

**ADRIANA LETICIA GOLDONI**

**“Estudo da imunogenicidade da vacina de DNA quimérica *LAMP/gag* do HIV-1 em  
sítios de mucosa de camundongos imunizados no período neonatal”**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do Título de Doutor em  
Ciências (Imunologia).**

**São Paulo  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

---

**ADRIANA LETICIA GOLDONI**

**“Estudo da imunogenicidade da vacina de DNA quimérica *LAMP/gag* do HIV-1 em sítios de mucosa de camundongos imunizados no período neonatal”**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Imunologia).**

**Área de Concentração: Imunologia**

**Orientador: Profa. Dra. Maria Notomi Sato**

**São Paulo  
2009**

---

---

A minha mãe Geilza, ao meu pai Alcir,  
as minhas irmãs Andiará e Ana Gabriela,  
a Vilma e ao meu sobrinho Arthur pelo  
amor, incentivo e apoio, sempre.

---

---

## AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Maria Notomi Sato pela orientação, dedicação, apoio, confiança, pelo constante incentivo, amizade, liderança, por acreditar sempre no meu potencial, por ter aceitado que eu fizesse parte de uma equipe tão boa durante minha jornada como sua aluna. Por ser sempre um modelo a ser seguido, uma pessoa exemplar que sempre nos ajuda a escolher o melhor caminho, por ser uma orientadora sempre presente, o que é essencial para nós, alunos. Obrigada por oferecer os meios para meu desenvolvimento profissional, pessoal e compreender minhas escolhas. Minha eterna gratidão e respeito.

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte pela confiança e pela oportunidade de fazer parte do LIM-56. A excelência e maestria que dirige o LIM-56 garantem que este seja sempre um local de constantes ensinamentos e crescimento profissional e pessoal.

A Dra. Paula Ordonhez Rigato que começou no aprimoranda como eu e agora é doutora, uma grande amiga que me ajudou desde que cheguei ao LIM-56, dividindo conhecimentos práticos, teóricos e pessoais, pelas nossas conversas e parcerias na realização dos experimentos, por estar sempre pronta a me ouvir e dar conselhos, pelos ensinamentos de HIV, por toda sua ajuda no desenvolvimento este trabalho.

Ao Orlando Guerra Piubelli que chegou no meio da minha jornada, mas teve papel decisivo na parte experimental desta tese. Obrigada pelo apoio técnico, pela amizade que construímos nesses 2 anos, conversas profissionais e pessoais. Você tornou nosso grupo mais divertido.

Ao Prof. Dr. Gil Benard pelo apoio e incentivo que sempre demonstrou. Pesquisador sempre presente no laboratório e no meu desenvolvimento profissional.

---

---

Ao Dr. Milton Maciel pelo que começou com apoio e orientação prática e teórica que auxiliaram o desenvolvimento deste projeto, mesmo estando distante e que se tornou em amizade. Sua orientação é parte essencial durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Ernesto Marques pela oportunidade de trabalharmos com esta vacina. Agradeço pela colaboração.

As amigos que sempre me ajudaram, que sempre dividiram seus conhecimentos práticos e teóricos, grandes amigos que fazem com que a caminhada seja mais leve, mais prazerosa: Cyro A. de Brito, Noemia M. Orii, Rosangela Araújo, Soraya Oigusuku, Juliana C. dos Santos e Ana Elisa Fusaro.

As amigadas nascidas no laboratório que ajudaram a manter a calma, a seguir a diante mesmo nas horas de desânimo, que pacientemente dividiram conhecimentos práticos, teóricos e pessoais e por todos os momentos de convívio e companherismo: Camila R. Cacere, Eliana Futata, Jefferson R. Victor, Elaine C. Cardoso,, Mayce H. Azor, Francinelson Lourenço, Bruno Muniz, Isabela Fernandes, Shinai Arriel Gregório, Vanessa Batista, Guilherme Silveira.

A Rachel Guedes e Vilma Santos pelo cuidado com os animais e com o biotério, possibilitando o desenvolvimento deste e outros projetos.

As meninas do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães da Fiocruz de Recife, Liciane Xavier, Andréa Melo e Karla Barbosa pela leitura das placas de ELISPOT e eterna disposição.

Aos funcionários incansáveis (que se tornaram amigos) do LIM-56, que me receberam de braços abertos e me ensinaram muito durante todos esses anos: Fabio Eduardo S. da Silva,

---

---

Rosana Alcade, Edna Reis, Luiz Abraão, Ângelo, Lucio Martins, Celeste Romano. E mesmo aqueles que não estão mais no LIM-56, mas fazem parte da nossa história: Olivete Venâncio, Daniel Morales. Às meninas maravilhosas da limpeza que zelam pelo nosso bem estar e pela lavagem dos nossos materiais e limpeza do laboratório: Adriana Santos e Silvia Castro.

Às minhas amigas Patrícia Ferreira, Juliana Paiva e Gisele Teixeira por todos os momentos que passamos juntos e pela compreensão, torcendo sempre pelo meu sucesso.

As observações e sugestões dos professores da banca do exame de qualificação: Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto, Solange Barros Carbonare e Ises de Almeida Abrahamsohn.

Principalmente aos meus pais, Geilza dos Santos e Alcir José Goldoni, por tudo que fizeram e ainda fazem por mim, por todo seu amor, pela educação, apoio, por sempre me ouvir e pela paciência em todos os momentos da minha vida. Graças a vocês consegui ir atrás e realizar meus sonhos. Obrigada por respeitarem minhas decisões e pelo que me tornei. Meu amor eterno a vocês.

As minhas irmãs Andiará Goldoni, Ana Gabriela Goldoni e a Vilma, que não é irmã de sangue, mas de amor, elas sempre me apoiaram e sempre alegraram nossa família. Vocês fazem parte da minha vida, do que conquistei e do que me tornei.

A FAPESP, LIM-56 e Ministério da Saúde pelo apoio técnico e financeiro.

Aqui no agradecimento em último lugar, mas nas minhas orações sempre em primeiro, agradeço ao DEUS, por me dar sempre forças para seguir a diante.

---

---

## RESUMO

Goldoni AL. Estudo da imunogenicidade da vacina de DNA quimérica *LAMP/gag* do HIV-1 em sítios de mucosa de camundongos imunizados no período neonatal [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O desenvolvimento de vacinas imunogênicas em mucosas é essencial na prevenção da infecção pelo HIV, já que as mucosas do trato gastrointestinal e vaginal são consideradas as principais vias de entrada para o HIV e de reservatório do vírus. A fase neonatal é caracterizada pela elevada suscetibilidade aos agentes infecciosos, em consequência da sua imaturidade imunológica e pela alta predisposição à tolerância. A utilização de vacinas de DNA em mucosas é uma estratégia de imunização que poderia evitar o risco das vacinas que utilizam microrganismos vivos ou atenuados, principalmente em fase precoce de vida. A estratégia vacinal *LAMP/gag*, que associa o gene que codifica a proteína LAMP com a fração que codifica a proteína de 55 kDa do gene *gag* do HIV-1 (GAG), direciona o peptídeo para o compartimentos lisossomais/endossomais e possibilita a apresentação antigênica no contexto das moléculas de classe II do MHC. Esta vacina quimérica é imunogênica em camundongos adultos por promover a ativação de células T CD4<sup>+</sup> e induz resposta de longa duração. O objetivo deste estudo foi avaliar a imunogenicidade da vacina de DNA quimérica administrada por via intranasal em camundongos iniciada na fase neonatal. Os resultados mostraram que após três doses das vacinas por via intranasal, somente a vacina quimérica *LAMP/gag* induziu produção de anticorpos sIgA e IgG anti-GAG e elevou a concentração total de imunoglobulinas IgG no lavado intestinal, mas ambas as vacinas de DNA estimularam a produção de TGF- $\beta$ 1 detectado no lavado intestinal. Para induzir a produção de sérica de anticorpos foi necessário associar injeções intradérmicas ao protocolo de imunização intranasal. A associação das vias IN/ID possibilitou a geração de resposta humoral de mucosa e sistêmica, principalmente da subclasse IgG1 do que IgG2a anti-p24 no soro dos animais vacinados com *LAMP/gag*. Ambas vacinas *LAMP/gag* e *gag* induziram resposta de células T CD8<sup>+</sup> similares no baço e gânglios mesentéricos (GM), avaliada pela frequência de células secretoras de IFN- $\gamma$  (SFC) aos *pools* de peptídeos da GAG, porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas de classe I (pentâmero<sup>+</sup>), resposta T citotóxica *in vivo* e secreção *in vitro* de citocinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Entretanto, a resposta T CD4<sup>+</sup> foi mais pronunciada nos animais *LAMP/gag*, que reconheceram o dobro do número de *pools* de peptídeos da GAG e

---

---

aumento da SFC de IFN- $\gamma$  e IL-4 quando comparados com os animais *gag*. A imunização com *LAMP/gag* e *gag* aumentou a frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> e de IDO nos GM, corroborando com os níveis aumentados de TGF- $\beta$ 1 encontrado no lavado intestinal. A resposta imune induzida pela vacina de DNA quimérica durou por 8 meses após a imunização neonatal. A associação do adjuvante oligodeoxinucleotídeo CpG A às vacinas de DNA regulou negativamente a resposta medida por células T CD4<sup>+</sup> e na produção de anticorpos IgG2a, mas não interferiu na resposta T CD8<sup>+</sup> e na síntese de anticorpos IgG1. A imunização com *LAMP/gag* ou *gag* mostrou ser imunogênica quando iniciada em período neonatal de camundongos BALB/c e capaz de induzir mecanismos reguladores. Os dados evidenciaram que apenas a vacina quimérica *LAMP/gag* foi capaz de induzir resposta imune celular e humoral e de memória imunológica, por ativar mais eficazmente as células T CD4<sup>+</sup>, sugerindo ser uma interessante estratégia vacinal no período neonatal.

Palavras-chave: Imunologia; Vacinas de DNA; HIV; Neonatologia.

---

---

## ABSTRACT

Goldoni AL. Immunogenicity study of the HIV *LAMP/gag* chimera DNA vaccine in the mucosa sites of immunized mice during neonatal phase [thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The development of mucosal immunogenic vaccines is essential to prevent HIV infection, since gut and vaginal mucosa are considered the main routes to HIV infection and virus reservoir. The neonatal phase is characterized by elevated susceptibility to infectious agents due to the immunological immaturity and high tolerance predisposition. The use of DNA vaccine in mucosa is an immunization strategy to avoid the risk of live microorganisms or attenuated in vaccines formulation, mainly in early phase of life. The *LAMP/gag* vaccine strategy, which associates the gene that encodes LAMP protein and the fraction encoding 55kDa protein (GAG) of the HIV-1 *gag* gene, directs the peptide to lysosomal/endosomal compartments and allows antigenic presentation in the context of MHC class II molecules. This chimeric vaccine is immunogenic in adult mice promoting CD4<sup>+</sup> T cells activation and inducing long-term immune response. The objective of this study was to evaluate the immunogenicity of the chimera DNA vaccine administered by intranasal route in mice beginning in the neonatal period. The results showed that after three doses of the vaccines by intranasal route, only the *LAMP/gag* chimera DNA vaccine induced anti-GAG sIgA and IgG antibodies production and increased total IgG immunoglobulins concentration in intestinal washes, whereas both DNA vaccines stimulated TFG-β1 synthesis as detected in intestinal washes. Furthermore, it was necessary to associate intradermal injections to the intranasal immunization protocol induce anti-p24 antibodies production in the serum. The association of the IN/ID routes allowed the generation of mucosal and systemic humoral response, mainly of anti-GAG IgG1 rather than IgG2a in the serum of *LAMP/gag*- immunized mice.

Both *LAMP/gag* and *gag* vaccines generated a strong CD8<sup>+</sup> T-cell response in spleen and mesenteric lymph nodes (MLN) compartments, as evaluated through the frequency of IFN-γ-secreting cells (SFC) to the GAG peptide pools; percentage of antigen-specific class I CD8<sup>+</sup> T cells (pentamer+); CTL *in vivo* response and *in vitro* TNF-α and IFN-γ secretion. However, the CD4<sup>+</sup> T cells response was more pronounced in *LAMP/gag* mice, able to recognized twice the number of GAG peptide pools and increasing the amplitude of IFN-γ and IL-4 SFC compared to *gag* mice. The immunization with *LAMP/gag* and *gag* increased

---

---

the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells and mRNA IDO expression in MLN, in accordance to the elevated levels of TGF- $\beta$ 1 in the intestinal washes. The immune response induced by the chimera DNA vaccine lasting 8 months after neonatal immunization. The association of the CpG oligodeoxynucleotide adjuvant to the DNA vaccines downregulated the CD4<sup>+</sup> T cells response and the IgG2a antibodies production, but did not altered the CD8<sup>+</sup> T cells response and IgG1 antibodies synthesis. The immunization with either *LAMP/gag* or *gag* vaccine was immunogenic when initiated in the neonatal period of BALB/c mice and capable to induce regulatory mechanisms. The data showed that only the *LAMP/gag* chimera DNA vaccine was able of inducing cellular and humoral immune responses and immunological memory, due to adequate CD4<sup>+</sup> T cells activation, suggesting an interesting vaccine strategy in neonatal period.

Key words: Immunology; DNA vaccines; HIV; Neonatology.

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAV - vírus adeno-associado  
AEC - 3-Amino-9-ethylcarbazole  
AIDS - síndrome da imunodeficiência adquirida  
APCs - células apresentadoras de antígenos  
BAL – lavado broncoalveolar  
CBA - *Cytometric Bead Array*  
CCR5 – receptor de quimiocina (motivo C-C) 5  
cDNA – DNA complementar  
células M – células *microfold*  
CFSE - carboxyfluorescein succinimidyl ester  
CMV – citomegalovírus  
CpG – dinucleotídeo citosina-guanina ligado por ponte de fósforo  
CTL – linfócito T citotóxico  
CXCR4 – receptor de quimiocina (motivo CXC) 4  
DCIR – imunoreceptor de células dendrítica  
DCs - células dendríticas  
DC-SIGN - *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*  
di – dias de idade  
DNA - ácido desoxirribonucléico  
DR5 - TRAIL *death receptor 5*  
ELISA – ensaio imunoenzimático  
ELISPOT - *enzyme-linked immunospot*  
GAG – proteína GAG do HIV-1  
GALT – tecido linfóide associado ao intestino  
GM – gânglios mesentéricos  
GM-CSF - fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos  
HIV - vírus da imunodeficiência humana  
ID – intradérmica  
IDO - enzima indolamina 2,3 dioxigenase  
IFN – interferon  
Ig – imunoglobulina

---

---

IL – interleucina  
IN – intranasal  
IP - intraperitoneal  
ITR – regiões terminais invertidas  
LAMP - proteína associada à membrana lisossomal murina  
LBA - meio Luria Bertani contendo ampicilina  
LFA-1 – Antígeno-1 de Função Associada de Leucócitos  
LPS – lipopolissacarídeos  
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade  
MIIC - compartimentos vesiculares especializados  
mRNA – RNA mensageiro  
ODN - oligodeoxinucleotídeos  
PAMPs - padrões moleculares associados à patógenos  
PBMC - células mononucleares de sangue periférico humano  
PBS – tampão fosfato-salino  
pDC – células dendríticas plasmocitóides  
PD-L1 - *programmed death ligand-1*  
pITR – plasmídeo contendo regiões terminais invertidas do vírus adeno-associado  
PRRs - receptores de reconhecimento padrão  
PVDF – fluoreto de polivinilideno  
RE - retículo endoplasmático  
RNA - ácido ribonucléico  
SFB - soro fetal bovino  
SFC – células formadoras de *spot*  
SIV - vírus da imunodeficiência símia  
SPF - livre de patógenos específicos  
STAT – fator de transcrição (*signal transduction-activated transcription*)  
TACI - *transmembrane activator and calcium modulator and cytophilin ligand interactor*  
TAP - transportadores associados ao processamento do antígeno  
TBK1 - proteína quinase ligadora de TANK 1  
TCB - tampão carbonato-bicarbonato  
TGF-β1 - Fator transformador de crescimento beta-1  
TLR - receptor *Toll-like*

---

---

TLR-9 - receptor *Toll-like 9*

TMB - tetrametil benzidina

TNF – fator de necrose tumoral

TRAIL - *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

Treg – células T reguladoras

UNAIDS - *United Nations Programme on HIV/AIDS*

---

---

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1 Epidemiologia, características biológicas e moleculares do HIV-1.....	19
1.2 Vacinas de DNA .....	23
1.3 Adjuvantes vacinais: oligodeoxinucleotídeo CpG .....	27
1.4 Imunidade neonatal.....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
2.1 Objetivos específicos.....	34
<b>3 MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 Animais.....	36
3.2 Plasmídeos .....	36
3.3 Obtenção e purificação dos plasmídeos.....	36
3.4 Expressão das proteínas GAG e LAMP/GAG.....	37
3.5 Protocolo de imunização neonatal .....	38
3.6 Protocolo de imunização de camundongos adultos .....	38
3.7 Protocolo de lavagem intestinal.....	39
3.8 Protocolo de lavagem broncoalveolar.....	40
3.9 Dosagem de TGF- $\beta$ 1 por ELISA .....	40
3.10 Dosagem de IFN- $\alpha$ por ELISA.....	40
3.11 Detecção de anticorpos anti-HIV e dosagem de imunoglobulinas (Ig).....	41
3.12 Obtenção de células do baço e GM .....	42
3.13 Cultura de células para obtenção de sobrenadante.....	42
3.14 Frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$ e IL-4 (ELISPOT).....	42
3.15 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo (CBA) .....	44
3.16 Quantificação de células T CD4+CD25+FoxP3+.....	44
3.17 Quantificação de células T CD8+ antígeno-específicas .....	44
3.18 Análise in vivo de células citotóxicas (CTL).....	45
3.19 Co-cultura de linfócitos anti-GAG e células T CD4+CD25+FoxP3+.....	46
3.20 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (Real-time PCR) do gene IDO.....	46
3.21 Análise estatística.....	47
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
4.1 Identificação dos genes inseridos nos plasmídeos.....	49
4.2 Expressão das proteínas GAG e LAMP/GAG após transfecção das células 293 .....	50
4.3 Imunogenicidade das vacinas de DNA na mucosa gastrintestinal de camundongos neonatos .....	52
4.4 Imunogenicidade das vacinas de DNA nas mucosas gastrintestinal e brônquica de camundongos neonatos e adultos .....	56
4.5 Determinação de TGF- $\beta$ 1 no lavado gastrintestinal dos camundongos imunizados com as vacinas gênicas gag e LAMP/gag.....	58
4.6 Determinação de anticorpos IgG anti-p24 do HIV-1 no soro de camundongos imunizados durante fase neonatal e adulta com as vacinas gênicas por via IN.....	60

---

---

4.7	Imunogenicidade das vacinas de DNA na resposta humoral sistêmica de neonatos..	62
4.8	Imunogenicidade das vacinas de DNA quanto à frequência de células secretoras de IFN- $\gamma$ e IL-4 anti-GAG em neonatos.....	65
4.9	Produção de citocinas a peptídeos de classe I e II da proteína GAG.....	69
4.10	Avaliação da resposta T CD8+ anti-GAG dos GM e baço em neonatos imunizados com as vacinas gag e LAMP/gag .....	71
4.11	Geração de células T CD4+CD25+FoxP3+ .....	73
4.12	Resposta imune de longa duração após imunização neonatal com as vacinas de DNA .....	75
4.13	Determinação de citocinas no lavado gastrintestinal e dos níveis séricos de anticorpos de camundongos imunizados por via IN/ID com as vacinas gênicas associadas ao adjuvante ODN CpG .....	77
4.14	Avaliação da frequência de células secretoras de IFN- $\gamma$ e IL-4 anti-GAG em neonatos imunizados com as vacinas de DNA associadas ao ODN CpG A.....	81
4.15	Perfil de produção de citocinas a peptídeos de classe I e II da proteína GAG de camundongos imunizados com as vacinas de DNA pelo ODN CpG A.....	83
4.16	Expressão relativa do gene IDO pelas células dos GM de animais imunizados com as vacinas gênicas associadas ao ODN CpG A .....	85
5	DISCUSSÃO .....	88
6	CONCLUSÕES.....	97
	REFERÊNCIAS .....	99
	ANEXOS .....	112
	Anexo A – Sequência consenso dos peptídeos (15 aa) da proteína GAG .....	112
	do subtipo B do HIV-1 .....	112
	Anexo B – Sequência da proteína GAG do subtipo B do HIV-1 e pools de peptídeos da proteína GAG.....	115

---

# *Introdução*

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Epidemiologia, características biológicas e moleculares do HIV-1

Há mais de vinte e seis anos foram descritos os primeiros casos de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e, posteriormente, o vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi identificado e denominado como agente causador desta síndrome. Desde então, a AIDS se tornou uma pandemia que hoje atinge 33 milhões de pessoas (United Nations Programme on HIV/AIDS - UNAIDS, 2008). Estima-se que a cada dia mais de 7397 pessoas se infectam com o vírus HIV e mais de 5479 morrem de causas relacionadas à AIDS, principalmente devido à falta de acesso aos serviços de prevenção e tratamento (UNAIDS, 2008).

A AIDS é a doença infecciosa que mais desafia a saúde pública e está associada a mais de 25 milhões de mortes em adultos (homens e mulheres), acarretando no aumento de crianças órfãs e na queda do desenvolvimento econômico em alguns países (UNAIDS, 2008). Em 2008, mais de dois milhões de mortes foram devido à AIDS, sendo que 76% ocorreram no Sub-Sahara Africano, a região mais afetada no mundo. É importante destacar a feminização e infantilização da doença, sendo que o contingente de mulheres e crianças infectadas pelo HIV aumentou vertiginosamente durante a última década. Segundo a Organização Mundial da Saúde, um número crescente de indivíduos com idade inferior a 15 anos vive com HIV/AIDS (UNAIDS, 2008). No Brasil, estima-se um número superior a 620.000 infectados pelo HIV (Ministério da Saúde, 2008). Desde 1980 até junho de 2008 confirmou-se 506.499 casos de AIDS notificados ao Ministério da Saúde, sendo que 8.179 são indivíduos menores de 12 anos de idade.

O HIV é um retrovírus membro da família *Retroviridae*, caracterizado por possuir duas fitas simples de ácido ribonucléico (RNA) que são transcritas em ácido desoxirribonucléico (DNA) de fita dupla e que, então, é integrado ao genoma celular (Wyatt *et al.*, 1998; Turners *et al.*, 1999). O HIV que pode ser subdividido em HIV-1 e HIV-2, que diferem quanto à estrutura genômica e distribuição geográfica. Ambos causam síndromes semelhantes, embora o HIV-2 possua menor potencial patogênico (Wyatt *et al.*, 1998). Variantes genômicas (subtipos) do HIV-1 e do HIV-2, têm sido descritos em pacientes infectados procedentes de diferentes regiões geográficas (Janssens *et al.*, 1994; Korber *et al.*, 1995). Filogeneticamente o HIV-1 é classificado em três grupos: M (*major*), O (*outlier*), N (não M/não O) com

---

variabilidade genética de até 30%. Os grupos O e N são mais raros e restritos a regiões menores, o grupo M é o responsável pela epidemia no mundo. No grupo M identificam-se os subtipos A, B, C, D, E, F, G, H, I e J e no grupo O apenas um subtipo. Em relação ao HIV-2 descrevem-se os subtipos A, B, C, D, e E.

O HIV, membro da subfamília dos Lentivirinae, possui morfologia singular do vírion com *core* cilíndrico e cônico e tem como característica promover infecções lentas e latentes (Turners *et al.*, 1999). O genoma é constituído por três genes estruturais (*env*, *gag*, *pol*), três acessórios (*nef*, *vpr* e *vif*) e três adicionais (*rev*, *tat* e *vpu*). Dentre os genes estruturais, o gene *env* codifica a estrutura do HIV-1 composta de glicoproteínas de superfície, a gp 120 e gp 41, que estão agrupadas em um complexo trimérico e são responsáveis pela entrada do vírus na célula hospedeira. O gene *gag* codifica as proteínas do *core*, constituída pela matriz (p24), capsídeo (p17) e nucleocapsídeo (p7), responsáveis pela estruturação do vírion imaturo contendo os outros componentes virais e ancoramento na membrana celular. O gene *pol* codifica três enzimas: a transcriptase reversa, que transcreve o RNA viral em DNA, a integrase, responsável por integrar o DNA pró-viral ao genoma das células hospedeira e a protease, responsável pela clivagem e maturação das sequências peptídicas virais. Os genes acessórios e adicionais codificam proteínas como a NEF, responsável por aumentar a replicação viral e diminuir a expressão de CD4 e moléculas de classe I; a REV, que transporta o RNA do núcleo para o citoplasma; a TAT que inibe a terminação prematura da transcrição gênica; VIF que é o fator de infectividade viral; VPR direciona os complexos de integração ao núcleo e induz a diferenciação celular e a VPU que degrada o CD4 e promove a liberação de novas partículas virais (Wyatt *et al.*, 1998; Turners *et al.*, 1999; HIV Sequence Compendium, 2008).

O HIV infecta as células que expressam concomitantemente a molécula CD4<sup>+</sup> (Dalglish *et al.*, 1984) e os receptores de quimiocinas, CCR5 (Alkhatib *et al.*, 1996) ou CXCR4 (Feng *et al.*, 1996), como por exemplo, os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, macrófagos, células dendríticas (DCs), entre outras células (Garzino-Demo *et al.*, 2003). A expressão destes co-receptores indica o tropismo apresentado pelo HIV, o que permite caracterizá-lo como M-trópico ou T-trópico (Berger *et al.*, 1999). O vírus tem a característica de replicar-se melhor em células ativadas e, assim, os ciclos repetitivos de infecção e ativação celular levam à destruição de células, principalmente de células T CD4<sup>+</sup>, resultando na imunossupressão característica da AIDS (Rowland-Jones, 2003). Sem a intervenção terapêutica, esta depleção de células T CD4<sup>+</sup> acarreta em imunodepressão grave e o aparecimento de sintomas

---

constitucionais, doença neurológica e permissividade a microrganismos oportunistas e/ou neoplasias (Rowland-Jones, 2003). A infecção pelo HIV-1 em adultos pode reduzir a viremia plasmática durante a infecção aguda, concomitante ao aparecimento de uma vigorosa resposta citotóxica específica. Entretanto, na infecção pediátrica derivada da transmissão vertical há evidências de rápida progressão da doença em consequência da imaturidade imunológica dos neonatos (Goulder *et al.*, 2001).

A grande maioria das infecções pelo HIV ocorre após exposição viral das mucosas como a vaginal, retal, peniana e oral, mesmo estas estando íntegras (Milush *et al.*, 2004). Estes sítios de mucosas são considerados reservatórios do vírus. Quando a mucosa está íntegra, as possíveis rotas de entrada do HIV-1 na lâmina própria da mucosa são mediadas pelas DCs, células epiteliais e células M (microfold) (Neutra *et al.*, 1996). As células M são especializadas na captura de antígenos e patógenos presentes no lúmen intestinal. Dentre os diversos mecanismos de entrada do HIV, algumas moléculas estão relacionadas com a susceptibilidade para entrada do vírus, como a lecitina tipo C DC-SIGN, a Syndecan-3 e a DCIR. Estas moléculas são expressas em DCs que capturam o HIV-1 em decorrência da sua alta afinidade com as moléculas de gp120 presentes no envelope do vírus (Geijtenbeek *et al.*, 2003; de Witte *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2008), e ao migrarem para órgãos linfóides secundários contribuem para disseminação viral (Kozlowski *et al.*, 2003; de Witte *et al.*, 2007). Este mecanismo de entrada do vírus pode ser importante na mucosa genital, pois este não possui células M. Há outros componentes do sistema imune que facilitam a disseminação do vírus, foi demonstrado que a gp120 do envelope do HIV-1 pode se ligar a moléculas de integrina  $\alpha 4\beta 7$ , que é expressa nos linfócitos e medeia a migração destes para o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) (Arthos *et al.*, 2008). O engajamento da integrina com o HIV induz a ativação de LFA-1, envolvida na sinapse virológica, facilitando assim a disseminação do vírus HIV-1 (Arthos *et al.*, 2008).

Devido à proximidade da mucosa com o ambiente externo e a constante exposição a uma variedade de antígenos, tanto patógenos como alimentares, um grande número de células T CD4<sup>+</sup> da mucosa gastrintestinal estão ativadas e diferenciadas em células de memória que expressam o receptor de quimiocina CCR5 (Mehandru *et al.*, 2004). Este fato favorece que, durante a fase aguda da infecção pelo HIV ou vírus da imunodeficiência símia (SIV), além da disseminação do HIV ocorra depleção maciça dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória nas mucosas, contribuindo para o desequilíbrio imunológico (Mehandru *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005; Grossman *et al.*, 2006). Da mesma forma, na infecção de macacos Rhesus adultos e

---

neonatos com SIV, independente da via de infecção, foi mostrado um acúmulo precoce de linfócitos infectados pelo vírus, com alta carga viral na mucosa intestinal e depleção maciça dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória na infecção primária (Veazey *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2007). Além disto, a infecção de macacos pelo SIV por via oral mostrou rápida disseminação do vírus, podendo ser detectado em diferentes tecidos um dia após contaminação (Milush *et al.*, 2004).

Essa replicação viral intensa durante a infecção primária ou aguda do HIV acarreta em um importante aumento da carga viral seguido por um declínio relativo na viremia, devido a uma forte resposta de células T citotóxicas específicas para o HIV-1. Com a resolução da fase aguda, ocorre a estabilização da viremia em níveis variáveis (*set points*), definidos pela velocidade da replicação e clareamento viral, iniciando deste modo a fase assintomática da síndrome (Davey *et al.*, 1999).

A infecção crônica pelo HIV é caracterizada por uma persistente ativação imunológica e pelo escape do vírus da resposta imunológica. A ativação crônica das células imunocompetentes pode levar a apoptose dessas células e evolução para a depressão do sistema imune, sendo que este processo diminui rapidamente com o início da terapia antiretroviral. Quando não ocorre o uso de antiretrovirais, pode ter início a fase sintomática da doença, manifestando-se os sintomas da AIDS.

A infecção aguda em crianças pelo HIV caracteriza-se por elevada carga viral, que pode permanecer acima de 100.000 cópias/ mL no primeiro ano de idade, e diminui vagarosamente em 2 a 3 anos nas crianças sobreviventes (Richardson *et al.*, 2003). O set-point viral é mais elevado nas crianças do que em adultos, consistente com progressão mais rápida da doença. Na ausência de uma terapia eficaz, aproximadamente 10-15% dos infectados morrem no primeiro ano de vida (Pliner *et al.*, 1998). Há dois tipos de perfis de progressão clínica na infecção vertical, algumas crianças progredem rapidamente desenvolvendo um rápido curso da doença nos primeiros meses de idade (Blanche *et al.*, 1990), embora a maioria apresente um curso crônico com vários padrões da doença (Mayaux *et al.*, 1996). Os progressores lentos podem desenvolver sinais clínicos e alterações imunológicas após 2-3 anos de idade, e incluem os que sobrevivem mais do que 8 anos após a transmissão vertical. Alterações estruturais e funcionais nos genes *nef* do HIV têm sido correlacionado com crianças não progressoras por longo prazo (Geffin *et al.*, 2000), bem como com defeito no alelo de CCR5 (CCR5delta32) (Rousseau *et al.*, 1997).

---

Estudos vacinais possuem grande importância para os recém-nascidos até os pré-adolescentes que ainda não são sexualmente ativos, uma vez que há difícil acesso à terapia antiretroviral nos países em desenvolvimento com conseqüente aumento do número de crianças e adolescentes infectados pelo HIV-1. Além disso, o fato de que a principal via de transmissão do vírus HIV ser pelas mucosas, um sítio de replicação e reservatório viral e de intensa depleção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, ressalta a importância do desenvolvimento de estudos de vacinas para o HIV que induzam resposta imune de mucosa e sistêmica em particular de resposta celular T CD8<sup>+</sup> (CTL). Com o propósito de controlar a replicação viral local e prevenir assim, a disseminação sistêmica do vírus, e que sejam capazes de estabelecer resposta protetora de longa duração.

## 1.2 Vacinas de DNA

No que diz respeito ao desenvolvimento de vacinas contra o HIV-1 há dois enfoques principais: vacinas profiláticas a serem administradas na população não infectada pelo HIV-1 e vacinas terapêuticas a serem usadas na imunoterapia em indivíduos infectados pelo HIV-1 para a melhora da resposta imune ao vírus, com conseqüente regressão e/ou estabilização da doença (Estcourt *et al.*, 2004).

Neste contexto, a utilização de vacinas de DNA em mucosas é uma estratégia de imunização que poderia evitar o risco das vacinas que utilizam microrganismos vivos ou atenuados. A construção da vacina deve ser capaz de estabelecer resposta humoral e celular, principalmente com indução de resposta Th1, crucial para o desenvolvimento de uma resposta imune celular eficiente e persistente com geração de resposta CTL de memória e produção de anticorpos (Brazolot Millan *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2002; Vatakis *et al.*, 2005; Arrode *et al.*, 2007).

A imunização com vacina de DNA contendo genes do vírus influenza (Bot *et al.*, 1998; Ulmer *et al.*, 1998), vírus do sarampo e vírus Sendai (Martinez *et al.*, 1997), vírus da leucemia murina (Sarzotti *et al.*, 1996) e vírus da hepatite C (Youn *et al.*, 2003) mostrou-se eficaz em estabelecer a resposta imune antiviral em alguns modelos murinos. Em humanos, as vacinas de DNA não são tão eficazes, quando administradas como *naked DNA* pelas vias intramuscular ou intradérmica, entretanto têm mostrado resultados promissores quando combinadas com outras formas de vacina, como os vetores virais (Lu *et al.*, 2008).

---

As vacinas de DNA são vetores de expressão eucarióticos (plasmídeo) que utilizam sinais de transcrição e as organelas das células eucarióticas transfectadas para expressão *in situ* do antígeno (Estcourt *et al.*, 2004). Estas vacinas codificam os genes de uma porção antigênica de um vírus, normalmente sob controle de um promotor viral (Hobson *et al.*, 2003; Estcourt *et al.*, 2004). Alguns plasmídeos possuem motivos CpG não metilados que podem atuar como adjuvantes (Tudor *et al.*, 2005). As vacinas de DNA são caracterizadas pela baixa expressão de antígeno, apesar de prolongada, capazes de estimular a resposta de células T e B antígeno específica (Mor, 1998; Howarth *et al.*, 2004). A ação adjuvante e a imunogenicidade de vacinas de DNA tem sido descrita ser dependente da proteína quinase TANK 1 (TBK1) (Ishii *et al.*, 2008). A sinalização via TBK1 pela vacina de DNA é essencial para resposta de IFN tipo I e necessária para indução de células T e B antígeno-específicas.

Na imunização com as vacinas gênicas ocorre a transfecção das células e tradução protéica, seguida da sua secreção ou processamento intracelular antigênico. A tradução da proteína é realizada utilizando as organelas da própria célula que foi transfectada. A proteína é degradada no citoplasma por proteases no proteossoma e os peptídeos gerados são transportados através do retículo endoplasmático (RE) pelos transportadores associados ao processamento do antígeno (TAP). Em seguida, estes peptídeos são associados, principalmente, as moléculas de classe I do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC – *major histocompatibility complex*) e transportados à superfície celular através do complexo de Golgi para apresentação às células T CD8<sup>+</sup> ou, em menor grau, apresentados para as células T CD4<sup>+</sup> associadas à moléculas de classe II por apresentação cruzada (Howarth *et al.*, 2004; Stevenson, 2004). As proteínas derivadas da vacina gênica podem também ser secretadas, endocitadas e posteriormente degradadas no endossoma por proteases. Em paralelo, as moléculas de classe II do MHC que são sintetizadas no RE estão ligadas à cadeia invariável que bloqueia a união com proteínas endógenas presentes no lúmen do RE. As moléculas de classe II do MHC são direcionadas para os endossomas acidificados contendo os peptídeos antigênicos derivados da clivagem da proteína exógena. Neste local, a cadeia invariável é clivada, ocorre a ligação dos peptídeos antigênicos às moléculas de classe II do MHC e, então, estas vesículas são direcionadas para a superfície celular e os complexos antígeno:molécula de classe II do MHC são apresentados para as células T CD4<sup>+</sup>.

A transfecção com o plasmídeo pode ocorrer em diferentes tipos celulares: 1) células somáticas que produzem e expressam os antígenos codificados pelo gene presente no plasmídeo, mas como não expressam moléculas coestimulatórias, atuam gerando antígenos

---

que serão endocitados por células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais; 2) DCs imaturas podem ser transfectadas diretamente e, após maturação, podem ativar linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B; 3) DCs imaturas podem adquirir o antígeno indiretamente após a fagocitose de células somáticas transfectadas em apoptose e apresentar o antígeno para linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>; 4) DCs imaturas e linfócitos B, que após endocitose de antígenos solúveis secretados podem apresentá-los aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Além disto, quando as vacinas são incorporadas pelas APC, os antígenos também podem ser apresentados de modo cruzado, ou seja, apresentação de antígenos endógenos no contexto de moléculas de classe II do MHC para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Stevenson *et al.*, 2004; Giri *et al.*, 2004; Garmory *et al.*, 2005).

A imunização com plasmídeos que codificam epítomos de classe I do MHC geralmente induz baixa resposta CTL e somente as construções com epítomos classe II do MHC podem melhorar a amplitude da resposta CTL. Os linfócitos Th são cruciais para o desenvolvimento de uma resposta imune celular eficiente e persistente com geração de resposta CTL de memória e produção de anticorpos (Vatakis *et al.*, 2005). Evidências em camundongos adultos imunizados com vacinas que expressam epítomos de classe I da gp120 do HIV e epítomos de classe II da ovalbumina mostram que quando não há direcionamento para as moléculas de classe II do MHC ou por baixa afinidade aos epítomos de classe II resulta em uma deficiente resposta CTL à gp120 (Vatakis *et al.*, 2005). Além do mais, os camundongos imunizados com plasmídeo que codifica epítomos de baixa afinidade de classe II desenvolvem menor número de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> secretoras de IFN- $\gamma$ . Por isso, as vacinas gênicas que possibilitam o direcionamento de antígenos às moléculas de classe II do MHC são vitais para a ativação de linfócitos Th, com conseqüente expansão clonal de células B antígeno específicas, mudança de classe de anticorpos, geração de células T de memória, aumento da expressão de sinais coestimulatórios e produção de citocinas.

Em camundongos, o uso da vacina de DNA gagp37 do HIV-1 por via intranasal mostrou ser imunogênica, com detecção de resposta imune celular e humoral anti-GAG sistêmica e humoral nas mucosas nasal e vaginal (Hinkula *et al.*, 2008). A combinação das vias intranasal e parenteral na imunização de macacos Rhesus com vacina de DNA seguido da proteína GAG foi capaz de induzir resposta imune sistêmica e na mucosa vaginal, além de resposta anti-HIV de memória (Vajdy *et al.*, 2004).

Várias construções de vacinas de DNA foram delineadas para potencializar a imunogenicidade, incluindo as que possibilitam a apresentação do antígeno endógeno pelas

---

moléculas de classe II do MHC. Vacinas quiméricas de DNA, constituídas pela proteína associada à membrana lisossomal 1 (LAMP-1 - *lysosomal associated membrane protein 1*), que direciona o tráfego do antígeno para os compartimentos de classe II do MHC conjugada a genes virais, tem sido formulada para a dengue (Lu *et al.*, 2003), o vírus do papiloma humano (Wu *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000) e para o HIV-1 (Rowell *et al.*, 1995; Ruff *et al.*, 1997, Marques *et al.*, 2003).

As moléculas LAMP são proteínas transmembrânicas tipo I que contém 24 domínios de aminoácidos transmembrânicos e 11 domínios de aminoácidos citoplasmáticos com seqüências carboxiterminais YQTI (Guarnieri *et al.*, 1993). No contexto do domínio citoplasmático, são suficientes e necessárias para levar algumas proteínas recombinantes do compartimento vesicular aos lisossomos. A proteína LAMP entra em compartimentos vesiculares especializados denominados MIIC, sítios associados com a formação do complexo peptídeo:molécula de classe II do MHC. Em estudos de microscopia eletrônica foi observada a co-localização da LAMP com as moléculas de classe II do MHC (Ruff *et al.*, 1997). O compartimento endocítico MIIC está envolvido com o transporte do peptídeo antigênico associado às moléculas de classe II do MHC para a superfície celular das APC (Kleijmeer *et al.*, 1995; Ruff *et al.*, 1997). O direcionamento do antígeno sintetizado endogenamente pelo tráfego da LAMP às moléculas de classe II do MHC leva ao aumento da resposta humoral e celular em camundongos imunizados com a vacina quimérica de DNA que codifica a gp160 do HIV e a LAMP (Ruff *et al.*, 1997).

Estudos de infecção por HIV têm relatado que a resposta de células T CD4+ e CD8+ aos peptídeos da GAG do HIV está associada com proteção (Betts *et al.*, 2005; Price *et al.*, 2009) e o controle da viremia durante a infecção (Rolland *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008; Serwanga *et al.*, 2009). Outros fatores que reforçam a escolha da proteína GAG na composição da vacina é por se tratar de um gene relativamente conservado entre as diversas classes e subclasses do HIV-1, permitindo resposta anti-GAG mesmo entre pacientes infectados por diferentes subclasses de HIV-1 (Norris *et al.*, 2004).

Desta forma, o Dr. Ernerto Marques do Departamento de Farmacologia e Ciências Moleculares, da Escola de Medicina da Universidade Johns Hopkins, construiu uma vacina quimérica de DNA que contém a fração que codifica a proteína de 55 kDa do gene *gag* do HIV-1 (GAG) associada ao gene que codifica a proteína LAMP-1. Esta vacina quimérica *LAMP/gag* é após transfecção é fortemente expressa em células de símios, humanas e murinas e apresenta um direcionamento antigênico para o compartimento MIIC (Marques *et al.*, 2003).

---

A imunização de camundongos BALB/c adultos com a quimera *LAMP/gag* mostrou ser mais eficiente na indução da resposta humoral e celular específica quando comparada com a resposta para vacina de DNA que codifica a proteína GAG, capaz de aumentar 10 vezes a resposta das células T CD4<sup>+</sup>, 4 a 5 vezes a resposta das células T CD8<sup>+</sup> e de elevar 50 a 100 vezes os títulos de anticorpos (Marques *et al.*, 2003), capaz de gerar resposta de memória de células B e T de longa duração (Arruda *et al.*, 2004). A vacina quimérica promove aumento na diversidade de epítopos que são reconhecidos pelas células T de camundongos imunizados e também o número de epítopos reconhecidos por células B (Arruda *et al.*, 2006). Chikhlikar e colaboradores (2006) imunizaram macacos Rhesus com a vacina *LAMP/gag* (contendo o gene *LAMP* humano) e detectaram intensa resposta de células T e B aos peptídeos da GAG. Até o momento, não foi realizado um estudo relacionado com a imunogenicidade da vacina *LAMP/gag* na mucosa de camundongos e para averiguar se a vacinação em mucosa de neonatos é capaz de induzir resposta de longa duração.

Neste sentido, há grande interesse em estudar a imunogenicidade desta vacina de DNA em fase precoce de vida, período caracterizado por imaturidade imunológica e averiguar sua capacidade de promover resposta de longa duração. Assim como em adultos, a mucosa do trato gastrointestinal de macacos Rhesus neonatos infectados com SIV tem depleção maciça dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória na infecção primária (Wang *et al.*, 2007).

### **1.3 Adjuvantes vacinais: oligodeoxinucleotídeo CpG**

Existem diversas maneiras para potencializar a resposta imune gerada pelas vacinas de DNA às proteínas virais como a inclusão de adjuvantes genéticos como citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias (Sasaki *et al.*, 2003). A imunização de camundongos com a vacina de DNA contendo o gene de interleucinas (GM-CSF, TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ ) associada às porções genéticas do HIV-1 pode aumentar a produção de anticorpos específicos e a resposta Th e citotóxica (Kim *et al.*, 2000). Desta maneira, a conjugação de peptídeos virais a genes que estimulem a resposta imune ou direcionem a resposta celular para uma resposta adequada e eficiente tem aperfeiçoado a imunogenicidade das vacinas genéticas. O uso de adjuvantes contendo motivos CpG tem sido uma opção para estimular resposta Th1 em diferentes modelos experimentais.

Os oligodeoxinucleotídeos CpG (ODN-CpG) são candidatos em potencial para serem utilizados como adjuvantes de vacinas, porque são capazes de estimular

---

macrófagos/monócitos, células dendríticas, linfócitos B, células NK e, conseqüentemente, induzir uma vigorosa resposta do tipo Th1 em camundongos (Dumais *et al.*, 2002; Krieg, 2002). O CpG é um dinucleotídeo citosina-guanina (CG) ligado por ponte de fósforo que está presente no DNA de bactérias, vírus e retrovírus na forma não metilada e em proporção vinte vezes maior que nos vertebrados (Krieg, 2002). O DNA que contém motivos CpG não metilados é um potente indutor de produção de citocinas anti-virais do tipo Th1. Esses motivos CpG constituem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), que são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como por exemplo os receptores Toll-like (TLR) (Guzylack-Piriou *et al.*, 2004; Tudor *et al.*, 2005). O receptor de oligonucleotídeos contendo motivos CpG é Toll-like 9 (TLR-9), um receptor intracelular, expresso em linfócitos B e DCs plasmocitóides (pDC) em humanos e nos camundongos nas células mielóides, linfócitos B e pDCs (Hartmann *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2002).

Há diversos padrões e cinéticas de ativação imune dependentes das diferentes seqüências, tipos de ligações e bases que flanqueiam o dinucleotídeo CpG. Entre os vários CpG descritos, o tipo A possui modificações fosforotioato nas extremidades 5' e 3' e a porção central é fosfodiéster, contendo seqüências poli-G nas extremidades e uma seqüência central palíndromo que contém dinucleotídeos CG (Krieg, 2002; Guzylack-Piriou *et al.*, 2004). A sinalização via TLR-9 pelo CpG induz as DCs, macrófagos e as células NK a produzir e secretar IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e interleucina (IL) 12 (Hartmann *et al.*, 2005). O reconhecimento do CpG pelas pDCs induz ativação e maturação, aumento da expressão de moléculas de classe II do MHC e de CD80 e CD86 e da produção de IFN do tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) (Dumais *et al.*, 2002; Guzylack-Piriou *et al.*, 2004). A produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  auxilia no desenvolvimento da imunidade mediada por células, incluindo linfócitos T citotóxicos.

Após imunização intranasal em camundongos adultos, ODN CpG resulta em forte resposta imune de mucosa e sistêmica quando administrada com antígeno de superfície de hepatite B (McCluskie *et al.*, 1998), vírus influenza (Moldoveanu *et al.*, 1998) e glicoproteínas recombinantes do envelope do vírus herpes simplex (Gallichan *et al.*, 2001).

A imunização de camundongos com a vacina de DNA que codifica os genes *env* e *gag* do HIV-1 subtipo C associado ao CpG aumenta a resposta humoral e celular e induz longa duração da produção de IFN- $\gamma$  (Aggarwal *et al.*, 2005). Estudo realizado com macacos imunizados com vacinas contendo plasmídeos que expressam seqüências do HIV-1 do tipo B (pHIS-HIV-B) e motivos CpG seguido de reforço com vacina recombinante (rFPV) que

---

expressam o gene *gag e pol* do HIV-1 tipo B mostra um aumento da síntese de IFN- $\gamma$  pelas células T específicas, aumento da linfoproliferação de células T CD4+ e aumento da síntese de anticorpos (Dale *et al.*, 2004).

A inclusão de motivos CpG A ou B em vetores da vacina de DNA, como no plasmídeo VR1020, é capaz de incitar, após estímulo *in vitro*, as células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) a produzirem IL-6 e aumentarem a expressão de CD83 e CD40 quando comparado com o plasmídeo não modificado (Coban *et al.*, 2005). A imunização de camundongos adultos o plasmídeo VR1020 que codifica o ODN-CpG A e o antígeno de superfície do *Plasmodium falciparum* Pfs25 induz níveis mais altos de anticorpos IgG2a específicos quando comparado com o grupo imunizado com plasmídeo sem a inserção de CpG ou com o CpG do tipo B; já em PBMC, o CpG B estimulou maior produção de IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  (Coban *et al.*, 2005).

Embora os TLR estejam envolvidos na resposta imune inata, os adjuvantes de TLR são capazes de afetar diretamente células T. Células T CD4+ ativadas expressam mRNA de TLR9, assim o CpG promove diretamente sobrevivência das células T e permite que as células T efetoras escapem da supressão mediada por células Treg (Gelman *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2007).

As células Treg expressam diversos TLR em concentrações maiores que as células T efetoras, o que pode fazer com que haja aumento ou diminuição da atividade supressora destas células, dependendo do tipo de estímulo e o TLR estimulado (Brito *et al.*, 2009). Estudos mostram o papel do agonistas de TLR no modelo experimental da doença inflamatória intestinal (Fukata *et al.*, 2008) e na produção de auto-anticorpos modelos de doenças auto-imunes murinos. Por outro lado, a estimulação de linfócitos B por ligantes de TLR apresentam papel protetor em modelos experimentais de encefalomielite e lupus eritematoso sistêmico através da indução de IL-10 (Fischer *et al.*, 2008)

#### **1.4 Imunidade neonatal**

A fase neonatal é caracterizada pela alta sensibilidade aos agentes infecciosos, em consequência da sua imaturidade imunológica, evidenciada por diferenças qualitativas e quantitativas em relação ao sistema imune do adulto (Brito *et al.*, 2009). A relativa imaturidade imunológica na fase neonatal, alta predisposição à tolerância encontrada nesta fase de vida e ausência de resposta de memória propicia um lento desenvolvimento e baixa

---

magnitude da resposta imunológica que torna os neonatos susceptíveis a várias infecções bacterianas e virais. Além disto, os anticorpos maternos podem interferir na resposta do neonato através da neutralização do antígeno vacinal devido à formação de imunocomplexos ou pela ação inibitória decorrente da interação do anticorpo no receptor Fc $\gamma$ RIIB expresso nas células B (Siegrist, 2003).

Há várias peculiaridades no período neonatal, como baixa reserva na medula óssea, aderência e quimiotaxia reduzidas, baixa atividade enzimática e menor quantidade de células que os adultos (Kovarik *et al.*, 1998; Adkins, 1999). Além destas características, principalmente em camundongos, células T neonatal, sob condições neutras, diferenciam para padrão Th2, com alta secreção de IL-4 e baixa secreção de IFN- $\gamma$  pelas células Th1 (Barrios *et al.*, 1996; Kovarik *et al.*, 1998; Adkins, 1999; Adkins *et al.*, 2004; Siegrist *et al.*, 2007), mas também devido a baixa secreção de IL-12 pelas APCs (Lee *et al.*, 1996). A presença de IL-4 durante a sensibilização, tanto em animais como humanos, inibe a expressão da cadeia IL-12 $\beta$ 2 em linfócitos T *naïve*, que então direciona para padrão de resposta Th2 e inibe o desenvolvimento de reposta Th1 (Kovarik *et al.*, 1998; Adkins, 2001).

Apesar do fato dos neonatos apresentam ausência de memória, grande parte dos linfócitos T e B *naïve* entram precocemente em ciclo celular, possibilitando que estas células respondam de modo eficiente a um grande número de patógenos no primeiro contato na fase neonatal (Adkins *et al.*, 2003). Em algumas situações, camundongos neonatos desenvolvem resposta primária do tipo Th1 equivalente a de um adulto, mas após restimulação antigênica, a resposta é direcionada para padrão Th2 (Bot *et al.*, 1997; Adkins *et al.*, 1998).

Linfócitos T CD4 + de camundongos neonatos, após a ativação, são capazes de produzir níveis elevados de IL-4 e IL-13, que são sintetizados por uma pequena subpopulação de células que não precisam entrar em ciclo celular (Rose *et al.*, 2007). Estas células mostram um estado relativamente hipometilado na região reguladora da expressão citocinas Th2, facilitando a expressão rápida e em alto nível dos genes *Il4* e *Il13*. Comparando com adultos, estes levam vários dias para fazer a transição para o padrão Th2, envolvendo diferentes processos, como a proliferação celular e extensa demetilação do DNA (Rose *et al.*, 2007). Além disso, após sensibilização, a IL-4 secretada pelas células Th2 induz aumento na expressão da cadeia  $\alpha$  do IL-13R nas células Th1 que, juntamente com a cadeia  $\alpha$  do IL-4R, induz as células entrarem em apoptose se houver reencontro com o antígeno em ambiente contendo IL-4 (Li *et al.*, 2004). Além do mais, as células T CD4 de neonatos são impedidas

---

de diferenciarem em células Th1 devido à diminuição dos níveis de STAT4 epigenética e regulação do promotor de IFN- $\gamma$  (Adkins B, 2007).

O desvio do padrão de resposta Th2 observado em neonatos pode influenciar no baixo potencial de resposta CTL. Entretanto, em circunstâncias seletivas, as células T CD8<sup>+</sup> de neonatos humanos e murinos parecem ser capazes de desenvolver função citotóxica madura. A resposta CTL pode ser gerada em paralelo ao desenvolvimento de células Th1, isto é, condições que favoreçam a resposta Th1 em neonatos potencializam a função CTL protetora (Adkins *et al.*, 1999). Os camundongos neonatos são capazes de desenvolver eficiente resposta Th1 antígeno específica, quando utilizado adjuvantes promotores de resposta Th1 como a IL-12 e ODN contendo motivos CpG com as vacinas de DNA (Adkins *et al.*, 2001). A imunização de camundongos de 3 dias de idade tratados apenas com CpG ODN torna-os protegidos contra infecção por *Listeria* com geração de resposta T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> antígeno específicos que confere proteção contra infecção subsequente (Ito *et al.*, 2005). Além disso, a vacina gênica contra o vírus da coriomeningite linfocítica em camundongos de 1 dia de idade pode induzir rápida maturação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> *naive* para células efetoras semelhantes às células de camundongos adultos (Zhang *et al.*, 2002). Da mesma forma, células de cordão umbilical humano são capazes de estabelecer resposta CTL quando transferidas em camundongos e desafiadas com células alogênicas irradiadas (Marcus *et al.*, 2002).

As APCs de neonatos são imaturas quanto à função e estão em número reduzido em relação aos adultos, mas atingem valores similares quando as áreas esplênicas tornam-se organizadas (Adkins *et al.*, 2004). As DCs imaturas, após a estimulação com lipopolissacarídeos (LPS), citocinas ou outros estímulos, aumentam a expressão de moléculas de classe II do MHC e de moléculas co-estimulatórias, tornam-se células capazes de capturar, processar e apresentar antígenos à células T *in vitro* e induzir resposta citotóxica específica mediada por linfócitos T *in vivo* (Dadaglio *et al.*, 2002). O estímulo de DCs de cordão humano com LPS mostrou diminuída habilidade na maturação e em ativar células T CD4<sup>+</sup> *naive* a secretarem IFN- $\gamma$ , sugerindo que as DCs são pré-programadas intrinsecamente contra a geração de resposta imune do tipo Th1 (Langrish *et al.*, 2002).

Nos neonatos, a falta de um microambiente anatômico apropriado para a interação entre as DCs e as células T e B, pode gerar diferenças fenotípicas e funcionais das células B, que refletem na baixa produção de anticorpos. A resposta humoral neonatal é mais tardia, com níveis mais baixos e de menor duração. A distribuição das subclasses de IgG difere da de

---

adultos com níveis mais baixos e de menor afinidade de anticorpos IgG2a (Adkins *et al.*, 2004; Pihlgren *et al.*, 2001).

Os linfócitos B imaturos, IgM<sup>+</sup> IgD<sup>low/-</sup> são majoritários no baço de camundongos neonatos (Marshall-Clarke *et al.*, 2000). A ausência de IgD de superfície altera a sinalização e ativação dos linfócitos B em resposta aos antígenos. As poucas células B maduras do neonato expressam baixos níveis de CD40 que, somado com a deficiente expressão de seu ligante CD40L nas células T, contribuem para a baixa produção de IgG, IgA e IgE (Adkins, 1999; Bot *et al.*, 2002). A expressão de moléculas *transmembrane activator and calcium modulator and cytophilin ligand interactor* (TACI) em linfócitos B de neonatos é bem reduzida quando comparada com adultos. Deste modo, os ligantes de TACI, APRIL ou BAFF, são incapazes de induzir secreção de IgA, IgG e IgM pelos linfócitos B de neonatos (Kanswall *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2001). Além disso, o componente C3 do complemento, que auxilia na apresentação de antígenos pelos linfócitos B, encontra-se em níveis diminuídos no soro, contribuindo na limitação da resposta humoral dos neonatos (Bot *et al.*, 2002).

A falta de resposta de memória na fase neonatal, somada à inabilidade na apresentação antigênica, menor qualidade funcional das células Th, baixa resposta T citotóxica (Adkins *et al.*, 2004) e diminuída produção de anticorpos salientam a necessidade de utilização de vacinas que possibilitem adequada apresentação de antígeno via classe II do MHC para as células Th e de adjuvantes estimuladores de resposta inata para favorecer o desenvolvimento da resposta adaptativa.

A compreensão dos mecanismos efetores envolvidos na vacinação neonatal com a vacina *LAMP/gag*, aspecto ainda pouco conhecido, oferece a oportunidade de melhorar a magnitude da resposta do neonato e na geração de resposta imune de longa duração até a fase adulta.

***Objetivos***

---

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar a imunogenicidade da vacina quimérica *LAMP/gag* que codifica a proteína de 55 kDa do gene *gag* do HIV-1 e a proteína associada a membrana lisossomal (LAMP) e da vacina *gag* em sítios da mucosa intestinal e no baço em camundongos BALB/c no período neonatal.

### 2.1 Objetivos específicos

- Estabelecer protocolo de imunização intranasal com as vacinas gênicas (*LAMP/gag* e *gag*) em camundongos neonatos pela indução de anticorpos IgA e IgG contra o lisado de HIV nos lavados intestinal e broncoalveolar e comparar com a resposta humoral induzida pelas vacinas em camundongos adultos; associar o protocolo de imunização intranasal com intradérmica para avaliar o potencial de indução de resposta humoral sérica;
- Avaliar a imunogenicidade das vacinas *LAMP/gag* e *gag* nos gânglios mesentéricos (GM) e no baço de neonatos imunizados por via intranasal e intradérmica pela produção de anticorpos, número de células secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 aos peptídeos da proteína GAG e a p24 do HIV-1 e de células T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas (pentâmero), na resposta T citotóxica *in vivo*, produção de citocinas induzidos por peptídeos de classe I ou II da proteína GAG do HIV-1, na geração de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> e seu potencial imunoregulatório;
- Analisar o papel do adjuvante oligodeoxinucleotídeo CpG A na indução de resposta imune nos camundongos imunizados com as vacinas de DNA associadas ao adjuvante por via intranasal.

# *Material e Métodos*

---

## 3 MÉTODOS

### 3.1 Animais

As proles de camundongos BALB/c, de ambos os sexos, obtidas dos acasalamentos de animais com aproximadamente 8 semanas de idade foram mantidos em condições livre de patógenos específicos (SPF – *specific pathogen free*) e utilizadas em diferentes idades. Os camundongos foram provenientes do Biotério do Centro Multidisciplinar para a Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas (UNICAMP).

### 3.2 Plasmídeos

O plasmídeo pITR é um vetor de expressão de proteínas de mamíferos que contém a região promotora do citomegalovírus (CMV) e regiões terminais invertidas (ITR) do vírus adeno-associado (AAV) que flanqueiam os elementos de expressão. O plasmídeo quimera pITR/*LAMP/gag* foi construído através da inserção do gene *gag* do HIV-1 e o gene *LAMP* murino no vetor, de modo que a proteína p55 (GAG) fosse expressa entre o domínio luminal, a porção citoplasmática e transmembrânica da proteína LAMP (Marques *et al.*, 2003). Os plasmídeos pITR (vetor), pITR/*gag* (*gag*) e o plasmídeo quimera pITR/*LAMP/gag* (*LAMP/gag*) utilizados para imunização dos animais foram gentilmente cedidos pelo Dr. Ernesto Marques Jr do Departamento de Farmacologia e Ciências Moleculares da Escola de Medicina da Universidade Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, USA.

### 3.3 Obtenção e purificação dos plasmídeos

As bactérias *Escherichia coli* competentes, cepa DH5 $\alpha$ , foram transformadas com os plasmídeos, expandidas e os plasmídeos purificados e extraídos utilizando o NucleoSpin® Plasmid Kit (BD Biosciences), de acordo com instruções do fabricante. Para confirmar a transformação das bactérias foi realizada a digestão enzimática dos plasmídeos com as enzimas de restrição Nhe I e Kpn I (BioLabs, New England) e submetidos à eletroforese em gel de agarose. As bactérias transformadas foram expandidas em meio Luria Bertani contendo ampicilina (LBA) e a purificação dos plasmídeos foi realizada utilizando o EndoFree Plasmid Mega Kit (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, as

---

bactérias transformadas com os plasmídeos foram incubadas por 16 horas a 37 °C em 500 mL de meio LBA sob homogeneização constante. A suspensão foi centrifugada a 6000 g por 15 minutos a 4 °C e o *pellet* formado foi lisado, neutralizado, filtrado no QIAfilter Mega Cartridge e também nas colunas Qiagen-tip. Após eluição dos plasmídeos das colunas, a suspensão foi precipitada com isopropanol e o *pellet* obtido lavado com etanol 70%. Posteriormente, as amostras foram reconstituídas em tampão de eluição livre de endotoxina e a concentração de DNA determinada em espectrofotômetro BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Os plasmídeos foram mantidos em alíquotas a -20 °C.

### **3.4 Expressão das proteínas GAG e LAMP/GAG**

Para verificar a expressão das proteínas GAG e LAMP/GAG, foi realizada a transfecção com os plasmídeos *gag* e *LAMP/gag* em células 293 (células renais humanas transformadas com DNA do adenovirus 5), utilizando reagente de transfecção Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, CA, EUA). As células foram incubadas com o reagente de transfecção e com o DNA por 48 horas a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram lisadas e a concentração protéica determinada pelo método de Bradford. A identificação das proteínas das células transfectadas com os plasmídeos foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida e imunotransferência. As amostras e padrão de peso molecular foram submetidas à eletroforese gel de poliacrilamida a 10% e transferidos para membranas de polivinil (PVDF, Immobilon, Millipore, Bedford, MA). As membranas foram bloqueadas com solução de PBS 5% leite desnatado e incubado com anticorpo monoclonal de camundongo anti-GAG do HIV-1 (cedido pelo Dr. James Hildreth, Johns Hopkins, Baltimore, MD). Após incubação, foi acrescentado anticorpo IgG anti-camundongo conjugado a peroxidase (Amersham Bioscience, Inglaterra). A membrana foi revelada com substrato quimioluminescente (Pierce, Rockford, IL, USA), exposta em filme de raios-X em cassete e revelado em máquina X-OMAT 450RA Processor (Kodak, Fotodyne, Hartland, WI, USA). As bandas com massas moleculares referentes às proteínas GAG (55kDa) e LAMP/GAG (200kDa) foram avaliadas.

---

### 3.5 Protocolo de imunização neonatal

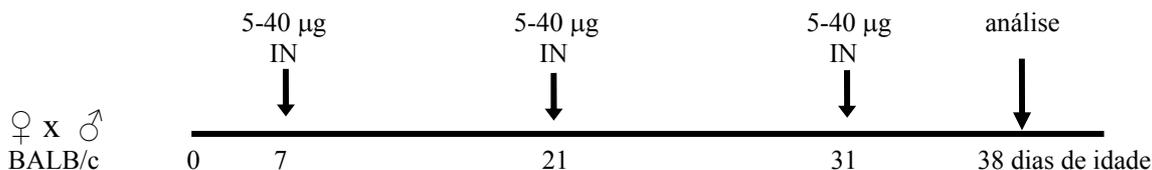
Inicialmente, as concentrações de DNA administradas na imunização e nos reforços foram de 5, 10, 20 ou 40 µg dos plasmídeos *gag* ou *LAMP/gag*. Os camundongos neonatos receberam instilação nasal (IN) dos plasmídeos nas doses descritas acima diluídas em 10 µL de solução salina estéril aos 7, 21 e 31 dias de idade (di). No 38º di, os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital, realizado lavagem intestinal e broncoalveolar e as amostras estocadas a -20 °C. Após avaliação da concentração ideal a ser utilizada por via IN quanto a resposta humoral de mucosa e sistêmica, as concentrações de DNA administradas na imunização foram de 20 µg por via IN (em cada instilação) e 5µg por via intradérmica (ID - em cada administração) dos plasmídeos pITR, *gag* ou *LAMP/gag*. Para tal, os camundongos neonatos receberam instilação nasal dos plasmídeos diluídos em 10 µL de solução salina estéril aos 7, 21 e 31 di e injeção ID aos 7 e 21 di. Alguns animais dos grupos imunizados via IN/ID receberam o 10µg do adjuvante ODN CpG-A 1585 (**5' GGGGTCAACGTTGAGGGGGG 3'**) (Krieg, 2002) juntamente com as primeira dose IN das vacinas utilizadas. As bases com modificações fosforotioato estão representadas em negrito e fosfodiéster em itálico. Os ODNs foram sintetizados pela Operon Biotechnologies, Alemanha. Após 7 dias da última dose, os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital e as amostras estocadas a -20 °C. Os respectivos baços e gânglios mesentéricos (GM) foram coletados para execução dos ensaios funcionais.

### 3.6 Protocolo de imunização de camundongos adultos

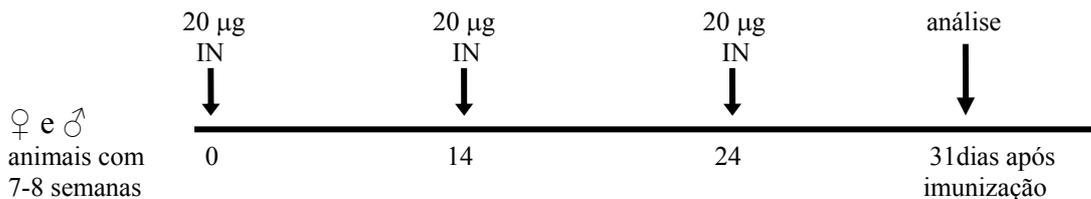
Camundongos com 7 a 8 semanas de idade receberam 20 µg das vacinas gênicas por via IN diluídas em 10 µL de solução salina estéril e duas doses após 14 e 24 dias da primeira dose. Sete dias após a terceira dose, os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital, realizado lavagem intestinal e broncoalveolar e as amostras estocadas a -20 °C.

---

### Protocolo de imunização por via IN iniciado em período neonatal

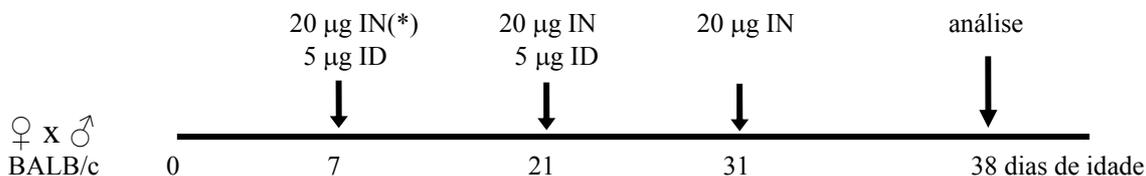


### Protocolo de imunização por via IN de adultos



- ↓ IN: instilação intranasal das vacinas *LAMP/gag* ou *gag*.  
↓ análise: detecção de anticorpos IgG anti-GAG no soro, lavagem intestinal e broncoalveolar para análise de anticorpos sIgA e IgG anti-GAG.

### Protocolo de imunização iniciado em período neonatal por via IN/ID



- ↓ IN: instilação intranasal da vacina *LAMP/gag*, *gag* ou pITR (\*) associação de 10 µg de ODN CpG A as vacinas (alguns grupos)  
ID: administração intradérmica da vacina *LAMP/gag*, *gag* ou pITR  
↓ análise: coleta de baço e gânglios mesentéricos para avaliação de células secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 (ELISPOT), produção de citocinas *in vitro*, resposta CD8, anticorpos anti-GAG no soro, porcentagem de células T CD4+CD25+FoxP3+.

### 3.7 Protocolo de lavagem intestinal

O procedimento de lavagem intestinal foi realizado de acordo com o descrito por Bao *et al.* (1998). O intestino delgado de camundongos com 38 di foi retirado e lavado com 1,5 mL de PBS com auxílio de seringa, sobre placa de Petri. A suspensão obtida foi centrifugada a

---

2000 g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para microtubos contendo coquetel de inibidor de protease (Calbiochem). As amostras foram armazenadas a -20 °C.

### **3.8 Protocolo de lavagem broncoalveolar**

O procedimento de lavagem broncoalveolar foi realizado de acordo com o descrito por Arulanandam *et al.* (1999). A traquéia de camundongos com 38 di foi canulada e os pulmões lavados três vezes com 500 µL de PBS. O material obtido foi centrifugado a 12000 g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi armazenado a -20 °C.

### **3.9 Dosagem de TGF-β1 por ELISA**

A dosagem de TGF-β1 foi avaliada no lavado intestinal coletado dos camundongos imunizados com as vaginas gênicas utilizando o Kit TGF-β1 Emax ImmunoAssay (Promega, Madison, WI), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, após sensibilização de microplacas de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) com anticorpo de captura, foi acrescentado 100 µL do padrão ou da amostra e incubado por uma hora e meia a temperatura ambiente, sob agitação. Após as lavagens, foi adicionado o anticorpo biotilado e incubado por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação. Foram feitas novas lavagens, acrescentado estreptoavidina peroxidase e incubado por 2 horas. Posteriormente, as microplacas foram lavadas e adicionado o substrato tetrametil benzidina (TMB). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico a 1M. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de ELISA (Molecular Devices, CA, USA). O limite de detecção da citocina foi de 15,6 à 1000 pg/ mL.

### **3.10 Dosagem de IFN-α por ELISA**

A dosagem de IFN-α foi avaliada no lavado intestinal coletado dos camundongos imunizados com as vaginas gênicas utilizando o *Mouse Interferon Alpha ELISA Kit* (Endogen, Piscataway, NJ, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foi acrescentado 100 µL do padrão ou da amostra e incubado por uma hora a 24 °C. Após as lavagens, foi adicionado o concentrado de anticorpo e incubado por 24 horas a 24 °C. Foram feitas novas lavagens, acrescentado estreptoavidina peroxidase e incubado por 1 horas a 24

---

°C. Posteriormente, as microplacas foram lavadas e adicionado o TMB. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico a 1M. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de ELISA (Molecular Devices, CA, USA). O limite de detecção da citocina foi de 10 à 500 pg/ mL.

### **3.11 Detecção de anticorpos anti-HIV e dosagem de imunoglobulinas (Ig)**

Para detecção de anticorpos anti-lisado de HIV (IgG e s-IgA), os orifícios de microplacas de 96 poços (Greiner Bio-One, Monroe, NC, EUA) foram incubados com 5 µg/mL do lisado HIVIIB (ABI, Rockville, MD, USA) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (TCB; pH 9,5) por 18 horas à 4 °C. Após lavagem das microplacas em tampão PBS, foram bloqueadas com PBS contendo 0,5% de gelatina por 1 hora à 37 °C. Para detecção de anticorpos IgG anti-p24 sérico, os orifícios de microplacas de 96 poços (Greiner Bio-One, Monroe, NC, EUA) foram incubados com 1 µg/mL da proteína recombinante p24 (gentilmente cedida pelo Prof. Dr Luis Carlos de Souza Ferreira do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo) diluída em TCB 0,1 M por 18 horas à 4 °C. Após lavagens, as microplacas foram bloqueadas com PBS com 1% de soro fetal bovino (SFB, Sigma) por 1 hora à 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas por três vezes e incubadas com diversas diluições das amostras por 2 horas à 37 °C. Após esta etapa, foram lavadas novamente em PBS 0,05% Tween e incubadas com anticorpo biotilado anti-γ ou anti-α (Southern Biotechnology Associates Inc, Birmingham, AL) por 1 hora à 37 °C. Em seguida, após lavagens, foi adicionado estreptoavidina peroxidase (Sigma) e incubada por 1 hora à 37 °C. Posteriormente, a atividade enzimática foi detectada pela adição de TMB (Zymed, São Francisco, USA) e a reação bloqueada com ácido sulfúrico 1 M. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de ELISA (Molecular Devices, CA, USA).

Para determinar a concentração de Ig sIgA e IgG, as microplacas foram sensibilizadas com 3 µg/mL de anticorpo de cabra anti-classe de Ig de camundongo (Southern) diluídos em TCB 0,1 M (pH 9,5) por 18 horas à 4 °C. Após bloqueio da placa com solução de PBS contendo 1% Soro Albumina Bovina (SAB; Sigma), as placas foram lavadas e incubadas com diluições seriadas das amostras ou da Ig padrão (Southern). Em seguida, incubadas com anticorpos biotilados específicos a cadeia pesada das classes de Ig analisadas (Southern). Posteriormente, foi procedido como descrito acima. A concentração de Ig foi obtida pela interpolação dos valores de densidade ótica na curva padrão de imunoglobulinas.

---

### 3.12 Obtenção de células do baço e GM

O baço e GM dos camundongos foram obtidos assepticamente e pressionados separadamente contra telas de 40 µm de diâmetro (Cell Strainer, BD PharMingen, CA, USA) em placas de petri contendo meio RPMI suplementado com 20% de SFB (Cultilab, Campinas, Brasil). A suspensão de células esplênicas foi submetida à centrifugação por 20 minutos a 2000 rpm em um gradiente de densidade da solução de Ficoll-Hypaque para obtenção de células mononucleares. As células do baço e GM foram lavadas separadamente e ressuspendidas em RPMI contendo 1% de FetalClone III (HyClone, Logan, UT, USA). A concentração celular obtida foi determinada através da contagem em contador automático (Cell Dyn 1400, Abbott) e ajustada de acordo com o ensaio a ser realizado. A viabilidade celular foi observada com auxílio do corante Azul de Tripán a 0,5%.

### 3.13 Cultura de células para obtenção de sobrenadante

Células de baço e do GM dos camundongos foram diluídas em meio RPMI contendo 10% SFB ( $4 \times 10^6$  células/mL) e distribuídas em 100 µL/poço em microplacas de 96 poços (Costar, Cambridge, MA) com 100 µL de meio RPMI com 10% SFB com 10 µg/mL do pool de peptídeos contendo epítipo imunodominante AMQMLKETINNAE E apresentado no contexto da molécula de classe I do MHC H-2<sup>d</sup> (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) ou com 10 µg/mL do pool de peptídeos contendo epítipo apresentado no contexto da molécula de classe II do MHC H-2<sup>d</sup> de camundongo (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) e incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes das culturas foram coletados após incubações de 72 horas, aliquotados e congelados a -70 °C para posterior dosagem das citocinas por citometria de fluxo.

### 3.14 Freqüência de células produtoras de IFN-γ e IL-4 (ELISPOT)

Para avaliação de células secretoras de IFN-γ e IL-4 do baço e do GM, foi utilizado o método de ELISPOT, utilizando o kit (BD PharMingen) de acordo como descrito por Marques *et al.* (2003). Microplacas de 96 poços com suporte de membrana immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, USA), foram incubadas com 5 µg/mL de anticorpos anti-IFN-γ ou

---

anti-IL-4 por 18 horas à 4 °C. Posteriormente, as placas foram lavadas e bloqueadas com RPMI com 10% SFB por 2 horas a temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente e as células diluídas em meio RPMI com 1% de FetalClone III e distribuídas nos poços e incubadas na presença ou não de 10 µg/mL de *pool* de peptídeos da proteína GAG do subtipo B do HIV-1 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program), 2 µg/mL da proteína recombinante p24 (gentilmente cedida pelo Prof. Dr Luis Carlos de Souza Ferreira do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo) ou anticorpo anti-CD3 (4 µg/mL, PharMingen) durante 16 horas à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Um total de 12 *pools* foram utilizados, sendo 11 com 10 peptídeos e 1 *pool* com 13 peptídeos, com 15 aminoácidos cada peptídeo (com sobreposição de 11 resíduos) representando a proteína GAG do subtipo B do HIV-1, [HIV-1 Consensus Subtype B Gag (15-mer) Peptides - Complete Set/NIH AIDS Research and Reference Reagent Program]. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com água deionizada seguido de três lavagens com PBS-Tween 0,05% e as microplacas incubadas com anticorpos monoclonais biotinizados anti-IFN-γ ou anti-IL-4 (BD PharMingen) durante 2 horas a temperatura ambiente. Uma nova série de lavagens em PBS-Tween 0,05% foi realizada seguida de uma incubação por 1 hora à 37 °C com avidina-peroxidase. As placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05% seguidas de 2 lavagens com PBS e incubadas com o substrato AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole; Calbiochem Corporation, San Diego, CA, USA) por 20 a 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água destilada e, uma vez secas, as placas foram contadas no contador automático CTL ImmunoSpot® S4 Analyzer utilizando o software ImmunoSpot 3.2 (C.T.L., Cleaveland, OH, EUA). Os dados foram expressos por número de células formadoras de *spot* (Spot forming cell – SFC)/1 x 10<sup>6</sup> obtidas por cada estímulo subtraída do número de SFC sem estímulo. Foi considerado positivo quando o número de SFC foi superior ou igual a 10 SFC/1 x 10<sup>6</sup> células.

Os *pools* de peptídeos foram agrupados da seguinte maneira: pool 1: aminoácido (aa) 1-51; pool 2 aa 41-91; pool 3 aa 81-131; pool 4 aa 121-171; pool 5 aa 161-211; pool 6 aa 201-251; pool 7 aa 241-291; pool 8 aa 281-331; pool 9 aa 321-371; pool 10 aa 361-411; pool 11 aa 401-451 e pool 12 aa 441-503. No anexo A encontra-se a descrição individual dos peptídeos da proteína GAG utilizados.

---

### 3.15 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo (CBA)

A determinação das citocinas no sobrenadante de cultura de esplenócitos e células do GM foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o kit *mouse* Th1/Th2 e *mouse inflammation* (BD PharMingen, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A curva padrão e as amostras foram diluídas e incubadas com esferas de captura e anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE) por duas horas a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras foram lavadas por centrifugação a 500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o *pellet* formado ressuspensionado em tampão de lavagem para a análise no citômetro BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA USA). Os limites de detecção dos kits são de: TNF- $\alpha$ : 7,3 pg/mL; IFN- $\gamma$ : 2,5 pg/mL; IL-2: 5,0 pg/mL; IL-4: 5,0 pg/mL; IL-5: 5,0 pg/mL; IL-12p70: 10,7 pg/mL; MCP-1: 52,7 pg/mL; IL-10: 17,5 pg/mL e IL-6: 5 pg/mL.

### 3.16 Quantificação de células T CD4+CD25+FoxP3+

Esplenócitos e células do GM foram incubados com os anticorpos monoclonais anti-CD4 (BD Pharmingen), anti-CD25 (BD Pharmingen) e anti-FoxP3 (eBioscience) conjugados à PerCP, ficoeritrina (PE) e à fluoresceína (FITC), respectivamente, com seus respectivos controles isotípicos. As células ( $1 \times 10^6$ ) foram incubadas com 1  $\mu$ g/mL dos anticorpos monoclonais e incubadas por 30 minutos a 4 °C. Para análise da expressão de FoxP3, após a marcação com anti-CD4-PerCP e anti-CD25-PE, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos a 4 °C e lavadas com tampão PBS 1%SAB. Posteriormente, as células foram incubadas com anti-FoxP3-FITC em tampão PBS/0,5%Saponina (Sigma) por 30 minutos a 4 °C. Após nova lavagem, as células foram ressuspensionadas em solução isotônica e a porcentagem da população de Treg no baço e GM foi determinada após aquisição de 10.000 eventos dentro da região de células T CD4+ por citometria de fluxo (BD FACSCalibur, Cell Quest PRO).

### 3.17 Quantificação de células T CD8+ antígeno-específicas

Grupos de animais receberam duas injeções contendo 20  $\mu$ g/mL do peptídeo da GAG apresentado no contexto da molécula de classe I do MHC AMQMLKETI<sub>65-73</sub> em 50  $\mu$ L de

adjuvante emulsão (Titermax® gold, TiterMax, EUA) por via intraperitoneal (IP). Cinco dias após a segunda injeção IP, foram coletadas as células do baço e GM e incubadas ( $1 \times 10^6$  células) com pentâmero H-2K<sup>d</sup>/AMQMLKETI PE e com anti-CD8 FITC (ProImmune, USA) por 30 minutos. Após lavagens, as células foram analisadas por citometria de fluxo (250000 eventos no citômetro Coulter Epics XL) e o resultado expresso por porcentagem de células T CD8<sup>+</sup>pentâmero<sup>+</sup>.

### 3.18 Análise *in vivo* de células citotóxicas (CTL)

Para avaliação de resposta CTL *in vivo* no baço e GM de animais imunizados, foi adaptado o método descrito por Cooper *et al.* (2008). Grupos de animais receberam duas injeções contendo 20 µg/mL do peptídeo AMQMLKETI<sub>65-73</sub>, em 50 µL de emulsão (Titermax® gold) por via IP. Células do GM e esplenócitos de camundongos BALB/c não-imunizados foram processadas e usadas como células alvo. Estas células foram divididas igualmente em duas populações e marcadas com alta ou baixa concentração (10 e 1 µM, respectivamente) de carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, Molecular Probes, USA) em RPMI por 30 minutos a 37 °C no escuro. A população marcada com alta concentração de CFSE foi pulsada com 2 µg/mL do peptídeo AMQMLKETI por 1h a 37 °C em 5% CO<sub>2</sub>. Após incubação, as células foram lavadas e misturadas em proporção 1:1 e diluídas em salina. Aproximadamente  $3 \times 10^7$  células diluídas em 200 µL foram injetadas por via iv nos animais imunizados e não imunizados. Esplenócitos e células do GM foram coletadas após 18 horas. A presença das células transferidas foi determinada pela detecção de células CFSE<sup>+</sup> por citometria de fluxo (FACSCalibur). A porcentagem de lise foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ lise específica} = 100 - \left\{ \left[ \frac{\left[ \frac{\% \text{ população CFSE alta}}{\% \text{ população CFSE baixa}} \right] \text{ de animal imunizado}}{\left[ \frac{\% \text{ população CFSE alta}}{\% \text{ população CFSE baixa}} \right] \text{ de animal não imunizado}} \right] \times 100 \right\}$$

---

### 3.19 Co-cultura de linfócitos anti-GAG e células T CD4+CD25+FoxP3+

Células dos GM dos camundongos imunizados com as vacinas de DNA foram coletadas e as células T CD4+CD25+ e CD4+CD25- purificadas por seleção positiva e negativa, respectivamente, com esferas magnéticas de acordo com instrução do fabricante (Milteniy Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Resumidamente, as células dos GM foram incubadas com coquetel de anticorpo marcado com biotina por 10 minutos e em seguida por 15 minutos com microesferas conjugadas com anti-biotina e com anti-CD25 PE. As células foram lavadas e passadas em coluna para obtenção das células T CD4+. Após lavagem das células T CD4+, estas foram incubadas por 15 minutos com anti-PE microbeads e submetidas em coluna para obtenção das células T CD4+CD25+ e T CD4+CD25-. As células foram lavadas com tampão de lavagem e ressuspensas em RPMI contendo 10% SFB.

As células efectoras foram obtidas do baço de camundongos adultos que foram primados e reforçados por via IP com proteína p55 (ProSpec, Rehovot, Israel) do HIV diluída em 50 µL de emulsão (Titermax® gold). Dez dias após o reforço, o baço destes animais foram coletados e os esplenócitos obtidos de acordo com descrição do item 11. As células efectoras foram ressuspensas em meio RPMI contendo 10% SFB. As células purificadas T CD4+CD25+ ou T CD4+CD25- foram incubadas com as células efectoras numa proporção 1:5 na presença ou não de 1 µg/mL da proteína p55 do HIV (ProSpec, Rehovot, Israel) por 72 horas e pulsadas por mais 18 horas com 2,75 µCi de <sup>3</sup>H-timidina/poço antes da coleta celular. A incorporação da <sup>3</sup>H-timidina foi medida usando contador de cintilação β-Plate (Willac OI, Turku, Finlândia). Os resultados foram expressos como média das contagens por minutos das duplicatas.

### 3.20 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (Real-time PCR) do gene IDO

O RNA total das células dos GM dos animais imunizados pelas vias IN/ID foi extraído com o kit QIAmp RNA blood (Qiagen, Valencia, Ca, EUA) conforme instruções fornecidas pelo fabricante. O RNA purificado foi utilizado para obtenção de cDNA utilizando o kit *Sensiscript Reverse Transcriptase* (Qiagen). A reação de amplificação em tempo real foi realizada com 1-2 µg da amostra de cDNA, 25 µL da solução *Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), 1 µL de *ROX Reference Dye*, 12 µL de água destilada estéril e

---

10 mM dos *primers* de IDO. Os primers para IDO *forward* 5'-TGG CAA ACT GGA AGA AAA AG-3' e *reverse* 5'-AAT GCT TTC AGG TCT TGA CG-3' (Serbecic *et al.*, 2005) e os primers da  $\beta$ -actina *forward* 5'-GCC TTC CTT CTT GGG TAT GGA ATC-3' e *reverse* 5'-ACG GAT GTC AAC GTC ACA CTT CAT-3' foram sintetizados pela Invitrogen (Crlsbad, CA, EUA). As amostras foram incubadas durante 10 minutos a 95 °C e 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C cada, em termociclador 7300 *Real-Time PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados obtidos foram interpretados com o programa *7300 System Software* (Applied Biosystems). Os dados obtidos pelo CT (cycle threshold) do gene de interesse (IDO) e gene de controle interno ( $\beta$ -actina) foram aplicados na fórmula  $(2^{-ct\ IDO} / 2^{-ct\ \beta\text{-actina}}) \times 10^6$ .

### 3.21 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov e de acordo com os resultados foram realizadas as análises pelos testes paramétricos ou não paramétricos de acordo. Os grupos foram analisados pelo teste não paramétrico *Mann-Whitney* ou paramétrico *t test* quando comparado dois grupos ou *Kruskall-Wallis* (não paramétrico) ou ANOVA (paramétrico) com pós-teste de *Dunn's* ou Tukey, respectivamente, quando comparado três ou mais grupos. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando o erro alfa for  $\leq 0.05$ .

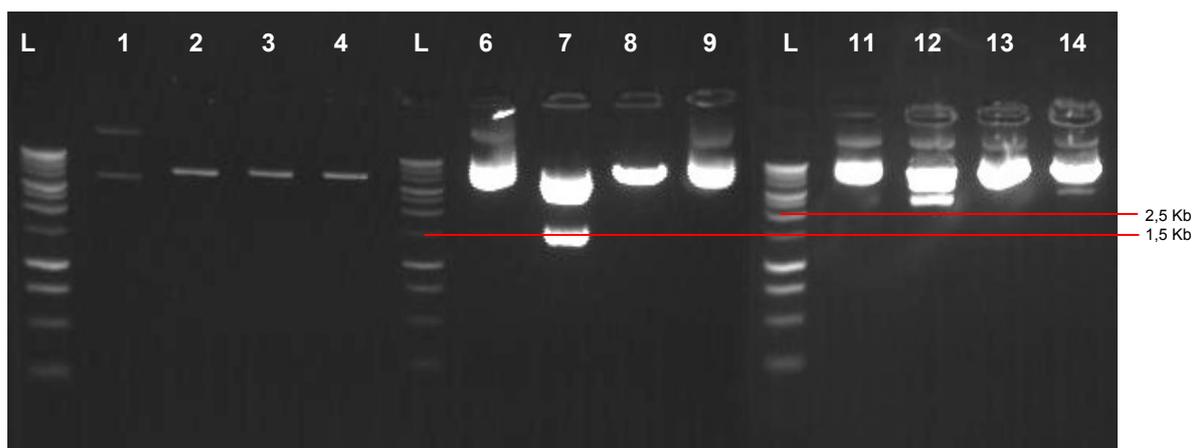
# *Resultados*

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Identificação dos genes inseridos nos plasmídeos

Os genes inseridos nos plasmídeos foram confirmados através do tratamento com enzimas Nhe I e Kpn I, que reconhecem os sítios de restrição entre o DNA do plasmídeo (pITR) e os genes *gag* nativo e *LAMP/gag*, separando o DNA em fragmentos. Desta forma, pode-se observar a formação de fragmentos de 1.5 e 2.7 kilobases (kb) para *gag* e *LAMP/gag*, respectivamente (Fig. 1). Após a confirmação dos plasmídeos, foi feita expansão destas bactérias em larga escala e os plasmídeos extraídos com colunas livre de endotoxina (Qiagen, Alemanha) para a imunização dos camundongos.

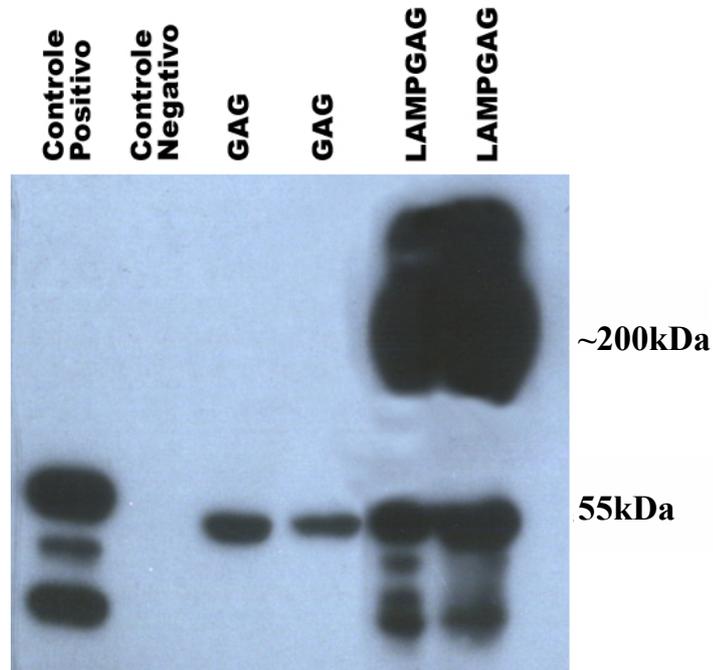


**Figura 1. Identificação dos genes das vacinas de DNA inseridos nos plasmídeos.** Os plasmídeos pITR contendo os genes *gag* nativo e *LAMP/gag* foram digeridos e o produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Linhas 1 a 4 – plasmídeo pITR; linhas 6 a 8 – plasmídeo pITR contendo gene *gag*; linhas 9 a 12 – plasmídeo pITR contendo a quimera gênica *LAMP/gag*. Nas linhas 1, 6 e 11 os plasmídeos não foram digeridos. Nas linhas 3, 4, 8, 9, 13 e 14 mostram os plasmídeos que foram digeridos com apenas 1 enzima de restrição. As linhas 7 e 12 contêm os fragmentos *gag* e *LAMP/gag*, respectivamente, formados após digestão por ambas as enzimas.

---

## 4.2 Expressão das proteínas GAG e LAMP/GAG após transfecção das células 293

Para avaliar a expressão das proteínas sintetizadas pelos plasmídeos, foi realizada transfecção de células 293 com os plasmídeos utilizando o reagente de transfecção Lipofectamine™ 2000. Posteriormente, o lisado celular foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida e imunotransferência. Na Fig. 2 pode-se observar a formação de banda protéica com aproximadamente 55 kDa no lisado celular das células 293 transfectadas com os plasmídeos *gag* (colunas 3 e 4), referentes à proteína GAG do HIV-1. Já a banda protéica com aproximadamente 200 kDa representa a proteína quimérica LAMP/GAG presente no lisado celular de células 293 transfectadas com o plasmídeo *LAMP/gag* (colunas 5 e 6). As proteínas com aproximadamente 220 kDa representam formas multimerizadas da proteína GAG devido a sua alta concentração e as bandas com menos de 100 kDa são formadas devido à proteólise protéica (Marques *et al.*, 2003).



**Figura 2. Expressão das proteínas GAG e LAMP/GAG pelas células 293 transfectadas com os plasmídeos *gag* e *LAMP/gag*.** Células 293 (células renais humanas transformadas com DNA de adenovirus 5) foram transfectadas com plasmídeos *gag* ou *LAMP/gag* utilizando reagente de transfecção Lipofectamine™ 2000 por 48 horas. O lisado celular obtido foi submetido ao imunoblotting. Na coluna 1, como controle positivo, foi utilizado o lisado HIVIIB (ABI, Rockville, MD, USA). Coluna 2: controle negativo - células 293 não transfectadas. Colunas 3 e 4: células 293 transfectadas com os plasmídeos *gag* provenientes de duas extrações. Colunas 5 e 6: células 293 transfectadas com plasmídeos *LAMP/gag* de duas extrações. A figura é representativa de várias transfecções com diferentes extrações de plasmídeos.

---

### 4.3 Imunogenicidade das vacinas de DNA na mucosa gastrintestinal de camundongos neonatos

É importante salientar que utilizamos o termo imunização neonatal os camundongos que tiveram o início da vacinação em período neonatal, ou seja a primeira dose das vacinas administradas aos 7 dias de idade. Já o termo imunização adulta foi utilizado quando os animais receberam as três doses das vacinas durante a fase adulta.

Inicialmente foi avaliado o efeito de doses variadas (5-40 µg/camundongo) das vacinas gênicas administradas por via IN em camundongos BALB/c neonatos na indução de resposta humoral pela mucosa gastrintestinal. A reatividade dos anticorpos sIgA e IgG ao lisado do HIV e a dosagem das imunoglobulinas sIgA e IgG no lavado intestinal obtido de camundongos aos 38 di foram determinados por ELISA.

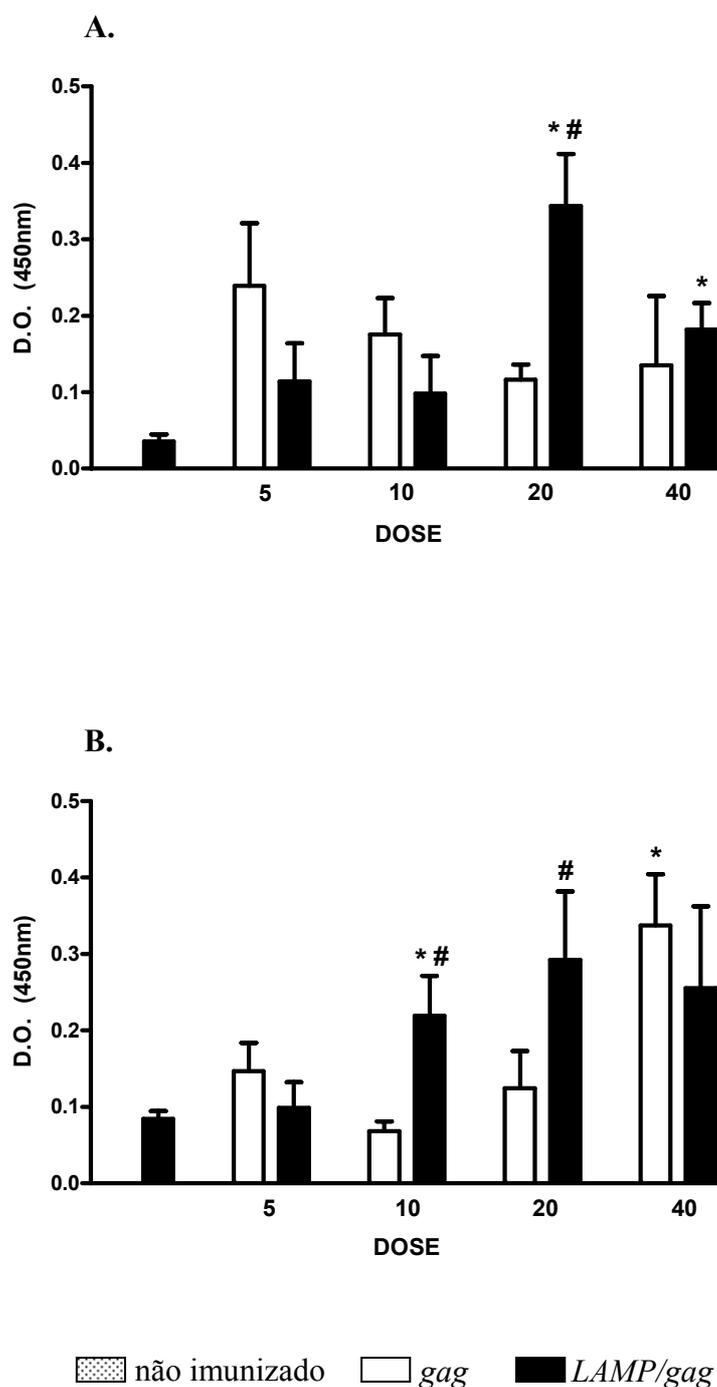
Os resultados apresentados nas Fig. 3. A e B mostram anticorpos sIgA e IgG anti-lisado de HIV-1 no lavado intestinal de animais neonatos imunizados com diversas doses das vacinas gênicas. A vacina quimérica *LAMP/gag* induziu produção de sIgA anti-GAG nas doses de 20 µg e 40 µg quando comparado com os animais não imunizados e também ao animal imunizado com *gag* na dose de 20 µg. Já a vacina *gag* não induziu síntese de sIgA anti-lisado de HIV em nenhuma das doses avaliadas. Para a indução de anticorpos IgG anti-GAG, pôde-se observar que as doses de 10 e 20 µg da vacina quimérica foram capazes de estimular a produção de anticorpos, quando comparado com animais imunizados com a vacina *gag* e animais não imunizados.

A Tabela 1 mostra que a concentração da imunoglobulina sIgA no lavado intestinal aumentou nos animais imunizados com 20 µg da vacina *gag* em relação aos animais não imunizados. Entretanto, 20 µg da vacina *LAMP/gag* aumentou também a concentração de IgG. A proporção da concentração de sIgA/IgG no lavado intestinal de animais não imunizados é de 257, já a vacina *LAMP/gag* diminui essa relação para 71, indicando o aumento na síntese de IgG e a mudança de isótipo.

Os resultados mostram que as vacinas gênicas são imunogênicas na mucosa intestinal, sendo a vacina *LAMP/gag* capaz de induzir a produção de anticorpos sIgA e IgG anti-lisado viral. A vacina *gag* não foi capaz de induzir produção de anticorpos sIgA e IgG anti-GAG, somente a vacina quimérica foi capaz de estimular a produção de ambos isótipos. Com base nesses resultados, pudemos selecionar a dose necessária para induzir resposta imune na

---

mucosa de camundongos, como três doses de 20 µg para prosseguir os experimentos para avaliar imunidade humoral e celular tanto nos GM como no baço.



**Figura 3. Presença de anticorpos anti-lisado de HIV no lavado intestinal de camundongos imunizados com as vacinas gênicas.** Camundongos neonatos foram imunizados por via IN com diversas doses das vacinas gênicas *gag* e *LAMP/gag* aos 7, 21 e 31 di. As amostras de lavado intestinal foram coletadas aos 38 di e analisadas por ELISA. Os dados representam a média e erro padrão obtidas de 5-8 animais de cada grupo. **A e B: anticorpos sIgA (A) e IgG anti-GAG (B):** avaliados nas diluições 1:200 e 1:160 para sIgA e IgG, respectivamente. \*  $P \leq 0.05$  comparado com animal não imunizado. #  $P \leq 0.05$  comparado com animal imunizado com a vacina *gag*.

---

**Tabela 1 – Concentração das imunoglobulinas sIgA e IgG no lavado intestinal de camundongos imunizados com as vacinas de DNA por via IN**

<b>Vacinas</b>	<b>sIgA (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>IgG (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>sIgA/IgG</b>
20 $\mu\text{g}$ <i>gag</i>	386,70 $\pm$ 68,74 *	0,82 $\pm$ 0,13	471,59
20 $\mu\text{g}$ <i>LAMP/gag</i>	317,10 $\pm$ 39,97	1,73 $\pm$ 0,22 * #	183,29

A concentração das imunoglobulinas sIgA e IgG do lavado intestinal representam a média e erro padrão obtidas de 5-8 animais de cada grupo. \*  $P \leq 0.05$  comparado com animal não imunizado. #  $P \leq 0.05$  comparado com animal imunizado com a vacina *gag*.

---

#### 4.4 Imunogenicidade das vacinas de DNA nas mucosas gastrintestinal e brônquica de camundongos neonatos e adultos

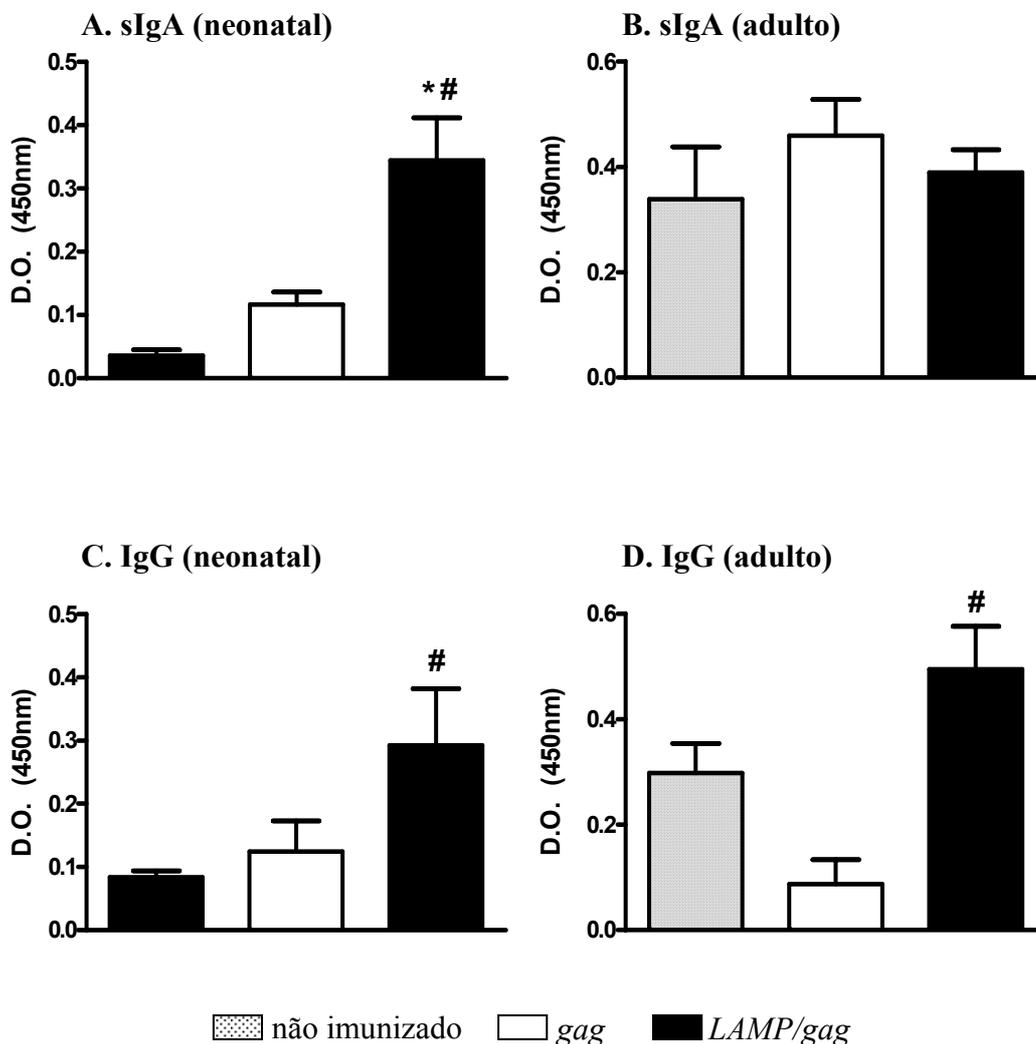
Conforme avaliado previamente, 3 doses de 20 µg da vacina quimérica *LAMP/gag* administradas por via IN em camundongos BALB/c durante a fase neonatal foi o protocolo mais eficaz na indução de resposta humoral na mucosa gastrintestinal. Com base neste resultado comparamos a imunogenicidade deste protocolo em camundongos BALB/c adultos. A reatividade dos anticorpos sIgA e IgG ao lisado do HIV dos lavados intestinal e brônquico obtidos 7 dias após a última dose foi determinado por ELISA.

A Fig. 4 mostra que a vacina quimérica *LAMP/gag* estimulou a produção de sIgA anti-lisado de HIV nos neonatos. Entretanto, nos animais adultos imunizados, os níveis de anticorpos sIgA foram similares entre os grupos (Fig. 4B).

A vacinação intranasal com *LAMP/gag* foi capaz de induzir a produção de anticorpos IgG anti-GAG no GALT de camundongos imunizados em período neonatal (Fig. 4C) e nos camundongos adultos (Fig. 4D).

Os resultados mostram instilações nasais com 20 µg da vacina quimérica *LAMP/gag* induziu nos animais adultos um perfil de resposta essencialmente de IgG, enquanto que o início da vacinação na fase neonatal induz a produção de sIgA e IgG anti-GAG.

Além do lavado intestinal, a presença dos anticorpos foi avaliada no lavado brônquico dos animais imunizados na fase neonatal e na fase adulta com as vacinas gênicas. No lavado brônquico (BAL) dos animais neonatos, assim como nos adultos, não foi possível detectar os anticorpos IgG e IgA anti-lisado de HIV (dados não mostrados), devido a indetectável densidade óptica (< 0,2) obtida, provavelmente devido ao volume para obtenção da amostra (500 µL).



**Figura 4. Presença de anticorpos anti-lisado viral no lavado intestinal de camundongos neonatos e adultos imunizados com as vacinas gênicas.** Camundongos foram imunizados por via IN com 3 doses de 20 µg cada das vacinas gênicas *gag* ou *LAMP/gag*. As amostras de lavado intestinal foram coletadas 7 dias após instilação da última dose da vacina no neonato (38 dias de idade) e no adulto (8-9 semanas de idade) e analisadas por ELISA. Os dados representam a média e erro padrão obtidas a partir em 5-8 animais neonatos/grupo e 5-6 animais adultos/grupo. **A e B: anticorpos sIgA anti-GAG:** os anticorpos foram avaliados nas diluições 1:200 e 1:400 para imunização iniciada em fase neonatal ou adulta, respectivamente. **C e D: anticorpos IgG anti-GAG:** os anticorpos foram avaliados nas diluições 1:160 e 1:3200 para imunização iniciada em fase neonatal ou adulta, respectivamente. \*  $P \leq 0.05$  comparado com animal não imunizado. #  $P \leq 0.05$  comparado com animal imunizado com a vacina *gag*.

---

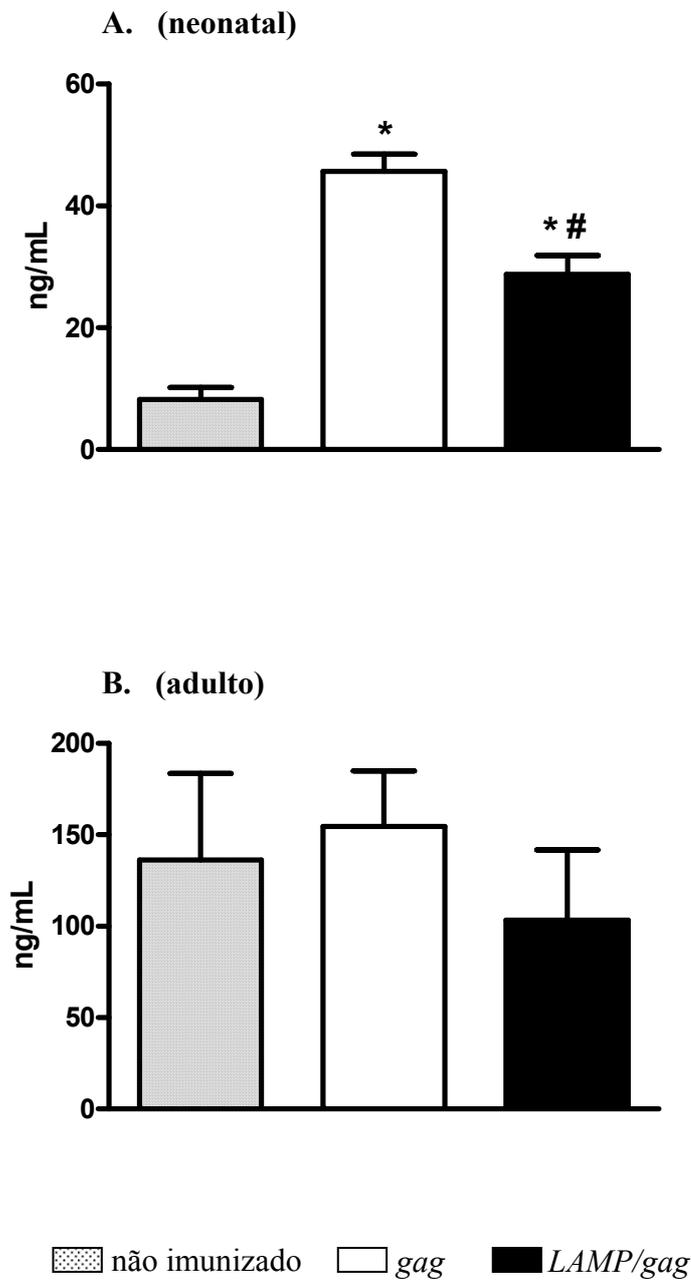
#### **4.5 Determinação de TGF- $\beta$ 1 no lavado gastrintestinal dos camundongos imunizados com as vacinas gênicas *gag* e *LAMP/gag***

Os níveis de TGF- $\beta$ 1 no lavado intestinal dos camundongos neonatos e adultos imunizados com três doses de 20  $\mu$ g das vacinas gênicas foram determinados por ELISA.

Na Fig. 5A, podemos observar que, os neonatos vacinados com *gag* ou *LAMP/gag* apresentaram maior concentração de TGF- $\beta$ 1 no lavado intestinal quando comparados com os animais não imunizados. Nos camundongos adultos (Fig. 5B), os níveis de TGF- $\beta$ 1 foram similares entre os grupos vacinados e camundongos não imunizados.

Proporcionalmente, o nível de TGF- $\beta$ 1 dos animais imunizados com *gag* em fase neonatal é 59% maior que os animais imunizados com *LAMP/gag* e 453% maior quando comparado com animais não imunizados. Já nos animais imunizados com *LAMP/gag*, o aumento do nível de TGF- $\beta$ 1 é de 249% comparado com o nível dos animais não imunizados. Por outro lado, nos camundongos adultos, não houve alteração dos níveis de TGF- $\beta$ 1 entre os grupos.

Os resultados mostram que a imunização neonatal com as vacinas de DNA estimulou a produção de TGF- $\beta$ 1, mas não alterou a produção nos animais adultos, sendo que estes também não tiveram seus níveis de sIgA alterados.



**Figura 5. Concentração de TGF-β1 no lavado intestinal dos animais imunizados com as vacinas gênicas.** Camundongos foram imunizados por via IN com 20 µg/dose das vacinas gênicas *gag* e *LAMP/gag*. As amostras de lavado intestinal foram coletadas 7 dias após a última dose e a concentração de TGF-β1 determinada por ELISA. Os dados representam a média e erro padrão obtidas de 5-8 animais neonatos/grupo ou 5-6 camundongos adultos/grupo. \*  $P \leq 0.05$  comparado com animal não imunizado. #  $P \leq 0.05$  comparado com animal imunizado com a vacina *gag*.

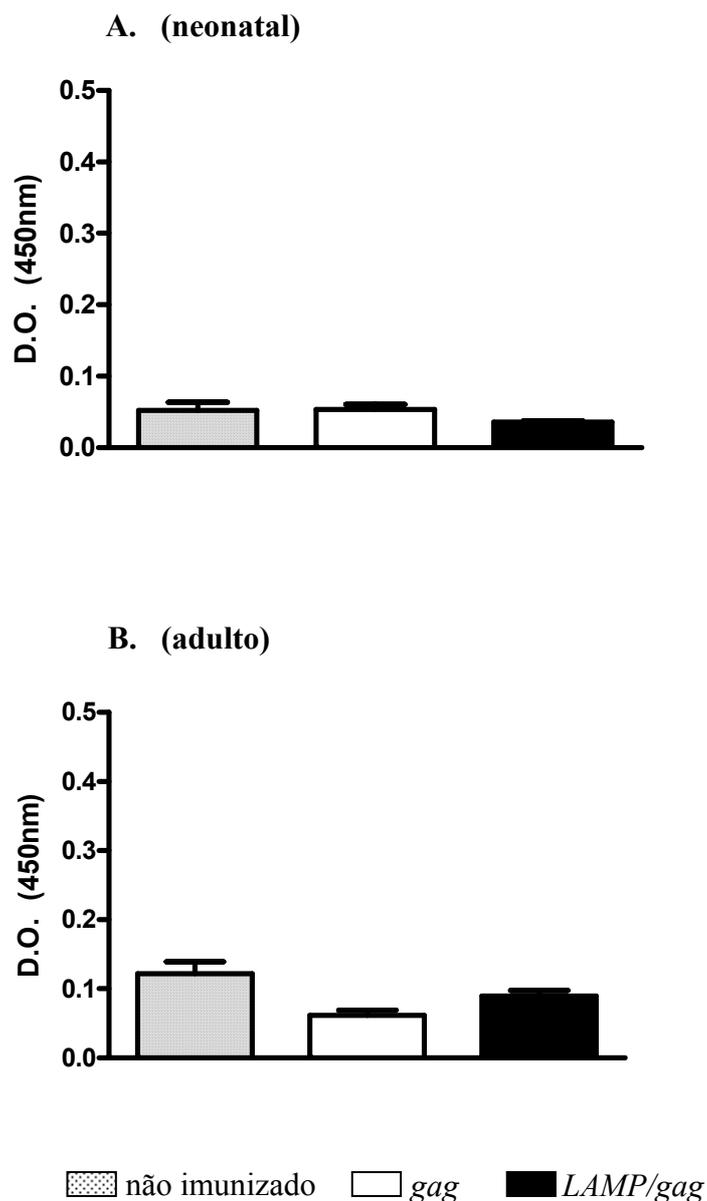
---

#### **4.6 Determinação de anticorpos IgG anti-p24 do HIV-1 no soro de camundongos imunizados durante fase neonatal e adulta com as vacinas gênicas por via IN**

O próximo passo foi analisar se a imunização por via IN na fase neonatal e adulta com o protocolo de 3 doses de 20 µg das vacinas é capaz de estimular a síntese de anticorpos IgG anti-p24 do HIV-1 no soro destes animais.

A Fig. 6 mostra que a imunização por via IN em camundongos neonatos e adultos não é capaz de induzir a síntese de anticorpos IgG anti-p24 séricos, mostrando uma característica destas vacinas gênicas quando administradas por esta via e não uma consequência da imaturidade do sistema imunológico neonatal.

Com o intuito de obter resposta sistêmica além de resposta de mucosa nos camundongos imunizados durante a fase neonatal, foi associada à imunização IN duas doses das vacinas gênicas por via ID. De acordo com projeto desenvolvido no nosso grupo com as mesmas vacinas gênicas, duas doses de 5 µg por via ID são suficientes para induzir imunidade sistêmica em camundongos neonatos BALB/c.



**Figura 6. Avaliação de anticorpos IgG anti-p24 no soro de camundongos imunizados com as vacinas gênicas.** Camundongos foram imunizados pela via intranasal com 3 doses de 20  $\mu$ g cada das vacinas gênicas *gag* ou *LAMP/gag*. As amostras de soro foram coletadas 7 dias após a última dose das vacinas e analisadas por ELISA. Os dados representam a média e erro padrão obtidas a partir de 5-6 animais/grupo. **A: anticorpos IgG anti-p24 imunização neonatal: diluição 1:150. B: anticorpos IgG anti-p24 imunização adultos: diluição 1:150.**

---

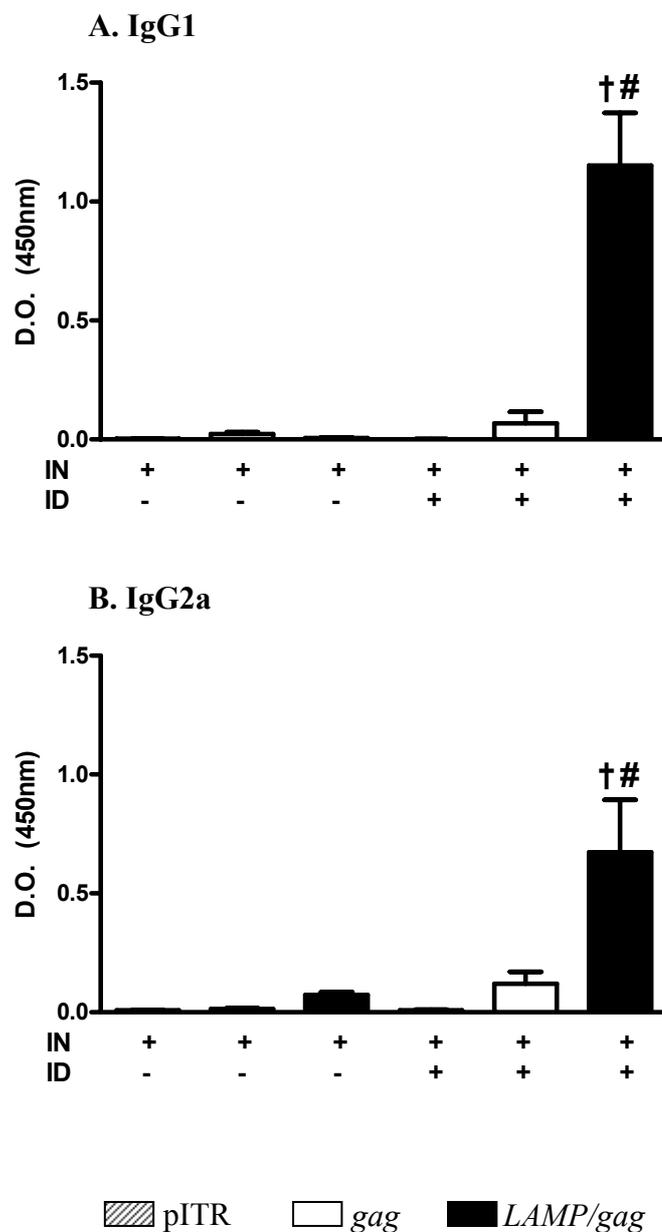
#### 4.7 Imunogenicidade das vacinas de DNA na resposta humoral sistêmica de neonatos

O perfil de produção de anticorpos IgG anti-p24 foi avaliado no soro de camundongos neonatos imunizados com 20 µg das vacinas gênicas por via IN associada à injeção ID com 5 µg das vacinas gênicas. A reatividade dos anticorpos IgG1 e IgG2a à p24 no soro de camundongos vacinados foi determinada por ELISA.

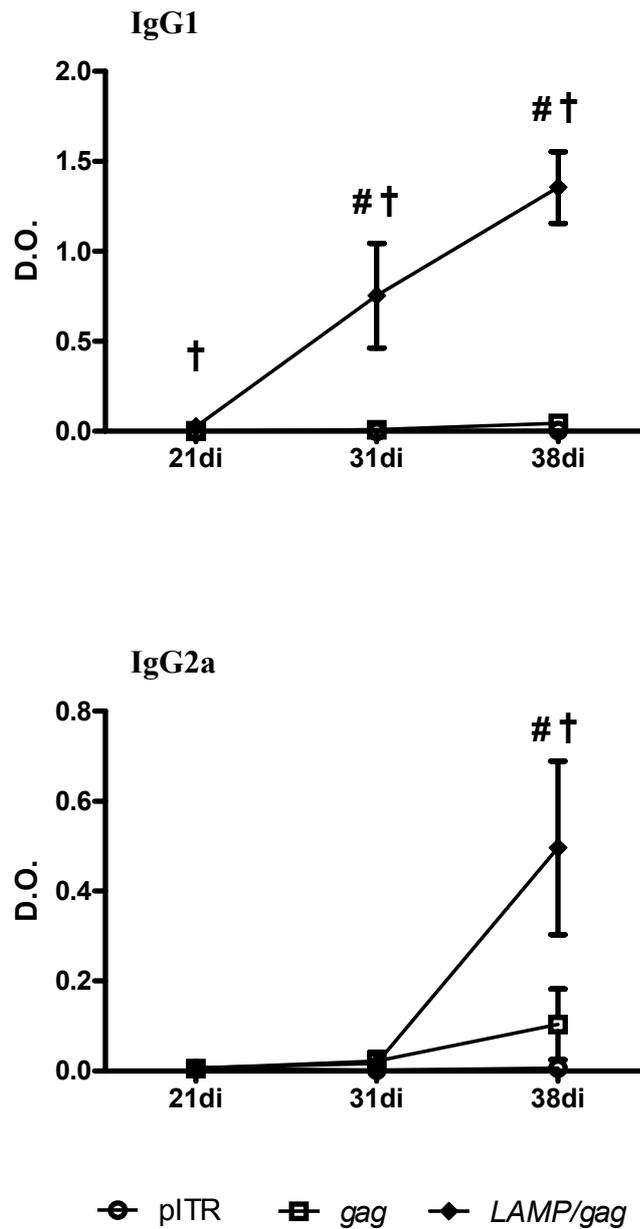
A Fig. 7 mostra a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-p24 de camundongos imunizados com as vacinas gênicas *gag* ou *LAMP/gag* durante a fase neonatal. O protocolo de imunização intranasal associado à intradérmica (IN/ID) com a vacina quimérica *LAMP/gag* foi capaz de aumentar os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a nos neonatos quando comparado com a vacina *gag* e animais imunizados com pITR (controle). A produção de anticorpos anti-p24 foi predominantemente de IgG1 em relação à IgG2a nos animais imunizados com *LAMP/gag*.

Na Fig. 8 podemos observar a cinética da produção dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-p24 após cada dose das vacinas. Aos 21 dias foi coletada amostra de soro dos animais antes da segunda dose, mostrando que apenas uma dose aos 7 dias não é suficiente para induzir produção de anticorpos. Entretanto, aos 31 dias, após duas doses pelas vias IN/ID já é detectável a produção de anticorpos, indicando que a primeira dose da vacina *LAMP/gag* aos 7 dias foi capaz de sensibilizar os camundongos. A terceira dose IN da vacina quimérica aumentou ainda mais os níveis de IgG1. A produção de anticorpos IgG2a anti-p24 foi mais tardia do que para IgG1, sendo evidenciável a partir dos 31 dias .

Para produção sérica de anticorpos anti-p24 do HIV-1 foi necessário o uso da via ID da vacina quimérica, que foi capaz de estimular a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a. A proteína LAMP codificada pela vacina quimérica foi fundamental na indução de anticorpos anti-GAG pelas mucosas e via sistêmica no período neonatal.



**Figura 7. Presença de anticorpos IgG anti-p24 sérico após imunização neonatal com as vacinas gênicas.** Camundongos foram imunizados por via IN com 3 doses de 20  $\mu$ g e ID com 2 doses de 5  $\mu$ g das vacinas *gag* e *LAMP/gag*. As amostras de soro foram coletadas 7 dias após última dose IN e analisadas por ELISA. Os dados representam a média e erro padrão obtidos a partir de 8-10 animais/grupo. Diluição 1:100. †  $P \leq 0.05$  comparado com animal pITR. #  $P \leq 0.05$  comparado com animal imunizado com a vacina *gag*.



**Figura 8. Cinética de produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-p24 sérico após administração das doses das vacinas gênicas.** Camundongos foram imunizados por via IN com 3 doses de 20 µg e ID com 2 doses de 5 µg das vacinas *gag* e *LAMP/gag*. As amostras de soro foram coletadas antes da segunda dose (21 di), da terceira dose (31 di), 7 dias após última dose IN (38 di) e analisadas por ELISA. Os dados representam a média e erro padrão obtidos a partir de 5-9 animais/grupo. Diluição 1:1350. †  $P \leq 0.05$  comparado com animal pITR. #  $P \leq 0.05$  comparado com animal imunizado com a vacina *gag*.

---

#### 4.8 Imunogenicidade das vacinas de DNA quanto à frequência de células secretoras de IFN- $\gamma$ e IL-4 anti-GAG em neonatos

Camundongos imunizados durante período neonatal com o protocolo de três doses de 20  $\mu$ g das vacinas gênicas por via IN associada com duas doses de 5  $\mu$ g por via ID foram avaliados quanto ao número de esplenócitos e de células dos GM secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 em resposta à estímulos com *pools* de peptídeos da proteína GAG do HIV-1 e a proteína p24 pela técnica de ELISPOT. Os 123 peptídeos (cada um com 15 aminoácidos e sobreposição de 11aa) que compreendem a proteína GAG foram agrupados em 12 *pools*, sendo cada *pools* composto por 10 peptídeos e um 1 *pool* contendo 13 peptídeos. Foi considerada resposta positiva quando o número de células formadoras de *spot* (SFC) foi superior a 10 SFC/1 x 10<sup>6</sup> células para IFN- $\gamma$  e 20 SFC/1 x 10<sup>6</sup> para IL-4 (*cut-off*).

A Fig. 9 A mostra amplo reconhecimento dos peptídeos da proteína GAG, com maior número de SFC de IFN- $\gamma$  nos animais imunizados com a vacina quimérica (*pool* nº 4, 5, 7, 8 e 10) comparado com os animais imunizados com a vacina *gag* (*pool* nº 5 e 8). Entre os grupos de peptídeos reconhecidos pelos animais vacinados com a quimera, os grupos 4, 7, 8 e 10 contêm peptídeos que são reconhecidos por células T CD4<sup>+</sup> por serem apresentados no contexto de moléculas de classe II do MHC H-2K<sup>d</sup> (Arruda *et al.*, 2006). Por outro lado, animais vacinados com *LAMP/gag* ou *gag* tiveram perfil semelhante de reconhecimento ao 5<sup>o</sup> *pool* de peptídeos da GAG. Este grupo contém o peptídeo imunodominante AMQMLKETINNAE que possui 15 aa e é apresentado no contexto de moléculas de classe I do MHC H-2K<sup>d</sup>, haplótipo dos camundongos BALB/c. De acordo com estes dados, foi observado que a resposta a esse peptídeo isolado, representado pelo número 50 (Fig. 9) e à p24 apresenta número semelhante de SFC secretoras de IFN- $\gamma$  entre os grupos de camundongos imunizados.

Os resultados mostram que a construção da vacina quimérica contendo o gene que codifica a proteína LAMP ativa com maior amplitude as células T CD4<sup>+</sup> anti-GAG secretoras de IFN- $\gamma$ , mas não altera a capacidade de resposta T CD8<sup>+</sup>.

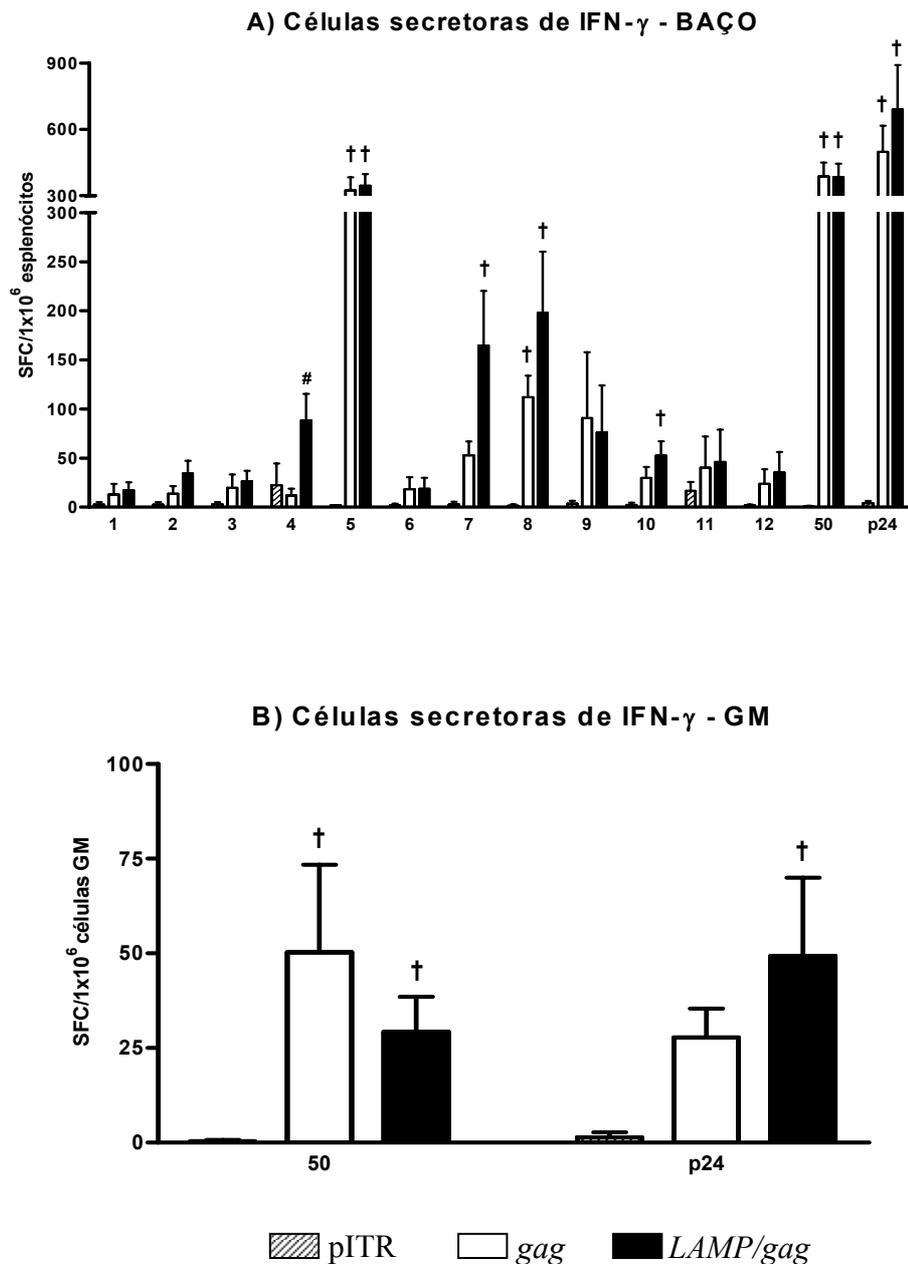
Para avaliação de células secretoras de IFN- $\gamma$  dos GM dos animais imunizados por via IN/ID foi utilizado apenas o estímulo do peptídeo imunodominante (50) e a proteína p24 devido à reduzida quantidade de células neste sítio. A Fig. 9 B mostra que o número de SFC de IFN- $\gamma$  de células dos GM que respondem a estes estímulos é semelhante para o grupo

---

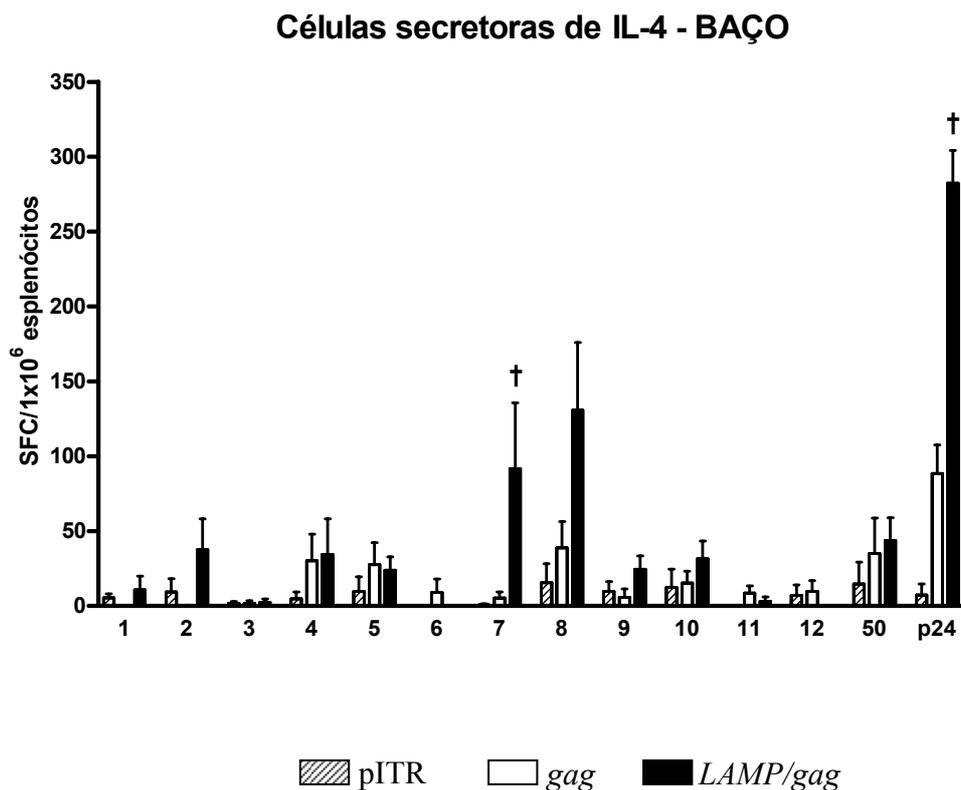
*LAMP/gag* e *gag*, como observado nas células esplênicas. Entretanto, a frequência de SFC de IFN- $\gamma$  nos GM foi aproximadamente 10 vezes menor do que o detectado no baço.

O número de SFC de IL-4 mostrou que apenas os animais imunizados com a vacina quimérica foram capazes de reconhecer *pools* de peptídeos da GAG (7 e 8) quando comparado com os animais imunizados com a vacina *gag*. Além disso, um elevado número de esplenócitos secretores de IL-4 foi identificado nos animais imunizados com *LAMP/gag* quando estimulados com p24 (Fig. 10). Nos GM não foram detectadas respostas aos estímulos com peptídeo imunodominante de classe I e à p24, onde foi observado um número abaixo de 20 SFC de IL-4.

É interessante destacar que os *pools* que apresentaram maior frequência de células secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 são os que compreendem a proteína p24 do HIV (Anexo B).



**Figura 9. Perfil de resposta de IFN- $\gamma$  dos esplenócitos e das células dos GM aos pep-tídeos da GAG de camundongos neonatos imunizados com as vacinas de DNA.** Camundongos neonatos foram imunizados pelas vias IN/ID com as vacinas gênicas e a obtenção das células foi realizada 7 dias após a última dose IN. A análise de SFC de IFN- $\gamma$  foi realizada por ELISPOT. **A:** células do baço secretoras de IFN- $\gamma$  aos *pools* de peptídeos da proteína GAG e à p24. **B:** células do GM secretoras de IFN- $\gamma$  ao peptídeo imunodominante de classe I (50) da proteína GAG e à p24. A barra ilustra a média e erro padrão do número de SFC obtido por cada estímulo subtraída do número de SFC sem estímulo de 4 (controle) e 10 (*gag* e *LAMP/gag*) experimentos com *pools* de células de 2-3 animais por experimento. †  $P \leq 0.05$  comparado com animal pITR. #  $P \leq 0.05$  comparado com animal imunizado com a vacina *gag*.



**Figura 10.** Perfil de resposta de IL-4 dos esplenócitos aos peptídeos da GAG de camundongos neonatos imunizados com as vacinas de DNA. Camundongos neonatos foram imunizados pelas vias IN/ID com as vacinas gênicas e a obtenção das células foi realizada 7 dias após a última dose in. A análise de células secretoras de IL-4 aos *pools* de peptídeos da proteína GAG ao peptídeo imunodominante de classe I (50) da proteína GAG e à p24 foi realizada por ELISPOT. A barra ilustra a média e erro padrão do número de SFC obtido por cada estímulo subtraída do número de SFC sem estímulo de 4 experimentos com *pools* de células de 2-3 animais por experimento. †  $P \leq 0.05$  comparado com animal pITR.

---

#### 4.9 Produção de citocinas a peptídeos de classe I e II da proteína GAG

Os níveis das citocinas IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL-10, IL-6, IL-4, IL-5 e IL-2 foram determinados em sobrenadante de culturas com esplenócitos e de células do GALT estimuladas por 72 horas com o *pool* contendo o peptídeo imunodominante de classe I (5° *pool*) ou *pool* de peptídeo de classe II (7° *pool*) por citometria de fluxo, usando *Cytometric Bead Array (CBA) - mouse inflammation kit e mouse Th1/Th2 kit*.

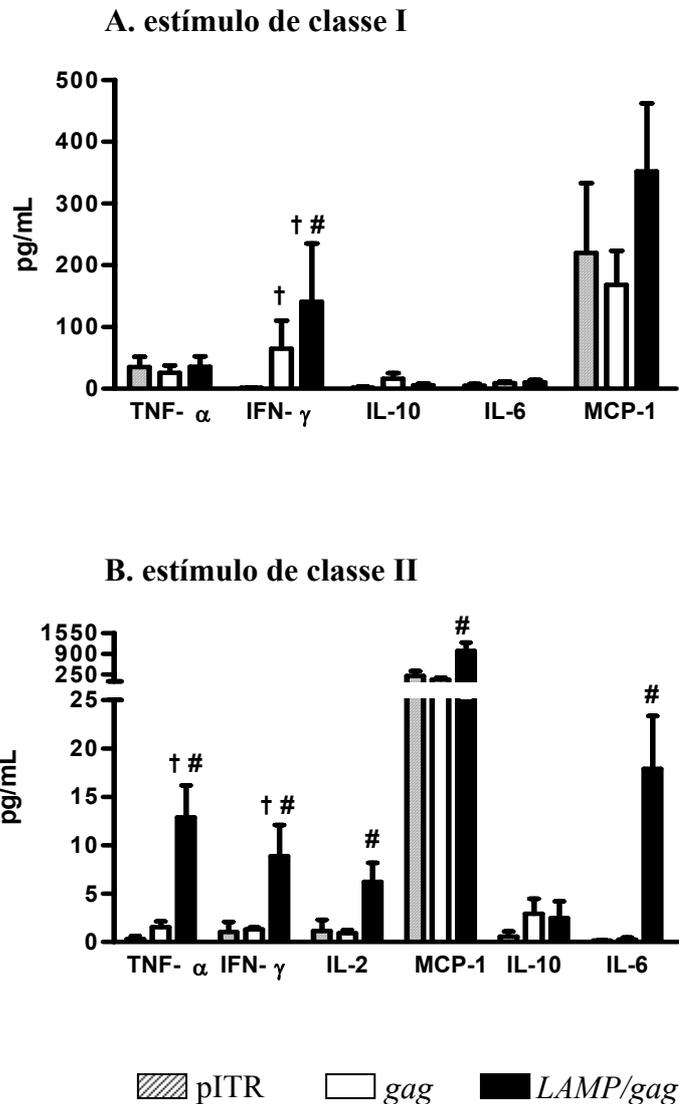
As citocinas IL-12p70, IL-4 e IL-5 não foram detectáveis no sobrenadante de cultura de esplenócitos, por isto não foram mostradas nos gráficos.

A Fig.11 A mostra que a imunização com a vacina quimérica induz maior secreção de IFN- $\gamma$  quando comparado com animais imunizados com a vacina *gag*. O estímulo com peptídeo de classe I, induziu a secreção preferencial de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e MCP-1, sendo que para esta quimiocina, os níveis foram similares e elevados em todos os grupos.

Chama atenção que para o estímulo com os peptídeos de classe II houve produção de citocinas apenas por esplenócitos de animais imunizados com a vacina quimérica (Fig.11B). Aumento significativo de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, MCP-1 e IL-6 após estímulo com peptídeos de classe II foi observado com a vacina quimérica quando comparado com os animais imunizados com *gag* ou controle pITR, exceto para IL-10.

Os níveis de todas as citocinas analisadas no sobrenadante das células do GM ficaram abaixo do limite de detecção para ambos os estímulos utilizados.

Em conjunto, os resultados mostram que há maior capacidade de secreção de IFN- $\gamma$  sob estímulo com peptídeo de classe I pelas células do animal imunizado com a vacina quimérica, embora os mesmos apresentem número equivalente de células secretoras de IFN- $\gamma$  por ELISPOT. Além disto, a produção de citocinas em resposta aos peptídeos de classe II mostra que há maior amplitude de ativação das células T CD4+ anti-GAG, sintetizando citocinas necessárias para o desenvolvimento de resposta Th1 mais eficiente. Para o estímulo com o peptídeo de classe I, em contraste para o observado com a classe II, o vetor por si só estimulou a produção de TNF- $\alpha$  e de MCP-1.



**Figura 11. Produção de citocinas *in vitro* aos peptídeos de classe I ou II da GAG por esplenócitos de camundongos imunizados com as vacinas gênicas.** Camundongos foram imunizados no período neonatal com as vacinas gênicas pelas vias IN/ID e analisados 7 dias após administração da última dose das vacinas. Os esplenócitos destes camundongos ( $4 \times 10^5$  células/poço) foram cultivados por 72 horas com  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  dos *pools* contendo peptídeo de classe I (A) ou II (B). O sobrenadante foi analisado quanto à presença de citocinas por citometria de fluxo. O resultado representa a média e erro padrão da diferença entre os níveis das citocinas secretadas após estimulação e a produção espontânea. Os valores são representativos de 3 animais controle e 5-10 imunizados com *gag* ou *LAMP/gag*. †  $P \leq 0.05$  comparado com animal pITR. #  $P \leq 0.05$  comparado com animal imunizado com a vacina *gag*.

---

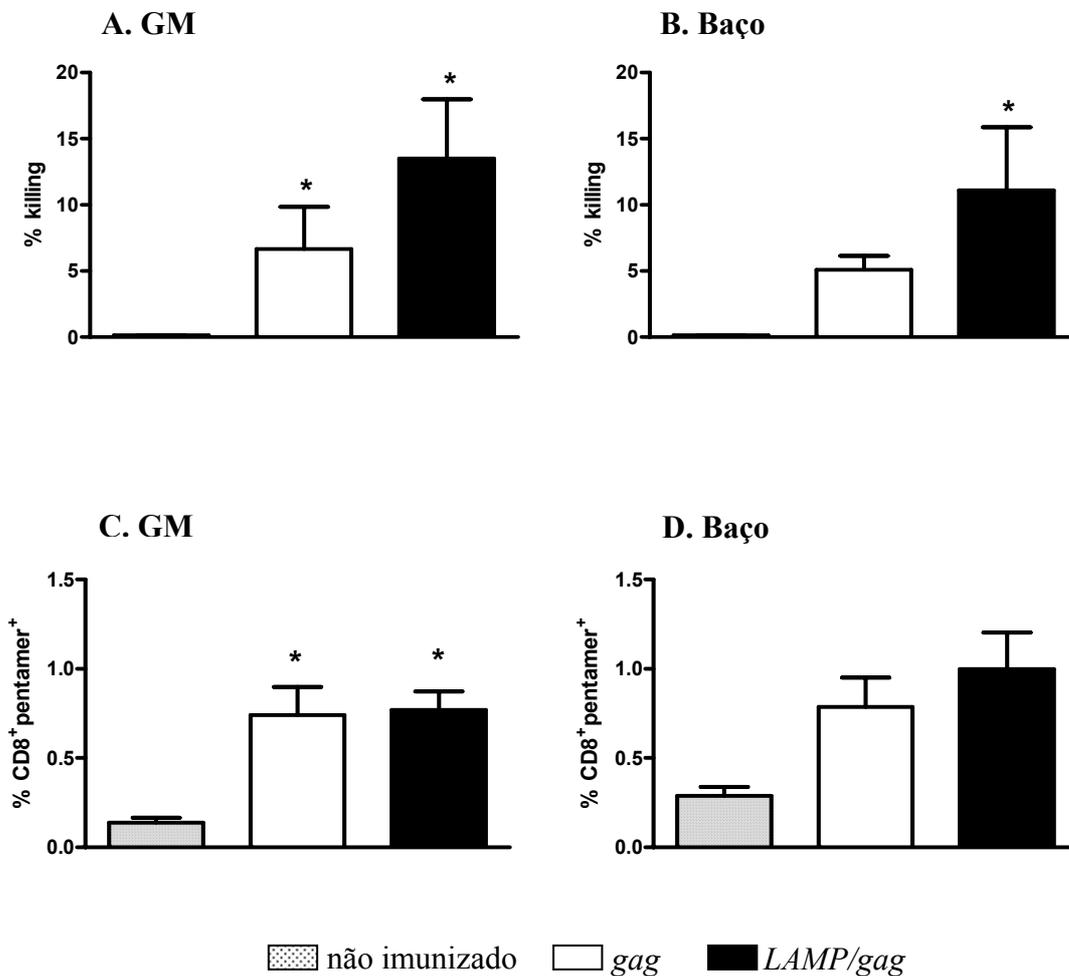
#### 4.10 Avaliação da resposta T CD8+ anti-GAG dos GM e baço em neonatos imunizados com as vacinas *gag* e *LAMP/gag*

A resposta de células T CD8+ antígeno-específicas de camundongos imunizados por via IN/ID com as vacinas de DNA foi avaliada por ensaio CTL *in vivo* e pela frequência de células T CD8+pentâmero+ específicas ao peptídeo imunodominante de classe I da GAG por citometria de fluxo.

A Fig. 12 A mostra que a atividade citotóxica das células T contra células-alvo pulsadas com peptídeo imunodominante de classe I foi detectada no baço de ambos os grupos imunizados. Já nos GM, pode-se evidenciar resposta T citotóxica contra as células-alvo mais elevada nos animais imunizados com a vacina quimérica em relação ao grupo controle (Fig. 12 B).

Além disto, a frequência de células T CD8+pentâmero+ específicas ao peptídeo imunodominante de classe I da GAG aumentou significativamente em ambos as vacinas no GM (Fig. 12 D) de animais imunizados, enquanto que no baço não houve alteração na percentagem de células quando comparados com animais não imunizados. O percentual de células T CD8+ antígeno-específico foi similar entre as imunizações com *LAMP/gag* ou *gag*.

Os resultados evidenciam que as vacinas de DNA são capazes de gerar resposta CTL ao peptídeo imunodominante de classe I da GAG em ambos os compartimentos, GM e baço. Estes achados confirmam os dados observados nas células T secretoras de IFN- $\gamma$  aos peptídeos de classe I da GAG que ambas as vacinas possuem capacidade semelhante no desenvolvimento da resposta T CD8+.



**Figura 12. Resposta citotóxica anti-GAG no GALT e baço de camundongos imunizados com as vacinas de DNA no período neonatal.** Camundongos foram imunizados no período neonatal com as vacinas gênicas pelas vias IN/ID. Sete dias após administração da última dose in os animais receberam duas injeções IP contendo peptídeo imunodominante de classe I, AMQMLKETI, em adjuvante. **A e B:** células-alvo foram marcadas com duas concentrações diferentes de CFSE e as células CFSE alta foram pulsadas com peptídeo AMQ MLKETI. As células-alvo foram injetadas via IV em animais imunizados e não imunizados. Após 18 horas, as células dos GM e baço foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo para avaliar porcentagem de lise *in vivo* das células pulsadas com peptídeos. **C e D:** esplenócitos e células dos GM foram coletadas e as células T CD8<sup>+</sup> H-2K<sup>d</sup>/AMQMLKETI foram analisadas por citometria de fluxo. Os dados representam a média e erro padrão obtidos a partir de 4-8 animais/grupo. \*  $P \leq 0.05$  comparado com animal não imunizado.

---

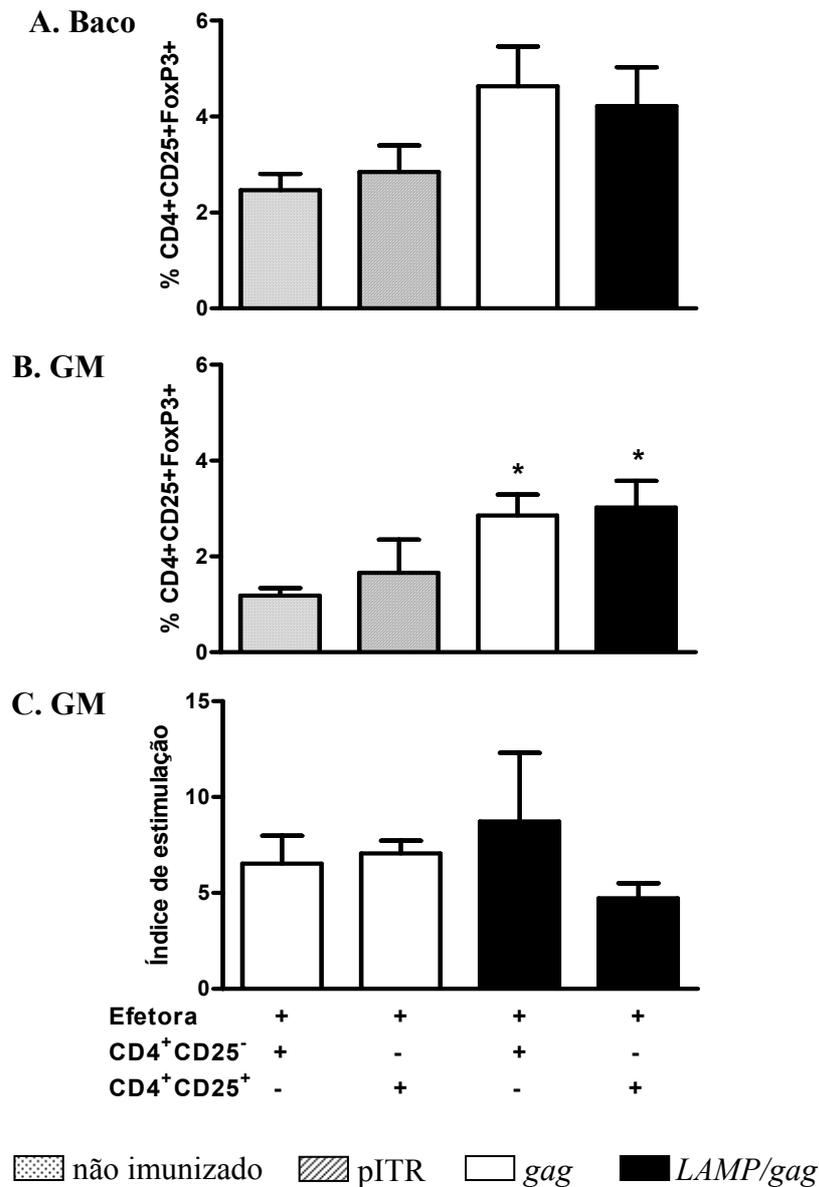
#### 4.11 Geração de células T CD4+CD25+FoxP3+

Após termos observado aumento da concentração de TGF- $\beta$ 1 no lavado intestinal de animais imunizados quando comparado com animais não imunizados (Fig. 5), passamos a analisar as células T reguladoras nos GM, uma vez que esta citocina está relacionada com a diferenciação de células T CD4+ em células T CD4+CD25+FoxP3+. O percentual de células TCD4+CD25+FoxP3+ no baço e GM de camundongos imunizados por via IN/ID com as vacinas de DNA foi avaliado por citometria de fluxo. A porcentagem desta população foi determinada após aquisição de 10.000 eventos dentro da região de células T CD4+.

Na Fig. 13 A observamos que não houve diferença no percentual de células TCD4+CD25+FoxP3+ no baço dos animais não imunizados e imunizados. Entretanto, no GM, houve aumento da percentagem de células T CD4+CD25+FoxP3+ dos animais imunizados com as vacinas de DNA *gag* e *LAMP/gag* em relação aos animais não imunizados (Fig. 13 B). Os resultados com grupo controle (pITR) mostrou que esse aumento das células CD4+CD25+FoxP3+ é um efeito gerado pelas vacinas *gag* e *LAMP/gag* inoculadas via IN e não um efeito causado pelo vetor.

O próximo passo foi analisar a capacidade regulatória das células T CD4+CD25+FoxP3+ dos GM na resposta efetora anti-GAG. Para isso, as células T CD4+CD25+ e TCD4+CD25- dos GM dos animais imunizados com as vacinas *gag* ou *LAMP/gag* foram purificadas e cocultivadas com esplenócitos de camundongos BALB/c adultos imunizados com a proteína p55 em adjuvante por via IP (células efetoras), na presença da proteína p55 por 96 horas. A Fig. 13 C mostra que as células T CD4+CD25+ dos animais imunizados com as vacinas de DNA não interferiram na resposta Ag-específica das células efetoras.

Os resultados mostram que ambas as vacinas de DNA são capazes de estimular a geração de células TCD4+CD25+FoxP3+, especialmente nos GM, sem alterar no controle da resposta das células efetoras antígeno-específicas.



**Figura 13. Geração de células T CD4+CD25+Foxp3+ nos GM e baço de camundongos imunizados com as vacinas de DNA no período neonatal.** Camundongos foram imunizados pelas vias IN/ID com as vacinas gênicas e a obtenção das células foi realizada 7 dias após a última dose IN. **A e B:** a análise de células T CD4+CD25+FoxP3+ foi realizada após aquisição de 10.000 eventos dentro da região de células T CD4+ por citometria de fluxo. Os dados representam a média e erro padrão obtidos a partir de 6-9 animais/grupo. **C:** cocultura realizada com células T CD4+CD25+ ou T CD4+CD25- dos GM e esplenócitos (células efetoras) de animais imunizados com p55 do HIV-1 numa proporção 1:5 na presença de 1 µg/ mL de p55 por 72 horas antes da adição de <sup>3</sup>H-timidina. Os dados representam média e erro padrão obtidos a partir de 3 animais por grupo de 3 experimentos diferentes. \*  $P \leq 0.05$  comparado com animal não imunizado.

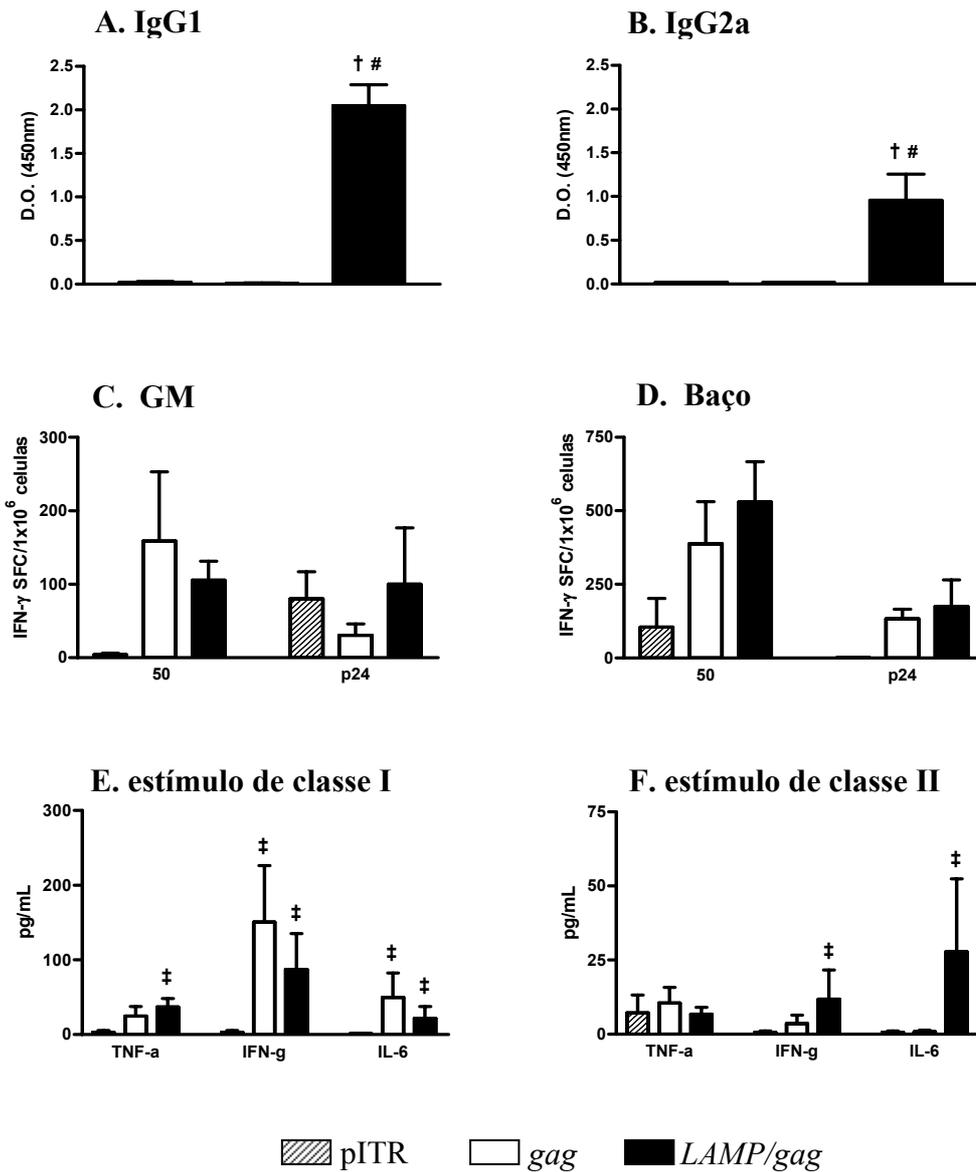
---

#### 4.12 Resposta imune de longa duração após imunização neonatal com as vacinas de DNA

Após investigação da imunogenicidade da vacina em mucosa de camundongos que tiveram imunização iniciada em período neonatal, nós passamos a observar a se esta resposta duraria até a fase adulta. Após 8 meses da primeira dose da vacina, os animais receberam reforço pelas vias IN/ID e avaliamos a resposta humoral através da formação de anticorpos antígeno-específicos e resposta celular dos GM e baço.

A Fig. 14 A e B mostra que níveis séricos elevados de anticorpos IgG só foram detectados em animais imunizados com a vacina quimérica, com maiores níveis de IgG1 do que IgG2a anti-p24. A frequência de SFC de IFN- $\gamma$  dos GM e baço foi similar entre os grupos analisados, tanto para p24 (Fig. 14 C) como para o estímulo de classe I (peptídeo 50 - Fig. 14 D).

A síntese de citocinas após estímulo com peptídeo apresentado no contexto das moléculas de classe I do MHC confirma a produção similar de IFN- $\gamma$  e IL-6 entre os grupos *LAMP/gag* e *gag*. Novamente, o estímulo com peptídeo no contexto de moléculas de classe II do MHC, induz a produção de citocinas apenas nos animais imunizados com a vacina quimérica (Fig. 14 E e F).



**Figura 14. Estratégia de imunização com vacinas de DNA induz resposta imune de longa duração.** Camundongos foram imunizados pelas vias IN/ID com as vacinas gênicas e oito meses após a primeira dose, os animais receberam um reforço pelas vias IN/ID. As células dos GM e baço foram coletadas 7 dias após a última dose IN/ID. **A e B:** anticorpos IgG1 (1:1350) e IgG2a (1:1350) anti-p24 foram avaliados por ELISA. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão de 6-8 animais por grupo. **C e D:** SFC de IFN- $\gamma$  dos GM e baço, respectivamente, ao peptídeo 50 e à p24 foram avaliados por ELISPOT. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão de 2-3 animais por grupo de 4 experimento. **E e F:** os esplenócitos foram cultivados por 72 horas com 10  $\mu$ g/mL do *pool* de peptídeo contendo estímulo de classe I ou II. O sobrenadante foi analisado quanto à presença de citocinas por citometria de fluxo. O resultado representa a média e erro padrão da diferença entre os níveis das citocinas secretadas após estimulação e a produção espontânea. Os valores são representativos de 6 animais por grupo. †  $P \leq 0.05$  comparado com animal pITR. #  $P \leq 0.05$  comparado com animal imunizado com a vacina gag.

---

#### 4.13 Determinação de citocinas no lavado gastrintestinal e dos níveis séricos de anticorpos de camundongos imunizados por via IN/ID com as vacinas gênicas associadas ao adjuvante ODN CpG

Após observações dos dados obtidos até esta etapa, foi associado o ODN CpG A na primeira dose das vacinas por via IN com intuito de estimular o desenvolvimento da resposta inata, uma vez que o reconhecimento do CpG pelas pDCs induz ativação e maturação, aumento da expressão de moléculas do MHC de classe II, de CD80 e CD86 e aumento da produção de IFN do tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) (Dumais *et al.*, 2002; Guzykack-Piriou *et al.*, 2004), que podem influenciar o desenvolvimento da imunidade mediada por células, incluindo linfócitos T citotóxicos. Os níveis de TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\alpha$  no lavado intestinal dos camundongos imunizados com as vacinas gênicas pelas vias IN/ID foram determinados por ELISA.

Na Fig. 15, podemos observar que a associação do ODN CpG A à primeira dose das vacinas por via IN causou diminuição significativa dos níveis de TGF- $\beta$ 1 no lavado intestinal dos camundongos quando comparado com grupos que receberam apenas as vacinas. Essa alteração dos níveis de TGF- $\beta$ 1 não foi observada nos animais controles, ou seja, aqueles que foram vacinados com pITR associado ao ODN CpG A. Os animais que receberam o adjuvante associado à vacina quimérica tiveram seus níveis de TGF- $\beta$ 1 semelhante aos animais não imunizados, em contraste com animais imunizados com a vacina *gag*, que mantiveram níveis mais elevados que os animais não imunizados.

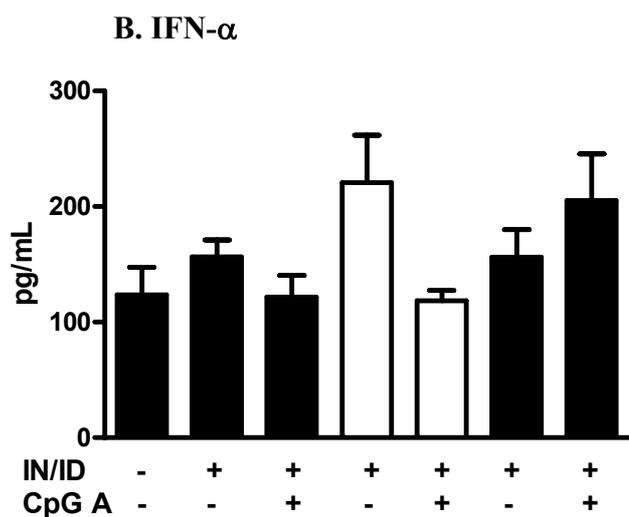
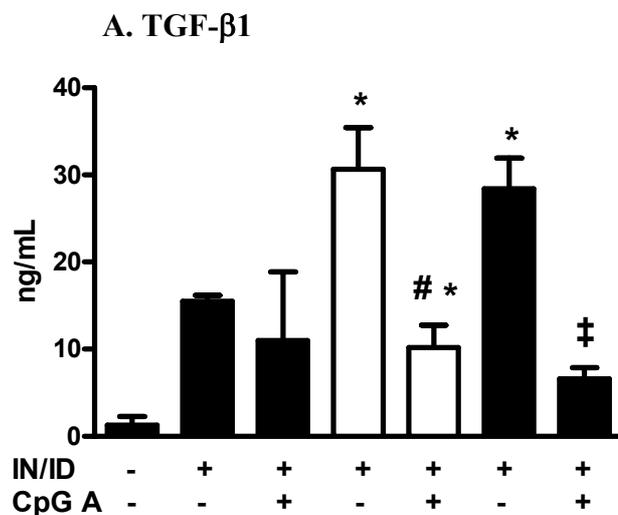
Já a associação do CpG A às vacinas não alterou a síntese de IFN- $\alpha$ , embora este ODN CpG possua a característica de ativar pDCs, que são as principais secretoras de IFN- $\alpha$ . (Dumais *et al.*, 2002; Guzykack-Piriou *et al.*, 2004)

Embora a administração do ODN CpG A tenha sido feita apenas na primeira dose e por via IN, o perfil de produção de anticorpos IgG anti-p24 foi avaliado no soro de camundongos neonatos imunizados com as vacinas de DNA. A reatividade dos anticorpos IgG1 e IgG2a à p24 no soro de camundongos vacinados foi determinada por ELISA.

A Fig. 16 mostra que a associação do ODN CpG A com a vacina quimérica não altera o perfil de produção de anticorpos IgG1 anti-p24, mas reduz a síntese de anticorpos IgG2a anti-p24, embora essa diminuição não seja estatisticamente significativa. O ODN CpG A também não influenciou na resposta humoral nos animais imunizados com a vacina *gag*.

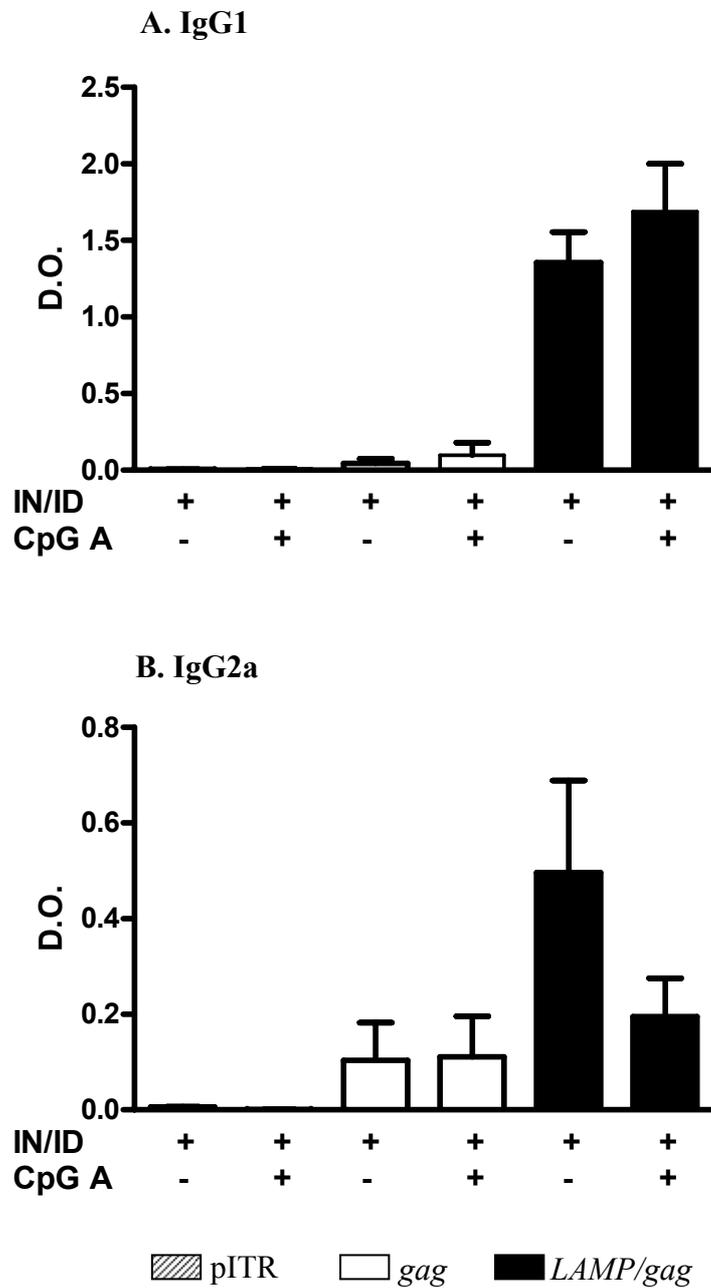
---

Estes resultados mostram que o ODN CpG A, na imunização neonatal, interfere mais na mucosa intestinal, considerando a inibição da produção de TGF- $\beta$ 1 mediada pelas vacinas gênicas, embora mantenha íntegra a secreção de IFN do tipo I, mas não interfere nos níveis de anticorpos séricos.



não imunizado
  pITR
  gag
  LAMP/gag

**Figura 15. Efeito da associação do ODN CpG A às vacinas de DNA na concentração de TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\alpha$  no lavado intestinal dos animais imunizados.** Camundongos foram imunizados pelas vias IN/ID com as vacinas gênicas, sendo que a primeira dose IN foi associado o ODN CpG A às vacinas e a obtenção do lavado intestinal foi realizado 7 dias após a última dose IN. As concentrações de TFG- $\beta$ 1 e IFN- $\alpha$  foram determinadas por ELISA. Os dados representam a média e erro padrão obtidas de 5-9 animais/grupo. \*  $P \leq 0.05$  comparado com animal não imunizado. #  $P \leq 0.05$  comparado com animal imunizado com a vacina gag. ‡  $P \leq 0.05$  comparado com animal imunizado com a vacina LAMP/gag



**Figura 16. Efeito do ODN CpG A na imunização neonatal com as vacinas de DNA na produção de anticorpos IgG anti-p24 sérico.** Camundongos foram imunizados pelas vias IN/ID com as vacinas gênicas, sendo que a primeira dose IN foi associado o ODN CpG A. As amostras de soro foram coletadas 7 dias após última dose IN e analisadas por ELISA. Os dados representam a média e erro padrão obtidos a partir de 8-10 animais/grupo. Diluição 1:1350.

---

#### 4.14 Avaliação da frequência de células secretoras de IFN- $\gamma$ e IL-4 anti-GAG em neonatos imunizados com as vacinas de DNA associadas ao ODN CpG A

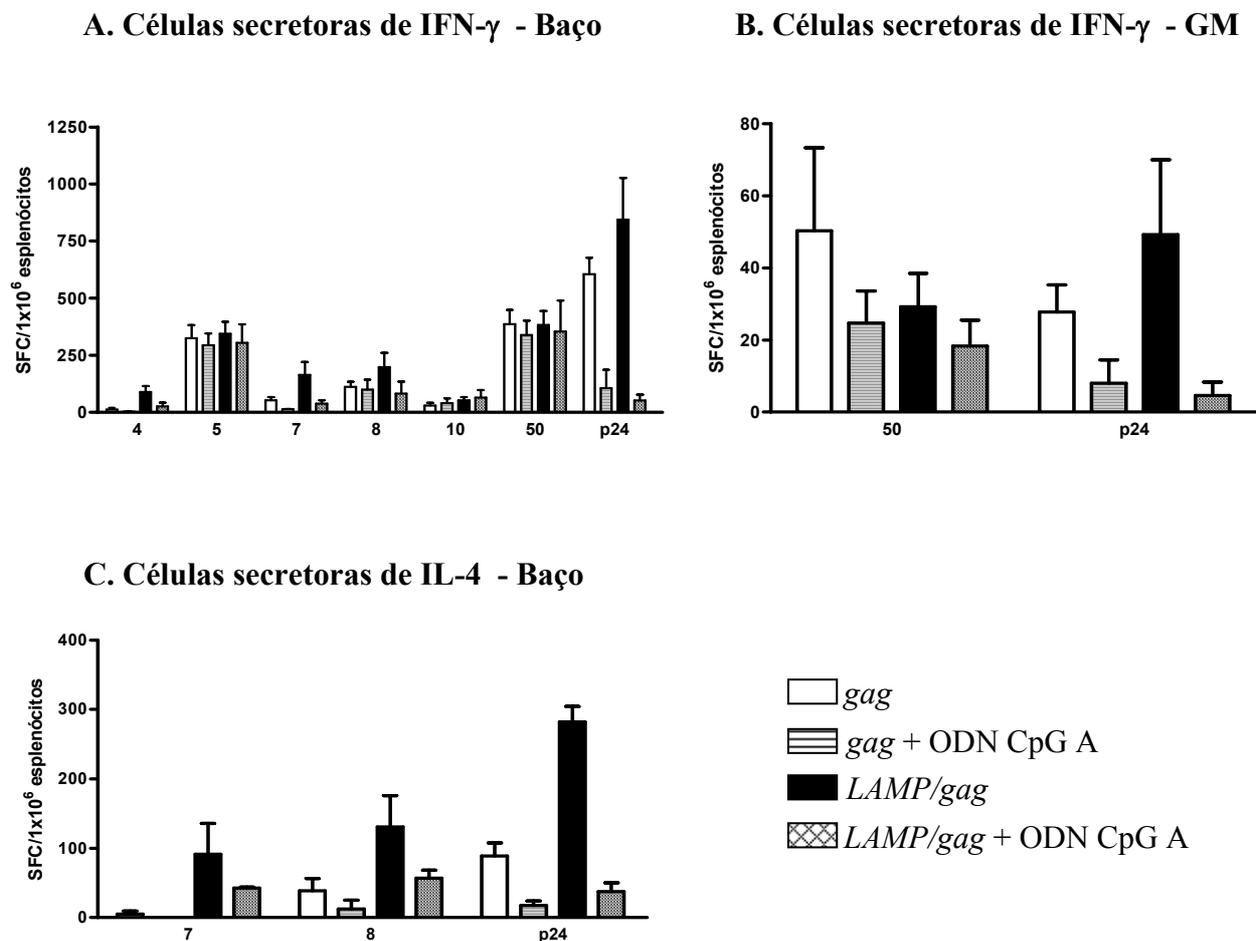
O próximo passo foi avaliar o efeito do adjuvante do ODN CpG A sobre a resposta imune celular pela avaliação do número de esplenócitos e de células do GM secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 em resposta à estímulos com *pools* de peptídeos da proteína GAG do HIV-1 e a proteína p24 pela técnica de ELISPOT.

A resposta foi considerada positiva quando o SFC foi superior a 10 SFC/1 x 10<sup>6</sup> células para IFN- $\gamma$  e 20 SFC/1 x 10<sup>6</sup> para IL-4 (*cut-off*). As figuras representam apenas os *pools* de peptídeos que induziram resposta imune celular nos animais imunizados com as vacinas gênicas.

A Fig. 17 A mostra que o ODN CpG A não interferiu no reconhecimento dos *pools* que contêm peptídeos que são apresentados para células T CD8+ no contexto de moléculas de classe I do MHC tanto nos animais imunizados com a vacina *LAMP/gag* como *gag*. Por outro lado, os resultados mostram que há diminuição da frequência de esplenócitos secretores de IFN- $\gamma$  dos *pools* que contêm epítomos de classe II. Esse efeito é mais pronunciado na resposta a p24 tanto nos animais imunizados com a vacina quimérica como *gag*.

Similarmente, a Fig. 17 B mostra que no GM, a resposta de células T CD8+ não é alterada com a associação do ODN CpG as vacinas, mas a resposta das células T CD4+ à proteína p24 é drasticamente reduzida. A ausência de diferença estatística é provavelmente devido ao baixo número de experimentos realizados para cada grupo.

A Figura 17 C mostra que apenas os animais imunizados com a vacina quimérica foram capazes de reconhecer os *pools* de peptídeos da GAG (7 e 8) quando comparado com os animais imunizados com a vacina *gag*, assim a diminuição da frequência de SFC de IL-4 ocorreu somente nestes animais. Embora sem diferença estatisticamente significativa, houve uma diminuição do número de esplenócitos secretores de IL-4 nos animais imunizados com *LAMP/gag* quando estimulados com p24 (Fig. 17 C).



**Figura 17. Influência do ODN CpG A na imunização neonatal com as vacinas de DNA na resposta de IFN- $\gamma$  e de IL-4 aos peptídeos da GAG.** Camundongos foram imunizados pelas vias IN/ID com as vacinas gênicas, sendo que a primeira dose IN foi associado o ODN CpG A e a obtenção das células foi realizada 7 dias após a última dose IN. A análise de células secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 foi realizada por ELISPOT. **A:** células do baço secretoras de IFN- $\gamma$  aos grupos de peptídeos da proteína GAG e à p24. **B:** células dos GM secretoras de IFN- $\gamma$  ao peptídeo imunodominante de classe I (50) da proteína GAG e à p24. **C:** células secretoras de IL-4 aos grupos de peptídeos da proteína GAG e à p24. A barra ilustra a média e erro padrão do número de SFC obtido por cada estímulo subtraída do número de SFC para IFN- $\gamma$  sem estímulo de 4 (controle) e 10 (*gag* e *LAMP/gag*) experimentos com grupos de células de 2-3 animais/experimento e para IL-4, 4 experimentos com grupos de células de 2-3 animais/experimento.

---

#### 4.15 Perfil de produção de citocinas a peptídeos de classe I e II da proteína GAG de camundongos imunizados com as vacinas de DNA pelo ODN CpG A

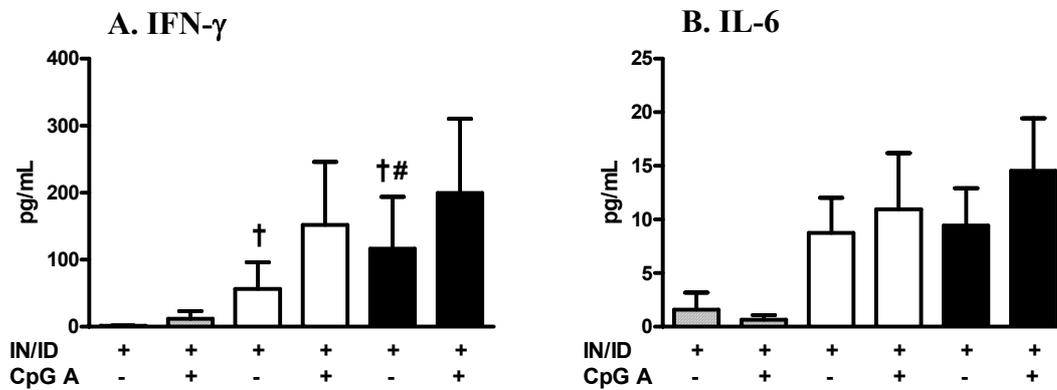
Os níveis das citocinas IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL-10, IL-6, IL-4, IL-5 e IL-2 foram determinados em sobrenadante de culturas com esplenócitos e de células do GALT estimuladas por 72 horas com o *pool* contendo o peptídeo imunodominante de classe I ou peptídeo de classe II por citometria de fluxo. Foram mostrados apenas os dados dos animais imunizados que apresentaram alteração na secreção de citocinas em relação ao grupo controle (estímulo de classe I ou de classe II).

A Fig.18 A e B mostra que a imunização com a vacina associada ao ODN CpG A não interferiu na secreção de citocinas quando as células foram estimuladas com peptídeo de classe I, o que pode ser observado pela secreção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-6.

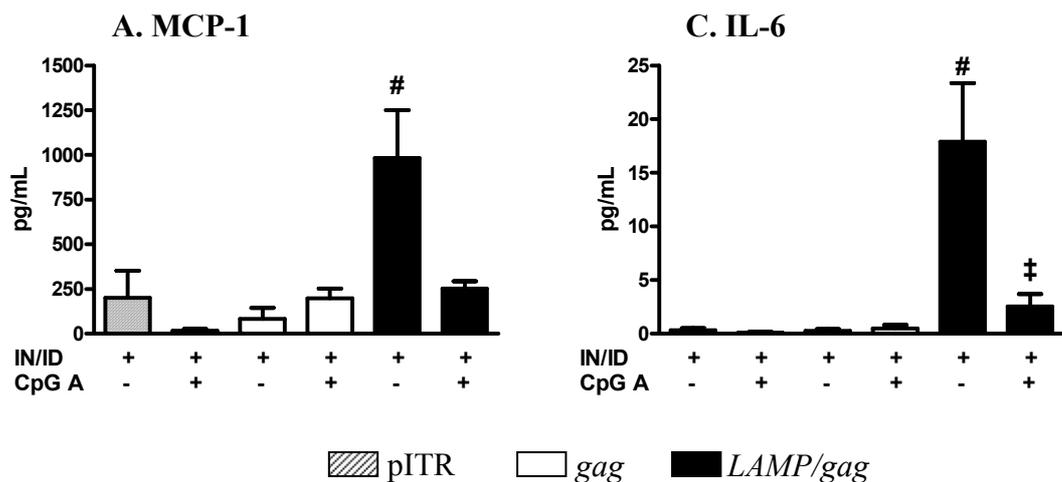
Entretanto, para o estímulo com os peptídeos de classe II foi evidenciada diminuição da secreção das citocinas MCP-1 e IL-6 pelos esplenócitos de animais imunizados com a vacina quimérica associada ao adjuvante (Fig.18 C e D), uma que vez apenas a vacina *LAMP/gag* induziu secreção de citocinas pelos esplenócitos após estímulo com peptídeos de classe II.

Em conjunto, com os dados obtidos a partir da análise por ELISPOT, os resultados mostram que o adjuvante ODN CPG A regula a resposta imune para a proteína p24 e para os peptídeos apresentados no contexto de moléculas de classe II do MHC, seja pelas células T *helper* como pelas células da imunidade inata secretoras de MCP-1 e IL-6.

### Estímulo de classe I



### Estímulo de classe II



**Figura 18.** Efeito do ODN CpG A na imunização com as vacinas de DNA na secreção de citocinas *in vitro* aos peptídeos de classe I ou II da GAG. Camundongos foram imunizados pelas vias IN/ID com as vacinas gênicas, sendo que a primeira dose IN foi associado o ODN CpG A e a obtenção das células foi realizada 7 dias após a última dose IN. Os esplenócitos destes camundongos ( $4 \times 10^5$  células/poço) foram cultivados por 72 horas com  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  do *pool* contendo peptídeo de classe I (5) ou II (7). O sobrenadante foi analisado quanto à presença de citocinas por citometria de fluxo. O resultado representa a média e erro padrão da diferença entre os níveis das citocinas secretadas após estimulação e a produção espontânea. Os valores são representativos de 3 animais controle e 5-10 imunizados com *gag* ou *LAMP/gag*. †  $P \leq 0.05$  comparado com animal pITR. #  $P \leq 0.05$  comparado com animal imunizado com a vacina *gag*. ‡  $P \leq 0.05$  comparado com animal imunizado com a vacina *LAMP/gag*

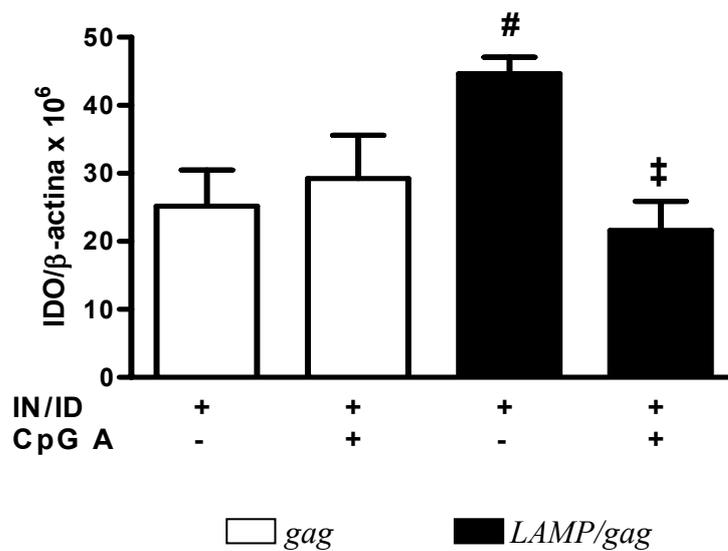
---

#### 4.16 Expressão relativa do gene IDO pelas células dos GM de animais imunizados com as vacinas gênicas associadas ao ODN CpG A

O adjuvante ODN CpG A é descrito na literatura por ativar as pDCs (Dumais *et al.*, 2002; Guzykack-Piriou *et al.*, 2004; Hartmann *et al.*, 2005) e estas por sua vez quando estimuladas podem secretar maiores quantidades da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), capaz de degradar o aminoácido essencial triptofano, exercendo assim efeito regulatório na resposta imune (Fallarino *et al.*, 2007). Como observamos intensa regulação na ativação celular mediado por CpG, resolvemos avaliar se esta diminuição da resposta imune celular poderia ser reflexo do aumento da secreção de IDO por células dos GM. A avaliação da expressão do gene IDO e o controle  $\beta$ -actina foi realizado através de PCR em tempo real com células provenientes dos GM dos animais imunizados com as vacinas gênicas.

A Fig. 19 mostra a expressão relativa do gene IDO nas células dos GM dos animais imunizados com as vacinas *gag* ou *LAMP/gag* associadas ou não ao ODN CpG A. A imunização com a vacina quimérica induz maior expressão de mRNA de IDO pelas células do GM quando comparado com animais imunizados com a vacina *gag*. Por outro lado, ao contrário do que esperávamos, houve diminuição significativa da expressão de IDO pelas células dos GM dos animais imunizados com a vacina *LAMP/gag* associada ao adjuvante, sendo que o mesmo efeito não foi observado nos animais imunizados com a vacina *gag*.

Esses resultados indicam que a regulação da resposta imune das células T *helper* mediado pelo adjuvante são potentes para inibir a expressão de proteínas reguladoras como IDO e de fatores como TGF- $\beta$ , capazes de atenuar a resposta imune como também induzir tolerância. Desta forma, adjuvantes podem ser controladores de inflamação bem como de tolerância.



**Figura 19.** Efeito do adjuvante ODN CpG A na imunização neonatal com as vacinas de DNA na expressão relativa do gene IDO em células do GM. Camundongos foram imunizados pelas vias IN/ID com as vacinas gênicas, sendo que a primeira dose IN foi ou não associado o ODN CpG A e a obtenção das células foi realizada 7 dias após a última dose IN. A análise da expressão do gene IDO foi realizada por PCR tempo real. O resultado da expressão relativa foi obtido através da divisão da expressão do gene IDO pelo controle interno  $\beta$ -actina e o valor multiplicado por  $10^6$ . Os dados representam a média e erro padrão obtidas de 3-5 animais/grupo. #  $P \leq 0.05$  comparado com animal imunizado com a vacina *gag*. ‡  $P \leq 0.05$  comparado com animal imunizado com a vacina *LAMP/gag*.

*Discussão*

---

## 5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de vacinas imunogênicas em mucosas é essencial na prevenção da infecção pelo HIV, já que as mucosas do trato gastrintestinal e vaginal são consideradas as principais vias de entrada para o HIV e reservatório viral (Mehandru *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005; Grossman *et al.*, 2006). A indução de resposta vacinal nas mucosas em fase precoce de vida é um desafio devido a alta suscetibilidade à tolerância, tornando cruciais os estudos vacinais utilizando modelos experimentais com propósito de estabelecer resposta de mucosa e sistêmica precoce capaz de perdurar até a fase adulta.

Antes de iniciar a imunização dos animais com as vacinas gênicas, foi verificada a capacidade de síntese da proteína GAG pelos plasmídeos *gag* e *LAMP/gag* por transfecção de células da linhagem 293. Qualitativamente foi observada intensa síntese da proteína de 200 kDa pelas células transfectadas com plasmídeo quimérico *LAMP/gag* comparada com a síntese das proteínas de 55 kDa obtidas após transfecção com o plasmídeo *gag*. De fato, foi descrito que a quantidade de p24 do HIV produzida por células 293 transfectadas com *gag* e *LAMP/gag* é de 500 e 2200 pg/ mL de proteína, respectivamente (Arruda *et al.*, 2004).

As seqüências flanqueadoras ITR invertidas do vírus adeno-associado possibilitam a expressão de GAG de modo independente da expressão do Rev do HIV-1 (Chikhlikar *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2003). Além disto, expressão da proteína GAG do HIV-1 é limitada na ausência da proteína REV do HIV-1 devido a seqüências de mRNA inibitórias que agem *in cis* (Maldarelli *et al.*, 1991), sendo assim, a presença da seqüência LAMP aumenta a síntese de proteínas codificadas pelo plasmídeo quimérico (Marques *et al.*, 2003). É possível que a expressão mais intensa da proteína GAG na transfecção *in vitro* com o plasmídeo quimérico pode ser um dos mecanismos que contribuem para uma maior imunogenicidade *in vivo*. Contudo, o fato da proteína LAMP possibilitar o direcionamento do tráfego da proteína GAG aos compartimentos MIIC, a apresentação com moléculas de classe II do MHC e ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> são atributos que favorecem a resposta humoral/celular pela vacina quimérica em relação à vacina *gag*.

Para averiguar a imunogenicidade da imunização de camundongos BALB/c no período neonatal, os animais receberam a primeira dose aos sete dias de idade considerando que esta fase em murinos é correspondente ao estágio de imaturidade imunológica encontrada nos recém-nascidos humanos (Siegrist, 2001). Primeiramente foi necessário determinar a dose necessária das vacinas que induzisse resposta imune e que não fosse tolerogênica na mucosa

---

intestinal. Para isso, várias concentrações e número de doses das vacinais foram avaliadas pela capacidade de induzir anticorpos anti-GAG após imunização por via IN. Os achados mostram que a produção de anticorpos sIgA e IgG anti-GAG dos camundongos vacinados foi mais pronunciada com três doses de 20 µg da vacina quimérica *LAMP/gag*. Embora ainda seja desconhecido o papel dos anticorpos IgG anti-GAG produzidos em mucosas na infecção pelo HIV, talvez ele possam participar nos processos de lise celular por citotoxicidade celular dependente de anticorpos de células infectadas na mucosa, uma vez que foi observado que as células T CD4+ infectadas com o SIV expressam epítomos da proteína GAG associados às moléculas de classe I do MHC duas horas após infecção, antes mesmo da integração do DNA proviral (Sacha *et al.*, 2007).

Enquanto que a imunização IN neonatal com *LAMP/gag* induziu a síntese tanto de anticorpos sIgA e IgG anti-GAG na mucosa intestinal em relação aos animais imunizados não imunizados, nos camundongos adultos foi observado apenas a produção de anticorpos IgG anti-GAG. Os camundongos neonatos desenvolvem preferencialmente uma resposta Th2 (Brito *et al.*, 2009), que pode ter contribuído, em parte, para a síntese de sIgA. A mudança de isótipo para IgA pelos linfócitos B do GALT, depende de TGF-β, IL-6 e IL-10 secretadas pelas células do estroma das placas de Peyer (Fagarasan *et al.*, 2004). O TGF-β pode ser produzido por linfócitos, células epiteliais do intestino e macrófagos (Faria *et al.*, 2006), estimula a síntese de anticorpos IgA, além de possuir ampla atuação regulatória capaz de inibir a proliferação e ativação dos linfócitos e de macrófagos e diminuir a produção de IgG, IgM e IgE (Ohtsuka *et al.*, 2000). As células Th3 são produtoras desta citocina regulatória, além de IL-10, ambas importantes na manutenção da homeostase no GALT (Veldman *et al.*, 2006).

A presença de TGF-β no lavado intestinal aumentou intensamente com as vacinas de DNA nos animais neonatos, o que refletiu na elevação da concentração total de sIgA. Curiosamente, aumento na secreção de anticorpos sIgA anti-GAG e da concentração de IgG total no lavado intestinal foi detectado somente nos animais imunizados com a vacina quimérica, o que sugere ativa participação de outros fatores como quimiocinas e citocinas que favorecem a mudança de isótipo para IgG. Além disto, a diferença nas classes de anticorpos produzidos por animais vacinados no período neonatal ou adulto pode ser devido ao diferente estágio de maturação do GALT.

---

A imunização realizada somente por via IN em fase neonatal ou adulta com ambas as vacinas gênicas não foi capaz de induzir a produção de anticorpos anti-GAG séricos. A ausência de resposta humoral sistêmica, pode ser devido a característica do próprio plasmídeo pITR ou por ser plasmídeo *naked*, ou seja, o fato de não possuir nenhuma estrutura protetora pode aumentar a suscetibilidade para degradação. Geralmente os protocolos que utilizam plasmídeos na imunização de camundongos fazem uso de adjuvantes ou proteínas recombinantes devido à baixa resposta sistêmica gerada após imunização apenas por via IN. Por outro lado, a aplicação das vacinas de DNA por outras vias com vetor viral é capaz de gerar resposta CTL de maior afinidade em mucosa e sistêmica (Belyakov *et al.*, 2008). Construções gênicas com adenovírus recombinante (Souza *et al.*, 2007) têm demonstrado imunogenicidade em ambos os compartimentos, mucosas e órgãos linfóides periféricos em camundongos.

Em nosso estudo para induzir simultaneamente imunidade em mucosa e sistêmica nos animais imunizados durante período neonatal, foi associado às instilações nasais injeções intradérmicas das vacinas de DNA (IN/ID). Em decorrência da imunização ID, a vacina *LAMP/gag* estimulou a produção sérica de anticorpos IgG anti-p24, com predominância da subclasse IgG1, seguido de IgG2a. A cinética de produção de anticorpos mostrou que os animais imunizados com a vacina quimérica começam a produzir anticorpos IgG1 anti-p24 apenas com a primeira dose aos 7 dias de idade e os níveis de anticorpos aumentam a cada dose. Por outro lado, os animais imunizados com *LAMP/gag* começam a produzir níveis significantes de IgG2a anti-p24 apenas após as três doses da vacina. Estes dados são coerentes com dados anteriormente descritos, que mostraram que duas doses da vacina quimérica por via ID são necessárias para indução de anticorpos IgG2a em camundongos neonatos (Rigato, 2009). Estes dados evidenciam a capacidade do plasmídeo *LAMP/gag* em induzir resposta Th1/Th2 nos animais imunizados durante a fase neonatal, como mostrado o perfil misto de secreção de IL-4 e IFN- $\gamma$  com a proteína GAG em camundongos adultos (Arruda *et al.*, 2006). Considerando o perfil imunogênico obtido com o protocolo IN/ID, prosseguimos as análises com esse protocolo de imunização.

A imunogenicidade da vacina *LAMP/gag* foi verificada pela amplitude no reconhecimento de número de *pools* de peptídeos da proteína GAG e pela frequência de células esplênicas secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 comparado com a vacina *gag*. Este aumento foi devido ao reconhecimento de *pools* contendo peptídeos apresentados no contexto de

---

moléculas de classe II do MHC. A ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos animais imunizados com *LAMP/gag* pode também ser avaliada pelo aumento da secreção de IL-4 e intensidade de resposta à proteína p24 do HIV. A adequada ativação das células T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicas é vital para o desenvolvimento de resposta imunológica vigorosa, indução de resposta de células T CD8<sup>+</sup> e de linfócitos B e na geração de células de memória. A proteína GAG é uma das mais conservadas entre os diversos grupos e subtipos de HIV, sendo, portanto, a geração de células capazes de reconhecer epítomos desta proteína aspectos considerados positivos na vacinação anti-HIV. É interessante uma vacina induzir amplo reconhecimento de epítomos do antígeno, pois com a possibilidade de mutação de algum epítomo, o sistema imune ainda será capaz de identificar o antígeno pelo reconhecimento dos outros epítomos.

Os resultados obtidos nos GM chamam atenção, pois foi observado um perfil de resposta de células secretoras de IFN- $\gamma$  semelhante ao evidenciado no baço, embora com menor frequência de SFC. É provável que no período avaliado, sete dias após a última instilação IN, tenha ocorrido a migração das células dos GM para outros sítios de mucosa, como a lâmina própria. Além disto, vacinação por via IN pode ter gerado um aumento no número de células secretoras de IL-4 nos GM, como observado pelos níveis basais nos animais vacinados, favorecendo a ativação das células Th2, predominantes no sítio de mucosa.

Outra evidência de que na imunização com a vacina quimérica há maior ativação de células T CD4<sup>+</sup>, foi observada pela secreção de citocinas ao peptídeo de classe II como TNF- $\alpha$ , MCP-1, IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-6 e o número de SFC de IFN- $\gamma$  e IL-4, os quais foram detectáveis somente nos animais imunizados *LAMP/gag*. A IL-2 é fundamental na proliferação de células Th, sendo o IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  importante na diferenciação de células Th1 e a IL-6 na geração de plasmócitos.

Por outro lado, foi similar o nível de secreção de citocinas estimulados com *pools* contendo peptídeo imunodominante de classe I, principalmente de TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IFN- $\gamma$  e para o número de SFC para IFN- $\gamma$  ao peptídeo imunodominante. Embora tenha sido semelhante entre os grupos de animais imunizados, conforme observado no ELISPOT, uma maior capacidade de secreção de IFN- $\gamma$  foi observado com a vacina *LAMP/gag*. A vacina quimérica em camundongos adultos imunizados por via intradérmica mostra um aumento na amplitude e magnitude da resposta aos peptídeos de classe I e de resposta T CD8<sup>+</sup> em relação

---

aos camundongos imunizados com a vacina *gag* (Marques *et al.*, 2003; Arruda *et al.*, 2004). O fato de verificarmos uma resposta similar de IFN- $\gamma$  aos estímulos de classe I com ambas as vacinas gênicas nos neonatos sugere que a associação da via IN com a ID pode ter propiciado um controle na geração de resposta Th1, ou seja, interferido no aumento de células produtoras de IFN- $\gamma$ . Além disto, as três doses da vacina *gag* podem ter potencializado a resposta T CD8<sup>+</sup> alcançando níveis similares ao da vacina *LAMP/gag*.

Esses dados indicam que tanto a vacina *gag* como *LAMP/gag* são igualmente capazes de ativar células T CD8<sup>+</sup>, enquanto que apenas a vacina ativa adequadamente as células T CD4<sup>+</sup>. Esses resultados destacam mais uma vez o papel da proteína LAMP na ativação de células T CD4<sup>+</sup> no período neonatal, com conseqüente ativação da resposta imune mediada tanto por células T CD8<sup>+</sup> como T CD4<sup>+</sup>.

Apesar de ter sido identificado freqüência de SFC de IFN- $\gamma$  das células dos GM, a produção de citocinas em sobrenadantes de cultura de células estimuladas *in vitro* com os *pools* de peptídeos, não foi detectável, provavelmente, seria necessário um maior número de células dos GM na cultura celular para a detecção das citocinas.

A resposta de memória imunológica gerada pelas vacinas nos camundongos, foi avaliada após 8 meses da primeira dose das vacinas, revelando um perfil semelhante na resposta primária quanto a freqüência de células secretoras de IFN- $\gamma$ , produção de anticorpos e secreção de citocinas. Como verificado aos 38 dias de idade, a imunização com *gag* apenas induziu resposta células T CD8<sup>+</sup> e somente os animais imunizados com *LAMP/gag* mostraram resposta de células T CD4<sup>+</sup> de memória.

O efeito das vacinas de DNA na resposta T CD8<sup>+</sup> citotóxica foi avaliado quanto à porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> específicas para o peptídeo imunodominante de classe I e funcionalmente pela atividade CTL *in vivo* nos GM e baço dos animais imunizados. Apesar de ampla freqüência de células secretoras e magnitude no reconhecimento dos *pools* de peptídeos da GAG com a vacina quimérica, isto não parece ter influenciado a resposta T CD8<sup>+</sup>, seja no percentual de células T antígenos específicos (pentâmero positivo) como na função CTL, os quais mantiveram similares à vacina *gag* nos GM. Nossos resultados contrastam com os achados de camundongos adultos imunizados com a vacina quimérica por via ID, que apresentaram resposta T citotóxica 4-5 vezes maior do que os animais imunizados com a vacina *gag* (Marques *et al.*, 2003; Arruda *et al.*, 2004). Novamente, os dados sugerem que a administração por via da mucosa nasal, modulou a resposta no compartimento de

---

mucosa gastrointestinal, um ambiente predominantemente Th2 que pode ter equilibrado a ativação de células Th1, pois estas contribuem na geração de um microambiente inflamatório. Assim, a ativação das células dos GM induzida pela vacina quimérica pode ter gerado um controle da resposta CTL, não ultrapassando os níveis induzidos pela vacina *gag*. Além disto, foi analisada somente a resposta citotóxica ao peptídeo imunodominante de classe I, que já havia se mostrado similar quanto à frequência de células secretoras de IFN- $\gamma$ .

O GALT é um ambiente que necessita de intensa regulação da resposta imune, devido os constantes estímulos gerados pelos alimentos e microorganismos da microbiota. Este sítio de mucosa é enriquecido de células Th3 e Tr1, secretoras de TGF- $\beta$  e IL-10, respectivamente (Allez *et al.*, 2004; Mills *et al.*, 2004). A citocina TGF- $\beta$  é potencialmente regulatória e está relacionada com a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> em células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Treg) (Mold *et al.*, 2008). De fato, no lavado intestinal dos animais imunizados foi detectado um intenso aumento da concentração de TGF- $\beta$ 1 comparado aos animais não imunizados. Para avaliar se este fator poderia influenciar na geração das Treg, foi avaliado o número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nos GM e baço dos camundongos. Ambas as vacinas induziram um aumento da frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nos GM em relação ao animal não imunizado. Entretanto, não foi possível observar regulação da resposta antígeno-específica das células efectoras. Talvez seja necessário maior número de experimentos para podermos concluir se o aumento da frequência de Treg geradas pelas vacinas de DNA possui potencial regulatório. Essa capacidade regulatória seria importante para evitar que haja ativação excessiva na mucosa intestinal ocasionada pela vacinação e um possível controle do desenvolvimento de resposta auto-imune. As células Treg podem ser antígeno-específicas e atuam no controle da imunidade (Suffia *et al.*, 2006). O aumento no número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> foi devido à imunização com as vacinas gênicas e não pelo vetor. Estudos utilizando combinação de vacina de DNA e proteína OVA para imunização por mucosa nasal de camundongos evidenciaram indução de células Treg antígeno-específicas e proteção contra asma experimental (Kang *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2008). Da mesma forma, em outro modelo de uso da via intranasal com vacina de DNA contendo gene da proinsulina mostrou ser capaz de induzir a formação de células Treg protetoras no baço dos camundongos (Every *et al.*, 2006). É importante destacar que são escassos os trabalhos sobre o uso de vacinas de DNA por via IN e conseqüente geração de células Treg nos sítios de mucosa.

---

As células dendríticas plasmocitoides (pDCs) são um subtipo de DCs especializadas que possuem papel na imunidade antiviral e produzem até 1000 vezes mais IFN- $\alpha$  que outras células em resposta a exposição viral (Grouard *et al.*, 1997; Siegal *et al.*, 1999). Essas células podem ser ativadas por RNA (retrovírus) ou DNA viral através dos TLR 7 e 9, respectivamente, e, então, secretar grandes quantidades de IFN- $\alpha$ , que por sua vez exibe papel inibitório *in vitro* da replicação do HIV-1 (Yamamoto *et al.*, 1986).

Devido a esse caráter protetor do IFN- $\alpha$ , o ODN CpG tipo A, que é agonista de TLR9 e ativa preferencialmente pDCs foi associado às vacinas de DNA com intuito também de potencializar a resposta inata e, assim, potencializar a resposta imune dos animais imunizados. Entretanto, a associação do ODN CpG A às vacinas diminuiu a resposta vacinal dos animais imunizados, especialmente a resposta das células T CD4+, mantendo inalterada a resposta de células T CD8+, ou seja houve inibição da resposta aos peptídeos de classe II, mas sem interferir na resposta mediada aos peptídeos de classe I.

O uso do adjuvante induziu intensa inibição dos níveis de TGF- $\beta$  no lavado intestinal sem alterar nos níveis de IFN- $\alpha$ , possivelmente pela ação do CpG. A modulação mediada pelo adjuvante quando administrado por via intranasal pode ter estimulado a produção de fatores regulatórios, entre eles a via do catabolismo de triptofano, iniciada pela enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), que representa um mecanismo de tolerância periférica, crítica em promover a resposta imune protetora, pelo balanço entre inflamação e tolerância (Fallarino *et al.*, 2007). Assim, foi analisado a expressão de IDO nas células dos GM dos camundongos vacinados que receberam CpG.

A imunização com a vacina quimérica induz maior expressão de mRNA de IDO nas células dos GM dos camundongos e a associação ao ODN CpG A reduziu a expressão de IDO. Esses dados mostram que a vacina quimérica induz importante alteração nos GM dos animais e que além de gerar maior produção de anticorpos, também estimula a expressão de IDO que está envolvido na indução de células T reguladoras (Chen *et al.*, 2008) e que pode ser regulado pelo CpG. Este adjuvante vacinal, o CpG, pode induzir a expressão da molécula inibitória *programmed death ligand-1* (PD-L1) (Kool *et al.*, 2009), que por sua vez pode estar participando na regulação da resposta. A alta expressão de PD-L1 em pDCs está associada à tolerância periférica e pode exibir papel imunorregulador na mucosa brônquica (Habicht *et al.*, 2007; Tokita *et al.*, 2008; Kool *et al.*, 2009).

---

O IFN- $\alpha$  produzido por pDCs estimuladas pelo HIV estimulam a expressão da molécula *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) em monócitos (Herbeuval *et al.*, 2005). Além disto, células T CD4<sup>+</sup> e não T CD8<sup>+</sup> de indivíduos não infectados com HIV expressam níveis elevados das moléculas TRAIL, *TRAIL death receptor 5* (DR5) e caspase 3 ativada após cultura com HIV-1 infectante ou não, resultando em apoptose preferencial dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Herbeuval *et al.*, 2005). Embora Herbeuval *et al.* (2005) tenha mostrado que essa interação era dependente da ligação da célula TCD4<sup>+</sup> e a gp 120 do HIV. É possível que este mecanismo pode ter sido induzido pelo CpG na imunização dos animais, pois todas as respostas dependentes de células T CD4<sup>+</sup> (ELISPOT, secreção de citocinas) estavam reduzidas nos camundongos neonatos imunizados com as vacinas de DNA em associação com CpG A. Este efeito inibitório, refletiu nos níveis de anticorpos anti-p24 IgG1 e IgG2a dos camundongos imunizados com a vacina quimérica

Em conjunto, a imunização por via in/id com as vacinas gênicas durante a fase neonatal é capaz de gerar resposta imunológica de longa duração em mucosa e órgãos linfóides periféricos. Diferentemente da vacina *gag*, que ativa preferencialmente células T CD8<sup>+</sup> por apresentarem epítomos através de moléculas de classe I do MHC, a porção LAMP da proteína quimérica tem papel importante no desenvolvimento de resposta imune de mucosa e sistêmica anti-GAG por induzir ativação de células T CD4<sup>+</sup>. Este processo foi essencial para a imunogenicidade em fase neonatal, aumentando a síntese de anticorpos, ampliando o número de reconhecimento dos *pools* de peptídeos da GAG e da p24 e secreção de citocinas aos peptídeos de classe II. A presença de células Treg e a expressão da enzima IDO são componentes essenciais na regulação da resposta induzida pela imunização com as vacinas no período neonatal. Apesar da vacina gênica *gag* ser capaz de estimular o desenvolvimento de resposta celular aos epítomos de classe I, a vacina quimérica é mais atrativa para imunização neonatal, sendo a única capaz de estimular o desenvolvimento de resposta imune de mucosa e sistêmica tanto humoral como celular à proteína e aos peptídeos de classe I e II da GAG.

***Conclusões***

---

## 6 CONCLUSÕES

- As vacinas são imunogênicas em camundongos durante fase neonatal, sendo que a vacina quimérica *LAMP/gag* é capaz de induzir maior amplitude de resposta celular anti-GAG e humoral com duração de até oito meses de idade;
- A proteína LAMP é essencial para a ativação das células T CD4+, possibilitando o reconhecimento dos peptídeos de classe II da proteína GAG e da proteína p24, e a síntese de anticorpos na imunização com *LAMP/gag* sem interferir na magnitude da resposta TCD8+ e no percentual de células T CD4+CD25+FoxP3+;
- O adjuvante ODN CpG A na imunização com as vacinas gênicas regulou negativamente a resposta mediada pelas células T CD4+, incluindo a expressão da molécula reguladora IDO, por um mecanismo de controle da resposta reguladora;
- A imunização com quimérica *LAMP/gag* em camundongos no período neonatal traz uma importante estratégia para indução de resposta imune em ambos os sítios de mucosa e sistêmico.

# *Referências*

---

## REFERÊNCIAS\*

- Adkins B, Bu Y, Guevara P. The generation of Th memory in neonates versus adults: prolonged primary Th2 effector function and impaired development of Th1 memory effector function in murine neonates. *J Immunol*. 2001 Jan 15;166(2):918-25.
- Adkins B, Du RQ. Newborn mice develop balanced Th1/Th2 primary effector responses in vivo but are biased to Th2 secondary responses. *J Immunol*. 1998 May 1;160(9):4217-24.
- Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):553-64.
- Adkins B, Williamson T, Guevara P, Bu Y. Murine neonatal lymphocytes show rapid early cell cycle entry and cell division. *J Immunol*. 2003 May 1;170(9):4548-56.
- Adkins B. Heterogeneity in the CD4 T Cell Compartment and the Variability of Neonatal Immune Responsiveness. *Curr Immunol Rev*. 2007 Aug;3(3):151-9.
- Adkins B. T-cell function in newborn mice and humans. *Immunol Today*. 1999 Jul;20(7):330-5.
- Aggarwal P, Pandey RM, Seth P. Augmentation of HIV-1 subtype C vaccine constructs induced immune response in mice by CpG motif 1826-ODN. *Viral Immunol*. 2005;18(1):213-23.
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. 1996 Jun 28;272(5270):1955-8.
- Allez M, Mayer L. Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis*. 2004 Sep;10(5):666-76.
- Arrode G, Hegde R, Mani A, Jin Y, Chebloune Y, Narayan O. Phenotypic and functional analysis of immune CD8+ T cell responses induced by a single injection of a HIV DNA vaccine in mice. *J Immunol*. 2007 Feb 15;178(4):2318-27.
- Arruda LB, Chikhlikar PR, August JT, Marques ET. DNA vaccine encoding human immunodeficiency virus-1 Gag, targeted to the major histocompatibility complex II compartment by lysosomal-associated membrane protein, elicits enhanced long-term memory response. *Immunology*. 2004 May;112(1):126-33.

---

\* **De acordo com:**

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: Sample References. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

---

---

Arruda LB, Sim D, Chikhlikar PR, Maciel M Jr, Akasaki K, August JT, et al. Dendritic cell-lysosomal-associated membrane protein (LAMP) and LAMP-1-HIV-1 gag chimeras have distinct cellular trafficking pathways and prime T and B cell responses to a diverse repertoire of epitopes. *J Immunol*. 2006 Aug 15;177(4):2265-75.

Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, Wei D, et al. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol*. 2008 Mar;9(3):301-9.

Arulanandam BP, O'Toole M, Metzger DW. Intranasal interleukin-12 is a powerful adjuvant for protective mucosal immunity. *J Infect Dis*. 1999 Oct;180(4):940-9.

Bao S, Beagley KW, Murray AM, Caristo V, Matthaehi KI, Young IG, et al. Intestinal IgA plasma cells of the B1 lineage are IL-5 dependent. *Immunology*. 1998 Jun;94(2):181-8.

Barrios C, Brandt C, Berney M, Lambert PH, Siegrist CA. Partial correction of the TH2/TH1 imbalance in neonatal murine responses to vaccine antigens through selective adjuvant effects. *Eur J Immunol*. 1996 Nov;26(11):2666-70.

Bauer S, Wagner H. Bacterial CpG-DNA licenses TLR9. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2002;270:145-54.

Belyakov IM, Ahlers JD, Nabel GJ, Moss B, Berzofsky JA. Generation of functionally active HIV-1 specific CD8+ CTL in intestinal mucosa following mucosal, systemic or mixed prime-boost immunization. *Virology*. 2008 Nov 10;381(1):106-15.

Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:657-700.

Betts MR, Exley B, Price DA, Bansal A, Camacho ZT, Teaberry V, et al. Characterization of functional and phenotypic changes in anti-Gag vaccine-induced T cell responses and their role in protection after HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 22;102(12):4512-7.

Blanche S. [Developmental profile of HIV infection in children]. *Rev Prat*. 1990 Jan 11;40(2):124-6.

Bot A, Antohi S, Bot S, Garcia-Sastre A, Bona C. Induction of humoral and cellular immunity against influenza virus by immunization of newborn mice with a plasmid bearing a hemagglutinin gene. *Int Immunol*. 1997 Nov;9(11):1641-50.

Bot A, Bona C. Genetic immunization of neonates. *Microbes Infect*. 2002 Apr;4(4):511-20.

Bot A, Bot S, Garcia-Sastre A, Bona C. Protective cellular immunity against influenza virus induced by plasmid inoculation of newborn mice. *Dev Immunol*. 1998;5(3):197-210.

---

Brazolot Millan CL, Weeratna R, Krieg AM, Siegrist CA, Davis HL. CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 22;95(26):15553-8.

Brito CA, Goldoni AL, Sato MN. Immune adjuvants in early life: targeting the innate immune system to overcome impaired adaptive response. *Immunotherapy*. 2009; 1(5): 883-95.

Chen CH, Wang TL, Hung CF, Pardoll DM, Wu TC. Boosting with recombinant vaccinia increases HPV-16 E7-specific T cell precursor frequencies of HPV-16 E7-expressing DNA vaccines. *Vaccine*. 2000 Apr 3;18(19):2015-22.

Chen W, Liang X, Peterson AJ, Munn DH, Blazar BR. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol*. 2008 Oct 15;181(8):5396-404.

Chikhlikar P, Barros de Arruda L, Agrawal S, Byrne B, Guggino W, August JT, et al. Inverted terminal repeat sequences of adeno-associated virus enhance the antibody and CD8(+) responses to a HIV-1 p55Gag/LAMP DNA vaccine chimera. *Virology*. 2004 Jun 1;323(2):220-32.

Chikhlikar P, de Arruda LB, Maciel M, Silvera P, Lewis MG, August JT, et al. DNA encoding an HIV-1 Gag/human lysosome-associated membrane protein-1 chimera elicits a broad cellular and humoral immune response in Rhesus macaques. *PLoS One*. 2006;1:e135.

Coban C, Ishii KJ, Gursel M, Klinman DM, Kumar N. Effect of plasmid backbone modification by different human CpG motifs on the immunogenicity of DNA vaccine vectors. *J Leukoc Biol*. 2005 Sep;78(3):647-55.

Cooper D, Wright KJ, Calderon PC, Guo M, Nasar F, Johnson JE, et al. Attenuation of recombinant vesicular stomatitis virus-human immunodeficiency virus type 1 vaccine vectors by gene translocations and g gene truncation reduces neurovirulence and enhances immunogenicity in mice. *J Virol*. 2008 Jan;82(1):207-19.

Dadaglio G, Sun CM, Lo-Man R, Siegrist CA, Leclerc C. Efficient in vivo priming of specific cytotoxic T cell responses by neonatal dendritic cells. *J Immunol*. 2002 Mar 1;168(5):2219-24.

Dale CJ, De Rose R, Wilson KM, Croom HA, Thomson S, Coupar BE, et al. Evaluation in macaques of HIV-1 DNA vaccines containing primate CpG motifs and fowlpoxvirus vaccines co-expressing IFN $\gamma$  or IL-12. *Vaccine*. 2004 Nov 25;23(2):188-97.

Dalglish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984 Dec 20-1985 Jan 2;312(5996):763-7.

Davey RT Jr, Bhat N, Yoder C, Chun TW, Metcalf JA, Dewar R, et al. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 21;96(26):15109-14.

---

de Witte L, Bobardt M, Chatterji U, Degeest G, David G, Geijtenbeek TB, et al. Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 4;104(49):19464-9.

Dumais N, Patrick A, Moss RB, Davis HL, Rosenthal KL. Mucosal immunization with inactivated human immunodeficiency virus plus CpG oligodeoxynucleotides induces genital immune responses and protection against intravaginal challenge. *J Infect Dis*. 2002 Oct 15;186(8):1098-105.

Estcourt MJ, McMichael AJ, Hanke T. DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1. *Immunol Rev*. 2004 Jun;199:144-55.

Every AL, Kramer DR, Mannering SI, Lew AM, Harrison LC. Intranasal vaccination with proinsulin DNA induces regulatory CD4+ T cells that prevent experimental autoimmune diabetes. *J Immunol*. 2006 Apr 15;176(8):4608-15.

Fagarasan S, Honjo T. Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces. *Curr Opin Immunol*. 2004 Jun;16(3):277-83.

Fallarino F, Gizzi S, Mosci P, Grohmann U, Puccetti P. Tryptophan catabolism in IDO+ plasmacytoid dendritic cells. *Curr Drug Metab*. 2007 Apr;8(3):209-16.

Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2006 Sep;5(3):179-90.

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996 May 10;272(5263):872-7.

Fischer M, Ehlers M. Toll-like receptors in autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Nov;1143:21-34.

Fukata M, Abreu MT. Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies. *Oncogene*. 2008 Jan 7;27(2):234-43.

Gallichan WS, Woolstencroft RN, Guarasci T, McCluskie MJ, Davis HL, Rosenthal KL. Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus-2 in the genital tract. *J Immunol*. 2001 Mar 1;166(5):3451-7.

Garmory HS, Perkins SD, Phillpotts RJ, Titball RW. DNA vaccines for biodefence. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005 Jun 17;57(9):1343-61.

Garzino-Demo A, Gallo RC. HIV receptors on lymphocytes. *Curr Opin Hematol*. 2003 Jul;10(4):279-83.

---

Geffin R, Wolf D, Muller R, Hill MD, Stellwag E, Freitag M, et al. Functional and structural defects in HIV type 1 nef genes derived from pediatric long-term survivors. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000 Nov 20;16(17):1855-68.

Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2003;276:31-54.

Gelman AE, Zhang J, Choi Y, Turka LA. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J Immunol*. 2004 May 15;172(10):6065-73.

Giri M, Ugen KE, Weiner DB. DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1 in the past decade. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Apr;17(2):370-89.

Goulder PJ, Pasquier C, Holmes EC, Liang B, Tang Y, Izopet J, et al. Mother-to-child transmission of HIV infection and CTL escape through HLA-A2-SLYNTVATL epitope sequence variation. *Immunol Lett*. 2001 Nov 1;79(1-2):109-16.

Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med*. 2006 Mar;12(3):289-95.

Grouard G, Clark EA. Role of dendritic and follicular dendritic cells in HIV infection and pathogenesis. *Curr Opin Immunol*. 1997 Aug;9(4):563-7.

Guarnieri FG, Arterburn LM, Penno MB, Cha Y, August JT. The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *J Biol Chem*. 1993 Jan 25;268(3):1941-6.

Guzylack-Piriou L, Balmelli C, McCullough KC, Summerfield A. Type-A CpG oligonucleotides activate exclusively porcine natural interferon-producing cells to secrete interferon-alpha, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12. *Immunology*. 2004 May;112(1):28-37.

Habicht A, Kewalaramani R, Vu MD, Demirci G, Blazar BR, Sayegh MH, et al. Striking dichotomy of PD-L1 and PD-L2 pathways in regulating alloreactive CD4(+) and CD8(+) T cells in vivo. *Am J Transplant*. 2007 Dec;7(12):2683-92.

Hartmann G, Marschner A, Viveros PR, Stahl-Hennig C, Eisenblatter M, Suh YS, et al. CpG oligonucleotides induce strong humoral but only weak CD4+ T cell responses to protein antigens in rhesus macaques in vivo. *Vaccine*. 2005 May 9;23(25):3310-7.

Herbeuval JP, Boasso A, Grivel JC, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood*. 2005 Mar 15;105(6):2458-64.

Herbeuval JP, Grivel JC, Boasso A, Hardy AW, Chougnet C, Dolan MJ, et al. CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood*. 2005 Nov 15;106(10):3524-31.

---

Herbeuval JP, Hardy AW, Boasso A, Anderson SA, Dolan MJ, Dy M, et al. Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4+ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 27;102(39):13974-9.

Hinkula J, Hagbom M, Wahren B, Schroder U. Safety and immunogenicity, after nasal application of HIV-1 DNA gagp37 plasmid vaccine in young mice. *Vaccine*. 2008 Sep 19;26(40):5101-6.

HIV Sequence Compendium. 2008. Disponível em:  
<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html> [2009 May 12].

Hobson P, Barnfield C, Barnes A, Klavinskis LS. Mucosal immunization with DNA vaccines. *Methods*. 2003 Nov;31(3):217-24.

Howarth M, Elliott T. The processing of antigens delivered as DNA vaccines. *Immunol Rev*. 2004 Jun;199:27-39.

Huang S, Dunkley-Thompson J, Tang Y, Macklin EA, Steel-Duncan J, Singh-Minott I, et al. Deficiency of HIV-Gag-specific T cells in early childhood correlates with poor viral containment. *J Immunol*. 2008 Dec 1;181(11):8103-11.

Ishii KJ, Kawagoe T, Koyama S, Matsui K, Kumar H, Kawai T, et al. TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature*. 2008 Feb 7;451(7179):725-9.

Ito S, Ishii KJ, Gursel M, Shirotra H, Ihata A, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides enhance neonatal resistance to *Listeria* infection. *J Immunol*. 2005 Jan 15;174(2):777-82.

Janssens W, Heyndrickx L, Franssen K, Temmerman M, Leonaers A, Ivens T, et al. Genetic variability of HIV type 1 in Kenya. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994 Nov;10(11):1577-9.

Jiang JQ, Patrick A, Moss RB, Rosenthal KL. CD8+ T-cell-mediated cross-clade protection in the genital tract following intranasal immunization with inactivated human immunodeficiency virus antigen plus CpG oligodeoxynucleotides. *J Virol*. 2005 Jan;79(1):393-400.

Jin H, Xiao C, Geng S, Hu Y, She R, Yu Y, et al. Protein/DNA vaccine-induced antigen-specific Treg confer protection against asthma. *Eur J Immunol*. 2008 Sep;38(9):2451-63.

Kang Y, Jin H, Zheng G, Du X, Xiao C, Zhang X, et al. Co-inoculation of DNA and protein vaccines induces antigen-specific T cell suppression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Feb 23;353(4):1034-9.

Kanswal S, Katsenelson N, Selvapandiyan A, Bram RJ, Akkoyunlu M. Deficient TACI expression on B lymphocytes of newborn mice leads to defective Ig secretion in response to BAFF or APRIL. *J Immunol*. 2008 Jul 15;181(2):976-90.

- 
- Kim SK, Ragupathi G, Cappello S, Kagan E, Livingston PO. Effect of immunological adjuvant combinations on the antibody and T-cell response to vaccination with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugates. *Vaccine*. 2000 Oct 15;19(4-5):530-7.
- Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, van Veen CJ, van Hellemond JJ, Neeffjes JJ, Kast WM, et al. MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J Immunol*. 1995 Jun 1;154(11):5715-24.
- Kool M, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Boon L, Smit JJ, et al. An anti-inflammatory role for plasmacytoid dendritic cells in allergic airway inflammation. *J Immunol*. 2009 Jul 15;183(2):1074-82.
- Korber BT, Allen EE, Farmer AD, Myers GL. Heterogeneity of HIV-1 and HIV-2. *AIDS*. 1995;9 Suppl A:S5-18.
- Kovarik J, Siegrist CA. Immunity in early life. *Immunol Today*. 1998 Apr;19(4):150-2.
- Kozlowski PA, Neutra MR. The role of mucosal immunity in prevention of HIV transmission. *Curr Mol Med*. 2003 May;3(3):217-28.
- Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:709-60.
- Lambert AA, Gilbert C, Richard M, Beaulieu AD, Tremblay MJ. The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1299-307.
- Langrish CL, Buddle JC, Thrasher AJ, Goldblatt D. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clin Exp Immunol*. 2002 Apr;128(1):118-23.
- Lee SM, Suen Y, Chang L, Bruner V, Qian J, Indes J, et al. Decreased interleukin-12 (IL-12) from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and upregulation of interferon-gamma, natural killer, and lymphokine-activated killer activity by IL-12 in cord blood mononuclear cells. *Blood*. 1996 Aug 1;88(3):945-54.
- Li L, Lee HH, Bell JJ, Gregg RK, Ellis JS, Gessner A, et al. IL-4 utilizes an alternative receptor to drive apoptosis of Th1 cells and skews neonatal immunity toward Th2. *Immunity*. 2004 Apr;20(4):429-40.
- Lu Y, Raviprakash K, Leao IC, Chikhlikar PR, Ewing D, Anwar A, et al. Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. *Vaccine*. 2003 May 16;21(17-18):2178-89.
- Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation. *J Virol*. 1991 Nov;65(11):5732-43.
-

---

Marcus H, Dekel B, Arditti FD, Reich-Zeliger S, Segal H, Bocher WO, et al. T cells from newborn humans are fully capable of developing into cytotoxic T lymphocyte effector cells in adoptive hosts. *Transplantation*. 2002 Mar 15;73(5):803-10.

Marques ET Jr, Chikhlikar P, de Arruda LB, Leao IC, Lu Y, Wong J, et al. HIV-1 p55Gag encoded in the lysosome-associated membrane protein-1 as a DNA plasmid vaccine chimera is highly expressed, traffics to the major histocompatibility class II compartment, and elicits enhanced immune responses. *J Biol Chem*. 2003 Sep 26;278(39):37926-36.

Marshall-Clarke S, Tasker L, Parkhouse RM. Immature B lymphocytes from adult bone marrow exhibit a selective defect in induced hyperexpression of major histocompatibility complex class II and fail to show B7.2 induction. *Immunology*. 2000 Jun;100(2):141-51.

Martinez X, Brandt C, Saddallah F, Tougne C, Barrios C, Wild F, et al. DNA immunization circumvents deficient induction of T helper type 1 and cytotoxic T lymphocyte responses in neonates and during early life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Aug 5;94(16):8726-31.

Mayaux MJ, Burgard M, Teglas JP, Cottalorda J, Krivine A, Simon F, et al. Neonatal characteristics in rapidly progressive perinatally acquired HIV-1 disease. The French Pediatric HIV Infection Study Group. *JAMA*. 1996 Feb 28;275(8):606-10.

McCluskie MJ, Davis HL. CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *J Immunol*. 1998 Nov 1;161(9):4463-6.

Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 2004 Sep 20;200(6):761-70.

Mills KH, McGuirk P. Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. *Semin Immunol*. 2004 Apr;16(2):107-17.

Milush JM, Kosub D, Marthas M, Schmidt K, Scott F, Wozniakowski A, et al. Rapid dissemination of SIV following oral inoculation. *AIDS*. 2004 Dec 3;18(18):2371-80.

Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico AIDS. 2008. Disponível em: <http://www.aids.gov.br> [2009 Mar 16].

Mold JE, Michaelsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science*. 2008 Dec 5;322(5907):1562-5.

Moldoveanu Z, Love-Homan L, Huang WQ, Krieg AM. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine*. 1998 Jul;16(11-12):1216-24.

Mor G. Plasmid DNA: a new era in vaccinology. *Biochem Pharmacol*. 1998 Apr 15;55(8):1151-3.

---

Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol.* 2006 Feb;6(2):148-58.

Norris PJ, Moffett HF, Brander C, Allen TM, O'Sullivan KM, Cosimi LA, et al. Fine specificity and cross-clade reactivity of HIV type 1 Gag-specific CD4+ T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2004 Mar;20(3):315-25.

Ohtsuka Y, Sanderson IR. Transforming growth factor-beta: an important cytokine in the mucosal immune response. *Curr Opin Gastroenterol.* 2000 Nov;16(6):541-5.

Pihlgren M, Schallert N, Tougne C, Bozzotti P, Kovarik J, Fulurija A, et al. Delayed and deficient establishment of the long-term bone marrow plasma cell pool during early life. *Eur J Immunol.* 2001 Mar;31(3):939-46.

Pliner V, Weedon J, Thomas PA, Steketee RW, Abrams EJ, Lambert G, et al. Incubation period of HIV-1 in perinatally infected children. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *AIDS.* 1998 May 7;12(7):759-66.

Price DA, Asher TE, Wilson NA, Nason MC, Brenchley JM, Metzler IS, et al. Public clonotype usage identifies protective Gag-specific CD8+ T cell responses in SIV infection. *J Exp Med.* 2009 Apr 13;206(4):923-36.

Richardson BA, John-Stewart GC, Hughes JP, Nduati R, Mbori-Ngacha D, Overbaugh J, et al. Breast-milk infectivity in human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. *J Infect Dis.* 2003 Mar 1;187(5):736-40.

Rigato PO. Imunogenicidade da vacina de DNA quimérica LAMP-1/p55Gag do HIV-1 no período neonatal e efeito da imunização materna na resposta vacinal da prole de camundongos [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Rolland M, Heckerman D, Deng W, Rousseau CM, Coovadia H, Bishop K, et al. Broad and Gag-biased HIV-1 epitope repertoires are associated with lower viral loads. *PLoS One.* 2008;3(1):e1424.

Rosa DS, Bastos KR, Bargieri DY, Tzelepis F, Nomizo A, Russo M, et al. Role of interferon-gamma during CpG oligodeoxynucleotide-adjuvanted immunization with recombinant proteins. *Vaccine.* 2007 Aug 10;25(32):6007-17.

Rose S, Lichtenheld M, Foote MR, Adkins B. Murine neonatal CD4+ cells are poised for rapid Th2 effector-like function. *J Immunol.* 2007 Mar 1;178(5):2667-78.

Rousseau CM, Just JJ, Abrams EJ, Casabona J, Stein Z, King MC. CCR5del32 in perinatal HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1997 Dec 1;16(4):239-42.

Rowell JF, Ruff AL, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll K, Lin X, Tang J, et al. Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an

---

endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. *J Immunol.* 1995 Aug 15;155(4):1818-28.

Rowland-Jones SL. Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nat Rev Immunol.* 2003 Apr;3(4):343-8.

Ruff AL, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll K, Siliciano RF, August JT. The enhanced immune response to the HIV gp160/LAMP chimeric gene product targeted to the lysosome membrane protein trafficking pathway. *J Biol Chem.* 1997 Mar 28;272(13):8671-8.

Sacha JB, Chung C, Rakasz EG, Spencer SP, Jonas AK, Bean AT, et al. Gag-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. *J Immunol.* 2007 Mar 1;178(5):2746-54.

Sarzotti M, Robbins DS, Hoffman PM. Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science.* 1996 Mar 22;271(5256):1726-8.

Sasaki S, Takeshita F, Xin KQ, Ishii N, Okuda K. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. *Methods.* 2003 Nov;31(3):243-54.

Serwanga J, Shafer LA, Pimego E, Auma B, Watera C, Rowland S, et al. Host HLA B\*allele-associated multi-clade Gag T-cell recognition correlates with slow HIV-1 disease progression in antiretroviral therapy-naive Ugandans. *PLoS One.* 2009;4(1):e4188.

Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science.* 1999 Jun 11;284(5421):1835-7.

Siegrist CA. Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine.* 2003 Jul 28;21(24):3406-12.

Siegrist CA. Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine.* 2001 May 14;19(25-26):3331-46.

Siegrist CA. The challenges of vaccine responses in early life: selected examples. *J Comp Pathol.* 2007 Jul;137 Suppl 1:S4-9.

Souza AP, Haut LH, Silva R, Ferreira SI, Zanetti CR, Ertl HC, et al. Genital CD8<sup>+</sup> T cell response to HIV-1 gag in mice immunized by mucosal routes with a recombinant simian adenovirus. *Vaccine.* 2007 Jan 2;25(1):109-16.

Stevenson FK. DNA vaccines and adjuvants. *Immunol Rev.* 2004 Jun;199:5-8.

Suffia IJ, Reckling SK, Piccirillo CA, Goldszmid RS, Belkaid Y. Infected site-restricted Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Med.* 2006 Mar 20;203(3):777-88.

---

Tokita D, Mazariegos GV, Zahorchak AF, Chien N, Abe M, Raimondi G, et al. High PD-L1/CD86 ratio on plasmacytoid dendritic cells correlates with elevated T-regulatory cells in liver transplant tolerance. *Transplantation*. 2008 Feb 15;85(3):369-77.

Tudor D, Dubuquoy C, Gaboriau V, Lefevre F, Charley B, Riffault S. TLR9 pathway is involved in adjuvant effects of plasmid DNA-based vaccines. *Vaccine*. 2005 Jan 26;23(10):1258-64.

Tudor D, Dubuquoy C, Gaboriau V, Lefevre F, Charley B, Riffault S. TLR9 pathway is involved in adjuvant effects of plasmid DNA-based vaccines. *Vaccine*. 2005 Jan 26;23(10):1258-64.

Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol*. 1999 Jan 8;285(1):1-32.

Ulmer JB, Fu TM, Deck RR, Friedman A, Guan L, DeWitt C, et al. Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J Virol*. 1998 Jul;72(7):5648-53.

United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Report on the global AIDS epidemic 2008. Geneva, Switzerland: UNAIDS; 2008. 1-362.

Vajdy M, Singh M, Kazzaz J, Soenawan E, Ugozzoli M, Zhou F, et al. Mucosal and systemic anti-HIV responses in rhesus macaques following combinations of intranasal and parenteral immunizations. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004 Nov;20(11):1269-81.

Vatakis DN, Koh YT, McMillan M. CD4+ T cell epitope affinity to MHC II influences the magnitude of CTL responses elicited by DNA epitope vaccines. *Vaccine*. 2005 Apr 8;23(20):2639-46.

Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science*. 1998 Apr 17;280(5362):427-31.

Veldman C, Nagel A, Hertl M. Type I regulatory T cells in autoimmunity and inflammatory diseases. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;140(2):174-83.

Wang X, Rasmussen T, Pahar B, Poonia B, Alvarez X, Lackner AA, et al. Massive infection and loss of CD4+ T cells occurs in the intestinal tract of neonatal rhesus macaques in acute SIV infection. *Blood*. 2007 Feb 1;109(3):1174-81.

Wu TC, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Viscidi RP, Levitsky HI, Hedrick L, et al. Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 5;92(25):11671-5.

Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, et al. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature*. 1998 Jun 18;393(6686):705-11.

---

Yamamoto N, Harada S, Nakashima H. Substances affecting the infection and replication of human immunodeficiency virus (HIV). *AIDS Res.* 1986 Dec;2 Suppl 1:S183-9.

Yan M, Wang H, Chan B, Roose-Girma M, Erickson S, Baker T, et al. Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat Immunol.* 2001 Jul;2(7):638-43.

Youn JW, Park SH, Cho JH, Sung YC. Optimal induction of T-cell responses against hepatitis C virus E2 by antigen engineering in DNA immunization. *J Virol.* 2003 Nov;77(21):11596-602.

Zhang J, Silvestri N, Whitton JL, Hassett DE. Neonates mount robust and protective adult-like CD8(+)-T-cell responses to DNA vaccines. *J Virol.* 2002 Dec;76(23):11911-9.

*Anexos*

## ANEXOS

### Anexo A – Sequência consenso dos peptídeos (15 aa) da proteína GAG do subtipo B do HIV-1

Pool	Sequência dos peptídeos	Peptídeos (aa)	Linfócito T	Proteína
1	1 MGARASVLSGGELDR	1-15		p17
	2 ASVLSGGELDRWEKI	5-19		
	3 SGGELDRWEKIRLRP	9-23		
	4 LDRWEKIRLRPGGKK	13-27		
	5 EKIRLRPGGKKKYKL	17-31		
	6 LRPGGKKKYKLKHIV	21-35		
	7 GKKKYKLKHIVWASR	25-39		
	8 YLKLHIVWASRELER	29-43		
	9 HIVWASRELERFAVN	33-47		
	10 ASRELERFAVNPGLL	37-51		
2	11 LERFAVNPGLLETSE	41-55		
	12 AVNPGLLETSEGCRQ	45-59		
	13 GLLLETSEGCRQILGQ	49-63		
	14 TSEGCRQILGQLQPS	53-67		
	15 CRQILGQLQPSLQTG	57-71	CD8 <sup>+</sup>	
	16 LGQLQPSLQTGSEEL	61-75		
	17 QPSLQTGSEELRSLY	65-79		
	18 QTGSEELRSLYNTVA	69-83		
	19 EELRSLYNTVATLYC	73-87		
	20 SLYNTVATLYCVHQR	77-91	CD4 <sup>+</sup>	
3	21 TVATLYCVHQRIEVK	81-95		
	22 LYCVHQRIEVKDTKE	85-99		
	23 HQRIEVKDTKEALEK	89-103		
	24 EVKDTKEALEKIEEE	93-107		
	25 TKEALEKIEEEQNKS	97-111		
	26 LEKIEEEQNKSKKKA	101-115		
	27 EEEQNKSKKKAQQAA	105-119		
	28 NKSKKKAQQAAADTG	109-123		
	29 KKAQQAAADTGNSSQ	113-127		
	30 QAAADTGNSSQVSQN	117-131		
4	31 DTGNSSQVSQNYPIV	121-135	CD4 <sup>+</sup>	p24
	32 SSQVSQNYPIVQNLQ	125-139		
	33 SQNYPIVQNLQGQMV	129-143		
	34 PIVQNLQGQMVHQAI	133-147		
	35 NLQGQMVHQAI SPRT	137-151		
	36 QMVHQAI SPRTLNAW	141-155		
	37 QAISPRTLNAWVKVV	145-159		
	38 PRTLNAWVKVVEEKA	149-163		
	39 NAWVKVVEEKAFSPE	153-167		

	40 KVVEEKAFSPEVIPM	157-171	
5	41 EKAFSPEVIPMFSAL	161-175	
	42 SPEVIPMFSALSEGA	165-179	
	43 IPMFSALSEGATPQD	169-183	
	44 SALSEGATPQDLNTM	173-187	
	45 EGATPQDLNTMLNTV	177-191	
	46 PQDLNTMLNTVGGHQ	181-195	
	47 NTMLNTVGGHQAAMQ	185-199	
	48 NTVGGHQAAMQMLKE	189-203	
	49 GHQAAMQMLKETINE	193-207	CD8 <sup>+</sup>
	50 AMQMLKETINEEAAE	197-211	CD8 <sup>+</sup>
6	51 LKETINEEAAEWDR	201-215	CD8 <sup>+</sup>
	52 INEEAAEWDRHPVH	205-219	
	53 AAEWDRHPVHAGPI	209-223	
	54 DRLHPVHAGPIAPGQ	213-227	
	55 PVHAGPIAPGQMREP	217-231	
	56 GPIAPGQMREPRGSD	221-235	
	57 PGQMREPRGSDIAGT	225-239	
	58 REPRGSDIAGTTSTL	229-243	
	59 GSDIAGTTSTLQEIQ	223-247	
	60 AGTTSTLQEIQWMT	237-251	
7	61 STLQEIQWMTNPP	241-255	
	62 EQIGWMTNPPPIV	245-259	
	63 WMTNPPPIVGEIYK	249-263	
	64 NPPPIVGEIYKRWII	253-267	
	65 PVGEIYKRWIILGLN	257-271	CD4 <sup>+</sup>
	66 IYKRWIILGLNKIVR	261-275	
	67 WIILGLNKIVRMYS	265-279	CD4 <sup>+</sup>
	68 GLNKIVRMYSPTSIL	269-283	
	69 IVRMYSPTSILDIRQ	273-287	
	70 YSPTSILDIRQGPKE	277-291	
8	71 SILDIRQGPKEPFRD	281-295	
	72 IRQGPKEPFRDYVDR	285-299	
	73 PKEPFRDYVDRFYKT	289-303	
	74 FRDYVDRFYKTLRAE	293-307	
	75 VDRFYKTLRAEQASQ	297-311	CD4 <sup>+</sup>
	76 YKTLRAEQASQEVKN	301-315	CD4 <sup>+</sup>
	77 RAEQASQEVKNWMTE	305-319	CD4 <sup>+</sup>
	78 ASQEVKNWMTETLLV	309-323	
	79 VKNWMTETLLVQAN	313-327	
	80 MTETLLVQANPDCK	317-331	
9	81 LLVQANPDCKTILK	321-335	
	82 NANPDCKTILKALGP	325-339	
	83 DCKTILKALGPAATL	329-343	
	84 ILKALGPAATLEEMM	333-347	
	85 LGPAATLEEMMTACQ	337-351	
	86 ATLEEMMTACQGVGG	341-355	

p24

	87 EMMTACQGVGGPGHK	345-359			
	88 ACQGVGGPGHKARVL	349-363			
	89 VGGPGHKARVLAEAM	353-367			
	90 GHKARVLAEAMSQVT	357-371			
10	91 RVLAEAMSQVTNSAT	361-375		p2	
	92 EAMSQVTNSATIMMQ	365-379			
	93 QVTNSATIMMQRGNF	369-383			
	94 SATIMMQRGNFRNQR	373-387			
	95 MMQRGNFRNQRKTVK	377-391			
	96 GNFRNQRKTVKCFNC	381-395	CD4 <sup>+</sup>		
	97 NQRKTVKCFNCGKEG	385-399	CD4 <sup>+</sup>		
	98 TVKCFNCGKEGHIAK	389-403	CD4 <sup>+</sup>		
11	99 FNCGKEGHIAKN CRA	393-407	CD4 <sup>+</sup>		p6
	100 KEGHIAKNCRAPRKK	397-411			
	101 IAKNCRAPRKKGCWK	401-415			
	102 CRAPRKKGCWKCGKE	405-419			
	103 RKKGCWKCGKEGHQM	409-423			
	104 CWKCGKEGHQMKDCT	413-427			
	105 GKEGHQMKDCTERQA	417-431			
	106 HQMKDCTERQANFLG	421-435			
12	107 DCTERQANFLGKIWP	425-439		p6	
	108 RQANFLGKIWPSHKG	429-443			
	109 FLGKIWPSHKGRPGN	443-447			
	110 IWPSHKGRPGNFLQS	437-451			
	111 HKGRPGNFLQSRPEP	441-455			
	112 PGNFLQSRPEPTAPP	445-459			
	113 LQSRPEPTAPPEESF	449-463			
	114 PEPTAPPEESFRFGE	453-467			
	115 APPEESFRFGEETTT	457-471			
	116 ESFRFGEETTTPSQK	461-475			
	117 FGEETTTPSQKQEPI	465-479			
	118 TTTPSQKQEPIDKEL	469-483			
	119 SQKQEPIDKELYPLA	473-487			
	120 EPIDKELYPLASLRS	477-491			
	121 KELYPLASLRS LFGN	481-495			
	122 PLASLRS LFGNDPSS	485-499			
	123 LRS LFGNDPSSQ	489-500			

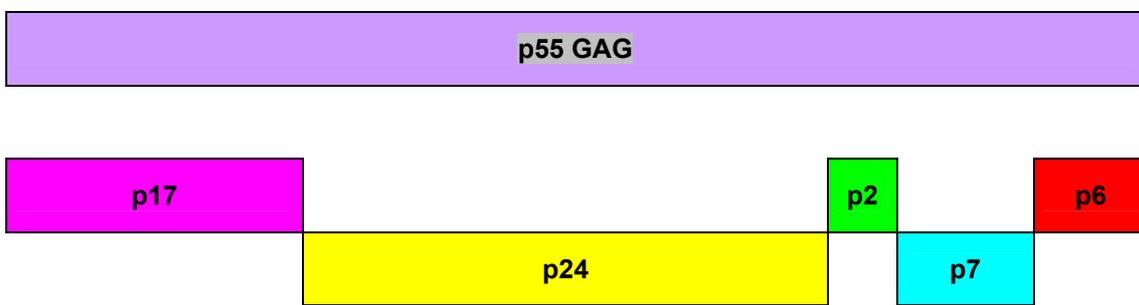
Nota: Os peptídeos apresentam 15 aminoácidos de comprimento (aa) com sobreposição de 11 resíduos, representando a proteína GAG do subtipo B do HIV-1, [HIV-1 Consensus Subtype B Gag (15-mer) Peptides - Complete Set/NIH AIDS Research and Reference Reagent Program] e é apresentado por moléculas de classe I ou II do MHC H-2<sup>d</sup>, haplótipo dos camundongos BALB/c

**Anexo B – Sequência da proteína GAG do subtipo B do HIV-1 e pools de peptídeos da proteína GAG**

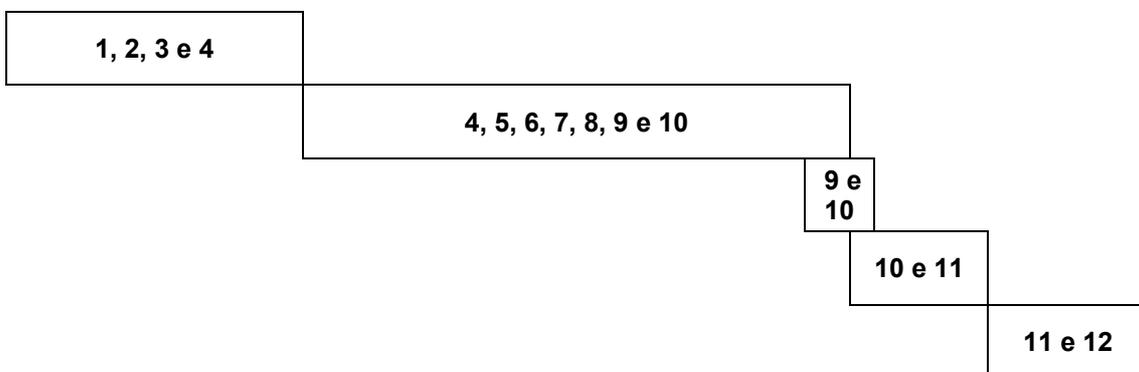
```

1 mgarasvlsq geldrwekir lrpqgkkyk lkhivwasre lerfavnppl letsegcrqi
61 lgqlqpslqt gseelrslrn tvatlycvhq rieikdtkea ldkieeqnk skkkaqqaaa
121 dtghsnqvsg nypivqniqg qmvhqaispr tlnawkvve ekafspevip mfsalsegat
181 pqdlntmlnt vggghqaamqm lketineeaa ewdrvhpvha gpiapggmre prgsdiagtt
241 stlqeqigwm tnnppipvge iykrwiilgl nkivrmyspt sildirqgpk epfrdyvdrf
301 yktrlraeqas qevknwmtet llvqnanpdc ktilkalga atleemmtac qgvvggphka
361 rvlaeamsqv tnsatimmqr gnfrnqrkiy kcfncgkegh tarncraprk kgcwkcqkeg
421 hqmkdcterq anflgkiwps ykgrpgnflq srpeptappe esfrsgvett tppqkqepid
481 kelypltslr slfgndpssc

```



**Pools de peptídeos da proteína GAG**



Fonte: HIV Sequence Compendium, 2008.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)