAPMAN, M. M.; HAYMAN, A.; NEWTON, P.; CORNFORTH, D.; WILLIAMS, I.; BORROW, P.; BALFE, P. e MCKNIGHT, A. Development of the antibody response in acute HIV-1 infection. **Aids** v. 18, n. 3, p. 371-381, 2004.

ALEXAKI, A.; LIU, Y. e WIGDAHL, B. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. **Current HIV Research** v. 6, n. 5, p. 388-400, 2008.

ALIMONTI, J. B.; KOESTERS, S. A.; KIMANI, J.; MATU, L.; WACHIHI, C.; PLUMMER, F. A. e FOWKE, K. R. CD4<sup>+</sup> T cell responses in HIV-exposed seronegative women are qualitatively distinct from those in HIV-infected women. **The Journal of Infectious Diseases** v. 191, n. 1, p. 20-24, 2005.

ALTER, G.; RIHN, S.; WALTER, K.; NOLTING, A.; MARTIN, M.; ROSENBERG, E. S.; MILLER, J. S.; CARRINGTON, M. e ALTFELD, M. HLA class I subtype-

dependent expansion of KIR3DS1+ and KIR3DL1+ NK cells during acute human immunodeficiency virus type 1 infection. **Journal of Virology** v. 83, n. 13, p. 6798-6805, 2009.

ALTFELD, M.; ROSENBERG, E. S.; SHANKARAPPA, R.; MUKHERJEE, J. S.; HECHT, F. M.; ELDRIDGE, R. L.; ADDO, M. M.; POON, S. H.; PHILLIPS, M. N.; ROBBINS, G. K.; SAX, P. E.; BOSWELL, S.; KAHN, J. O.; BRANDER, C.; GOULDER, P. J.; LEVY, J. A.; MULLINS, J. I. e WALKER, B. D. Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection. **The Journal of Experimental Medicine** v. 193, n. 2, p. 169-180, 2001.

ALTMAN, J. D. e FEINBERG, M. B. HIV escape: there and back again. **Nature Medicine** v. 10, n. 3, p. 229-230, 2004.

BARNETT, S. W.; SRIVASTAVA, I. K.; KAN, E.; ZHOU, F.; GOODSSELL, A.; CRISTILLO, A. D.; FERRAI, M. G.; WEISS, D. E.; LETVIN, N. L.; MONTEFIORI, D.; PAL, R. e VAJDY, M. Protection of macaques against vaginal SHIV challenge by systemic or mucosal and systemic vaccinations with HIV-envelope. **Aids** v. 22, n. 3, p. 339-348, 2008.

BAROUCH, D. H.; CRAIU, A.; KURODA, M. J.; SCHMITZ, J. E.; ZHENG, X. X.; SANTRA, S.; FROST, J. D.; KRIVULKA, G. R.; LIFTON, M. A.; CRABBS, C. L.; HEIDECKER, G.; PERRY, H. C.; DAVIES, M. E.; XIE, H.; NICKERSON, C. E.; STEENBEKE, T. D.; LORD, C. I.; MONTEFIORI, D. C.; STROM, T. B.; SHIVER, J. W.; LEWIS, M. G. e LETVIN, N. L. Augmentation of immune responses to HIV-1 and simian immunodeficiency virus DNA vaccines by IL-2/Ig plasmid administration in rhesus monkeys. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 97, n. 8, p. 4192-4197, 2000.

BAROUCH, D. H.; SANTRA, S.; TENNER-RACZ, K.; RACZ, P.; KURODA, M. J.; SCHMITZ, J. E.; JACKSON, S. S.; LIFTON, M. A.; FREED, D. C.; PERRY, H. C.; DAVIES, M. E.; SHIVER, J. W. e LETVIN, N. L. Potent CD4+ T cell responses elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp120 and GM-CSF. **The Journal of Immunology** v. 168, n. 2, p. 562-568, 2002.

BECKER, T. C.; WHERRY, E. J.; BOONE, D.; MURALI-KRISHNA, K.; ANTIA, R.; MA, A. e AHMED, R. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. **The Journal of Experimental Medicine** v. 195, n. 12, p. 1541-1548, 2002.

BERGER, E. A.; MURPHY, P. M. e FARBER, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. **Annual Review of Immunology** v. 17, p. 657-700, 1999.

BORROW, P.; LEWICKI, H.; HAHN, B. H.; SHAW, G. M. e OLDSTONE, M. B. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. **Journal of Virology** v. 68, n. 9, p. 6103-6110, 1994.

BOWNE, W. B.; WOLCHOK, J. D.; HAWKINS, W. G.; SRINIVASAN, R.; GREGOR, P.; BLACHERE, N. E.; MOROI, Y.; ENGELHORN, M. E.; HOUGHTON, A. N. e LEWIS, J. J. Injection of DNA encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor recruits dendritic cells for immune adjuvant effects. **Cytokines, Cellular & Molecular Therapy** v. 5, n. 4, p. 217-225, 1999.

BOYER, J. D.; ROBINSON, T. M.; KUTZLER, M. A.; VANSANT, G.; HOKEY, D. A.; KUMAR, S.; PARKINSON, R.; WU, L.; SIDHU, M. K.; PAVLAKIS, G. N.; FELBER, B. K.; BROWN, C.; SILVERA, P.; LEWIS, M. G.; MONFORTE, J.; WALDMANN, T. A.; ELDRIDGE, J. e WEINER, D. B. Protection against simian/human immunodeficiency virus (SHIV) 89.6P in macaques after coimmunization with SHIV antigen and IL-15 plasmid. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 104, n. 47, p. 18648-18653, 2007.

BRIGGS, J. A.; JOHNSON, M. C.; SIMON, M. N.; FULLER, S. D. e VOGT, V. M. Cryo-electron microscopy reveals conserved and divergent features of gag packing in immature particles of Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus. **Journal of Molecular Biology** v. 355, n. 1, p. 157-168, 2006.

BUCHBINDER, S. P.; MEHROTRA, D. V.; DUERR, A.; FITZGERALD, D. W.; MOGG, R.; LI, D.; GILBERT, P. B.; LAMA, J. R.; MARMOR, M.; DEL, R. C.; MCEL RATH, M. J.; CASIMIRO, D. R.; GOTTESDIENER, K. M.; CHODAKEWITZ, J. A.; COREY, L. e ROBERTSON, M. N. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. **Lancet** v. 372, n. 9653, p. 1881-1893, 2008.

BUKREYEV, A.; BELYAKOV, I. M.; BERZOFSKY, J. A.; MURPHY, B. R. e COLLINS, P. L. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expressed by recombinant respiratory syncytial virus attenuates viral replication and increases the level of pulmonary antigen-presenting cells. **Journal of Virology** v. 75, n. 24, p. 12128-12140, 2001.

BUNNELL, R.; EKWARU, J. P.; SOLBERG, P.; WAMAI, N.; BIKAAKO-KAJURA, W.; WERE, W.; COUTINHO, A.; LIECHTY, C.; MADRAA, E.; RUTHERFORD, G. e MERMIN, J. Changes in sexual behavior and risk of HIV transmission after antiretroviral therapy and prevention interventions in rural Uganda. **Aids** v. 20, n. 1, p. 85-92, 2006.

BURTON, D. R. A vaccine for HIV type 1: the antibody perspective. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 94, n. 19, p. 10018-10023, 1997.

CANTRELL, D. A. e SMITH, K. A. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. **Science** v. 224, n. 4655, p. 1312-1316, 1984.

CARMICHAEL, A.; JIN, X.; SISSONS, P. e BORYSIEWICZ, L. Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. **The Journal of Experimental Medicine** v. 177, n. 2, p. 249-256, 1993.

CARRINGTON, M.; NELSON, G. W.; MARTIN, M. P.; KISSNER, T.; VLAHOV, D.; GOEDERT, J. J.; KASLOW, R.; BUCHBINDER, S.; HOOTS, K. e O'BRIEN, S. J. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage. **Science** v. 283, n. 5408, p. 1748-1752, 1999.

CASARTELLI, N.; DI, M. G.; POTESTA, M.; ROSSI, P. e DORIA, M. CD4 and major histocompatibility complex class I downregulation by the human immunodeficiency virus type 1 nef protein in pediatric AIDS progression. **Journal of Virology** v. 77, n. 21, p. 11536-11545, 2003.

CASTILLA, J.; DEL, R. J.; HERNANDO, V.; MARINCOVICH, B.; GARCIA, S. e RODRIGUEZ, C. Effectiveness of highly active antiretroviral therapy in reducing heterosexual transmission of HIV. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes** v. 40, n. 1, p. 96-101, 2005.

CHEUNG, T. C.; HUMPHREYS, I. R.; POTTER, K. G.; NORRIS, P. S.; SHUMWAY, H. M.; TRAN, B. R.; PATTERSON, G.; JEAN-JACQUES, R.; YOON, M.; SPEAR, P. G.; MURPHY, K. M.; LURAIN, N. S.; BENEDICT, C. A. e WARE, C. F. Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 102, n. 37, p. 13218-13223, 2005.

COHEN, M. S.; HELLMANN, N.; LEVY, J. A.; DECOCK, K. e LANGE, J. The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic. **The Journal of Clinical Investigation** v. 118, n. 4, p. 1244-1254, 2008.

COMPAAN, D. M.; GONZALEZ, L. C.; TOM, I.; LOYET, K. M.; EATON, D. e HYMOWITZ, S. G. Attenuating lymphocyte activity: the crystal structure of the BTLA-HVEM complex. **The Journal of Biological Chemistry** v. 280, n. 47, p. 39553-39561, 2005.

DEMBERG, T.; FLORESE, R. H.; HEATH, M. J.; LARSEN, K.; KALISZ, I.; KALYANARAMAN, V. S.; LEE, E. M.; PAL, R.; VENZON, D.; GRANT, R.; PATTERSON, L. J.; KORIOTH-SCHMITZ, B.; BUZBY, A.; DOMBAGODA, D.; MONTEFIORI, D. C.; LETVIN, N. L.; CAFARO, A.; ENSOLI, B. e ROBERT-GUROFF, M. A replication-competent adenovirus-human immunodeficiency virus (Ad-HIV) tat and Ad-HIV env priming/Tat and envelope protein boosting regimen elicits enhanced protective efficacy against simian/human immunodeficiency virus SHIV89.6P challenge in rhesus macaques. **Journal of Virology** v. 81, n. 7, p. 3414-3427, 2007.

DINIZ, M. O.; LASARO, M. O.; ERTL, H. C. e FERREIRA, L. C. Immune responses and therapeutic antitumor effects of an experimental DNA vaccine encoding human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to herpesvirus glycoprotein D. **Clinical and Vaccine Immunology** v. 17, n. 10, p. 1576-1583, 2010.

DIOP, O. M.; PLOQUIN, M. J.; MORTARA, L.; FAYE, A.; JACQUELIN, B.; KUNKEL, D.; LEBON, P.; BUTOR, C.; HOSMALIN, A.; BARRE-SINOUSSE, F. e MULLER-TRUTWIN, M. C. Plasmacytoid dendritic cell dynamics and alpha interferon

production during Simian immunodeficiency virus infection with a nonpathogenic outcome. **Journal of Virology** v. 82, n. 11, p. 5145-5152, 2008.

DOLIN, R. HIV vaccine trial results--an opening for further research. **The New England Journal of Medicine** v. 361, n. 23, p. 2279-2280, 2009.

DOUEK, D. C.; BRENCHLEY, J. M.; BETTS, M. R.; AMBROZAK, D. R.; HILL, B. J.; OKAMOTO, Y.; CASAZZA, J. P.; KURUPPU, J.; KUNSTMAN, K.; WOLINSKY, S.; GROSSMAN, Z.; DYBUL, M.; OXENIUS, A.; PRICE, D. A.; CONNORS, M. e KOUP, R. A. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. **Nature** v. 417, n. 6884, p. 95-98, 2002.

DOUEK, D. C.; PICKER, L. J. e KOUP, R. A. T cell dynamics in HIV-1 infection. **Annual Review of Immunology** v. 21, p. 265-304, 2003.

EGAN, M. A.; CHONG, S. Y.; MEGATI, S.; MONTEFIORI, D. C.; ROSE, N. F.; BOYER, J. D.; SIDHU, M. K.; QUIROZ, J.; ROSATI, M.; SCHADECK, E. B.; PAVLAKIS, G. N.; WEINER, D. B.; ROSE, J. K.; ISRAEL, Z. R.; UDEM, S. A. e ELDRIDGE, J. H. Priming with plasmid DNAs expressing interleukin-12 and simian immunodeficiency virus gag enhances the immunogenicity and efficacy of an experimental AIDS vaccine based on recombinant vesicular stomatitis virus. **AIDS Research and Human Retroviruses** v. 21, n. 7, p. 629-643, 2005.

EMERMAN, M. e MALIM, M. H. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. **Science** v. 280, n. 5371, p. 1880-1884, 1998.

FANALES-BELASIO, E.; RAIMONDO, M.; SULIGOI, B. e BUTTO, S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. **Ann Ist Super Sanita** v. 46, n. 1, p. 5-14, 2010.

FIEBIG, E. W.; WRIGHT, D. J.; RAWAL, B. D.; GARRETT, P. E.; SCHUMACHER, R. T.; PEDDADA, L.; HELDEBRANT, C.; SMITH, R.; CONRAD, A.; KLEINMAN, S. H. e BUSCH, M. P. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. **Aids** v. 17, n. 13, p. 1871-1879, 2003.

FLYNN, N. M.; FORTHAL, D. N.; HARRO, C. D.; JUDSON, F. N.; MAYER, K. H. e PARA, M. F. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. **The Journal of Infectious Diseases** v. 191, n. 5, p. 654-665, 2005.

FONSECA, S. G.; COUTINHO-SILVA, A.; FONSECA, L. A.; SEGURADO, A. C.; MORAES, S. L.; RODRIGUES, H.; HAMMER, J.; KALLAS, E. G.; SIDNEY, J.; SETTE, A.; KALIL, J. e CUNHA-NETO, E. Identification of novel consensus CD4 T-cell epitopes from clade B HIV-1 whole genome that are frequently recognized by HIV-1 infected patients. **Aids** v. 20, n. 18, p. 2263-2273, 2006.

FREEL, S. A.; LAMOREAUX, L.; CHATTOPADHYAY, P. K.; SAUNDERS, K.; ZARKOWSKY, D.; OVERMAN, R. G.; OCHSENBAUER, C.; EDMONDS, T. G.; KAPPES, J. C.; CUNNINGHAM, C. K.; DENNY, T. N.; WEINHOLD, K. J.; FERRARI,

G.; HAYNES, B. F.; KOUP, R. A.; GRAHAM, B. S.; ROEDERER, M. e TOMARAS, G. D. Phenotypic and functional profile of HIV-inhibitory CD8 T cells elicited by natural infection and heterologous prime/boost vaccination. **Journal of Virology** v. 84, n. 10, p. 4998-5006, 2010.

FULTZ, P. N.; MCCLURE, H. M.; ANDERSON, D. C.; SWENSON, R. B.; ANAND, R. e SRINIVASAN, A. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from naturally infected sooty mangabey monkeys (*Cercocebus atys*). **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 83, n. 14, p. 5286-5290, 1986.

GANDHI, R. T. e WALKER, B. D. Immunologic control of HIV-1. **Annual Review of Medicine** v. 53, p. 149-172, 2002.

GAO, F.; BAILES, E.; ROBERTSON, D. L.; CHEN, Y.; RODENBURG, C. M.; MICHAEL, S. F.; CUMMINS, L. B.; ARTHUR, L. O.; PEETERS, M.; SHAW, G. M.; SHARP, P. M. e HAHN, B. H. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. **Nature** v. 397, n. 6718, p. 436-441, 1999.

GAUDUIN, M. C.; YU, Y.; BARABASZ, A.; CARVILLE, A.; PIATAK, M.; LIFSON, J. D.; DESROSIERS, R. C. e JOHNSON, R. P. Induction of a virus-specific effector-memory CD4<sup>+</sup> T cell response by attenuated SIV infection. **The Journal of Experimental Medicine** v. 203, n. 12, p. 2661-2672, 2006.

GEISSLER, M.; BRUSS, V.; MICHALAK, S.; HOCKENJOS, B.; ORTMANN, D.; OFFENSPERGER, W. B.; WANDS, J. R. e BLUM, H. E. Intracellular retention of hepatitis B virus surface proteins reduces interleukin-2 augmentation after genetic immunizations. **Journal of Virology** v. 73, n. 5, p. 4284-4292, 1999.

GELDMACHER, C. e KOUP, R. A. Pathogen-specific T cell depletion and reactivation of opportunistic pathogens in HIV infection. **Trends in Immunology** v. 33, n. 5, p. 207-214, 2012.

GOEPFERT, P. A.; ELIZAGA, M. L.; SATO, A.; QIN, L.; CARDINALI, M.; HAY, C. M.; HURAL, J.; DEROSA, S. C.; DEFAWE, O. D.; TOMARAS, G. D.; MONTEFIORI, D. C.; XU, Y.; LAI, L.; KALAMS, S. A.; BADEN, L. R.; FREY, S. E.; BLATTNER, W. A.; WYATT, L. S.; MOSS, B. e ROBINSON, H. L. Phase 1 safety and immunogenicity testing of DNA and recombinant modified vaccinia Ankara vaccines expressing HIV-1 virus-like particles. **The Journal of Infectious Diseases** v. 203, n. 5, p. 610-619, 2011.

GOULDER, P. J.; BUNCE, M.; KRAUSA, P.; MCINTYRE, K.; CROWLEY, S.; MORGAN, B.; EDWARDS, A.; GIANGRANDE, P.; PHILLIPS, R. E. e MCMICHAEL, A. J. Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. **AIDS Research and Human Retroviruses** v. 12, n. 18, p. 1691-1698, 1996.

GOULDER, P. J. e WATKINS, D. I. Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. **Nature Reviews Immunology** v. 8, n. 8, p. 619-630, 2008.

GRAHAM, B. S.; KOUP, R. A.; ROEDERER, M.; BAILER, R. T.; ENAMA, M. E.; MOODIE, Z.; MARTIN, J. E.; MCCLUSKEY, M. M.; CHAKRABARTI, B. K.; LAMOREAUX, L.; ANDREWS, C. A.; GOMEZ, P. L.; MASCOLA, J. R. e NABEL, G. J. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 DNA candidate vaccine. **The Journal of Infectious Diseases** v. 194, n. 12, p. 1650-1660, 2006.

GRANT, R. M.; LAMA, J. R.; ANDERSON, P. L.; MCMAHAN, V.; LIU, A. Y.; VARGAS, L.; GOICOCHEA, P.; CASAPIA, M.; GUANIRA-CARRANZA, J. V.; RAMIREZ-CARDICH, M. E.; MONTOYA-HERRERA, O.; FERNANDEZ, T.; VELOSO, V. G.; BUCHBINDER, S. P.; CHARİYALERTSAK, S.; SCHECHTER, M.; BEKKER, L. G.; MAYER, K. H.; KALLAS, E. G.; AMICO, K. R.; MULLIGAN, K.; BUSHMAN, L. R.; HANCE, R. J.; GANOZA, C.; DEFECHEREUX, P.; POSTLE, B.; WANG, F.; MCCONNELL, J. J.; ZHENG, J. H.; LEE, J.; ROONEY, J. F.; JAFFE, H. S.; MARTINEZ, A. I.; BURNS, D. N. e GLIDDEN, D. V. Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. **The New England Journal of Medicine** v. 363, n. 27, p. 2587-2599, 2010.

GRAY, G.; BUCHBINDER, S. e DUERR, A. Overview of STEP and Phambili trial results: two phase IIb test-of-concept studies investigating the efficacy of MRK adenovirus type 5 gag/pol/nef subtype B HIV vaccine. **Current Opinion in HIV and AIDS** v. 5, n. 5, p. 357-361, 2010.

HANSEN, S. G.; VIEVILLE, C.; WHIZIN, N.; COYNE-JOHNSON, L.; SIESS, D. C.; DRUMMOND, D. D.; LEGASSE, A. W.; AXTHELM, M. K.; OSWALD, K.; TRUBEY, C. M.; PIATAK, M., JR.; LIFSON, J. D.; NELSON, J. A.; JARVIS, M. A. e PICKER, L. J. Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. **Nature Medicine** v. 15, n. 3, p. 293-299, 2009.

HARRER, T.; HARRER, E.; KALAMS, S. A.; ELBEIK, T.; STAPRANS, S. I.; FEINBERG, M. B.; CAO, Y.; HO, D. D.; YILMA, T.; CALIENDO, A. M.; JOHNSON, R. P.; BUCHBINDER, S. P. e WALKER, B. D. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. **AIDS Research and Human Retroviruses** v. 12, n. 7, p. 585-592, 1996.

HAYNES, B. F.; GILBERT, P. B.; MCEL RATH, M. J.; ZOLLA-PAZNER, S.; TOMARAS, G. D.; ALAM, S. M.; EVANS, D. T.; MONTEFIORI, D. C.; KARNASUTA, C.; SUTTHENT, R.; LIAO, H. X.; DEVICO, A. L.; LEWIS, G. K.; WILLIAMS, C.; PINTER, A.; FONG, Y.; JANES, H.; DECAMP, A.; HUANG, Y.; RAO, M.; BILLINGS, E.; KARASAVVAS, N.; ROBB, M. L.; NGAUY, V.; DE SOUZA, M. S.; PARIS, R.; FERRARI, G.; BAILER, R. T.; SODERBERG, K. A.; ANDREWS, C.; BERMAN, P. W.; FRAHM, N.; DE ROSA, S. C.; ALPERT, M. D.; YATES, N. L.; SHEN, X.; KOUP, R. A.; PITISUTTITHUM, P.; KAEWKUNGWAL, J.; NITAYAPHAN, S.; RERKS-NGARM, S.; MICHAEL, N. L. e KIM, J. H. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. **The New England Journal of Medicine** v. 366, n. 14, p. 1275-1286, 2012.

HEL, Z.; NACSA, J.; TRYNISZEWSKA, E.; TSAI, W. P.; PARKS, R. W.; MONTEFIORI, D. C.; FELBER, B. K.; TARTAGLIA, J.; PAVLAKIS, G. N. e FRANCHINI, G. Containment of simian immunodeficiency virus infection in vaccinated macaques: correlation with the magnitude of virus-specific pre- and postchallenge CD4+ and CD8+ T cell responses. **The Journal of Immunology** v. 169, n. 9, p. 4778-4787, 2002.

HUBER, M. e TRKOLA, A. Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. **Journal of Internal Medicine** v. 262, n. 1, p. 5-25, 2007.

HUNT, P. W.; BRENCHLEY, J.; SINCLAIR, E.; MCCUNE, J. M.; ROLAND, M.; PAGE-SHAFFER, K.; HSUE, P.; EMU, B.; KRONE, M.; LAMPIRIS, H.; DOUEK, D.; MARTIN, J. N. e DEEKS, S. G. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. **The Journal of Infectious Diseases** v. 197, n. 1, p. 126-133, 2008.

JAMES, C. O.; HUANG, M. B.; KHAN, M.; GARCIA-BARRIO, M.; POWELL, M. D. e BOND, V. C. Extracellular Nef protein targets CD4+ T cells for apoptosis by interacting with CXCR4 surface receptors. **Journal of Virology** v. 78, n. 6, p. 3099-3109, 2004.

JIN, X.; BROOKS, A.; CHEN, H.; BENNETT, R.; REICHMAN, R. e SMITH, H. APOBEC3G/CEM15 (hA3G) mRNA levels associate inversely with human immunodeficiency virus viremia. **Journal of Virology** v. 79, n. 17, p. 11513-11516, 2005.

JOHNSON, W. E. e DESROSIERS, R. C. Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. **Annual Review of Medicine** v. 53, p. 499-518, 2002.

KAHN, J. O. e WALKER, B. D. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. **The New England Journal of Medicine** v. 339, n. 1, p. 33-39, 1998.

KALAMS, S. A.; BUCHBINDER, S. P.; ROSENBERG, E. S.; BILLINGSLEY, J. M.; COLBERT, D. S.; JONES, N. G.; SHEA, A. K.; TROCHA, A. K. e WALKER, B. D. Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. **Journal of Virology** v. 73, n. 8, p. 6715-6720, 1999.

KARIM, Q. A.; KARIM, S. S. A.; FROHLICH, J. A.; GROBLER, A. C.; BAXTER, C.; MANSOOR, L. E.; KHARSANY, A. B. M.; SIBEKO, S.; MLISANA, K. P.; OMAR, Z.; GENGLAH, T. N.; MAARSCHALK, S.; ARULAPPAN, N.; MLOTSHWA, M.; MORRIS, L. e TAYLOR, D. Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. **Science** v. 233, n. 6042, p. 1168-1174, 2011.

KASLOW, R. A.; CARRINGTON, M.; APPLE, R.; PARK, L.; MUNOZ, A.; SAAH, A. J.; GOEDERT, J. J.; WINKLER, C.; O'BRIEN, S. J.; RINALDO, C.; DETELS, R.; BLATTNER, W.; PHAIR, J.; ERLICH, H. e MANN, D. L. Influence of combinations of

human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. **Nature Medicine** v. 2, n. 4, p. 405-411, 1996.

KASLOW, R. A.; DUQUESNOY, R.; VANRADEN, M.; KINGSLEY, L.; MARRARI, M.; FRIEDMAN, H.; SU, S.; SAAH, A. J.; DETELS, R.; PHAIR, J. e . A1, Cw7, B8, DR3 HLA antigen combination associated with rapid decline of T-helper lymphocytes in HIV-1 infection. A report from the Multicenter AIDS Cohort Study. **Lancet** v. 335, n. 8695, p. 927-930, 1990.

KELLY, M. E.; ZHUO, J.; BHARADWAJ, A. S. e CHAO, H. Induction of immune tolerance to FIX following muscular AAV gene transfer is AAV-dose/FIX-level dependent. **Molecular Therapy** v. 17, n. 5, p. 857-863, 2009.

KIBUUKA, H.; KIMUTAI, R.; MABOKO, L.; SAWE, F.; SCHUNK, M. S.; KROIDL, A.; SHAFFER, D.; ELLER, L. A.; KIBAYA, R.; ELLER, M. A.; SCHINDLER, K. B.; SCHUETZ, A.; MILLARD, M.; KROLL, J.; DALLY, L.; HOELSCHER, M.; BAILER, R.; COX, J. H.; MAROVICH, M.; BIRX, D. L.; GRAHAM, B. S.; MICHAEL, N. L.; DE SOUZA, M. S. e ROBB, M. L. A phase 1/2 study of a multiclade HIV-1 DNA plasmid prime and recombinant adenovirus serotype 5 boost vaccine in HIV-Uninfected East Africans (RV 172). **The Journal of Infectious Diseases** v. 201, n. 4, p. 600-607, 2010.

KLEIN, F.; HALPER-STROMBERG, A.; HORWITZ, J. A.; GRUELL, H.; SCHEID, J. F.; BOURNAZOS, S.; MOUQUET, H.; SPATZ, L. A.; DISKIN, R.; ABADIR, A.; ZANG, T.; DORNER, M.; BILLERBECK, E.; LABITT, R. N.; GAEBLER, C.; MARCOVECCHIO, P. M.; INCESU, R. B.; EISENREICH, T. R.; BIENIASZ, P. D.; SEAMAN, M. S.; BJORKMAN, P. J.; RAVETCH, J. V.; PLOSS, A. e NUSSENZWEIG, M. C. HIV therapy by a combination of broadly neutralizing antibodies in humanized mice. **Nature** v. 492, n. 7427, p. 118-122, 2012.

KORBER, B.; GASCHEN, B.; YUSIM, K.; THAKALLAPALLY, R.; KESMIR, C. e DETOURS, V. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. **British Medical Bulletin** v. 58, p. 19-42, 2001.

KORBER, B.; MULDOON, M.; THEILER, J.; GAO, F.; GUPTA, R.; LAPEDES, A.; HAHN, B. H.; WOLINSKY, S. e BHATTACHARYA, T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. **Science** v. 288, n. 5472, p. 1789-1796, 2000.

KOUP, R. A.; SAFRIT, J. T.; CAO, Y.; ANDREWS, C. A.; MCLEOD, G.; BORKOWSKY, W.; FARTHING, C. e HO, D. D. 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. 4650-4655, 1994.

KUSAKABE, K.; XIN, K. Q.; KATOH, H.; SUMINO, K.; HAGIWARA, E.; KAWAMOTO, S.; OKUDA, K.; MIYAGI, Y.; AOKI, I.; NISHIOKA, K.; KLINMAN, D. e OKUDA, K. The timing of GM-CSF expression plasmid administration influences the Th1/Th2 response induced by an HIV-1-specific DNA vaccine. **The Journal of Immunology** v. 164, n. 6, p. 3102-3111, 2000.

KUTZLER, M. A.; ROBINSON, T. M.; CHATTERGOON, M. A.; CHOO, D. K.; CHOO, A. Y.; CHOE, P. Y.; RAMANATHAN, M. P.; PARKINSON, R.; KUDCHODKAR, S.; TAMURA, Y.; SIDHU, M.; ROOPCHAND, V.; KIM, J. J.; PAVLAKIS, G. N.; FELBER, B. K.; WALDMANN, T. A.; BOYER, J. D. e WEINER, D. B. Coimmunization with an optimized IL-15 plasmid results in enhanced function and longevity of CD8 T cells that are partially independent of CD4 T cell help. **The Journal of Immunology** v. 175, n. 1, p. 112-123, 2005.

LADDY, D. J. e WEINER, D. B. From plasmids to protection: a review of DNA vaccines against infectious diseases. **International Reviews of Immunology** v. 25, n. 3-4, p. 99-123, 2006.

LAI, L.; VODROS, D.; KOZLOWSKI, P. A.; MONTEFIORI, D. C.; WILSON, R. L.; AKERSTROM, V. L.; CHENNAREDDI, L.; YU, T.; KANNANGANAT, S.; OFIELU, L.; VILLINGER, F.; WYATT, L. S.; MOSS, B.; AMARA, R. R. e ROBINSON, H. L. GM-CSF DNA: an adjuvant for higher avidity IgG, rectal IgA, and increased protection against the acute phase of a SHIV-89.6P challenge by a DNA/MVA immunodeficiency virus vaccine. **Virology** v. 369, n. 1, p. 153-167, 2007.

LASARO, M. O.; DINIZ, M. O.; REYES-SANDOVAL, A.; ERTL, H. C. e FERREIRA, L. C. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. **Microbes and Infection** v. 7, n. 15, p. 1541-1550, 2005.

LASARO, M. O.; TATSIS, N.; HENSLEY, S. E.; WHITBECK, J. C.; LIN, S. W.; RUX, J. J.; WHERRY, E. J.; COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J. e ERTL, H. C. Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. **Nature Medicine** v. 14, n. 2, p. 205-212, 2008.

LECHNER, M. G.; LIEBERTZ, D. J. e EPSTEIN, A. L. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. **The Journal of Immunology** v. 185, n. 4, p. 2273-2284, 2010.

LIU, J.; BARTESAGHI, A.; BORGNIA, M. J.; SAPIRO, G. e SUBRAMANIAM, S. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. **Nature** v. 455, n. 7209, p. 109-113, 2008.

LOO, C. P.; LONG, B. R.; HECHT, F. M.; NIXON, D. F. e MICHAELSSON, J. HIV-1-specific T Cell-dependent natural killer (NK) cell activation: major contribution by NK cells to interferon-gamma production in response to HIV-1 antigens. **AIDS Research and Human Retroviruses** v. 25, n. 6, p. 603-605, 2009.

LUCKAY, A.; SIDHU, M. K.; KJEKEN, R.; MEGATI, S.; CHONG, S. Y.; ROOPCHAND, V.; GARCIA-HAND, D.; ABDULLAH, R.; BRAUN, R.; MONTEFIORI, D. C.; ROSATI, M.; FELBER, B. K.; PAVLAKIS, G. N.; MATHIESEN, I.; ISRAEL, Z. R.; ELDRIDGE, J. H. e EGAN, M. A. Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. **Journal of Virology** v. 81, n. 10, p. 5257-5269, 2007.

MALLERET, B.; MANEGLIER, B.; KARLSSON, I.; LEBON, P.; NASCIMBENI, M.; PERIE, L.; BROCHARD, P.; DELACHE, B.; CALVO, J.; ANDRIEU, T.; SPREUX-VAROUQUAUX, O.; HOSMALIN, A.; LE, G. R. e VASLIN, B. Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. **Blood** v. 112, n. 12, p. 4598-4608, 2008.

MCCUTCHAN, F. E. Understanding the genetic diversity of HIV-1. **Aids** v. 14 Suppl 3, p. S31-S44, 2000.

MEHANDRU, S.; POLES, M. A.; TENNER-RACZ, K.; HOROWITZ, A.; HURLEY, A.; HOGAN, C.; BODEN, D.; RACZ, P. e MARKOWITZ, M. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. **The Journal of Experimental Medicine** v. 200, n. 6, p. 761-770, 2004.

MEIER, A.; ALTER, G.; FRAHM, N.; SIDHU, H.; LI, B.; BAGCHI, A.; TEIGEN, N.; STREECK, H.; STELLBRINK, H. J.; HELLMAN, J.; VAN, L. J. e ALTFELD, M. MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. **Journal of Virology** v. 81, n. 15, p. 8180-8191, 2007.

MELLORS, J. W.; KINGSLEY, L. A.; RINALDO, C. R., JR.; TODD, J. A.; HOO, B. S.; KOKKA, R. P. e GUPTA, P. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. **Annals of Internal Medicine** v. 122, n. 8, p. 573-579, 1995.

MELLORS, J. W.; RINALDO, C. R., JR.; GUPTA, P.; WHITE, R. M.; TODD, J. A. e KINGSLEY, L. A. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. **Science** v. 272, n. 5265, p. 1167-1170, 1996.

Ministério da Saúde. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO: AIDS e HIV. 2011

MOOIJ, P.; VAN DER KOLK, M.; BOGERS, W. M.; TEN HAAFT, P. J.; VAN DER MEIDE, P.; ALMOND, N.; STOTT, J.; DESCHAMPS, M.; LABBE, D.; MOMIN, P.; VOSS, G.; VON, H. P.; BRUCK, C. e HEENEY, J. L. A clinically relevant HIV-1 subunit vaccine protects rhesus macaques from in vivo passaged simian-human immunodeficiency virus infection. **Aids** v. 12, n. 5, p. F15-F22, 1998.

MORGAN, C.; MARTHAS, M.; MILLER, C.; DUERR, A.; CHENG-MAYER, C.; DESROSIERS, R.; FLORES, J.; HAIGWOOD, N.; HU, S. L.; JOHNSON, R. P.; LIFSON, J.; MONTEFIORI, D.; MOORE, J.; ROBERT-GUROFF, M.; ROBINSON, H.; SELF, S. e COREY, L. The use of nonhuman primate models in HIV vaccine development. **PLOS Medicine** v. 5, n. 8, p. e173, 2008.

MURRAY, H. W.; RUBIN, B. Y.; MASUR, H. e ROBERTS, R. B. Impaired production of lymphokines and immune (gamma) interferon in the acquired immunodeficiency syndrome. **New England Journal of Medicine** v. 310, n. 14, p. 883-889, 1984.

MUSEY, L. K.; KRIEGER, J. N.; HUGHES, J. P.; SCHACKER, T. W.; COREY, L. e MCEL RATH, M. J. Early and persistent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-

1)-specific T helper dysfunction in blood and lymph nodes following acute HIV-1 infection. **The Journal of Infectious Diseases** v. 180, n. 2, p. 278-284, 1999.

O'CONNELL, R. J.; KIM, J. H.; COREY, L. e MICHAEL, N. L. Human immunodeficiency virus vaccine trials. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine** v. 2, n. 12, p. a007351, 2012.

PANTALEO, G.; GRAZIOSI, C. e FAUCI, A. S. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **New England Journal of Medicine** v. 328, n. 5, p. 327-335, 1993.

PARREN, P. W.; MOORE, J. P.; BURTON, D. R. e SATTENTAU, Q. J. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. **Aids** v. 13 Suppl A, p. S137-S162, 1999.

PITISUTTITHUM, P.; GILBERT, P.; GURWITH, M.; HEYWARD, W.; MARTIN, M.; VAN, G. F.; HU, D.; TAPPERO, J. W. e CHOOPANYA, K. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. **The Journal of Infectious Diseases** v. 194, n. 12, p. 1661-1671, 2006.

POMERANTZ, R. J.; SESHAMMA, T. e TRONO, D. Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: potential implications for latency. **Journal of Virology** v. 66, n. 3, p. 1809-1813, 1992.

PRICE, H.; LACAP, P.; TUFF, J.; WACHIHI, C.; KIMANI, J.; BALL, T. B.; LUO, M. e PLUMMER, F. A. A TRIM5 $\alpha$  exon 2 polymorphism is associated with protection from HIV-1 infection in the Pumwani sex worker cohort. **Aids** v. 24, n. 12, p. 1813-1821, 2010.

RERKS-NGARM, S.; PITISUTTITHUM, P.; NITAYAPHAN, S.; KAEWKUNGWAL, J.; CHIU, J.; PARIS, R.; PREMSRI, N.; NAMWAT, C.; DE, S. M.; ADAMS, E.; BENENSON, M.; GURUNATHAN, S.; TARTAGLIA, J.; MCNEIL, J. G.; FRANCIS, D. P.; STABLEIN, D.; BIRX, D. L.; CHUNSUTTIWAT, S.; KHAMBOONRUANG, C.; THONGCHAROEN, P.; ROBB, M. L.; MICHAEL, N. L.; KUNASOL, P. e KIM, J. H. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. **The New England Journal of Medicine** v. 361, n. 23, p. 2209-2220, 2009.

RIBEIRO, S. P.; ROSA, D. S.; FONSECA, S. G.; MAIRENA, E. C.; POSTOL, E.; OLIVEIRA, S. C.; GUILHERME, L.; KALIL, J. e CUNHA-NETO, E. A vaccine encoding conserved promiscuous HIV CD4 epitopes induces broad T cell responses in mice transgenic to multiple common HLA class II molecules. **PLoS One** v. 5, n. 6, p. e11072, 2010.

RICHMAN, D. D.; WRIN, T.; LITTLE, S. J. e PETROPOULOS, C. J. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 100, n. 7, p. 4144-4149, 2003.

ROSA, D. S.; RIBEIRO, S. P.; ALMEIDA, R. R.; MAIRENA, E. C.; KALIL, J. e NETO, E. C. A recombinant adenovirus encoding multiple HIV-1 epitopes induces stronger

CD4+ T cell responses than a DNA vaccine in mice. **Vaccines & Vaccination** v. 2, n. 4, p. 1-8, 2011a.

ROSA, D. S.; RIBEIRO, S. P.; ALMEIDA, R. R.; MAIRENA, E. C.; POSTOL, E.; KALIL, J. e CUNHA-NETO, E. A DNA vaccine encoding multiple HIV CD4 epitopes elicits vigorous polyfunctional, long-lived CD4+ and CD8+ T cell responses. **PLoS One** v. 6, n. 2, p. e16921, 2011b.

ROSATI, M.; BERGAMASCHI, C.; VALENTIN, A.; KULKARNI, V.; JALAH, R.; ALICEA, C.; PATEL, V.; VON GEGERFELT, A. S.; MONTEFIORI, D. C.; VENZON, D. J.; KHAN, A. S.; DRAGHIA-AKLI, R.; VAN ROMPAY, K. K.; FELBER, B. K. e PAVLAKIS, G. N. DNA vaccination in rhesus macaques induces potent immune responses and decreases acute and chronic viremia after SIVmac251 challenge. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 106, n. 37, p. 15831-15836, 2009.

ROSENBERG, E. S.; BILLINGSLEY, J. M.; CALIENDO, A. M.; BOSWELL, S. L.; SAX, P. E.; KALAMS, S. A. e WALKER, B. D. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. **Science** v. 278, n. 5342, p. 1447-1450, 1997.

SAEZ-CIRION, A.; PANCINO, G.; SINET, M.; VENET, A. e LAMBOTTE, O. HIV controllers: how do they tame the virus? **Trends in Immunology** v. 28, n. 12, p. 532-540, 2007.

SCHADECK, E. B.; SIDHU, M.; EGAN, M. A.; CHONG, S. Y.; PIACENTE, P.; MASOOD, A.; GARCIA-HAND, D.; CAPPELLO, S.; ROOPCHAND, V.; MEGATI, S.; QUIROZ, J.; BOYER, J. D.; FELBER, B. K.; PAVLAKIS, G. N.; WEINER, D. B.; ELDRIDGE, J. H. e ISRAEL, Z. R. A dose sparing effect by plasmid encoded IL-12 adjuvant on a SIVgag-plasmid DNA vaccine in rhesus macaques. **Vaccine** v. 24, n. 21, p. 4677-4687, 2006.

SCHELL, J. B.; BAHL, K.; ROSE, N. F.; BUONOCORE, L.; HUNTER, M.; MARX, P. A.; LABRANCHE, C. C.; MONTEFIORI, D. C. e ROSE, J. K. Viral vectored granulocyte-macrophage colony stimulating factor inhibits vaccine protection in an SIV challenge model: protection correlates with neutralizing antibody. **Vaccine** v. 30, n. 28, p. 4233-4239, 2012.

SCHWARTZ, R. H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. **Science** v. 248, n. 4961, p. 1349-1356, 1990.

SMITH, K. A. Interleukin-2: inception, impact, and implications. **Science** v. 240, n. 4856, p. 1169-1176, 1988.

STOTT, E. J.; ALMOND, N.; KENT, K.; WALKER, B.; HULL, R.; ROSE, J.; SILVERA, P.; SANGSTER, R.; CORCORAN, T.; LINES, J.; SILVERA, K.; LUCIW, P.; MURPHY-CORB, M.; MOMIN, P. e BRUCK, C. Evaluation of a candidate human immunodeficiency virus type 1 (HIV 1) vaccine in macaques: effect of vaccination with HIV-1 gp120 on subsequent challenge with heterologous simian

immunodeficiency virus-HIV-1 chimeric virus. **Journal of General Virology** v. 79, p. 423-432, 1998.

STURNIOLO, T.; BONO, E.; DING, J.; RADDRIZZANI, L.; TUERECI, O.; SAHIN, U.; BRAXENTHALER, M.; GALLAZZI, F.; PROTTI, M. P.; SINIGAGLIA, F. e HAMMER, J. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. **Nature Biotechnology** v. 17, n. 6, p. 555-561, 1999.

SUN, Y.; SCHMITZ, J. E.; BUZBY, A. P.; BARKER, B. R.; RAO, S. S.; XU, L.; YANG, Z. Y.; MASCOLA, J. R.; NABEL, G. J. e LETVIN, N. L. Virus-specific cellular immune correlates of survival in vaccinated monkeys after simian immunodeficiency virus challenge. **Journal of Virology** v. 80, n. 22, p. 10950-10956, 2006.

SUZUKI, G.; KAWASE, Y.; KOYASU, S.; YAHARA, I.; KOBAYASHI, Y. e SCHWARTZ, R. H. Antigen-induced suppression of the proliferative response of T cell clones. **The Journal of Immunology** v. 140, n. 5, p. 1359-1365, 1988.

TENBUSCH, M.; NCHINDA, G.; STORCKSDIECK GENANNT, B. M.; TEMCHURA, V. e UBERLA, K. Targeting the antigen encoded by adenoviral vectors to the DEC205 receptor modulates the cellular and humoral immune response. **International Immunology** 2012.

TRYNISZEWSKA, E.; NACSA, J.; LEWIS, M. G.; SILVERA, P.; MONTEFIORI, D.; VENZON, D.; HEL, Z.; PARKS, R. W.; MONIUSZKO, M.; TARTAGLIA, J.; SMITH, K. A. e FRANCHINI, G. Vaccination of macaques with long-standing SIVmac251 infection lowers the viral set point after cessation of antiretroviral therapy. **The Journal of Immunology** v. 169, n. 9, p. 5347-5357, 2002.

UNAIDS/WHO. <http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/pubfacts>. Acesso em: 22 de nov, 2012.

UNAIDS. GLOBAL HIV/AIDS RESPONSE: Epidemic update and health sector progress toward Universal Access. 2011

VACCARI, M.; MATTAPALLIL, J.; SONG, K.; TSAI, W. P.; HRYNIEWICZ, A.; VENZON, D.; ZANETTI, M.; REIMANN, K. A.; ROEDERER, M. e FRANCHINI, G. Reduced protection from simian immunodeficiency virus SIVmac251 infection afforded by memory CD8+ T cells induced by vaccination during CD4+ T-cell deficiency. **Journal of Virology** v. 82, n. 19, p. 9629-9638, 2008.

VEAZEY, R. S.; DEMARIA, M.; CHALIFOUX, L. V.; SHVETZ, D. E.; PAULEY, D. R.; KNIGHT, H. L.; ROSENZWEIG, M.; JOHNSON, R. P.; DESROSIERS, R. C. e LACKNER, A. A. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. **Science** v. 280, n. 5362, p. 427-431, 1998.

WAGNER, L.; YANG, O. O.; GARCIA-ZEPEDA, E. A.; GE, Y.; KALAMS, S. A.; WALKER, B. D.; PASTERNAK, M. S. e LUSTER, A. D. Beta-chemokines are

released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. **Nature** v. 391, n. 6670, p. 908-911, 1998.

WANJALLA, C. N.; GOLDSTEIN, E. F.; WIRBLICH, C. e SCHNELL, M. J. A role for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the regulation of CD8(+) T cell responses to rabies virus. **Virology** v. 426, n. 2, p. 120-133, 2012.

WEBER, B. Screening of HIV infection: role of molecular and immunological assays. **Expert Review of Molecular Diagnostics** v. 6, n. 3, p. 399-411, 2006.

WEISS, W. R.; ISHII, K. J.; HEDSTROM, R. C.; SEDEGAH, M.; ICHINO, M.; BARNHART, K.; KLINMAN, D. M. e HOFFMAN, S. L. A plasmid encoding murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases protection conferred by a malaria DNA vaccine. **The Journal of Immunology** v. 161, n. 5, p. 2325-2332, 1998.

WILSON, J. D.; OGG, G. S.; ALLEN, R. L.; DAVIS, C.; SHAUNAK, S.; DOWNIE, J.; DYER, W.; WORKMAN, C.; SULLIVAN, S.; MCMICHAEL, A. J. e ROWLAND-JONES, S. L. Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. **Aids** v. 14, n. 3, p. 225-233, 2000.

WILSON, N. A.; KEELE, B. F.; REED, J. S.; PIASKOWSKI, S. M.; MACNAIR, C. E.; BETT, A. J.; LIANG, X.; WANG, F.; THORYK, E.; HEIDECKER, G. J.; CITRON, M. P.; HUANG, L.; LIN, J.; VITELLI, S.; AHN, C. D.; KAIZU, M.; MANESS, N. J.; REYNOLDS, M. R.; FRIEDRICH, T. C.; LOFFREDO, J. T.; RAKASZ, E. G.; ERICKSON, S.; ALLISON, D. B.; PIATAK, M., JR.; LIFSON, J. D.; SHIVER, J. W.; CASIMIRO, D. R.; SHAW, G. M.; HAHN, B. H. e WATKINS, D. I. Vaccine-induced cellular responses control simian immunodeficiency virus replication after heterologous challenge. **Journal of Virology** v. 83, n. 13, p. 6508-6521, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO case definitions of hiv for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of hiv-related disease in adults and children. 2007

WUNDERLICH, G.; MOURA, I. C. e DEL PORTILLO, H. A. Genetic immunization of BALB/c mice with a plasmid bearing the gene coding for a hybrid merozoite surface protein 1-hepatitis B virus surface protein fusion protects mice against lethal *Plasmodium chabaudi chabaudi* PC1 infection. **Infection and Immunity** v. 68, n. 10, p. 5839-5845, 2000.

WYAND, M. S.; MANSON, K.; MONTEFIORI, D. C.; LIFSON, J. D.; JOHNSON, R. P. e DESROSIERS, R. C. Protection by live, attenuated simian immunodeficiency virus against heterologous challenge. **Journal of Virology** v. 73, n. 10, p. 8356-8363, 1999.

WYATT, R.; KWONG, P. D.; DESJARDINS, E.; SWEET, R. W.; ROBINSON, J.; HENDRICKSON, W. A. e SODROSKI, J. G. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. **Nature** v. 393, n. 6686, p. 705-711, 1998.

YANG, O. O.; KALAMS, S. A.; ROSENZWEIG, M.; TROCHA, A.; JONES, N.; KOZIEL, M.; WALKER, B. D. e JOHNSON, R. P. Efficient lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by cytotoxic T lymphocytes. **Journal of Virology** v. 70, n. 9, p. 5799-5806, 1996.

YU, X.; YU, Y.; LIU, B.; LUO, K.; KONG, W.; MAO, P. e YU, X. F. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. **Science** v. 302, n. 5647, p. 1056-1060, 2003.

ZHANG, X.; SUN, S.; HWANG, I.; TOUGH, D. F. e SPRENT, J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8(+) T cells in vivo by IL-15. **Immunity** v. 8, n. 5, p. 591-599, 1998.

ZHU, P.; LIU, J.; BESS, J., JR.; CHERTOVA, E.; LIFSON, J. D.; GRISE, H.; OFEK, G. A.; TAYLOR, K. A. e ROUX, K. H. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. **Nature** v. 441, n. 7095, p. 847-852, 2006.