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**

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⁺ 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- β 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⁺ similares no baço e gânglios mesentéricos (GM), avaliada pela frequência de células secretoras de IFN- γ (SFC) aos *pools* de peptídeos da GAG, porcentagem de células T CD8⁺ antígeno específicas de classe I (pentâmero⁺), resposta T citotóxica *in vivo* e secreção *in vitro* de citocinas como TNF- α e IFN- γ . Entretanto, a resposta T CD4⁺ 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- γ e IL-4 quando comparados com os animais *gag*. A imunização com *LAMP/gag* e *gag* aumentou a frequência de células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e de IDO nos GM, corroborando com os níveis aumentados de TGF- β 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⁺ e na produção de anticorpos IgG2a, mas não interferiu na resposta T CD8⁺ 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⁺, 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⁺ 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⁺ 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⁺ T cells (pentamer+); CTL *in vivo* response and *in vitro* TNF-α and IFN-γ secretion. However, the CD4⁺ 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⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells and mRNA IDO expression in MLN, in accordance to the elevated levels of TGF- β 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⁺ T cells response and the IgG2a antibodies production, but did not altered the CD8⁺ 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⁺ T cells activation, suggesting an interesting vaccine strategy in neonatal period.

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

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 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⁺ (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⁺, 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⁺, resultando na imunossupressão característica da AIDS (Rowland-Jones, 2003). Sem a intervenção terapêutica, esta depleção de células T CD4⁺ 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⁺ da mucosa gastrointestinal 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⁺ 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⁺ 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 progridem 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⁺, 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⁺ (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⁺ ou, em menor grau, apresentados para as células T CD4⁺ 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⁺.

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⁺, linfócitos T CD8⁺ 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⁺ e CD8⁺; 4) DCs imaturas e linfócitos B, que após endocitose de antígenos solúveis secretados podem apresentá-los aos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. 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⁺ (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⁺ e CD8⁺ secretoras de IFN- γ . 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⁺, 4 a 5 vezes a resposta das células T CD8⁺ 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 epítomos que são reconhecidos pelas células T de camundongos imunizados e também o número de epítomos 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⁺ 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- α e TNF- β) 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, consequentemente, 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- γ , TNF- α 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- α e IFN- β) (Dumais *et al.*, 2002; Guzylack-Piriou *et al.*, 2004). A produção de IL-12 e IFN- γ 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- γ (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- γ 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- γ e IFN- α (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 γ 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- γ 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 β 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 α do IL-13R nas células Th1 que, juntamente com a cadeia α 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- γ (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⁺ 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⁺ e CD8⁺ 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⁺ *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⁺ *naive* a secretarem IFN- γ , 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⁺ IgD^{low/-} 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.

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*

- 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 $\alpha 4\beta 7$, 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, Matthaei 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 IFNgamma or IL-12. *Vaccine*. 2004 Nov 25;23(2):188-97.

Dalgleish 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, Fransen 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⁺ 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-naïve 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⁺ 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+ 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.