

**PAULA ORDONHEZ RIGATO**

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

**São Paulo  
2009**

**PAULA ORDONHEZ RIGATO**

**“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 apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do Título  
De Doutor em Ciências.**

**Área de Concentração: Imunologia  
Orientador: Profa. Dra. Maria Notomi Sato**

**São Paulo  
2009**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ordonhez Rigato, Paula.

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 / Paula Ordonhez Rigato. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Maria Notomi Sato.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunorregulação / Imunologia de doenças infecciosas.

Versão do título para o inglês: Immunogenicity of LAMP-1/p55Gag of HIV-1 DNA chimeric vaccine on neonatal period and effect of maternal immunization immune response of vaccinated offspring.

Descritores: 1. Imunologia 2. Vacinas 3. HIV 4. AIDS 5. Neonatologia 6. DNA I. Sato, Maria Notomi II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB086/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Paula Ordonhez Rigato.

Título da Tese: 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.

Orientador(a): Maria Notomi Sato.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

**Dedico este trabalho a todos que vivem com aids, àqueles que necessitam do tratamento, de uma vacina, compreensão e aceitação.**

**Que este trabalho possa, verdadeiramente, um dia contribuir com vocês:**

“A aids não é mais só uma doença, é uma questão de direito humano. Como eu fiquei preso com uma sentença de prisão perpétua, as pessoas infectadas pelo HIV vivem com uma condenação para a vida toda. Temos os remédios e as formas de livrar as pessoas desta condenação em mãos. Precisamos agir juntos para fazer esta ajuda chegar as pessoas necessitadas.”

**Nelson Mandela**

**Dedico este trabalho também à minha família por todo amor, dedicação, companheirismo e educação.**

## **Agradecimentos**

A Professora Dra. Maria Notomi Sato pela dedicação, orientação, amizade e paciência despendidas nestes quatro anos de trabalho. Uma orientadora que sempre agregou conhecimentos na minha vida profissional e pessoal. Uma profissional exemplar que ajuda na escolha dos caminhos e clareia as nossas decisões, abre portas do mundo e nos ensina, a cada momento, por que vale a pena seguir nesta direção. É um exemplo de orientador que está sempre ali, para o que nós, como alunos e como pessoas, precisarmos... Obrigada pela presença constante em muitas das minhas decisões e em todo curso deste doutorado, mais do que orientadora, é uma pessoa amiga que inspira força para enfrentar todos os desafios!

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte pela confiança, dedicação, orientação e oportunidades que me oferece desde minha chegada ao LIM-56 em 2000, supervisor no aprimoramento, orientador no mestrado e mestre em todos os momentos... Representa para mim, muito mais que um chefe, é exemplo e inspiração de dedicação e de persistência nesta caminhada acadêmica. Apesar de sempre falar que aqui dentro do laboratório é só o profissional que conta, não tem como não nos apegarmos como uma grande família, pois esta é a palavra que está em todos os seus discursos!

Aos Profs. Drs. Gil Benard e Jorge Casseb pela dedicação e orientação em outros projetos além do doutorado. Pesquisadores sempre presentes em toda minha caminhada e decisões nesta área maravilhosa da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ernesto Marques pela oportunidade de trabalharmos com esta vacina, que para mim representa uma das estratégias para conter a aids. Agradeço pela colaboração e dicas científicas durante as reuniões do projeto.

Ao Dr. Milton Maciel Jr pela co-orientação virtual e amizade.

Aos amigos/colegas imprecidíveis sem os quais este trabalho não teria sido finalizado: Adriana Letícia Goldoni, Cyro Alves de Brito, Orlando Guerra Piubelli, Ana Elisa Fusaro e Soraya Ogusuku. Agradeço pela ajuda técnica e principalmente pela amizade e momentos especiais. Um agradecimento em especial a Ana Elisa Fusaro que me ensinou e me orientou no manuseio dos animais, ensinando o respeito que devemos ter por estes seres.

A Rachel Guedes e Wilma Santos pelo zelo com os animais e o nosso biotério, o trabalho de vocês sempre foi a base para que todo o projeto se desenvolvesse.

Às meninas do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães da Fiocruz de Recife, Liciane Xavier, Karla Barbosa e Andrea Melo pela ajuda na leitura das placas de ELISpot e pelo treinamento no leitor de ELISpot e pela amizade.

Aos amigos do grupo Experimental e LIM-56: Mayce Helena Azor, Francinelson Duarte, Jefferson Russo Victor, Juliana Santos, Isabela Fernandes, Bruno Pacola, Eliana Tanigushi que dividiram conhecimentos e deixaram momentos de convívio, companheirismo e conhecimento.

À equipe efetiva de pesquisadores associados ao LIM-56, que incentivam e inspiram a busca por respostas científicas, transmitindo a dedicação, a seriedade e a curiosidade, que se deve ter com a ciência básica e clínica.

Às amigas nascidas no laboratório que dividem e comemoram todos os momentos, sejam estes de vitória, de alegria, de conquistas, de queda, de perdas, de dificuldades, de despedidas. Pessoas que pacientemente dividiram seus conhecimentos práticos, teóricos e pessoais: Camila Rodrigues Cacere, Ligia Fukumori, Rosemeire Navickas, Noemia Mie Orii, Rosângela Araújo, Soraya Ogusuku, Bosco Cristiano, Bianca Santos, Vanessa Batista, Liã Barbara Arruda, Fábio Eduardo da Silva, Rosana Alcalde, Viviane Bressani, Adriana de Brito e toda equipe do experimental.

Ao pessoal da secretaria e suporte técnico que nos ajudam e apoiam em *todos* os momentos: Edna Reis, Luiz Abraão, Lucio Martins, Celeste Romano, André Goto e a equipe de informática. E aos que não estão mais no LIM-56, mas que fazem parte da história deste laboratório: Daniel Morales e Olivete Venâncio.

Às meninas maravilhosas que zelam pela limpeza do nosso laboratório e pela eficiência dos experimentos com a lavagem dos nossos materiais: Adriana Santos e Silvia Castro;

Às observações e sugestões dos professores da banca do exame de qualificação: Prof. Dr. Magnus Ake Gidlund; Prof. Dr. Maurício Rodrigues e Prof. Dr. José Maria Alvarez Mosig. E ao Prof. Luiz Carlos Ferreira pelas oportunidades de colaboração e conselhos científicos.

A Profa. Dra. Lourdes Isaak, pela oportunidade de estagiar e aprender um pouco da arte da docência no ensino superior (PAE).

Ao CNPq, FAPESP, LIM-56 e Ministério da Saúde pelo auxílio técnico e financeiro.

Ao Programa de Cooperação Técnica em HIV/AIDS do Ministério da Saúde do Brasil e ao governo Francês, pela oportunidade do treinamento no *Laboratoire d'Immunologie Cellulaire do Hôpital Pitié-Salpêtrière* sob supervisão da Profa. Dra. Brigitte Autran, uma grande pesquisadora na área de imunologia HIV/AIDS e ao Prof. Dr. Ionnis Theodorou, um grande pesquisador na área de imunogenética do HIV/AIDS, pela orientação e oportunidade do treinamento seu laboratório. Agradeço a toda sua equipe pelo treinamento. Agradeço por me receberem tão bem e pelas oportunidades que me abriram para fazer meu pós-doc em seus laboratórios. Este incentivo representa hoje a realização de um dos meus maiores ideais, que é vivenciar profissionalmente a pesquisa numa instituição estrangeira em grupo de excelência científica na área do HIV/AIDS.

Em especial agradeço aos meus pais, Euclépia Ordonhez Rigato e Renato Rigato, por todo amor, educação, paciência e ajuda em todos os momentos da minha vida. A estrutura que eu recebo suporta que eu percorra meus caminhos sem dúvida e com total apoio de vocês.

Aos meus irmãos, Daniel Rigato e Fernando Rigato, e a praticamente irmã Talitta Galvano Rigato pelo companheirismo e força! Ao meu sobrinho Enrico Galvano Rigato, que renovou a alegria de nossa família. Ao meu *nonno* Tullio Rigato, minha *nonna* Maria Zandonaddi Rigato e avó Adelina Ordonhez, todos *in memoriam*, meus queridos, os quais mesmo ausentes fisicamente, inspiram minha caminhada na busca pelas respostas e soluções às doenças que desestruturam famílias e populações (*grazie per fare di me parte della historia*).

Aos meus amigos do Espiritismo que seguem comigo mais esta jornada, e que com ensinamentos, paciência, perseverança e colaboração me situam frente a beleza e misérias do mundo, me ajudando na compreensão das razões e causas de todas diferenças e dores vivenciadas pelos seres humanos. Inspirando a luta por uma convivência melhor e estimulando a caridade a todos em qualquer situação.

Os meus carinhosos e sinceros agradecimentos pela amizade essencial daqueles que me acompanham há muito ou pouco tempo, àqueles que me inspiram e me dão força, que de

perto ou longe, estão sempre ao meu lado: Camila Rodrigues Cacere, Fernanda Tinelli Marquesini, Roni Lara Moya, Patrícia Montanheiro, Vanessa Lopes, Vanessa Galinari, Agnes Akemi Aoki, Luciane Ordonhez, Rafael Ordonhes, Gabriela Ordonhes... e àqueles que por descuido esqueci de mencionar..... Algumas pessoas se tornam essenciais no nosso caminhar e sabem o real e verdadeiro sentido da palavra amizade...

A DEUS pela oportunidade de estar vivendo neste momento e nesta situação, pelo livre arbítrio, pelos ensinamentos, pela vida e pela capacidade de compreensão em geral do que acontece no mundo... e por permitir o estudo em seres vivos.. por mais difícil que seja a aceitação por parte da comunidade não-científica e científica. E agradeço por esta paixão que tenho por estudar esta doença que hoje representa uma pandemia.

Os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Aqui mais um sonho se encerra e muitos caminhos se abrem. Enquanto um projeto chega ao final, a realização de outro apenas se inicia, com a base teórica e profissional adquirida, nestes 9 anos de LIM-56, entre disciplinas, técnicas, congressos, simpósios e palestras, sigo ao pós-doutorado, dando continuidade aos meus ideais e sonhos. Cada pessoa citada ou que, inconscientemente, deve ter esquecido de citar, contribuiu e ensinou muito a cada passo desta realização. A gratidão será eterna a toda minha família, amigos e equipe/amigos/colegas do Laboratório de Investigação Médica 56 da Faculdade de Medicina da USP e aos professores das disciplinas que reacenderam a chama da curiosidade a cada aula cursada...

“O senhor não daria banho a um leproso nem por um milhão de dólares? Eu também não. Só por amor se pode dar banho a um leproso.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Todas as nossas palavras serão inúteis se não brotarem do fundo do coração. As palavras que não dão luz aumentam a escuridão.

É fácil amar os que estão longe. Mas nem sempre é fácil amar os que vivem ao nosso lado.

As palavras de amizade e conforto podem ser curtas e sucintas, mas o seu eco é infindável.

Temos de ir à procura das pessoas, porque podem ter fome de pão ou de amizade.

A falta de amor é a maior de todas as pobrezaas.

Quem julga as pessoas não tem tempo para amá-las.

O importante não é o que se dá, mas o amor com que se dá.

Não ame pela beleza, pois um dia ela acaba. Não ame por admiração, pois um dia você se decepciona. Ame apenas, pois o tempo nunca pode acabar com um amor sem explicação.

Não devemos permitir que alguém saia da nossa presença sem se sentir melhor e mais feliz.”

**Madre Teresa de Calcutá**

“... Marco Polo ficou inquieto. Esfregou as duas mãos no rosto. Suspirou, colocou a mão no queixo, apoiou o cotovelo sobre a coxa como um pensador e perguntou:

"O que pensavam os filósofos a respeito de Deus?"

"Lembre-se do que eu lhe disse: muitos filósofos acreditavam na metafísica. eles não tinham medo de argumentar e discutir a respeito de Deus. A ciência tem medo de debater sobre Ele por receio de pender para uma religião e perder a individualidade. Nós não sabemos quase nada sobre a caixa de segredos da existência. Milhões de livros são uma gota no oceano. Lembre-se, somos uma grande pergunta procurando uma resposta nos poucos anos dessa vida."

"Mas filósofos como Marx, Nietzsche e Sartre foram ateus."

Falcão fitou vagarosamente o amigo e, como se estivesse iluminado, disse: "Há dois tipos de Deus: um Deus que criou os homens, e outro que os homens criaram. Para mim, esses filósofos não acreditavam no Deus criado pelos homens. eles foram contra a religiosidade da sua época, que dilacerava os direitos humanos, mas não são ateus puros. Ainda não posso falar por eles."

O jovem pensou e inquiriu: "Quem somos nós? O que somos? Para onde vamos?"

"Frequentemente, me faço tais perguntas. Quanto mais as faço, mais me perco, e quanto mais me perco, mais procuro me achar. Olhe as pessoas ao seu redor. O que você vê?"  
(Falcão)

"Pessoas de ternos, mulheres bem-vestidas, jovens exibindo seus tênis, adolescentes arrumando o cabelo, enfim, pessoas transitando." (Marco Polo)

"A maioria dessas pessoas vive porque respira. Não perguntam mais "quem são?", "o que são?" Estão entorpecidos pelo sistema. O ser humano atual não ouve o grito da sua maior crise. Cala sua angústia porque tem medo de se perder num emaranhado de dúvidas sobre seu próprio ser. No começo do século XX, a ciência prometeu ser o deus do Homo sapiens e responder a essas perguntas. Mas ela nos traiu." (Falcão).

"Por que nos traiu?" (Marco Polo)

"Primeiro porque não desvendou quem somos, continuamos a ser um enigma, uma gota que por um instante aparece e logo se dissipa no palco da existência. Segundo, porque, apesar do salto na tecnologia, ela não resolveu os problemas humanos fundamentais. A violência, a fome, a discriminação, a intolerância e as misérias psíquicas não foram debeladas. A ciência é um produto do ser humano e não um deus do ser humano. Use-a não seja usado por ela."

**Augusto Cury**

## Resumo

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]. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

A alta incidência de crianças infectadas pelo HIV-1 devido a transmissão materna do vírus salienta a necessidade de estudos que verifiquem a imunogenicidade de vacinas anti-HIV profiláticas e/ou terapêuticas em período precoce de vida. O período neonatal é caracterizado pela imaturidade do sistema imunológico associada à alta predisposição à tolerância e ao efeito inibitório dos anticorpos maternos, sendo as vacinas de DNA uma estratégia para contornar estes efeitos. A vacina de DNA quimérica *LAMP/gag*, constituída pelo gene *gag* do HIV-1 ligado ao gene da proteína associada a membrana lisossomal 1 murina (*LAMP*), direciona o antígeno endógeno aos compartimentos lisossomais/endossomais possibilitando a apresentação via moléculas de classe II do MHC, promovendo a ativação de células T CD4+, evidenciada pelo aumento da resposta imunológica celular e humoral a Gag em camundongos BALB/c adultos e macacos Rhesus. Neste projeto, avaliou-se o potencial imunogênico da vacina *LAMP/gag* em período precoce de vida em camundongos e o efeito da imunização materna na resposta vacinal da prole. Os resultados, mostram que o DNA quimérico *LAMP/gag* é imunogênico no período neonatal, considerando a produção de anticorpos anti-Gag e a magnitude do número de células produtoras de IFN- $\gamma$  aos peptídeos da Gag do HIV-1. A imunização iniciada em idade neonatal com a vacina *LAMP/gag* (1 ou 5 $\mu$ g) induziu a produção de anticorpos IgG anti-Gag, sendo a dose de 5 $\mu$ g indutora de isótipos de anticorpos semelhantes à imunização adulta (IgG1 > IgG2a > IgG2b). Além de estimular um número superior de células produtoras de IFN- $\gamma$  para epítomos de classe I e II do MHC comparados aos imunizados com *gag*. Os neonatos imunizados com baixa dose (1 $\mu$ g) de *LAMP/gag* e reforçados com *gag* produziram níveis de isótipos de anticorpos similares ao grupo imunizado com duas doses de 5 $\mu$ g de *LAMP/gag*, aumentou a porcentagem de células T CD8+ com potencial citotóxico (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , granzima) e de células específicas ao epítomo imunodominante de classe I do MHC da Gag. Além disso, a imunização neonatal com *LAMP/gag* foi capaz de gerar resposta humoral e celular de longa duração observado até os 9 meses de idade. A imunização pré-concepcional com *LAMP/gag* possibilitou a transferência preferencialmente IgG1 anti-Gag às proles pela via transplacentária e pelo leite, os quais perduram até 60 dias na circulação das proles. A vacinação gênica diminuiu algumas citocinas/quimiocinas transferidos à prole e o TGF- $\beta$ 1 no leite materno. A imunização materna com *LAMP/gag* inibiu a resposta humoral e diminuiu a magnitude de resposta celular aos peptídeos da Gag na prole imunizada em período neonatal, em paralelo à detecção de elevado nível dos anticorpos maternos IgG anti-Gag e de células CD4+CD25+FoxP3 na prole. Entretanto, a vacinação materna não interferiu na geração de resposta de memória imunológica. O protocolo de imunização por via intravenosa com *LAMP/gag* durante a gestação mostrou que há transferência do plasmídeo aos tecidos fetais capaz de primar o sistema imunológico neonatal, gerando SFC de IFN- $\gamma$  aos peptídeos da Gag, além de primar o sistema imune materno. Os resultados mostram que a vacina de DNA quimérica é imunogênica e necessária para sensibilização de células T e B dos camundongos em período neonatal e na geração de resposta de memória imunológica

anti-Gag. Além disso, a imunização pré-concepcional materna com *LAMP/gag* transfere anticorpos e outros fatores para a prole, diminuindo a resposta imune ao *LAMP/gag*, mas não afeta o desenvolvimento de memória imunológica na prole. A estratégia de imunização por via intravenosa com *LAMP/gag* durante a gestação evita a transferência de anticorpos inibitórios e é capaz de sensibilizar ambos os sistemas imunológicos, materno e fetal .

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

## Abstract

Rigato, PO. Immunogenicity of *LAMP-1/p55Gag* of HIV-1 DNA chimeric vaccine on neonatal period and effect of maternal immunization immune response of vaccinated offspring [thesis]. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The high incidence of HIV-1 infected children due to mother-to-child transmission emphasizes the need of studies about immunogenicity of profilactics and/or therapeutics HIV vaccines during early stages of life. Neonatal period is characterized by immaturity of immune system associated to the high susceptibility to tolerance and to the inhibitory effects of the maternal antibodies, thus DNA vaccine is a strategy to overcome these effects. The *LAMP/gag* DNA chimeric vaccine encoding the p55 of *gag* from HIV with the lysosomal associated membrane protein 1 (*LAMP-1*) drive the endogen antigen to MHC compartment, eliciting T CD4+ cell activation, leading to a strong cellular and humoral response in BALB/c adult mice and Rhesus' monkeys. In the present work, we evaluated the immunogenic potential of *LAMP/gag* DNA vaccine in the early stage of life in mice as well as the effect of the maternal immunization on the offspring vaccination. The results showed that *LAMP/gag* chimeric vaccine is immunogenic in neonatal period, considering the anti-Gag antibody production and the magnitude of HIV-1 Gag peptide IFN- $\gamma$  producing cells. The *LAMP/gag* DNA immunization initiated in neonatal period (1 or 5 $\mu$ g) induced the IgG anti-Gag antibody response, in which the dose of 5 $\mu$ g elicited antibodies levels similarly to adult immunization (IgG1 > IgG2a > IgG2b). In addition, *LAMP/gag* DNA immunization induced higher number of IFN- $\gamma$  producing cells to the class I and II epitopes compared to *gag* immunization. The neonatal immunization with *LAMP/gag* with the lower dose (1 $\mu$ g) boosted with *gag* generated anti-Gag antibody isotypes similar the group immunized with two doses of 5 $\mu$ g *LAMP/gag*, augmenting the T CD8+ cell percentage with cytotoxicity potential (expression of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , granzyme) and MHC class I epitope specific cells. Furthermore, the neonatal immunization with *LAMP/gag* was able to elicit marked lasting humoral and cellular response until 9 months old. The *LAMP/gag* DNA pre-conceptional immunization transferred mainly anti-Gag IgG1 antibodies to offspring by transplacental and breastfeeding routes, detecting until 60 days in the offspring circulation. Genetic mother immunization downmodulated the concentration of some cytokines/chemokines transferred to offspring and the TGF- $\beta$ 1 on the milk. Maternal *LAMP/gag* immunization inhibited Gag humoral response and diminished magnitude of Gag cellular response on immunized offspring, in parallel to detection of high levels of anti-Gag maternal antibody and increase of the percentage of CD4+CD25+FoxP3 in offspring. Nevertheless, maternal immunization with chimeric DNA vaccine did not affect the generation of cellular memory response. Evaluating an intravenous *LAMP/gag* protocol of immunization during pregnancy it was noticed plasmid transference to fetal tissues which primed the neonatal immune system, generating Gag IFN- $\gamma$  producing cells and also priming the maternal immune system. These results showed that chimeric DNA vaccine is immunogenic and necessary to prime T and B cell and to develop immunologic memory on mice in neonatal period. Furthermore, the preconceptional immunization transferred antibodies and others immune factors to offspring and diminished the *LAMP/gag* immunization, whereas did not affecting the

immunologic memory development of the offspring. The strategy intravenous immunization during pregnancy avoided antibody transference and primed both maternal/fetal immune systems.

Key words: Immunology; Vaccines; HIV; AIDS; Neonatology; DNA.

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>35</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>Material e métodos</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Animais</b>	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Plasmídeos</b>	<b>38</b>
<b>3.3</b>	<b>Expressão das proteínas LAMP/gag e Gag</b>	<b>39</b>
<b>3.4</b>	<b>Protocolo de imunização neonatal</b>	<b>40</b>
<b>3.5</b>	<b>Protocolo de imunização adulta e/ou materna</b>	<b>43</b>
<b>3.6</b>	<b>Protocolo de imunização intravenosa materna no período gestacional</b>	<b>47</b>
<b>3.7</b>	<b>Obtenção de células esplênicas</b>	<b>48</b>
<b>3.8</b>	<b>Frequência de células esplênicas produtoras de IFN-<math>\gamma</math> (ELISpot)</b>	<b>48</b>
<b>3.9</b>	<b>Cultura de células para obtenção de sobrenadantes</b>	<b>49</b>
<b>3.10</b>	<b>Determinação da concentração de citocinas pró-inflamatórias por citometria de fluxo</b>	<b>50</b>
<b>3.11</b>	<b>Deteção de anticorpos por ELISA</b>	<b>50</b>
<b>3.12</b>	<b>Dosagem de TGF-<math>\beta</math>1</b>	<b>51</b>
<b>3.13</b>	<b>Quantificação de células CD8+ antígeno específicas</b>	<b>52</b>
<b>3.14</b>	<b>Fenotipagem das células CD8+</b>	<b>52</b>
<b>3.15</b>	<b>Análise de células CD8+ secretoras de IFN-<math>\gamma</math>, TNF-<math>\alpha</math>, IL-2, Perforina e Granzima</b>	<b>53</b>
<b>3.16</b>	<b>Quantificação de células T CD4+CD25+FoxP3+</b>	<b>53</b>
<b>3.17</b>	<b>Dosagem das citocinas e quimiocinas por microesferas recobertas com anticorpos (multiplexed bead-based immunoassay - xMAP<sup>TM</sup>) em citômetro de fluxo</b>	<b>54</b>
<b>3.18</b>	<b>Coleta dos órgãos de neonato</b>	<b>54</b>
<b>3.19</b>	<b>Extração de RNA, obtenção do cDNA e reação semi-quantitativa de PCR em tempo real (Real-Time PCR)</b>	<b>55</b>
<b>3.20</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>Resultados</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Expressão da proteína Gag em células HEK-293 transfectadas com as vacinas gênicas</b>	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>Imunogenicidade neonatal às vacinas de DNA</b>	<b>59</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Produção de anticorpos às vacinas de DNA</b>	<b>59</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Resposta celular neonatal às vacinas de DNA</b>	<b>65</b>
<b>4.2.2.1</b>	<b>Perfil da resposta de IFN-<math>\gamma</math> aos peptídeos da Gag do HIV-1 após imunização neonatal</b>	<b>65</b>
<b>4.2.2.2</b>	<b>Produção de citocinas ao peptídeo imunodominante de classe I do MHC em neonatos e adultos imunizados com as vacinas de DNA</b>	<b>70</b>
<b>4.2.2.3</b>	<b>Resposta de células com potencial citotóxico após imunização neonatal com as vacinas de DNA</b>	<b>73</b>
<b>4.3</b>	<b>Memória imunológica após imunização neonatal com as vacinas de DNA</b>	<b>75</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Resposta humoral e celular</b>	<b>75</b>
<b>4.4</b>	<b>Efeito da imunização materna na prole não imunizada</b>	<b>82</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Transferência de anticorpos maternos e permanência no soro da prole</b>	<b>82</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Presença de citocinas e quimiocinas em fluídos de mães imunizadas com as vacinas de DNA</b>	<b>85</b>

4.4.3 Efeito da imunização gênica na porcentagem de células T CD4+CD25+FoxP3+ dos neonatos aos sete dias de idade.....	88
4.5 Efeito da imunização materna na resposta vacinal da prole.....	90
4.5.1 Efeito da imunização materna na produção de IgG anti-Gag na prole imunizada .....	90
4.5.2 Efeito da imunização materna com <i>LAMP/gag</i> na resposta celular da prole imunizada no período neonatal .....	93
4.5.3 Efeito da imunização materna com <i>LAMP/gag</i> na produção de IFN- $\gamma$ da prole imunizada após seis meses de idade .....	96
4.6 Imunogenicidade materno-fetal das vacinas de DNA por via intravenosa .....	99
4.6.1 Detecção de RNAm de <i>gag</i> nos tecidos da prole de mães imunizadas com as vacinas de DNA por via intravenosa (iv).....	99
4.6.2 Efeito da imunização materna via intravenosa com as vacinas de DNA durante a gestação na resposta imune celular e humoral da prole.....	101
5 Discussão .....	105
6 Conclusões .....	118
Referências .....	120
Anexos.....	133
Anexo A – Células formadoras de spot (SFC) de IFN- $\gamma$ de camundongos neonatos imunizados com 1 $\mu$ g das vacinas de DNA. ....	133
Anexo B – Células formadoras de spot (SFC) de IFN- $\gamma$ de camundongos neonatos imunizados com 5 $\mu$ g das vacinas de DNA. ....	134
Anexo C – Células formadoras de spot (SFC) de IFN- $\gamma$ de camundongos adultos imunizados com 50 $\mu$ g das vacinas de DNA. ....	135
Anexo D – Resposta de células produtoras de IFN- $\gamma$ (SFC/0.5x10 <sup>6</sup> esplenócitos) 9 meses após imunização neonatal. ....	136
Anexo E – Resposta de células produtoras de IFN- $\gamma$ (SFC/0.5x10 <sup>6</sup> esplenócitos) 6 meses após imunização neonatal. ....	137

# *Introdução*

## 1 Introdução

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 o 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 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) o que acarretou no aumento de crianças órfãs e na queda do desenvolvimento econômico em alguns países (UNAIDS, 2008). Em 2008, globalmente mais de dois milhões de mortes foram devidas à aids, sendo que destas, 76% ocorreram no Sub-Sahara Africano, a região mais afetada no mundo. O que alarma as autoridades mundiais é a feminização e infantilização da doença, sendo que o contingente de mulheres e crianças infectadas pelo HIV aumentou vertiginosamente durante na 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 5.840 são indivíduos menores de cinco anos de idade e 2.339 menores de 12 anos. Segundo a UNAIDS (2008), uma porcentagem alta de pessoas infectadas pelo HIV-1 ignora este fato, em todo o globo.

A transmissão do HIV da mãe para a criança (TMC) é um tópico que merece atenção e representa um agravante na saúde pública mundial. A TMC contribui com cerca de 90% dos casos de infecção pelo HIV em crianças que ocorrem a cada ano (Center of Disease Control - CDC, 2006). Sem intervenção terapêutica, há um risco de 15-30% da mãe infectada transmitir o HIV para o filho durante a gravidez e parto, além do risco de 10-20% de transmissão pela amamentação. No Brasil de 2000 a junho de 2008, foram indentificados 41.777 gestantes infectadas, sendo a TMC responsável por 11.607 casos de infecção pelo HIV em crianças (84,5%), o que representa 2,3% do

número total de indivíduos infectados (Ministério da Saúde - MS, 2008). Apesar do número de crianças infectadas ser significativo, o Brasil realizou um dos grandes avanços no que diz respeito à diminuição de casos de TMC (MS, 2005). Entretanto este tipo de transmissão é ainda agravante em regiões da África e Ásia. No sub-Saara africano, onde mais de 40% das gestantes são infectadas pelo HIV, a pandemia HIV/aids promove efeitos devastadores na sobrevivência da criança (CDC, 2006). Nesta região africana, 90% das infecções em indivíduos menores de 15 anos ocorrem por TMC (UNAIDS, 2006).

Uma alternativa para diminuição da TMC no mundo é a intervenção com a terapia antiretroviral altamente potente (*Highly Active AntiRetroviral Treatment* HAART), entretanto mais de 70% de indivíduos infectados pelo HIV globalmente não tem acesso à medicação (UNAIDS, 2008). Durante estes 27 anos de epidemia, a aids continua desafiando os esforços para controlá-la (UNAIDS, 2008). Nos últimos anos, houve um aumento do número de países que sustentam o acesso universal ao tratamento antiretroviral e serviços para prevenir a transmissão materno infantil do HIV (UNAIDS, 2008). Ainda assim, existe uma necessidade crescente e emergencial para intensificar a prevenção da infecção pelo HIV-1, pois segundo as autoridades em saúde pública, hoje, para cada duas pessoas que começam a receber terapia antiretroviral, outras cinco se infectam (UNAIDS, 2008).

A prevenção da transmissão vertical do HIV da mãe para filho é um ponto crucial na diminuição da mortalidade infantil. A transmissão perinatal é a principal via de infecção pelo HIV na população infantil, sendo que na ausência de procedimento profilático (administração de HAART) a estimativa da ocorrência da infecção é de 25,5%, sendo que destes, 65% dos casos ocorrem no trabalho de parto (MS, 2005). Com a profilaxia antiretroviral, a TMC foi reduzida para menos que 1% em alguns países (Mandelbrot et al., 2001). Entretanto, foram reportados efeitos colaterais após a exposição fetal e neonatal em crianças não infectadas, incluindo alterações hematológicas e imunológicas (Pacheco et al., 2006, Bunders et al., 2005, Feiterna-Sperling et al., 2007). Desta forma, uma alternativa para contornar estes efeitos é o estudo e desenvolvimento de vacinas contra a infecção pelo HIV, que, quando administradas na mãe possam transferir fatores de proteção ao recém-nascido, ou ainda, transferir a vacina ao feto promovendo desenvolvimento de resposta anti-viral que perdure até a idade adulta. Este fato salienta a necessidade de estudos em modelos experimentais para obter novas formulações de vacinas e fornecer subsídios de monitoramento dos parâmetros da resposta imunológica, sejam celulares ou humorais.

Desta forma, torna-se necessário o estudo experimental para avaliar a imunogenicidade em fase precoce de vida, que leve a geração de resposta de memória imunológica que perdure até a fase adulta.

O HIV é da família *Retroviridae*, caracterizada por possuir duas fitas simples de ácido ribonucléico (RNA) que são transcritas pela ação da transcriptase reversa (RT) viral em ácido desoxirribonucléico (DNA) de fita dupla, que, por sua vez, é integrada ao genoma celular pela ação da integrase viral (Turners e Summers, 1999). Este microrganismo pertence à subfamília dos Lentivirinae, que possui morfologia singular do vírion com *core* cilíndrico e cônico e a característica de promover infecções lentas e latentes (Turners e Summers, 1999). O genoma do HIV é constituído por três genes estruturais (*env*, *gag*, *pol*) e três acessórios (*nef*, *vpr* e *vif*) e três adicionais (*rev*, *tat* e *vpu*). A estrutura do HIV-1 consiste de glicoproteínas de superfície codificadas pelo *env* (envelope viral), responsáveis pela entrada do vírus na célula hospedeira; de proteínas do *core*, constituído pela matriz (p24), capsídeo (p17) e nucleocapsídeo (p7) codificadas pelo *gag*, responsáveis pela estruturação do vírion imaturo contendo os outros componentes virais e ancoramento na membrana celular; de três enzimas (transcriptase reversa, a qual transcreve o RNA viral em DNA; integrase, responsável por integrar o DNA pró-viral ao genoma da células hospedeira e a protease responsável pela clivagem e maturação das sequências peptídicas virais) codificadas pelo *pol* (polimerase). Além das proteínas acessórias e adicionais: Nef codificada pelo *nef* (*negative factor*) responsável por aumentar a replicação viral e diminuir a expressão de CD4 e moléculas de classe I, Rev que transporta o RNA do núcleo para o citoplasma; 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; Vpu que degrada o CD4 e promove a liberação de novas partículas virais (Turners e Summers, 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, entre outras células (Garzino-Demo e Gallo, 2003). 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 novas células, principalmente de células T CD4+, resultando na imunossupressão característica da síndrome (Rowland-Jones, 2003). Sem a intervenção terapêutica, esta depleção de células T CD4+ ocasiona

imunodepressão severa 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 conceptos (Goulder et al., 2001).

No que diz respeito ao desenvolvimento de vacinas contra o HIV-1 há dois enfoques principais, estudos direcionados às vacinas profiláticas a serem administradas na população não infectada pelo HIV-1 e as vacinas terapêuticas a serem usadas na imunoterapia em indivíduos infectados pelo HIV-1 objetivando a melhora da resposta imune ao vírus, visando regressão e/ou estabilização da doença (Estcourt, McMichael e Hanke, 2004).

Neste contexto, a utilização de vacinas de DNA representa uma estratégia que evita o risco das vacinas com microrganismos vivos ou atenuados, além de ser capaz de estabelecer potente resposta citotóxica e humoral em modelos murinos, podendo ser utilizada na profilaxia ou na terapia. Além disso, são potencialmente indutoras de resposta Th1, essencial na geração de resposta de linfócitos T CD8+ citotóxicos (CTL), e da produção de anticorpos em camundongos e humanos (Arrode et al., 2007; Martin et al., 2007; Graham et al., 2006; Zhang et al., 2002).

A vacinação com 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), vírus da hepatite C (Youn et al., 2003), HIV (Asakura et al., 1999) mostrou-se eficaz em estabelecer a resposta imune antiviral em alguns modelos animais como os roedores. 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, Wang e Grimes-Serrano, 2008).

As vacinas de DNA são vetores de expressão (plasmídeo) que utilizam sinais de transcrição e as organelas das células eucarióticas transfectadas para expressão *in situ* do antígeno (Estcourt, McMichael e Hanke, 2004). As vacinas de DNA funcionam como sistemas de entrega do antígeno que são capazes de promover produção *in vivo* do antígeno vacinal por várias semanas (Boyle e Robinson, 2000). Estas vacinas codificam

os genes de uma porção antigênica de um microrganismo, normalmente sob controle de um promotor viral (Estcourt, McMichael e Hanke, 2004; Hobson et al., 2003).

Algumas vacinas que obtiveram sucesso em controlar a infecção *in vivo* contêm o antígeno e componentes adjuvantes que estimulam a resposta imune inata (Medzhitov, 2007; Rulendran e Ahmed, 2006). No caso das vacinas de DNA o elemento adjuvante e os mecanismos intra e extracelulares de sinalização que geram as respostas de células T e B ainda não são conhecidos (Ishii et al., 2008). Pensava-se que os adjuvantes dos plasmídeos seriam os motivos CpGs (citosina-fosfo-guanina) não metilados que sinalizariam via TLR-9 (Tudor et al., 2005). Entretanto, foi demonstrado que camundongos deficientes para TLR-9 ou MyD-88 geram similar resposta humoral e celular ao antígeno vacinal que os animais controles (Ishii et al., 2008). Recentemente, foi descrita que a ação adjuvante e a imunogenicidade de vacinas de DNA são 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 requerida para indução de células T e B antígeno-específicas. Na imunização com as vacinas gênicas ocorre a transfecção nas células e posteriormente a tradução da proteína, seguida da sua secreção ou processamento intracelular antigênico. Os antígenos sintetizados endogenamente são degradados 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), depois são associados a 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 via moléculas de classe II para as células T auxiliaadoras (T *helper* – Th ou T CD4+), por apresentação cruzada (Howarth e Elliot, 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 ligam-se na cadeia invariável que bloqueia a união com proteínas recém sintetizadas no lúmen e direciona para os endossomas acidificados contendo os peptídeos antigênicos, neste local a cadeia invariável é clivada e ocorre a ligação dos peptídeos antigênicos às moléculas de classe II do MHC que migram para a superfície celular e são apresentadas para as células T CD4+.

As vacinas antivirais consideradas eficientes são aquelas capazes de estimular as células T CD8+ e CD4+, por apresentação de antígeno por todas as células através das

moléculas de classe I e II do MHC, respectivamente, pelas APCs (Bennett et al., 1997), além de induzirem produção de anticorpos. A ativação de células T CD4+ por apresentação de antígenos através de moléculas de classe II do MHC é vital para a função de vacinas genéticas, como demonstrado em camundongos deficientes para moléculas de classe II do MHC ou depletados de células T CD4+ (Chan et al., 2001; Maecker et al. 1998). Os linfócitos T auxiliares são cruciais para o desenvolvimento de uma resposta imune celular eficiente e persistente. Sendo estes linfócitos T CD4+ essenciais para expansão clonal de células B antígeno específicas, mudança de classe de anticorpos e geração de células T de memória.

Várias construções de vacinas de DNA para potencializar a imunogenicidade foram documentadas e, entre elas, as que possibilitam a apresentação do antígeno endógeno através de moléculas de classe II do MHC. Neste sentido, foram realizados estudos de vacinas quiméricas de DNA que codificam proteínas de microrganismos patogênicos conjugadas à proteína associada à membrana lisossomal 1 (LAMP-1 - *lysosome-associated membrane protein 1*), capazes de direcionar o tráfego de antígeno endógeno para os compartimentos de classe II do MHC (Chen et al., 2000; Rowell et al., 1995; Ruff et al., 1997). Alguns estudos foram realizados com vacinas quiméricas de DNA, constituídas pelo gene que codifica a LAMP-1, que direciona o tráfego do antígeno para os compartimentos de classe II do MHC, conjugado aos genes de microrganismos como do *Plasmodium* sp (Dobaño et al., 2007); vírus da dengue (Lu et al., 2003), do vírus do papiloma humano (Peng et al., 2005; Chen et al., 2000; Wu et al., 1995) e do HIV-1 (Rowell et al., 1995; Ruff et al., 1997; Marques et al., 2003; De Arruda et al., 2004; Chikhlikar et al., 2004; De Arruda et al., 2006; Chikhlikar et al., 2006).

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, necessários para levar algumas proteínas recombinantes através do compartimento vesicular aos lisossomos (Guarnieri et al., 1993). A proteína LAMP-1 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). Este 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 (Ruff et al., 1997; Kleijmeer et al., 1995).

No caso do HIV-1, o direcionamento do antígeno sintetizado endogenamente pelo tráfego da LAMP-1 às moléculas de classe II do MHC aumentou a resposta de células T CD4+ e a imunidade humoral em camundongos imunizados com a vacina quimérica de DNA que codifica a gp160 do HIV conjugada à LAMP-1 (Ruff et al., 1997). Contudo, vacinas que contêm a gp160 do HIV-1 precisam ser constituídas por diversos genes do envelope que cubram toda heterogeneidade desta região viral, sendo este um obstáculo no uso das glicoproteínas do envelope do HIV-1 em construção de vacinas eficazes que impeçam a infecção por este vírus. A resposta imune contra proteínas do envelope do HIV é relativamente menos eficiente em reduzir as populações virais que infectam os indivíduos (Walker, 2007). A busca por uma vacina efetiva contra o HIV foi direcionada a produtos que geram resposta imunológica às proteínas do envelope viral, entretanto este direcionamento pode favorecer o crescimento do vírus (Walker, 2007).

Atualmente, muitos estudos têm abordado a resposta de células T CD4+ e CD8+ aos peptídeos da Gag do HIV, considerando que a intensa resposta a Gag está associada com proteção (Betts et al., 2005; Price et al., 2009) e com o controle da viremia durante a infecção (Rolland et al., 2008; Huang et al., 2008; Serwanga et al., 2009). Outros fatores corroboram com a seleção da proteína Gag na composição da vacina como por exemplo, a característica de ser um gene relativamente conservado entre as diversas classes e subclasses do HIV-1, além do fato de promover ampla resposta cruzada anti-Gag entre pacientes infectados por subclasses diferentes de HIV-1 (Bertoletti et al., 1997; Norris et al., 2004). Recentemente foi demonstrado que a Gag é o primeiro antígeno a ser exposto na membrana das células infectadas (Sacha et al., 2007). Propõe-se então, que vacinas que induzam respostas contra proteínas conservadas do HIV, como a Gag, expressas precocemente antes do ciclo replicativo do vírus terminar, sejam ideais, pois as células T CD8+ reconheceriam as células infectadas antes dos novos vírus serem liberados (Sacha et al., 2007), ressalta-se que o ciclo replicativo do HIV ocorre em torno de 24 horas (Kim et al., 1989).

Desta forma, Marques et al. (2003) desenvolveram a vacina quimérica de DNA denominada *LAMP/gag*, que contém a seqüência gênica que codifica a proteína de 55 kDa do *gag* do HIV-1 (*p55gag*) inserida entre os segmentos que codificam o domínio luminal e o citoplasmático/transmembrânico da LAMP-1 murina. A transfecção de

células de linhagem com o plasmídeo *LAMP/gag* promove co-localização da Gag com as moléculas de classe II do MHC (Marques et al., 2003). A imunização de camundongos adultos BALB/c com a vacina *LAMP/gag* foi capaz de induzir potente resposta celular CD4+, CD8+, produção de anticorpos e estabelecer resposta de memória de longa duração em camundongos imunizados com esta vacina em relação aos animais que receberam apenas o p55-*gag* nativo (Marques et al., 2003, Chikhlikar et al., 2004, De Arruda et al., 2004). Foi demonstrado que a depleção de células CD4+ estimuladas com p55Gag de camundongos adultos imunizados com *LAMP/gag* diminui a produção de IFN- $\gamma$  (Marques et al., 2003). De Arruda et al. (2006) demonstraram que a vacina *LAMP/gag* promove aumento na diversidade de epítomos que são reconhecidos pelas células T de camundongos imunizados com a vacina quimérica provavelmente devido ao direcionamento distinto que as proteínas *LAMP/gag* e Gag seguem no interior das células transfectadas (De Arruda et al., 2006). Ainda, foi observado que a vacina de DNA *LAMP/gag* aumenta o número de epítomos reconhecidos por células B por um provável aumento na produção da proteína que é produzida e/ou pela alteração da conformação da proteína Gag quando quimerizada com a LAMP-1 (De Arruda et al., 2006). Chikhlikar et al. (2006) imunizaram macacos Rhesus com a vacina *LAMP/gag* (contendo o gene *LAMP* humano) e detectaram resposta de células T e B aos peptídeos da Gag.

O fato desta vacina quimérica apresentar importante imunogenicidade em camundongos adultos e macacos chama a atenção para evoluir o estudo desta vacina em fase precoce de vida e posteriormente verificar sua capacidade de promover resposta de longa duração. A construção estratégica da vacina de DNA quimérica com a LAMP-1 e o gene *gag* do HIV poderá contribuir para a indução de resposta imune nos neonatos, possibilitando um adequado processamento antigênico pelas APCs e desenvolvimento de resposta adaptativa mediada pelas células Th e CTL.

Os neonatos são mais susceptíveis a vários agentes infecciosos devido a imaturidade imunológica e pela ausência de experiência antigênica. As infecções virais ou bacterianas no trato respiratório e/ou intestinal representam um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento (Siegrist, 2007). Dentre os agentes infecciosos relacionados com a morbidade e mortalidade neonatal/infantil vale citar os *Streptococcus* do grupo B, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, vírus da herpes simples (HSV), citomegalovirus (CMV), vírus Epstein-Barr (EBV), varicella-zoster,

virus sincicial respiratório (RSV) e o HIV-1 (Marchant et al., 2001; Goulder et al., 2001).

Este período precoce de vida geralmente é caracterizado pelas diferenças qualitativas e quantitativas em relação ao sistema imunológico do adulto, o que reflete na alta susceptibilidade neonatal aos agentes infecciosos (Siegrist, 2007; Adkins, Leclerc e Marshall-Clarke, 2004). Esta imaturidade imunológica relativa, caracterizada por um período de hipogamaglobulinemia transitória pode gerar uma limitação na eficácia de vacinas em induzir resposta imune protetora, como observado em neonatos e crianças e também em várias espécies de animais, incluindo os camundongos (Nahmias e Kourtis, 1997; Siegrist, 2001).

No período neonatal, há elevada predisposição à tolerância, um efeito indesejável nos testes de vacinas. Além disso, em período precoce de vida há ausência de memória, somada à inabilidade na apresentação antigênica, da qualidade funcional das células T *helper*, da resposta T citotóxica e da produção de anticorpos (Siegrist, 2007; Adkins, Leclerc e Marshall-Clarke, 2004). Estas características salientam a necessidade de utilização de vacinas que possibilitem adequada apresentação de antígeno via classe II do MHC para as células Th para favorecer o desenvolvimento da resposta adaptativa.

Muitas particularidades imunológicas são observadas no período neonatal, como a diminuição da reserva de fatores da medula óssea, acarretando na redução da aderência e quimiotaxia celular, baixa atividade enzimática e menor número de células em relação à medula óssea adulta (Kovarik e Siegrist, 1998; Adkins, Bu e Guevara, 1999). Ainda na fase neonatal existe a falta de um microambiente anatômico apropriado para a interação entre as DCs e as células T e B, caracterizado por separação indefinida entre os linfáticos periarteriolares, as zonas marginais, os folículos de células B e centros germinais. Estas características podem gerar diferenças fenotípicas e funcionais das células B, que refletem na baixa produção de anticorpos, contribuindo para uma resposta humoral neonatal mais tardia, de menor intensidade e duração (Adkins, Leclerc e Marshall-Clarke, 2004; Pihlgren et al., 2001).

A falha na expressão de moléculas acessórias em APCs e nas células T também é um dos fatores que contribui para a disfunção imunológica neonatal (Lu, Calamai e Unanue, 1979; Durandy et al., 1995; Min et al., 2001; Simpson, Woods e Muller, 2003). As DCs de camundongos neonatos expressam um número menor de moléculas de classe

II do MHC (*Major Histocompatibility Complex* – Complexo Principal de Histocompatibilidade), CD40, CD80 e CD86, desta maneira a interação com o CD28 nas células T é ineficiente (Marshall-Clarke, Tasker e Parkhouse, 2000; Muthukkumar, Goldstein e Stein, 2000; Simpson, Woods e Muller, 2003).

Além disso, as células apresentadoras de antígenos de neonatos são imaturas quanto à função, e estão em número reduzido em relação aos adultos promovendo inabilidade no desenvolvimento das respostas imunes contra patógenos. Porém, quando as áreas esplênicas se tornam organizadas, o número de APCs atingem valores similares aos adultos (Stockinger, 1996; Marshall-Clarke, Tasker e Parkhouse, 2000; Adkins, Leclerc e Marshall-Clarke, 2004). Apesar do número reduzido de DCs, as células CD11c+ de camundongos BALB/c de 7 dias de idade estimuladas com LPS são capazes de processar e apresentar o antígeno às células T, *in vitro*, e induzir resposta CTL *in vivo* (Dadaglio et al., 2002). Por outro lado, DCs humanas de cordão estimuladas com LPS não apresentam fenótipo completamente maduro na indução da produção de IFN- $\gamma$  pelas células T CD4+ (Langrish et al., 2002).

No baço neonatal de camundongos, a maioria dos linfócitos B apresenta fenótipo imaturo IgM+IgDlow/- (Marshall-Clarke, Tasker e Parkhouse, 2000). A ausência da expressão de IgD de superfície associada com a interação inapropriada entre as células, altera a sinalização e a ativação de linfócitos B, diminuindo a produção de anticorpos (Adkins, 1999; Bot e Bona, 2002). A resposta humoral em neonatos e em crianças é lenta, de curta duração e apresenta afinidade diminuída. Além disso, as células B expressam baixos níveis de CD40, que juntamente com a baixa expressão de CD40L nas células T, contribui para a síntese diminuída de anticorpos IgG, IgA e IgE (Bot e Bona, 2002; Adkins, Leclerc e Marshall-Clarke, 2004; Pihlgren et al., 2001). Os neonatos apresentam deficiência na produção de anticorpos aos antígenos T independentes tipo II, como os polissacarídeos da cápsula bacteriana (Adkins, Leclerc e Marshall-Clarke, 2004; Siegrist, 2007), consequentemente são mais susceptíveis a infecções por *Neisseria meningitides*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Em adultos, a expressão de TACI (*transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor*), uma molécula da família de receptores de TNF, é fundamental na resposta humoral contra vacinas composta por polissacarídeos (Kanswal et al., 2008). A expressão de TACI está dramaticamente reduzida em neonatos murinos comparados aos adultos, além dos seus ligantes BARR ou APRIL não

induzirem anticorpos IgA, IgG e IgM pelos linfócitos neste período inicial de vida (Kanswal et al., 2008).

Outra característica do período neonatal é a deficiência relativa na indução de proliferação das células plasmáticas da medula óssea que colabora com a baixa indução de anticorpos na idade neonatal e com o rápido declínio na produção de anticorpos às vacinas (Pihlgren et al., 2001). Outra característica das células estromais da medula óssea neonatal é o fato destas não proporcionarem sinais que promovam a sobrevivência e diferenciação de plasmablastos em células de longa duração (Pihlgren et al., 2006). Quando o compartimento de células B neonatal é estimulado de maneira apropriada, com o uso de imunógenos potentes, como proteínas complexas ou vetores virais, que ativam adequadamente as APCs, há indução de anticorpos de avidéz semelhante aos adultos (Schallert et al., 2002, Kovarik et al., 2001).

Outro fator que influencia a susceptibilidade neonatal às infecções é a ausência de memória imunológica, que pode ser compensada pela rapidez com que as células T e B entram em ciclo celular após ativação (Adkins et al., 2003) permitindo a rápida mobilização dos mecanismos efetores contra uma ampla gama de patógenos que são apresentando pela primeira vez ao sistema imune neonatal.

É bem documentado que a gestação está associada com mudanças da resposta imune periférica (Faas et al., 2005) e as citocinas/quimiocinas/fatores de crescimento estão envolvidos em vários processos como implantação do embrião, desenvolvimento da placenta, desenvolvimento do embrião e parto, desta forma oscilando quanto a sua concentração dependendo do período analisado e influenciando o desenvolvimento da resposta imune no recém-nascido (Bowen et al., 2002). Na gestação, as citocinas Th2 produzidas na interface materno/fetal eram relacionadas com o sucesso da gravidez, em contraste às citocinas Th1 (Wegmann, 1993). Entretanto, as citocinas Th1, como o IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1, são críticas para o processo de implantação do embrião no útero (Mitchell, Trautman e Dudley, 1993). Ainda, a IL-18 mostrou estar em concentração superior na decídua e na placenta de modelos de gestação não abortivos (Chaouat et al., 2002). Imediatamente após a implantação do feto, as células NK secretoras de IL-18 povoam o útero (Chaouat et al., 2002). As células NK uterinas são fontes de IFN- $\gamma$  no início da gravidez e são necessárias para o remodelamento vascular uterino e para ocorrência da implantação do embrião e gravidez ocorrer, estas células se expandem na presença de IL-15 e são ativadas por sinais dependentes de células T (Anne Croy et al., 2006). A IL-4 e IL-10 estimulam a liberação de prostaglandinas por alguns tecidos

gestacionais e oscilam durante o processo gestacional (Bowen et al., 2002). O GM-CSF e o G-CSF estão relacionados com o desenvolvimento/crescimento do embrião (Contramaestre et al., 2008) e estimulam a produção da gonadotrofina coriônica (Bowen et al., 2002). A IL-7 está associada com a diminuição da linfopoiese de células B durante a gestação (Bosco et al., 2006). Já a quimiocina IP-10 (*interferon-inducible protein 10* ou CXCL10) é induzida por estímulos pró-inflamatórios como por infecções virais e produtos microbianos, além de estar aumentada em gestantes com pré-eclampsia (Gotsch et al., 2007). De fato, o sucesso da gestação está relacionado com o balanço entre as citocinas Th1/Th2.

Supõe-se que a vacinação gênica pré-concepção possa alterar os níveis das citocinas/quimiocinas e outros fatores durante a gestação, por induzir ativação de fatores pró-inflamatórios pela TBK1 mimetizando uma infecção por vírus de DNA. As quimiocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES são induzidas no processo inflamatório gerado durante a infecção viral e são importantes na inibição da infecção pelo HIV-1 (Cocchi et al., 1995). Estas quimiocinas são ligantes naturais do CCR5, que é um co-receptor utilizado junto a molécula CD4, para o HIV-1 entrar nas células. A MCP-1 é a quimiocina ligante de CCR2, outro co-receptor utilizado pelo HIV-1, desta forma é mais um neutralizante natural da infecção (Berger, Murphy e Faber, 1999).

A imunidade caracterizada durante a gestação exerce impacto fundamental na indução da resposta imune no neonato (Morein et al., 2002; Morein et al., 2007). Fisiologicamente em camundongos neonatos, existe uma polarização de produção de citocinas do padrão Th2, com secreção de altos níveis de IL-4 e baixos de IFN- $\gamma$  em relação aos adultos (Barrios et al., 1996; Kovarik e Siegrist, 1998; Adkins, 1999; Adkins, Leclerc e Marshall-Clarke, 2004; Siegrist, 2007). Esta polarização se relaciona com a secreção diminuída de IL-12 pelas APCs neonatais (Lee et al., 1996). Em modelos experimentais e em humanos, a presença de IL-4 durante a sensibilização antigênica inibe a expressão da cadeia  $\beta$ 2 da IL-12 (IL-12 $\beta$ 2) em linfócitos virgens, direcionando a secreção de citocinas do padrão Th2 e inibindo o desenvolvimento da resposta Th1 (Adkins, Bu e Guevara, 2001). Após reestimulação com o mesmo antígeno o camundongo neonato desenvolve uma resposta Th2 (Adkins, Du, 1998).

Depois da ativação, uma pequena população de as células T CD4+ de neonatos que não entra em ciclo celular produz IL-4 e IL-13 (Rose et al., 2007). Estas células apresentam-se em estágio hipometilado na região genética regulatória de expressão de citocinas Th2, o que facilita a rápida e a alta expressão de IL-4 e IL-13. Em contraste,

em camundongos adultos a transição para o padrão Th2 demora vários dias e envolve processos diferentes, como a proliferação celular e demetilação do DNA (Rose et al., 2007). Foi demonstrado em modelo de transferência de células DO11.10 em camundongos, que linfócitos Th1 de neonatos, por apresentarem uma alta expressão do receptor IL-13R1, são susceptíveis a apoptose induzida por IL-4 (Li et al., 2004). Além disso, as células T CD4<sup>+</sup> apresentam níveis reduzidos de STAT4 e regulação epigenética do promotor de IFN- $\gamma$  prevenindo sua diferenciação em Th1 (Adkins, 2007). Outro achado que corrobora com a polarização da resposta Th2 em neonatos relaciona-se com a maturação tardia de um subgrupo de DCs que produz IL-12, permitindo a expressão aumentada da IL-13R $\alpha$ 1 e sua associação com a IL-4R $\alpha$ 1 (Lee et al., 2008). Aos seis dias de vida os neonatos apresentam acúmulo de DCs CD8a<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> produtoras de IL-12 no baço. A IL-12 promove regulação negativa do IL-13R $\alpha$ 1 na célula Th1, diminuindo a sua apoptose e restaurando a produção de IFN- $\gamma$  após re-estimulação antigênica (Lee et al., 2008). Estratégias que consigam balancear as respostas Th1/Th2 podem facilitar o desenvolvimento de vacinas contra infecções (Siegrist, 2001).

O direcionamento para o padrão Th2 na resposta imune neonatal pode ser um dos fatores que influencia a geração de resposta CTL nesta fase de vida. Entretanto, em circunstâncias específicas, células T CD8<sup>+</sup> de humanos e camundongos conseguem desenvolver uma resposta citotóxica madura paralelamente ao desenvolvimento de resposta Th1 (Adkins, Leclerc e Marshall-Clarke, 2004). A imunização de camundongos neonatos com vírus da leucemia murina promoveu maior expansão de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  comparada à imunização de camundongos adultos (Fadel, Ozaki e Sarzotti, 2002). A função efetora de células CD8<sup>+</sup> de memória *in vivo* após priming neonatal foi equivalente à gerada após priming de adultos (Fadel et al., 2006).

Ainda no período neonatal, foi demonstrado que aos sete dias de idade ocorre supressão da resposta efetora à infecção pelo HSV mediada pelas células T regulatórias (T regs) (Fernandes et al., 2008). A depleção das células T regs nos neonatos antes da infecção por HSV aumentou a resposta citotóxica de células T CD8<sup>+</sup> *in vivo* detectada pela expressão de granzima e IFN- $\gamma$  (Fernandes et al., 2008). As células (T regs) suprimem as células T auto-reativas evitando o desenvolvimento de doenças auto-imunes e limitam a amplificação da resposta a antígenos como de microrganismos, limitando a imunopatologia (Sakaguchi et al., 2005; Suffia et al., 2006). De fato, em

neonatos murinos infectados por rotavírus ocorre expansão de células Treg que interfere na sobrevivência de células T e B (Kim et al., 2008). Em humanos a depleção de células Tregs no cordão umbilical aumenta a função efetora de células T em crianças expostas à malária (Brustoski et al., 2006). Da mesma maneira, a depleção de células Treg em crianças expostas ao HIV-1 e não infectados revelou intensa resposta de células T comparada a infantis não expostos ao vírus (Legrand et al., 2006). Além disso, o acúmulo de células Treg em órgãos linfóides associa-se com a progressão da infecção pelo HIV-1 para aids, contribuindo com a inabilidade do sistema imune no controle da replicação viral (Nilsson et al., 2006).

A necessidade do amadurecimento e melhora da magnitude da resposta adaptativa neonatal salienta a importância dos anticorpos maternos (AcMats) na proteção contra as infecções durante este período, mas estes AcMats podem interferir na vacinação infantil. A vacinação materna se mostra eficaz em conferir proteção a várias doenças infecciosas através da transferência passiva de anticorpos, prevenindo ou atenuando o risco de infecção à criança (Siegrist et al., 1998). Os anticorpos maternos exercem função crucial na prevenção de algumas doenças no período neonatal até que o esquema de vacinação infantil seja completado (Rigato et al., 2009). Entretanto, os anticorpos maternos podem interferir na eficiência da imunização das crianças, como observado nas condições de altos níveis de anticorpos maternos que são capazes de inibir as vacinas compostas por vírus atenuados (Siegrist, 1998). Um dos mecanismos mais prováveis de influência dos AcMats na resposta do neonato é a neutralização do antígeno vacinal devido à formação de imunocomplexos ou pela ação inibitória decorrente da interação do imunocomplexo de antígeno-anticorpo ao receptor Fc $\gamma$ RIIB expresso nas células B (Siegrist, 2003). Uma estratégia para escapar do efeito inibitório dos AcMats na vacinação neonatal é a utilização de vacinas de DNA, considerando que a produção intracelular das proteínas vacinais impediria a ação destes anticorpos, visto que parte da proteína produzida após transfeção celular permanece no interior da célula.

A imunização com a vacina de DNA que codifica a proteína do HSV ou com o vírus inativado em camundongos de um dia de idade induz eficaz resposta imune humoral e celular (Manickan et al., 1997). Contudo, somente os neonatos de mães imunizadas que foram imunizados com a vacina de DNA foram capazes de desenvolver resposta imune efetiva. Estas evidências indicam que as vacinas de DNA, em contraste com outras formas de vacinação, parecem ser capazes de induzir imunidade mesmo em

presença de anticorpos maternos neutralizantes. Sedegah et al. (2003) demonstraram que camundongos imunizados com vacina de DNA contra malária, nascidos de mães imunizadas com a mesma vacina foram protegidos e desenvolveram eficiente resposta de células T. A imunização materna com plasmídeo contendo genes do HIV-1 com posterior reforço com peptídeos é capaz de aumentar a amplitude da resposta imune humoral na prole imunizada com DNA (Brave A et al., 2008).

Os anticorpos maternos gerados após infecção não alteram o desenvolvimento de resposta imune às vacinas de DNA e a proteção neonatal contra desafio utilizando vírus da coriomeningite linfocítica ou HSV em modelo murino (Hasset, Zhang e Whitton, 1997). A vacinação materna com DNA gera anticorpos neutralizantes que são transferidos para a prole de camundongos protegendo-os contra o desafio letal com vírus influenza (Zhang et al., 2005; Chen et al., 2007). Os anticorpos maternos são mais eficientes na neutralização do vírus do que os anticorpos produzidos pelos neonatos após imunização com DNA, provavelmente este fato se relacione com o fato da vacina não ser processada e traduzida em proteína estruturalmente complexa que promova a maturação de afinidade dos anticorpos no período neonatal.

A relação entre o sistema imune materno/fetal e materno/neonatal durante a gravidez e amamentação é assunto de intensa investigação e relevância para entendimento da indução de imunogenicidade às vacinas no período neonatal (Rigato et al., 2009). Alguns mecanismos são propostos em relação aos fatores imunológicos maternos que possam influenciar a imunização da prole como: a neutralização do antígeno vacinal pelos anticorpos maternos; as interações idiotípicas entre os anticorpos maternos e os receptores de células B e/ou T nos neonatos, que podem regular a proliferação clonal das células e a transferência materna de citocinas/quimiocinas e, fatores tróficos que podem controlar a expansão clonal de células T e B do neonato (Rigato et al., 2009).

Uma outra abordagem na tentativa de imunizar a mãe, durante a gravidez, visando sensibilizar o sistema imune fetal *in utero* foi documentada. A imunização materna de camundongos, por via intravenosa primou o sistema imune fetal (Xin et al., 2002; Okuda et al., 2001). A injeção de vacina de DNA via intravenosa em camundongos gestantes, nove dias após o coito transfere a vacina de DNA ao feto, gera resposta de células T e produção de anticorpos, protegendo o recém-nato após desafio com vírus influenza (Okuda et al., 2002). Enquanto que a vacina de DNA contendo

gene do envelope firal do HIV-1 administrada em camundongos na semana final da gestação gerou resposta celular e humoral quando a prole recebeu uma dose da mesma vacina (Xin et al., 2001).

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 que poderá refletir na prevenção da doença até a fase adulta. Desta forma, as vacinas *LAMP-1/p55Gag*, *p55Gag* e *LAMP-1* foram investigadas quanto a imunogenicidade em modelo experimental neonatal e para avaliar a influência da imunização materna, seja na pré-concepção ou durante a gestação, na resposta à vacinação da prole. Os achados experimentais sobre indução de imunidade utilizando vacina de DNA anti-HIV em modelo experimental neonatal, com a abordagem materno-fetal, poderão fornecer subsídios aplicáveis à vacinação que beneficiarão gestantes e crianças até a fase adulta.

***Objetivos***

## 2 Objetivos

A proposta do projeto foi avaliar a imunogenicidade da vacina de DNA quimérica contendo a seqüência que codifica a p55Gag do HIV-1 ligada à seqüência que codifica a proteína associada à membrana lisossomal 1 (LAMP-1) em camundongos BALB/c no período neonatal. A partir do estabelecimento dos protocolos de imunização neonatal, avaliar a duração da resposta e a influência da imunização materna pré-concepção e durante a gestação na resposta vacinal da prole.

## 2.1 Objetivos específicos

1. Avaliar a imunogenicidade das vacinas gênicas (*LAMP/gag*, *gag* e *LAMP*) iniciando a imunização em período neonatal em camundongos pela produção de anticorpos anti-Gag, número de células produtoras de IFN- $\gamma$  de aos pools de peptídeos da Gag, produção de citocinas ao peptídeo imunodominante da Gag restrito ao reconhecimento por moléculas de classe I do MHC, potencial citotóxico de células T CD8+ e a resposta de memória imunológica após imunização neonatal;
2. Avaliar o efeito da imunização materna com as vacinas gênicas, antes da concepção, na transferência de citocinas e anticorpos anti-Gag pela via transplacentária e pela amamentação à prole e na resposta humoral e celular da prole vacinada em período neonatal;
3. Avaliar se a imunização intravenosa com as vacinas gênicas durante a gestação é capaz de induzir a expressão do RNAm de Gag nos tecidos da prole e sensibilizar a prole de camundongos.

# *Material e Métodos*

## 3 Material e métodos

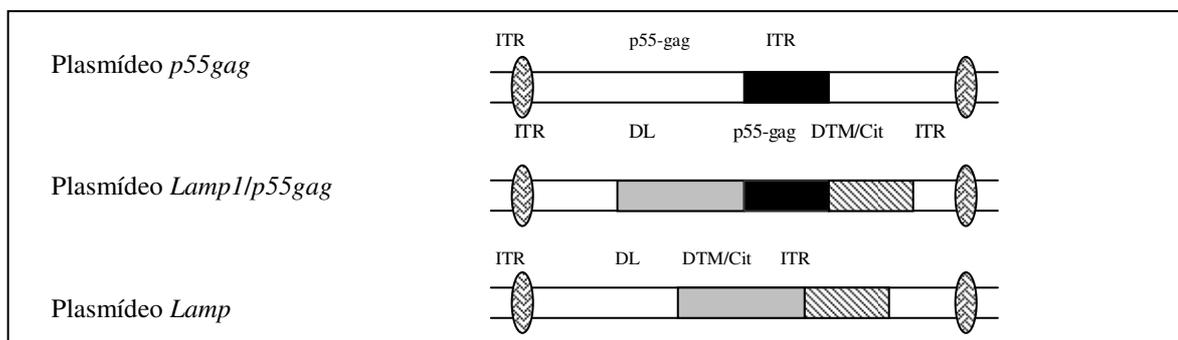
### 3.1 Animais

Camundongos isogênicos BALB/c, fêmeas e machos, de aproximadamente 6-8 semanas de idade, mantidos em condições livre de patógenos específicos (SPF – *specific pathogen free*) foram adquiridos do Biotério do Centro Multidisciplinar para a Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas (UNICAMP). As proles, de ambos os sexos, obtidas dos acasalamentos foram utilizadas em idade variável.

### 3.2 Plasmídeos

O plasmídeo utilizado foi o pITR que 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 (Marques *et al.*, 2003). O plasmídeo denominado *gag* (*p55gag*) foi construído através da clonagem da seqüência da proteína de 55 Kd do gene *gag* da cepa HXB2 do HIV-1 (nucleotídeos 1 ao 1503 de acordo com *GenBank* KO3455; HIV sequence Database, 1997, Los Alamos National Laboratory Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, NM) no vetor pITR. O plasmídeo quimera *LAMP/gag* foi construído através da inserção da seqüência *p55Gag* entre o domínio luminal e a porção citoplasmática e transmembrânica da LAMP-1 (Marques *et al.*, 2003), vide Figura 1. As seqüências da LAMP-1 (*GenBank* JO3881) também foram clonadas e inseridas no pITR (De Arruda *et al.*, 2004). Os plasmídeos foram obtidos através da transformação da cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (Invitrogen, Calsbad, CA) e purificados de acordo com recomendações do fabricante das colunas livre de endotoxina (Qiagen Inc., Valencia, CA). Os plasmídeos 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, EUA.



**Figura 1** – Representação esquemática dos plasmídeos a serem utilizados neste estudo. Os vetores de plasmídeo contêm regiões terminais invertidas de repetição (ITR – *inverted terminal repeats*) do vírus adenoassociado flanqueando os elementos de expressão. A caixa cinza representa a região de início de leitura (ORF – *open reading frame*) do domínio luminal da proteína associada à membrana lisossomal 1 (LAMP-1), a caixa cinza listrada representa as ORFs do domínio transmembrânico (TM) e citoplasmático (cit) da LAMP-1. A caixa preta representa a ORF da proteína de 55 Kd codificada pelo gene *gag* do HIV-1 (p55Gag) (Marques et al., 2003).

### 3.3 Expressão das proteínas LAMP/gag e Gag

As células HEK-293 foram transfectadas com os plasmídeos pITR-*LAMP/gag*, pITR-*gag* e pITR-*LAMP* com o reagente de transfecção Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, CA, EUA). Resumidamente, células da linhagem HEK-293 (células renais humanas transformadas com DNA adenovirus 5) foram distribuídas ( $1 \times 10^6$  células/poço) em placas de 6 orifícios (Nunc, Roskilde, Denmark) e incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Após confluência de 90% das culturas, as células foram lavadas com meio RPMI e incubadas com o reagente Lipofectamine™ 2000 e com 4 µg de DNA por 48 horas a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram incubadas a 4 °C por 15 minutos com tampão de lise e inibidor de protease (Calbiochem Corporation, CA, EUA) e a concentração protéica do *pellet* celular determinada pelo método de Bradford. O controle negativo utilizado foi célula HEK-293 não transfectada. A identificação das proteínas das células transfectadas com os plasmídeos foi realizada por eletroforese em gel de poliácridamida e imunotransferência. As amostras e padrão de

peso molecular (10 à 220kDa; Invitrogen) foram submetidas à eletroforese gel de poliacrilamida a 10% e transferidos para membranas de polivinilidene fluoride (PVDF, Immobilon Millipore, Bedford, MA, EUA). As membranas foram bloqueadas por 2 horas com PBS contendo 5% de leite desnatado em pó (Molico, Nestlé, SP, Brasil). Após lavagem com PBS 0,05% Tween, foi acrescentado o anticorpo monoclonal de camundongo IgG anti-Gag ou anticorpo monoclonal de rato anti-LAMP (cedido por Dr. Ernesto Marques, Johns Hopkins, Baltimore, MD) e incubado por 2 horas a temperatura ambiente. Após lavagens, anticorpos anti-camundongo ou anti-rato conjugado a peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA) foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi revelada com substrato quimioluminescente *SuperSignal* (Pierce, Rockford, IL, EUA), exposta em filme de raio-X em cassete e revelado em processador (X-OMAT 450RA Processor, Kodak, Fotodyne, Hartland, WI, EUA). As bandas de peso molecular referentes às proteínas Gag (55Kd), *LAMP/gag* (220Kd) foram avaliadas.

### **3.4 Protocolo de imunização neonatal**

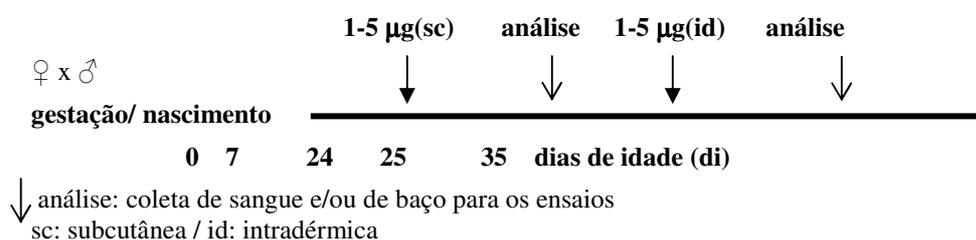
A imunização dos camundongos foi realizada com 1µg ou 5µg de DNA plasmideal que contém as seqüências gênicas *LAMP/gag*; *gag* nativa ou *Lamp*. Os camundongos neonatos receberam a primeira dose aos sete dias de idade pela via subcutânea (sc) com os plasmídeos em 20 µL de salina estéril e a segunda dose no 25º dia após imunização (dai) pela via intradérmica (id). Os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital no 20º ou 35º dai, o soro estocado a -70 °C e os respectivos baços foram coletados no 35º dia de idade para execução dos ensaios funcionais. Para avaliar a resposta de memória imunológica, alguns grupos após imunização neonatal, foram sangrados a cada 30 dias e reforçados por via id com 25µg da vacina aos 260 dias de idade (di) e avaliados após 10 dias.

- ***Grupo de Imunização Neonatal (proveniente de mãe não imunizada)***

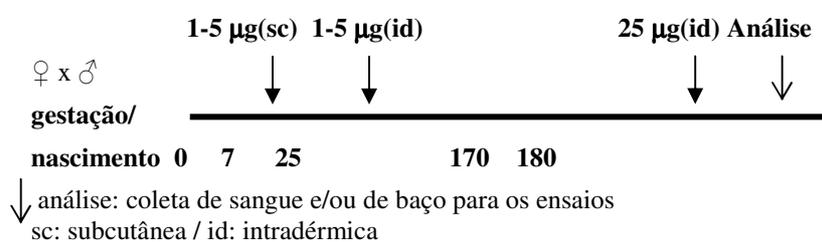
- A) Grupo *LAMP/gag+LAMP/gag* (LG+LG): proles submetidas à imunização neonatal com 1 ou 5µg de *LAMP/gag* aos sete dias de idade e no 25° dia de idade;
- B) Grupo *gag+gag* (G+G): proles submetidas à imunização neonatal com 1 ou 5µg de *p55Gag* nativo aos sete dias de idade e no 25° dia de idade;
- C) Grupo *LAMP/gag+gag* (LG+G): proles submetidas à imunização neonatal com 1µg de *Lamp /gag* aos sete dias de idade e com 1µg de *gag* no 25° dia de idade;
- D) Grupo *gag+ Lamp /gag* (G+LG): proles submetidas à imunização neonatal com 1µg de *gag* aos sete dias de idade e com 1µg de *LAMP/gag* no 25° dia de idade;
- E) Grupo *Lamp + Lamp* (L+L): proles submetidas à imunização neonatal com *Lamp* aos sete dias de idade e no 25° de idade.

Alguns grupos adicionais foram imunizados com as vacinas *LAMP/gag* e *gag* apenas no 25° de idade.

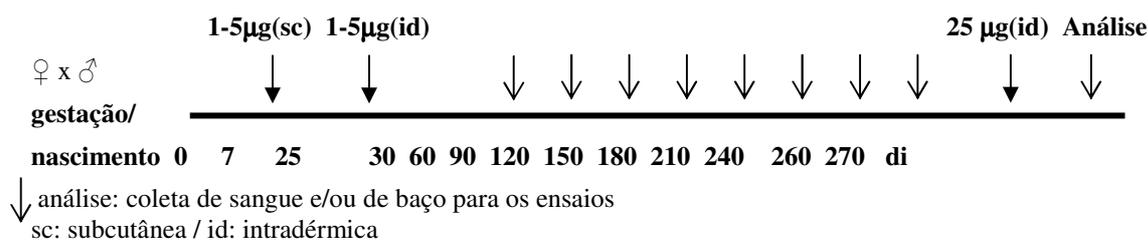
### *Protocolo de Imunização neonatal*



### *Protocolo de Imunização neonatal e análise de memória aos 6 meses de idade*



### *Protocolo de Imunização neonatal e análise de memória aos 9 meses de idade*



### 3.5 Protocolo de imunização adulta e/ou materna

Camundongos BALB/c fêmeas de 8-10 semanas foram imunizados de acordo com o protocolo de imunização descrito por De Arruda e colaboradores (2004). As fêmeas receberam pela via id 50 µg de plasmídeo (plasmídeo *LAMP/gag*; *gag* ou *Lamp*) em 50 µL de solução salina estéril e após 20 dias, foram submetidas a um reforço pela mesma via com 50 µg do respectivo plasmídeo, e analisadas 10 dias após o reforço (protocolo de imunização na idade adulta). Outros grupos de fêmeas foram acasalados no 21º dia após a imunização com camundongos machos BALB/c não imunizados e permaneceram com o macho por um período de 13 dias (imunização materna).

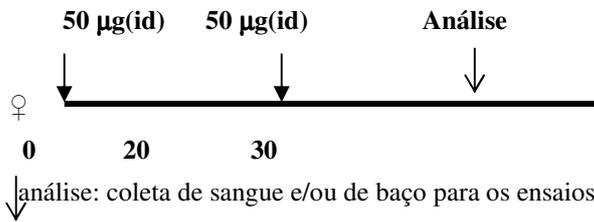
- **Grupo de Imunização Adulta/Materna**

- A) Grupo *LAMP/gag*+ *LAMP/gag* (LG+LG): fêmeas imunizadas e reforçadas com 50 µg de *LAMP/gag* foram acasaladas no 21º dia após imunização ou analisadas após 30 dias da imunização;
- B) Grupo *gag*+*gag* (G+G): fêmeas imunizadas e reforçadas com 50 µg de *gag*, acasaladas ou analisadas conforme item A;
- C) Grupo controle *Lamp*+*Lamp* (L+L): fêmeas imunizadas e reforçadas com 50 µg de *Lamp*, acasaladas ou analisadas conforme item A.

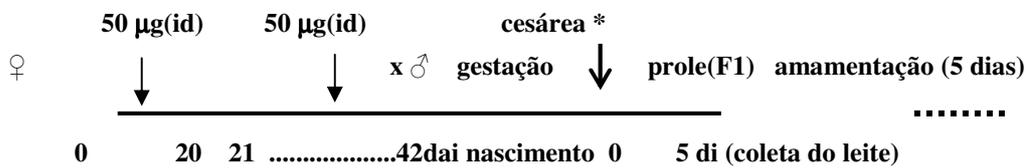
- ***Grupo de Imunização Neonatal (proveniente de mãe imunizada)***

- D) Grupo *LAMP/gag+LAMP/gag* (LG+LG): proles de mães imunizadas com *LAMP/gag* foram submetidas à imunização neonatal com 1 ou 5 µg de *LAMP/gag* aos sete dias de idade e aos 25 dias de idade;
- E) Grupo *gag+gag* (G+G): proles de mães imunizadas com *gag* foram submetidas à imunização neonatal com 1 ou 5 µg de p55*Gag* nativo aos sete dias de idade e aos 25 dias;
- F) Grupo *gag+gag* (G+G): proles de mães imunizadas com *LAMP/gag* foram submetidas à imunização neonatal com 1 ou 5 µg de p55*Gag* nativo aos sete dias de idade e aos 25 dias;
- G) Grupo *Lamp + Lamp* (L+L): proles submetidas à imunização neonatal com *Lamp* aos sete dias de idade e aos 25 dias.

**Protocolo de Imunização Adulta/Materna (via id)**



**Protocolo de Imunização Materna (via id)**



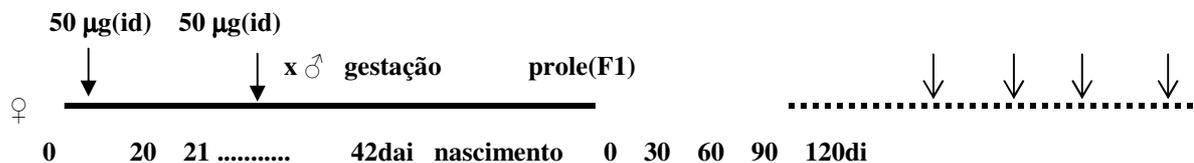
x ♂: acasalamento com BALB/c macho não imunizado

dai: dia após a imunização

cesárea\*: na gestação a termo (21 dias de gestação ) foi coletado o soro fetal, líquido amniótico, soro materno

prole (F1): coleta de leite materno do estômago de neonato de 5 dias de idade (di)

**Protocolo de Imunização Materna para análise de transferência de anticorpo para prole**



↓ análise: sangria

x ♂: acasalamento com BALB/c macho não imunizado

dai: dias após a imunização

prole (F1) não imunizada: coleta de sangue aos 30, 60, 90 e 120 dias de idade (di)

***Protocolo de Imunização Materna e de Imunização neonatal***



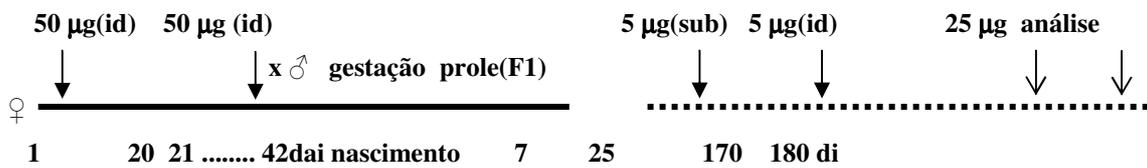
x ♂: acasalamento com BALB/c macho não imunizado

dai: dias após a imunização

prole (F1) imunizadas: análise aos 35 dias de idade (di) (sangria e coleta de baço), alguns camundongos imunizados na idade neonatal foram deixados para analisar resposta de memória imunológica e foram sangrados no 60º di.

↓ análise: coleta de sangue e de baço para os ensaios

***Protocolo de Imunização Materna e Imunização neonatal para análise de resposta de memória aos 6 meses de idade***



x ♂: acasalamento com BALB/c macho não imunizado

dai: dias após a imunização

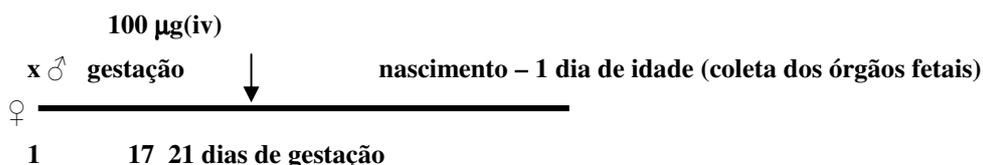
prole (F1) imunizadas: análise aos 180 dias de idade (di) (sangria e coleta de baço).

↓ análise: coleta de sangue e de baço para os ensaios

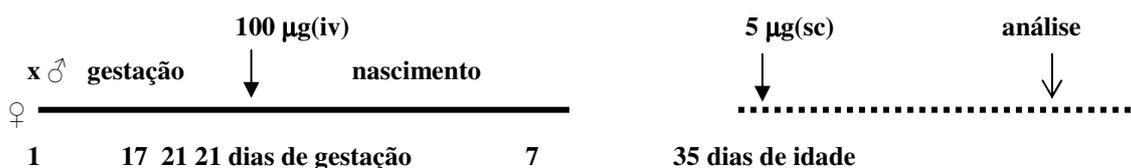
### 3.6 Protocolo de imunização intravenosa materna no período gestacional

Camundongos BALB/c fêmeas de 8-10 semanas foram acasalados e imunizados intravenosamente pelo plexo retro-orbital na terceira semana do período gestacional com 100µg de plasmídeo (*LAMP/gag*; *gag* ou *LAMP*) em 300 µL de salina estéril. Proles de 1 dia de idade foram sacrificadas para coleta de tecidos fetais (baço, timo, coração, pulmão, fígado) para análise da presença do RNA mensageiro do DNA vacinal. Outras fêmeas permaneceram com a prole pelo período de 35 dias. Algumas proles foram imunizadas com 5 µg aos 7 dias de idade e analisadas aos 35 dias de idade.

#### *Protocolo de Imunização Materna por via iv*



#### *Protocolo de Imunização Materna via iv e Imunização neonatal*



x ♂: acasalamento com BALB/c macho não imunizado  
prole (F1) imunizadas: análise aos 35 dias de idade (di) (sangria e coleta de baço),  
↓ análise: coleta de sangue e de baço para os ensaios

### **3.7 Obtenção de células esplênicas**

O baço dos camundongos foi obtido assepticamente e macerado em peneiras de nylon de 0,40µm (Cell strainer, BD&Pharmingen, San Diego, CA, EUA) sob uma placa de petri contendo meio de cultura RPMI 1640. A suspensão de células mononucleares foi obtida por centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque, densidade de 1096. A suspensão de células foi lavada por duas vezes em meio de cultura RPMI 1640 e a concentração celular obtida 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 Tripan.

### **3.8 Freqüência de células esplênicas produtoras de IFN-γ (ELISpot)**

Para avaliação de células esplênicas secretoras de IFN-γ por ELISpot, foi utilizado o kit (BD&Pharmingen, San Diego, CA, EUA), como descrito por De Arruda e colaboradores (2004). Microplacas de 96 poços com suporte de membrana de nitrocelulose (Millipore, Bedford, MA, EUA), foram previamente incubadas com 5 µg/mL de anticorpos anti- IFN-γ (clone RA-6A2) durante 18 à 20 horas à 4 °C. Posteriormente, as placas foram lavadas com tampão PBS, bloqueadas com PBS contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Hyclone III, Lotan CT, EUA) durante 2 horas a temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente e células esplênicas ( $0.5 \times 10^6$  céls/orifício) em meio RPMI 1640 suplementado (RPMI-S) com 1% de SFB foram distribuídas nos poços e incubadas na presença ou não de 10 µg/ml de 25 conjuntos (*pools*) de peptídeos de 15 aminoácidos (com sobreposição de 11 resíduos) representantes da 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] ou com 1µg/mL de anticorpo anti-CD3 NA/Le (BD&Pharmingen, San Diego, CA, EUA) durante 18 hrs à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Lavagens com PBS-Tween 0,1% foram procedidas e posteriormente as microplacas foram incubadas com 2µg/mL de anticorpo monoclonal biotilado anti-mouse-IFN-γ (PharMingen, San Diego, CA) durante 2

horas a temperatura ambiente. Uma nova série de lavagens em PBS-Tween 0,1% foi realizada seguida de uma incubação por 1 hora à 37° C com avidina-HRP (Pharmingen) diluída 1:100. As placas foram lavadas com PBS-Tween 0,1%, incubadas por 15 – 30 minutos à 37 °C com o substrato AEC (Calbiochem, San Diego, EUA), em seguida foram lavadas com água destilada e, uma vez secas, os *spots* foram quantificados em contador automático C.T.L. (Cellular Technology, OH, EUA) e referidos como número de células formadoras de *spot* (Spot forming cell – SFC) por  $0,5 \times 10^6$  células. Os dados foram avaliados pelo número de células formadoras de *spot* /  $0,5 \times 10^6$  obtidas por cada estímulo subtraída do número de SFC sem estímulo, contados no contador automático CTL ImmunoSpot® S4 Analyzer utilizando o software ImmunoSpot 3.2 (C.T.L., Cleaveland, OH, EUA). Foi considerado positivo quando o número de SFC foi superior ou igual a  $10 \text{ SFC} \times 0,5 \times 10^6$  células.

*Peptídeos da Gag do HIV-1 consenso subtipo B (15aa)* - os pools de peptídeos foram organizados conforme seguem:

1 – aa 1-31; 2 – aa 21-51; 3 – aa 41-67; 4 – aa 61-91; 5 – aa 81-111; 6 – aa 101-131; 7 – aa 121-151; 8 – 141-171; 9 – aa 161-191; 10 – aa 181-211; 11 – aa 201-231; 12 – aa 221-251; 13 – aa 241-271; 14 – aa 261-291; 15 – aa 281-311; 16 – aa 301-331; 17 – aa 321-351; 18 – aa 341-371; 19 – aa 361-391; 20 – aa 381-411; ; 21 – aa 401-431; 22 – aa 421-451; 23 – aa 441-471; 24 – aa 461-491; 25 – aa 481-503. (aa: aminoácidos)

### **3.9 Cultura de células para obtenção de sobrenadantes**

A suspensão de células esplênicas ( $4 \times 10^6$  células/mL) em meio RPMI contendo 10% de SFB foi distribuída em 100 µL/poço de microplacas de 96 orifícios e incubadas com 100 µL de meio RPMI-10% SFB ou 10 µg/ml de epitopo do gene *gag* AMQMLKETINNAEAE restrito a classe I do MHC (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, EUA) ou com anticorpo monoclonal de hamster anti-CD3 de camundongo (1 µg/mL, PharMingen) a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes das culturas foram coletados após incubações de 72 horas, centrifugados a 1000rpm por 5

minutos a 10 °C, aliquotados e congelados a -70 °C para posterior dosagem das citocinas.

### **3.10 Determinação da concentração de citocinas pró-inflamatórias por citometria de fluxo**

A dosagem de citocinas de IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p70 no sobrenadante de culturas de esplenócitos foi realizada por citometria de fluxo utilizando o Kit Mouse Inflammation Kit Cytometric Bead Array (CBA, BD Pharmingen, CA, EUA). As amostras de sobrenadantes e a curva de concentração padrão foram incubadas com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações, foi acrescentado 1mL da solução de lavagem e centrifugado por 10 minutos a 1100 rpm. Retirou-se o sobrenadante e com 300  $\mu$ L da solução de lavagem ressuspendeu-se as amostras para as aquisições no citômetro de fluxo. As aquisições das amostras foram realizadas no citômetro BD FACS Calibur (BD&Bioscience) e os resultados foram gerados em formato gráfico e tabular utilizando BD CBA Analysis Software (BD&Bioscience). O limite de detecção fornecido pelo fabricante é de 5 pg/mL (IL-6), 17.5 pg/mL (IL-10), 52.7 pg/mL (MCP-1), 2.5 pg/mL (IFN- $\gamma$ ), 7.3 pg/mL (TNF- $\alpha$ ) e 10.7 pg/mL (IL-12p70).

### **3.11 Detecção de anticorpos por ELISA**

Anticorpos anti-Gag foram detectados por ensaio imunoenzimático (ELISA) modificado de Marques e colaboradores (2003). Os orifícios de microplacas MaxiSorp de 96 poços (Greiner, Alemanha) foram sensibilizados com 5  $\mu$ g/mL do lisado de HIV (ABI, Rockville, MD, EUA) em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9.5) por 18 horas à 4 °C. A solução foi retirada e as microplacas lavadas por seis vezes em PBS. As microplacas foram bloqueadas com PBS- 0.5% de gelatina (Oetker, São Paulo, Brasil), por 1 hora à 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas por três vezes com PBS e

incubadas com diluições seriadas do soro em PBS contendo 0.25% de gelatina (IgG a partir de: 1:100; IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3: a partir de 1:50) por 18 hrs à 4 °C. Após esta etapa, foram lavadas novamente em PBS-T contendo 0.1% de Tween 20 (PBS-T) e incubadas com anticorpo biotilado anti- $\gamma$ , anti- $\gamma$ 1, anti- $\gamma$ 2a, anti- $\gamma$ 2b e anti- $\gamma$ 3 (SouthernBiotech, Birmingham, Alabama, EUA) por 1 hora à 37 °C. Em seguida, depois de novas lavagens, foi adicionado às placas estreptoavidina peroxidase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e incubada por 30 minutos à 37 °C. Posteriormente, a atividade enzimática foi detectada pela adição de 100  $\mu$ l de tetrametilbenzidina (TMB, Calbiochem, Darmstadt, Germany) aproximadamente de 15-20 minutos à temperatura ambiente. A reação foi neutralizada pela adição de ácido sulfúrico 1M. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplaca de Elisa (Molecular Devices, CA, EUA).

### **3.12 Dosagem de TGF- $\beta$ 1**

A determinação de TGF- $\beta$ 1 no leite materno foi realizada por ELISA seguindo as recomendações do fabricante (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Os orifícios das microplacas de 96 poços (Costar) foram sensibilizados com anticorpo monoclonal anti-TGF- $\beta$ 1 na diluição 1:100 em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9,5) e incubadas a 4° C por um período de 20 horas. As microplacas foram decantadas e bloqueadas com uma solução de bloqueio (Promega, Kit TGF- $\beta$ ) na diluição 1:5 por 35 minutos à temperatura ambiente. Após este procedimento, diluições das amostras e da respectiva citocina recombinante foram incubadas por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação constante. Ao término deste período, as placas foram lavadas com tampão Tris-HCl/NaCl/0,05%-Tween 20 (pH 7,6) e o anticorpo secundário anti-TGF- $\beta$ 1 na diluição 1:10 foi adicionado e incubado por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação constante. Após novas lavagens foi adicionado anti-TGF- $\beta$ 1/HRP e as placas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação constante. A reação foi desenvolvida com a adição de TMB e bloqueada com ácido fosfórico 1,0 M. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplaca de ELISA (Biorad, EUA). As concentrações foram obtidas pela interpolação

dos valores de densidade óptica (DO) das amostras na curva padrão. O limite de detecção de TGF- $\beta$ 1 foi de 32 pg/ml.

### **3.13 Quantificação de células CD8+ antígeno específicas**

Animais imunizados no período neonatal receberam uma injeção contendo 20  $\mu$ g/mL do peptídeo da Gag restrito ao MHC de classe I AMQMLKETI<sub>65-73</sub> em 50  $\mu$ L de adjuvante (Titermax® gold, TiterMax, EUA) por via intraperitoneal (ip). Cinco dias após a segunda injeção ip, as células do baço foram coletadas e incubadas com pentâmero H-2K<sup>d</sup>/AMQMLKETI conjugado à PE e com anti-CD8 conjugado à 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 CD8+pentâmero+.

### **3.14 Fenotipagem das células CD8+**

Para determinação da população de memória efetora as células esplênicas foram incubadas com o peptídeo 10  $\mu$ g/ml do peptídeo imunodominante restrito a classe I (AMQMLKETI) por 4 dias com adição de 5 U/mL de IL-2 murina recombinante (BD&PharMingen), 5 ng/mL de IL-15 murina recombinante (Peprotech, New Jersey, EUA) e 2ng/mL de IL-7 murina recombinante (Peprotech). Anticorpos monoclonais anti-CD8, anti-CD44, anti-CD127, anti-CD69 conjugados a FITC, PE ou PC5 foram utilizados com seus respectivos controles isotípicos (BD&PharMingen). Células ( $5,0 \times 10^5$ ) foram incubadas com anticorpos anti-CD16/32 (*Fc block*) por 5 minutos a 4 °C e posteriormente por 30 minutos a 4 °C com os anticorpos monoclonais marcados diluídos em PBS contendo 1,0% SAB e 0,1% de azida sódica. O número relativo de cada população foi adquirido utilizando 10.000 eventos em aparelho de citometria de fluxo (Coulter- Epics XL).

### **3.15 Análise de células CD8+ secretoras de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ :, IL-2, Perforina e Granzima**

Para determinação intracelular de citocinas as células esplênicas foram incubadas com o peptídeo AMQMLKETI (10  $\mu\text{g/ml}$ ) e Brefeldina A (10  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma) em meio RPMI-S por 14 hrs a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as células foram coletadas e lavadas com solução PBS contendo 0,1% de azida sódica. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD8 conjugado a PC5 ou anti-CD8 PC5 e anti-LAMP-1 FITC por 30 minutos a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS-SAB e fixadas com PBS contendo 4% de formaldeído (Merck). Após mais uma lavagem, as células foram permeabilizadas com PBS-SAB (Sigma) contendo 0,5% de saponina (Sigma) e anticorpos monoclonais anti-TNF- $\alpha$  FITC e anti-IFN- $\gamma$  PE ou anti-IFN- $\gamma$  PE e anti-IL-2 FITC, ou com anti-perforina PE ou anti-granzima PE ou anticorpos isotípicos (PharMingen) por 40 minutos/escuro/4 °C. As células foram lavadas e ressuspensas em PBS-SAB. Foram utilizados anticorpos conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou ficoeritrina-cianina 5.1 (PC5) com seus respectivos controles isotípicos (PharMingen). Foram adquiridos 25.000 eventos por amostra em citômetro de fluxo (Coulter- Epics XL). Os resultados foram expressos pela porcentagem de células CD8+ que co-expressam IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$ /IL-2. E quanto a porcentagem de células CD8+ que co-expressam LAMP+/Perforina ou Granzima.

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

Esplenócitos ( $1 \times 10^6$ ) foram incubados com os anticorpos monoclonais anti-CD4 conjugado a PerCP (PharMingen), anti-CD25 conjugado ao PE (PharMingen), ou com seus respectivos controles isotípicos, por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, 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 (e-Bioscience) em tampão PBS/0,5%Saponina (Sigma) por 30 minutos a 4° C.

Após nova lavagem, as células foram ressuspensas em solução isotônica e a porcentagem da população CD25+FOXP3+ no baço 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 Dosagem das citocinas e quimiocinas por microesferas recobertas com anticorpos (multiplexed bead-based immunoassay - xMAP™) em citômetro de fluxo**

Microesferas de captura recobertas com anticorpos monoclonais para as citocinas e quimiocinas: IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e RANTES foram incubadas com as amostras biológicas de acordo com as especificações do fabricante. O método Lincoplex foi realizado pela empresa Genese, São Paulo. Brevemente, microplacas de 96 poços com membrana de filtro (Millipore, Bedford, MA, EUA) foram bloqueadas por 10 minutos com SFB. As amostras e padrões utilizados foram incubados com a mistura das beads por uma hora a temperatura ambiente sob agitação. Após série de lavagens a placa foi incubada com estreptoavidina conjugada a ficoeritrina (SAPE) durante 45 minutos no escuro, a temperatura ambiente e em constante agitação. A placa foi submetida então a outra série de lavagens e ressuspensas em tampão de lavagem para leitura em citômetro de fluxo Luminex100 IS System (Luminex Corporation, Austin, EUA). O limite de detecção foi de 3.2 pg/mL para todos os analitos.

### **3.18 Coleta dos órgãos de neonato**

Os órgãos (timo, baço, coração, pulmão e fígado) dos camundongos de 1 dia de idade foram coletados assepticamente e macerados em tela de nylon (BD&Pharmingen, San Diego, CA, EUA) em placa de petri contendo meio de cultura RPMI 1640. A suspensão de células foi centrifugada e lavada por duas vezes em RPMI 1640 e armazenadas a -70 °C até a extração do RNA.

### **3.19 Extração de RNA, obtenção do cDNA e reação semi-quantitativa de PCR em tempo real (Real-Time PCR)**

O RNA total dos tecidos de neonatos de mães imunizadas por via intravenosa com as vacinas foi extraído com kit QIAmp RNA blood (Qiagen, Valencia, CA, EUA) seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante. Para obtenção de cDNA partiu-se do RNA total purificado utilizando a metodologia do kit *Sensiscript Reverse Transcriptase* (Qiagen). A reação de amplificação em tempo real foi realizada com 1 a 10 µg amostra de cDNA, 25 µL da solução *Platinum SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), 1 µL de *ROX Reference Dye*, 12 µL de água destilada estéril e 10 µM dos *primers*. A síntese dos primers para Gag F5'-AGGAGCCACCCCACAAGATTTA-3'; R5'-TGGCCGGGTCCTCCTACTC-3' (Chikhlikar et al., 2004) foi realizada pela Invitrogen (Carlsbad, 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 iCycler (BioRad, EUA). Os dados obtidos foram interpretados com o programa iCycler iQ Program (BioRad). Os resultados representam o CT (*cycle threshold*) do gene de interesse.

### **3.20 Análise estatística**

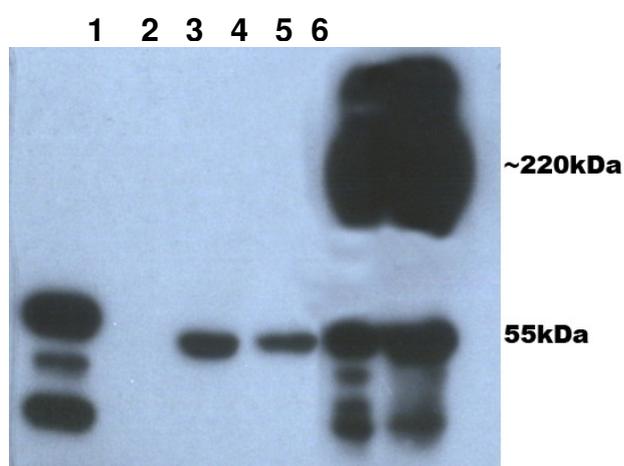
Os resultados foram analisados pelo teste estatístico *Mann-Whitney* quando comparados dois grupos e pelo teste *Kruskall-Wallis* com pós-teste de *Dunn's* quando foram comparados três ou mais grupos. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  e \*\*\* $P < 0.001$ .

# *Resultados*

## 4 Resultados

### 4.1 Expressão da proteína Gag em células HEK-293 transfectadas com as vacinas gênicas

Para procedermos a imunização de camundongos neonatos com as vacinas *LAMP/gag* e *gag*, avaliamos inicialmente a expressão da proteína por *western blot* após a transfecção de células HEK-293 com os plasmídeos pela técnica de lipofecção utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Detectamos a proteína Gag com anticorpos IgG anti-Gag pela identificação da banda de 55 kDa e a quimera *LAMP/gag* em bandas protéicas de aproximadamente 220 kDa ou superiores (Figura 2). Estas bandas são atribuídas à multimerização de Gag em altas concentrações, já as bandas abaixo de 200 kDa são atribuídas à proteólise da proteína quimérica (Marques *et al.*, 2003). A transfecção das células com *LAMP/gag* resultou em uma banda mais intensa de proteína em relação às células transfectadas com *gag*. Vale ressaltar que as transfecções foram realizadas em condições similares quanto a concentração de plasmídeo, número de células nas transfecções e na concentração das proteínas provenientes da lise das células transfectadas submetida a eletroforese.



**Figura 2 – Expressão de Gag por células HEK-293 transfectadas com os plasmídeos pITR-*gag* e pITR-*LAMP/gag*.** As células HEK 293 foram transfectadas utilizando *Lipofectamine 2000* com os plasmídeos contendo os genes *gag* nativo e *LAMP/gag* e as proteínas sintetizadas por estas células foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida e imunotransferência para membrana de PVDF e reveladas com IgG anti-Gag através da técnica de Western Blot. Coluna (1): lisado viral de HIV-1; (2): 20 $\mu$  g de proteína de lisado de células HEK não transfectadas com plasmídeos; (3) e (4): 20 $\mu$  g de proteína de lisado de células HEK transfectadas com plasmídeos *gag* nativo provenientes de diferentes extrações; (5) e (6): 20  $\mu$ g de proteína de lisado de células HEK transfectadas com plasmídeos *LAMP/gag* provenientes de diferentes extrações.

## 4.2 Imunogenicidade neonatal às vacinas de DNA

### 4.2.1 Produção de anticorpos às vacinas de DNA

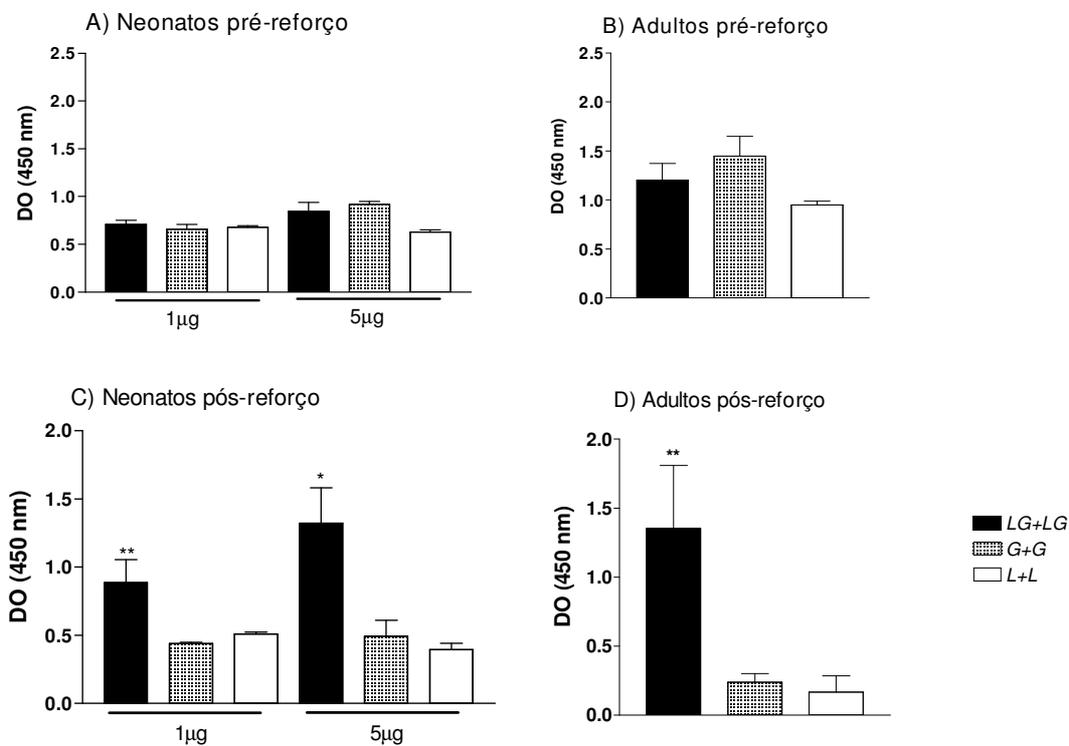
Camundongos BALB/c neonatos (sete dias de idade) e adultos (dois meses) foram imunizados com duas doses das vacinas com intervalo de 18-20 dias. A reatividade de anticorpos IgG anti-Gag dos animais imunizados com as vacinas *LAMP/gag*, *gag* ou *LAMP* foi determinada em dois momentos, antes da segunda dose (18-20 dias após imunização) e dez dias após o reforço, por reação de ELISA utilizando lisado viral de HIV-1 (Cepa IIIB). Observamos que uma única dose das vacinas em neonatos e adultos, tanto com *LAMP/gag* ou *gag*, não induz títulos detectáveis de anticorpos IgG anti-Gag (Figura 3A e 3B). No entanto, após o reforço, os neonatos imunizados com 1 µg e 5 µg de *LAMP/gag* apresentaram produção de IgG anti-Gag em nível superior comparados ao grupo imunizado com *gag* (Figura 3C). Perfis similares de produção de anticorpos foram observados em neonatos imunizados com as doses de 1 e 5 µg (Figura 3C) e em animais adultos imunizados com a mesma vacina (Figuras 3D).

Para avaliar se a produção de anticorpos foi decorrente da sensibilização no período neonatal, foi testado um grupo de camundongos que recebeu dose única aos 25 dias de idade (Figura 4). Comparando os níveis de anticorpos anti-Gag aos 35 dias de idade dos grupos testados, verificamos que somente a imunização com duas doses foi capaz de gerar resposta IgG anti-Gag. Além disso, houve o *priming* no período neonatal, considerando que os animais que receberam a vacina *LAMP/gag* somente aos 25 dias de idade não produziram anticorpos.

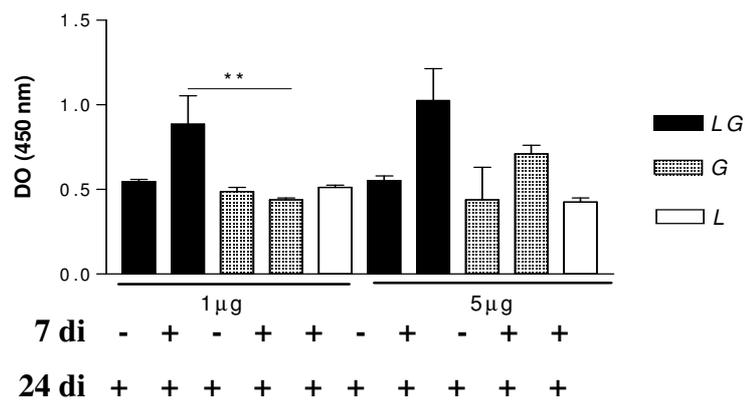
Posteriormente, analisamos a constituição das subclasses de anticorpos IgG anti-Gag promovida pela imunização neonatal e adulta com as vacinas de DNA. Observamos que a imunização com dose baixa de DNA (1µg) de *LAMP/gag* em neonatos induz preferencialmente anticorpos IgG1, enquanto a imunização com 5µg de *LAMP/gag* induz anticorpos IgG1, IgG2a e IgG2b (Figura 5). O aumento da dose da vacina em neonatos para 5 µg de *LAMP/gag* mostrou perfil de subclasses de IgG semelhante à imunização adulta com 50 µg, exceto para anticorpos IgG3 anti-Gag (Figura 5). Entretanto, no grupo de neonatos vacinados com *gag* (1 ou 5 µg) não foi

detectado produção de anticorpos, o que salienta que para produção de anticorpos no período neonatal é necessário a utilização da vacina quimérica *LAMP/gag*.

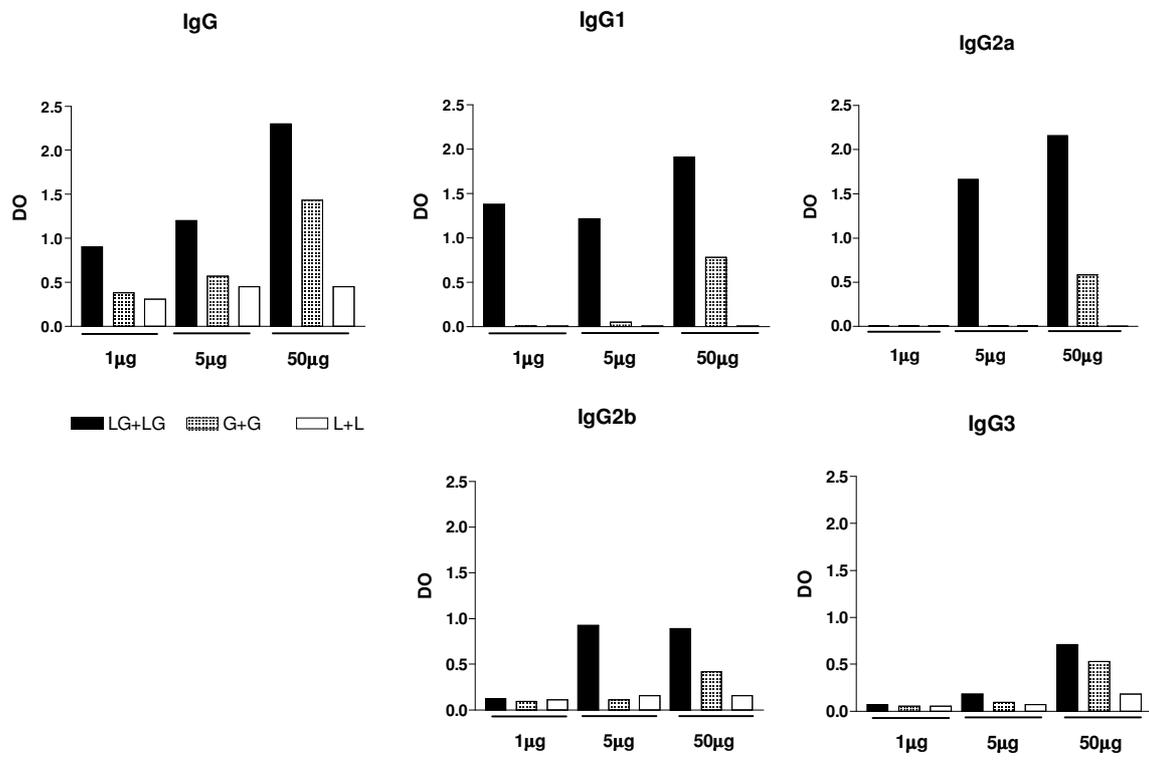
Um protocolo de imunização em que os camundongos receberam 1 µg de *LAMP/gag* aos sete dias e foram reforçados com 1 µg de *gag* aos 25 dias de idade foi avaliado. Este protocolo foi realizado para verificar se apenas o *priming* com *LAMP/gag* seria capaz de sensibilizar os animais. O *priming* com *LAMP/gag* seguido do reforço com *gag* foi mais eficiente para promover a produção de anticorpos IgG1, IgG2a e IgG2b (Figura 6) do que os grupos de animais que receberam as duas doses de *LAMP/gag* ou *gag*. Os resultados mostram que a imunização primária com *LAMP/gag* é eficiente para induzir a produção de anticorpos e que o reforço com *gag* potencializa a produção de anticorpos IgG2a e IgG2b anti-Gag.



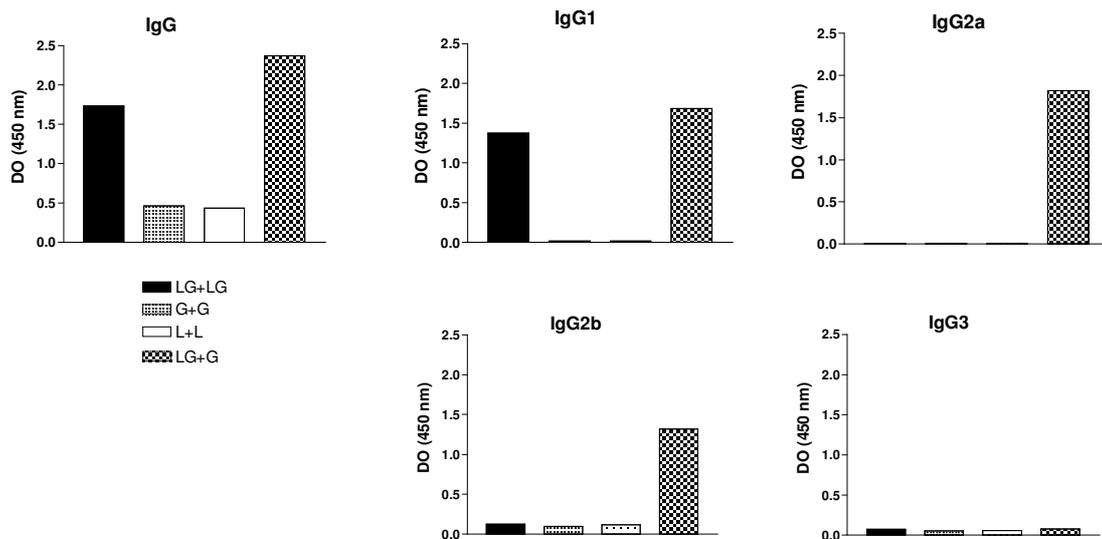
**Figura 3 – Vacinação neonatal com *LAMP/gag* induz produção de anticorpos IgG anti-Gag.** Camundongos neonatos foram imunizados subcutaneamente (sc) com 1 μg ou 5 μg das vacinas *LAMP/gag* (LG), *gag* (G) e *LAMP* (L) no sétimo dia de idade (di) e reforçados intradermicamente (id) no 25º di. Os animais adultos foram imunizados com 50 μg e reforçados após 20 dias. As amostras de soro (3-8 animais/grupo) foram coletadas após a primeira dose (18-20 dias após imunização: A e B) e 10 dias após o reforço (C e D). Os níveis de IgG anti-Gag foram avaliados por ELISA e representados por média ± EP, na diluição 1:100. \**P*<0.05; \*\**P*<0.01 quando comparado ao grupo imunizado com *gag*. DO = densidade óptica.



**Figura 4 – Priming com *LAMP/gag* no período neonatal é necessário para produção de IgG anti-Gag.** Camundongos neonatos foram imunizados ou não com 1µg ou 5µg de vacina de *LAMP/gag*, *gag* ou *Lamp* no sétimo dia de idade (di) e no 25º di. As amostras de soro (3-5 animais/grupo) foram coletadas aos 35 di e testados (1:100) por ELISA. \*\* $P < 0.01$  quando comparado ao grupo imunizado com *gag*.



**Figura 5 – Vacinação neonatal com *LAMP/gag* induz perfil de subclasses de IgG semelhante à imunização em camundongos adultos.** Camundongos neonatos foram imunizados e amostras de soro processadas em pool (3-6 animais/grupo) foram testadas por ELISA para determinação dos níveis de IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Os grupos analisados foram neonatos imunizados e reforçados com 1 ou 5 µg e adultos (50 µg) de *LAMP/gag*, *gag* ou *Lamp*. Os resultados são referentes a DO na diluição de 1:50 (neonatos e adultos), com exceção para IgG em adultos (1:1350). DO = densidade óptica (450 nm).



**Figura 6 – Uma dose de *LAMP/gag* (1  $\mu$ g) seguido do reforço com *gag* é mais eficiente para induzir a produção de subclasses de IgG do que a imunização com duas doses da vacina quimérica.** Camundongos neonatos foram imunizados e amostras de *pool* de soro (3-6 animais/grupo) testadas por ELISA (diluição do soro 1:50) para determinação dos níveis de IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Os grupos analisados foram camundongos neonatos imunizados e reforçados com 1  $\mu$ g de *LAMP/gag+LAMP/gag* (LG+LG), *gag+gag* (GAG+GAG), *LAMP+LAMP* (L+L) e *LAMP/gag+gag* (LG+GAG).

## 4.2.2 Resposta celular neonatal às vacinas de DNA

### 4.2.2.1 Perfil da resposta de IFN- $\gamma$ aos peptídeos da Gag do HIV-1 após imunização neonatal

Grupos de camundongos neonatos foram imunizados aos sete dias e reforçados aos 25 dias de idade com os plasmídeos: *LAMP/gag*, *gag* nativo e *LAMP*. Grupos de camundongos adultos também foram imunizados e avaliados para comparação dos resultados. O perfil de reatividade aos peptídeos da Gag do HIV foi avaliado por ELISPOT, para detectar o número de células secretoras de IFN- $\gamma$  para 123 peptídeos (15 aminoácidos com sobreposição de 11aa) compreendendo toda a proteína Gag do HIV-1. Estes foram agrupados em 25 conjuntos (*pools*), cada um contendo 5 peptídeos. O reconhecimento dos peptídeos da Gag foi considerado positivo quando o número de células formadoras de *spot* (SFC) foi superior a 10 IFN- $\gamma$  SFC por  $0.5 \times 10^6$  esplenócitos (*cut-off*).

Na Figura 7, observamos que os animais imunizados com 1  $\mu$ g de *LAMP/gag* reconheceram 11 *pools* de peptídeos enquanto os imunizados com *gag* reconheceram 6 *pools*. Um aumento no número de *pools* reconhecidos foi observado nos neonatos imunizados com 5  $\mu$ g de *LAMP/gag* e *gag*, com o reconhecimento de 17 e 12 *pools*, respectivamente. A vacinação com *LAMP/gag* em camundongos adultos promoveu o reconhecimento de 18 *pools* de peptídeos da proteína *Gag* do HIV enquanto que com *gag* de 16 *pools*.

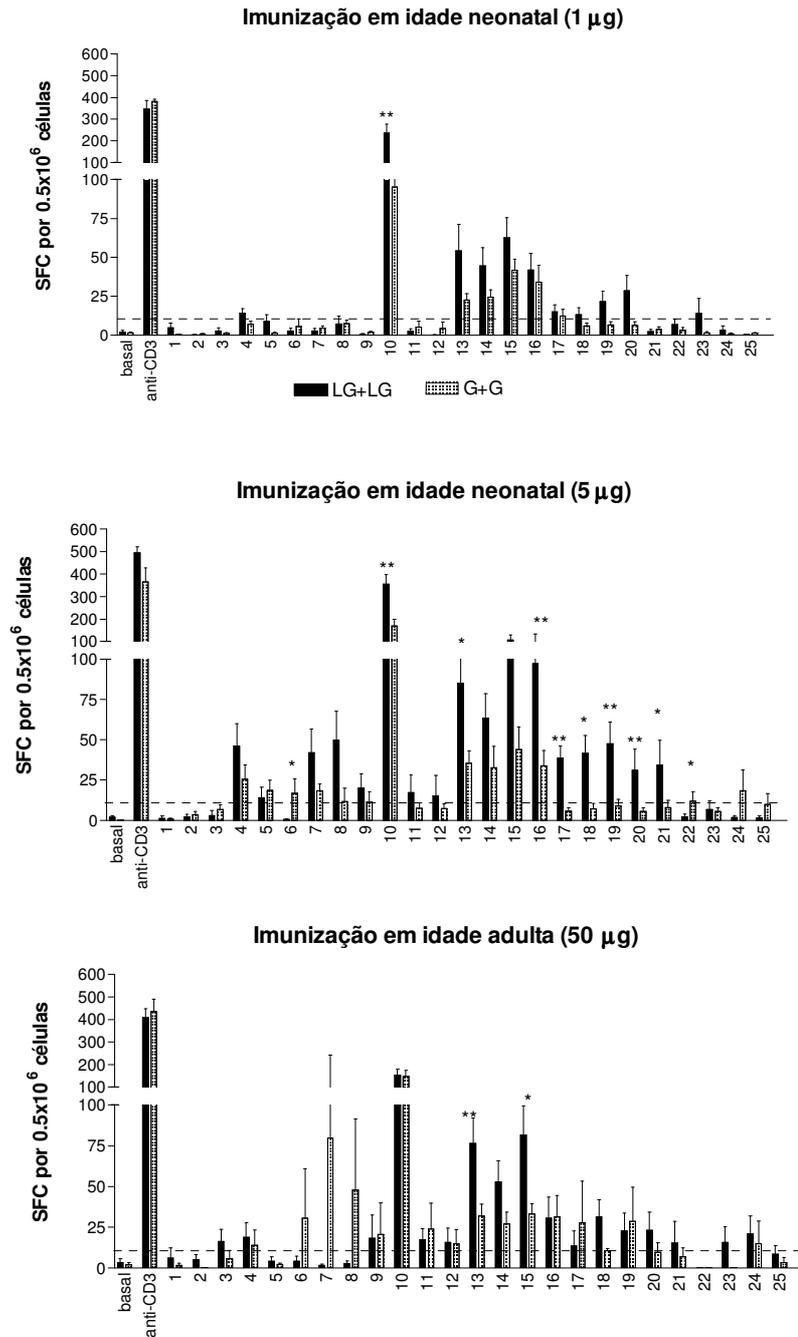
Um número maior de células produtoras de IFN- $\gamma$  foi observado para o pool 10 nos camundongos imunizados com 1  $\mu$ g de *LAMP/gag* em relação aos imunizados com *gag* (Figura 7). Neste *pool* de peptídeos está localizado o peptídeo imunodominante (AMQMLKETI) reconhecido pelas moléculas de classe I do MHC H-2K<sup>d</sup>, haplótipo dos camundongos BALB/c. O peptídeo imunodominante possui 15 aminoácidos de comprimento (AMQMLKETINNAE), e foi descrito por ser reconhecido apenas por clones de células T CD8<sup>+</sup> (De Arruda *et al.*, 2006). Já a imunização neonatal com 5  $\mu$ g de *LAMP/gag* promoveu aumento significativo no número de SFC para oito *pools* (10,

13, 16, 17, 18, 19, 20 e 22) quando comparado com a vacinação com *gag* (Figura 7). Na idade adulta a imunização com *LAMP/gag* gerou um número superior de SFC apenas para os pools 13 e 15 em relação à vacinação com *gag* (figura 7). As médias do número de SFC de IFN- $\gamma$  para cada grupo vacinado encontram-se no Anexos A, B e C. No grupo controle composto por camundongos imunizados com a vacina contendo o gene *LAMP* não houve produção de IFN- $\gamma$  aos pools de peptídeos da Gag, exceto para o *pool* 7 (Anexo A). Entretanto, não houve reconhecimento deste pool na imunização com *LAMP/gag* ou *gag*.

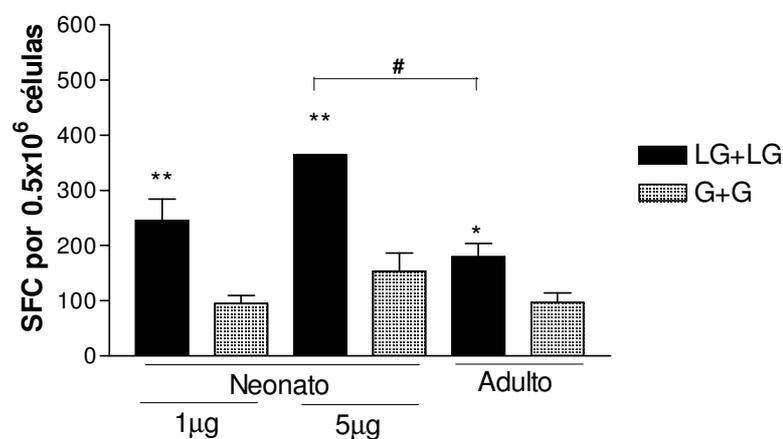
A Figura 8 ilustra o número SFC de IFN- $\gamma$  ao peptídeo imunodominante de classe I de neonatos imunizados (1  $\mu$ g ou 5  $\mu$ g de DNA) e de adultos imunizados (50  $\mu$ g). É possível observar que a dose de 5  $\mu$ g de *LAMP/gag* induz um número de SFC de IFN- $\gamma$  superior em relação à imunização adulta, enquanto que a imunização com *gag* tanto na idade neonatal como adulta gera uma frequência de SFC de IFN- $\gamma$  similar. A vacinação com *LAMP/gag* induziu número superior de SFC nos neonatos e adultos em relação à imunização com *gag*.

Na análise da resposta IgG anti-Gag dos protocolos de imunização neonatal foi observado que o *priming* com a vacina quimérica *LAMP/gag* (1  $\mu$ g) seguido de reforço com *gag* (1  $\mu$ g) foi mais eficaz (Figura 6). Desta forma, avaliamos o número de células secretoras de IFN- $\gamma$  aos peptídeos da Gag de camundongos imunizados com duas doses de 1  $\mu$ g de *LAMP/gag*, animais imunizados com uma dose de *LAMP/gag* e reforçados com *gag* (grupo LG+G), e animais imunizados com 1  $\mu$ g de *gag* e reforçados com 1 $\mu$ g de *LAMP/gag* (grupo G + LG). A figura 9 mostra que o grupo imunizado com LG+G apresenta número de SFC de IFN- $\gamma$  semelhante em relação ao grupo LG+LG, porém superior para os pools 6 e 9. Já o grupo G+LG mostrou um menor reconhecimento e um número reduzido de SFC aos *pools* de peptídeos, enfatizando a importância do *priming* com a vacina quimérica no período neonatal.

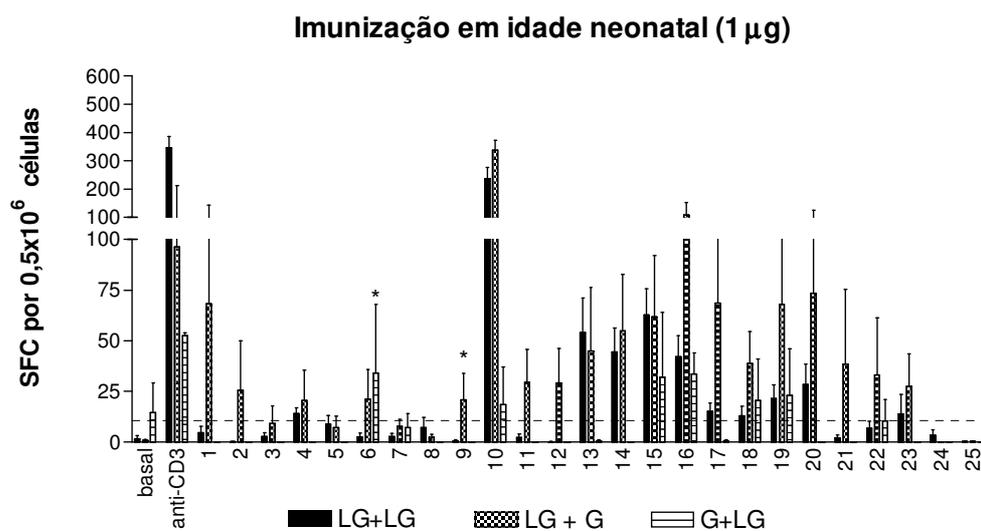
Os resultados evidenciam que a imunização com o plasmídeo quimérico *LAMP/gag* é imunogênico no período neonatal considerando o amplo reconhecimento e a magnitude de células produtoras de IFN- $\gamma$  aos peptídeos da região *gag* do HIV em relação a imunização com *gag*.



**Figura 7 – Perfil de resposta de IFN- $\gamma$  aos peptídeos da Gag de camundongos neonatos e adultos imunizados com as vacinas de DNA.** Camundongos neonatos e adultos foram imunizados com as vacinas de DNA *LAMP/gag* ou *gag* e sacrificados 10 dias após o reforço para obtenção dos esplenócitos e análise de células secretoras de IFN- $\gamma$  aos peptídeos da Gag por ELISPOT. A barra ilustra a média  $\pm$  EP de 2-5 experimentos utilizando um *pool* de células esplênicas de (2-3 animais/experimento) por grupo. A linha tracejada representa o *cut-off*. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  quando comparado com o grupo imunizado com *gag*.



**Figura 8 – Número de SFC de IFN- $\gamma$  ao peptídeo imunodominante de classe I em camundongos neonatos e adultos imunizados com *LAMP/gag* (LG+LG) e *gag* (G+G).** Esplenócitos produtores de IFN- $\gamma$  ao epítipo imunodominante restrito a classe I do MHC (AMQMLKETINNEEAA) foram determinados por ELISPOT. Camundongos foram imunizados em idade neonatal ou adulta e sacrificados 10 dias após o reforço para coleta das células esplênicas. A figura ilustra a média  $\pm$  EP de 2-5 experimentos (2-3 animais/experimento) por grupo. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , quando comparado com o grupo *gag*; # quando comparado com camundongos adultos imunizados com *LAMP/gag*

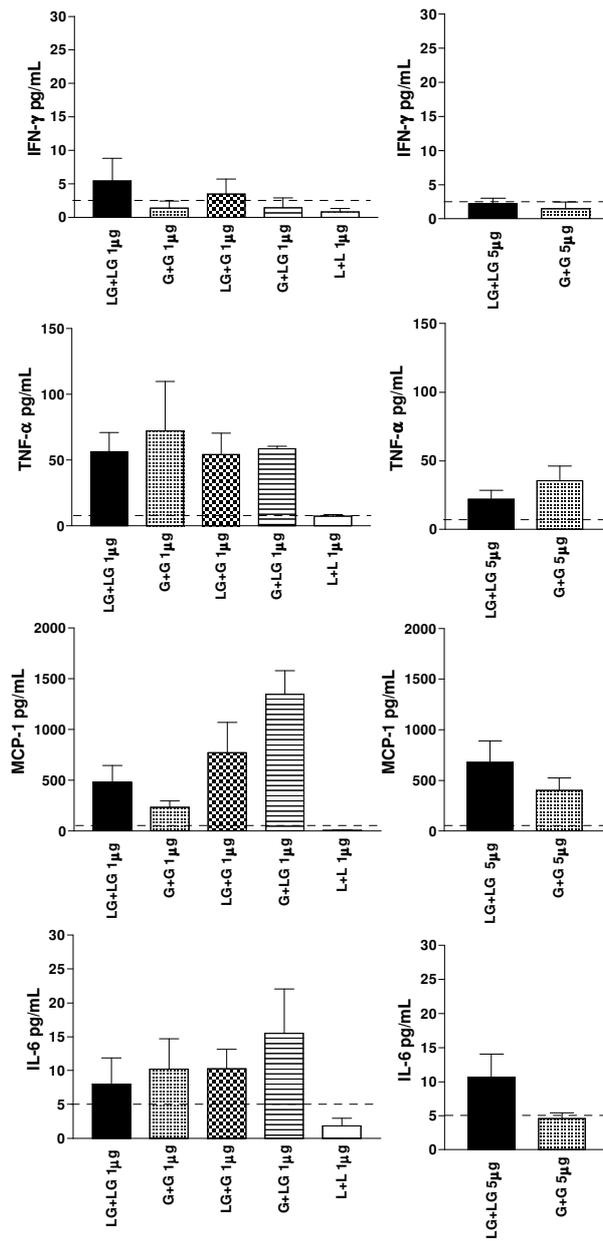


**Figura 9 – Efeito do *priming* neonatal com a vacina quimérica *LAMP/gag* na resposta de  $\text{IFN-}\gamma$  aos pools de peptídeos da Gag.** Camundongos neonatos foram imunizados intradermicamente (id) com 1 µg de DNA no 7º di e reforçados no 25º di conforme os seguintes protocolos: *LAMP/gag* + *LAMP/gag*; *LAMP/gag* + *gag* e *gag* + *LAMP/gag* e analisados quanto ao número de células secretoras de  $\text{IFN-}\gamma$  aos peptídeos da Gag por ELISPOT 10 dias após o reforço. A barra ilustra a média  $\pm$  EP de 2-5 experimentos utilizando um *pool* de células esplênicas de (2-3 animais/experimento) por grupo. A linha tracejada representa o *cut-off*. \* $P < 0.05$ , quando comparado com o grupo *LAMP/gag*.

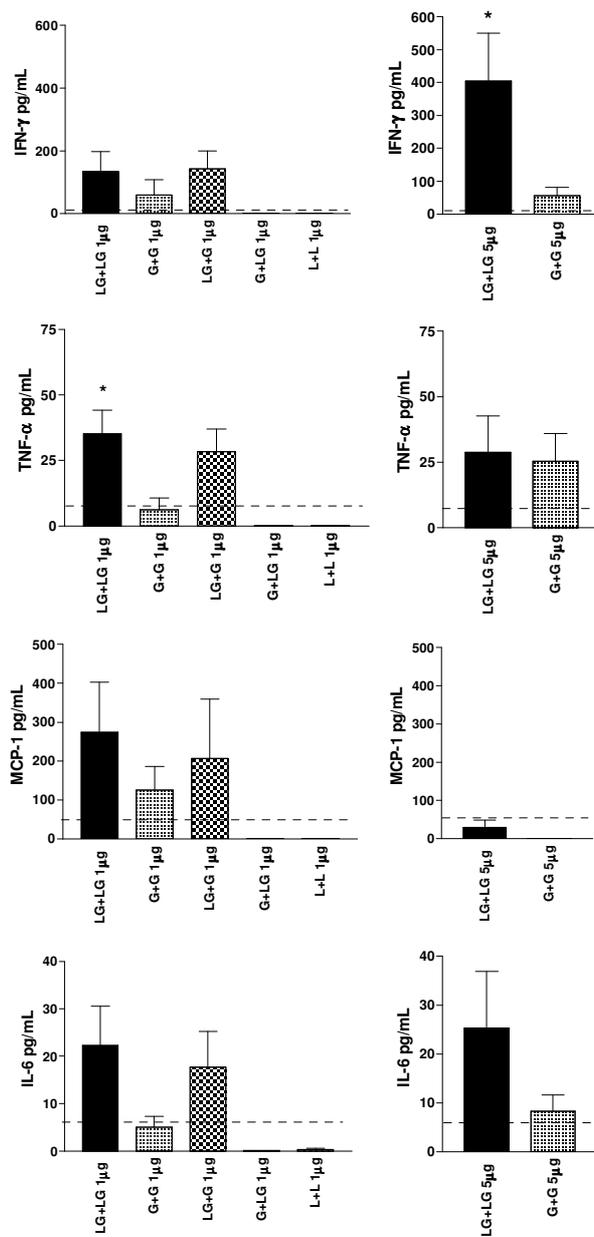
#### 4.2.2.2 Produção de citocinas ao peptídeo imunodominante de classe I do MHC em neonatos e adultos imunizados com as vacinas de DNA

Para avaliar a produção de citocinas de camundongos neonatos e adultos vacinados, os esplenócitos foram coletados dez dias após o reforço e cultivados com 10 µg/mL do peptídeo imunodominante AMQMLKETINNAEE (restrito a classe I do MHC) por 72 horas. As citocinas (IL12-p70, TNF-α, IFN-γ, MCP-1, IL-10 e IL-6) foram dosadas no sobrenadante por citometria de fluxo. Foram analisados grupos de animais neonatos (1 e 5 µg) e adultos (50 µg) imunizados com os seguintes protocolos: (1) *LAMP/gag* e reforço com *LAMP/gag* (LG +LG 1 µg, 5 µg e 50 µg); (2) *gag* e reforço com *gag* (GAG+GAG 1µg; 5 µg e 50 µg); (3) *LAMP* e reforço com *LAMP* (L+L 1 µg); (4) *LAMP/gag* e reforço com *gag* (LG+G 1 µg) e (5) *gag* e reforço com *LAMP/gag* (G+LG 1 µg).

A produção espontânea de IFN-γ, TNF-α, MCP-1 e de IL-6 foram similares entre os grupos, com exceção do controle L+L que não produziu citocinas detectáveis (Figura 10). Quando as células foram estimuladas com o peptídeo imunodominante observamos um aumento de produção de IFN-γ de animais imunizados com 5 µg de LG+LG em relação ao grupo imunizado com G+G (Figura 11). Já no grupo imunizado na idade neonatal com 1 µg de LG+LG observamos níveis superiores de TNF-α comparado ao grupo G+G. Os níveis de secreção de IL-12p70 e IL-10 foram indetectáveis (abaixo de 10 pg/mL).



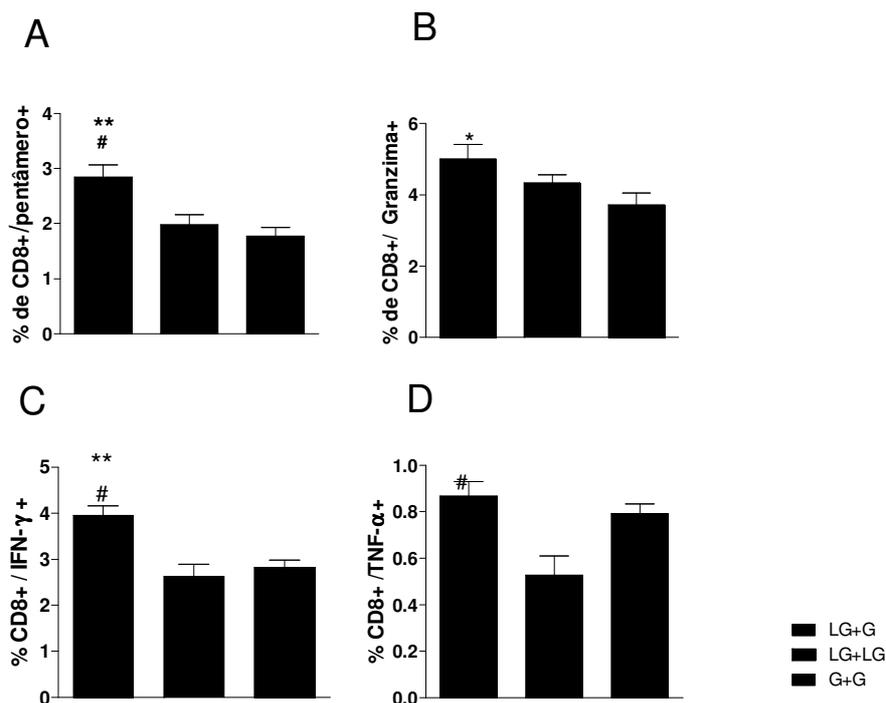
**Figura 10 – Produção espontânea de citocinas de camundongos imunizados com *LAMP/gag* e *gag* no período neonatal.** Camundongos neonatos foram imunizados com as doses 1 ou 5 μg, recebendo os plasmídeos *LAMP/gag* (LG), *gag* (G) e *LAMP* (L) reforçados com o mesmo plasmídeo, ou recebendo primeiro *LAMP/gag* ou *gag* e reforçados com *gag* ou *LAMP/gag*, e foram analisados 10 dias após o reforço. Os esplenócitos de camundongos imunizados (5-6 animais/grupo) foram cultivados por 72 horas com meio de cultura e o sobrenadante foi analisado quanto à presença de citocinas por citometria de fluxo. A linha tracejada é o limite de detecção de cada citocina/quimiocina. \* $P < 0.05$  quando comparado com *gag*.



**Figura 11 – Produção de citocinas após estímulo com o peptídeo imunodominante de camundongos imunizados com *LAMP/gag* e *gag* no período neonatal.** Camundongos neonatos foram imunizados com as doses 1 ou 5 μg, recebendo os plasmídeos *LAMP/gag* (LG), *gag* (G) e *Lamp* (L) reforçados com o mesmo plasmídeo, ou recebendo primeiro *LAMP/gag* ou *gag* e reforçados com *gag* ou *LAMP*, e foram analisados 10 dias após o reforço. Os esplenócitos de camundongos imunizados (5-6 animais/grupo) foram cultivados por 72 horas com 10 μg/mL do peptídeo AMQMLKETINNAEAE e o sobrenadante foi analisado quanto a presença de citocinas por citometria de fluxo. O resultado representa a diferença entre os níveis das citocinas produzidas após estimulação com a produção espontânea. \* $P < 0.05$  quando comparado com *gag*.

#### 4.2.2.3 Resposta de células com potencial citotóxico após imunização neonatal com as vacinas de DNA

A resposta de células T CD8<sup>+</sup> foi avaliada após imunização neonatal (protocolo de 5 µg de DNA) e desafio com o peptídeo imudominante de classe I do MHC da Gag do HIV-1 aos 35 dias de idade emulsionado em adjuvante. Após cinco dias os camundongos receberam por via iv o mesmo peptídeo e após duas horas foram avaliados quanto a porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> específicas ao epítipo de classe I da Gag (AMQMLKETI), por citometria de fluxo. Neonatos que receberam a primeira dose de *LAMP/gag* e a segunda de *gag* mostraram maior porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> positivas para o pentâmetro (2.8%) comparados aos camundongos imunizados com duas doses de *LAMP/gag* (1.8%) ou *gag* (1.7%) (Fig. 12A). Além disso, no grupo imunizado *LAMP/gag* + *gag* foi detectado uma porcentagem superior de células T CD8<sup>+</sup> expressando granzima B (Figura 12B) e IFN- $\gamma$  (Figura 12C) comparado aos camundongos imunizados com *gag*. A eficácia na estimulação de células T CD8<sup>+</sup> com potencial citotóxico do protocolo utilizando *LAMP/gag* no priming neonatal também foi verificado pela porcentagem superior de células T CD8 expressando TNF- $\alpha$  comparada ao protocolo no qual os neonatos receberam as duas doses de *LAMP/gag* (Figura 12D).



**Figura 12 – Indução de resposta de células T CD8+ após vacinação neonatal com *LAMP/gag*.** Camundongos neonatos foram imunizados com 5 µg de DNA com os protocolos: *LAMP/gag* + *gag* (LG+G); *LAMP/gag* + *LAMP/gag* (LG+LG) e; *gag*+*gag* (G+G). Aos 35 dias de idade receberam 20µg do peptídeo imunodominante da Gag restrito ao reconhecimento por moléculas de classe I do MHC emulsificados com adjuvante e cinco dias depois foram submetidos a injeção intravenosa com 10µg do mesmo peptídeo. Após 2 horas avaliou-se: (A) Porcentagem de células T CD8+pentâmero+ por citometria de fluxo. Os esplenócitos foram incubados com o peptídeo imunodominante de classe I e brefeldina A por 14 horas para avaliação da expressão intracelular de Granzima (B), IFN-γ (C) e TNF-α (D) em células T CD8+ por da citometria de fluxo. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  quando comparado com *gag*; #  $P < 0.05$  quando comparado com duas doses de *LAMP/gag*

### 4.3 Memória imunológica após imunização neonatal com as vacinas de DNA

#### 4.3.1 Resposta humoral e celular

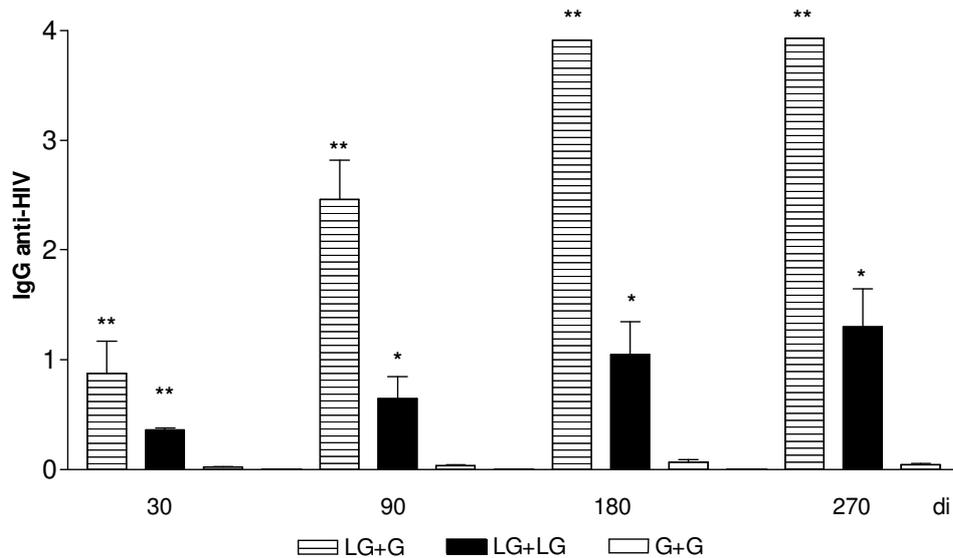
A cinética da produção de anticorpos anti-Gag de animais imunizados no período neonatal com 1 µg das vacinas de DNA *LAMP/gag* (LG), *gag* (G) ou *LAMP* (L) foi avaliada aos nove meses de idade. Aos 260 dias de idade (di) os animais foram reforçados com 25 µg de DNA e avaliados após dez dias. Foi observado que os níveis de IgG anti-Gag dos animais imunizados com a vacina quimérica e posterior reforço com *gag* ou com duas doses de *LAMP/gag* no período neonatal são superiores em relação aos animais imunizados com *gag* e se mantiveram elevados até 270 di. Como os níveis de anticorpos aos 180 e 270 dias de idade foram similares, evidencia-se que o reforço realizado não promoveu mudança na produção de anticorpos (Figura 13A). Quanto à resposta celular, os animais que receberam *LAMP/gag* na idade neonatal (7 e 25 di) e o reforço após 8 meses da mesma vacina responderam com um número de SFC de IFN-γ superior a 7 pools de peptídeos comparado aos animais que receberam a vacina *gag* ou que recebeu LG+G (Figura 14). Para o peptídeo imunodominante de classe I o número de células produtoras de IFN-γ foi de 501 (±18), 162 (±8) e 254 (±3) SFC/0.5x10<sup>6</sup> esplenócitos, para os grupos LG+LG, G+G e LG+G, respectivamente (Anexo D e E). Os resultados mostram que a imunização neonatal com a vacina quimérica induz resposta humoral e celular de longa duração, sendo eficiente na resposta humoral com apenas uma dose da vacina quimérica e, na resposta de IFN-γ aos peptídeos da Gag, principalmente para os vacinados com duas doses de *LAMP/gag*.

Com o objetivo de verificar se só a imunização neonatal é capaz de gerar clones de células de memória, um grupo experimental recebeu as vacinas de DNA (1µg) aos sete dias de idade e receberam um reforço somente aos 170 di (Figura 13A, 15, Tabela V). Apenas os animais imunizados com *LAMP/gag* foram capazes de produzir níveis detectáveis de IgG anti-Gag e células produtoras de IFN-γ aos peptídeos da Gag (Figura 15). Paralelamente a este grupo, foram imunizados camundongos aos 170 dias de idade com uma dose de 25 µg de *LAMP/gag* ou *gag* e evidenciou-se que a imunização com *LAMP/gag* gerou clones de células produtoras de IFN-γ que

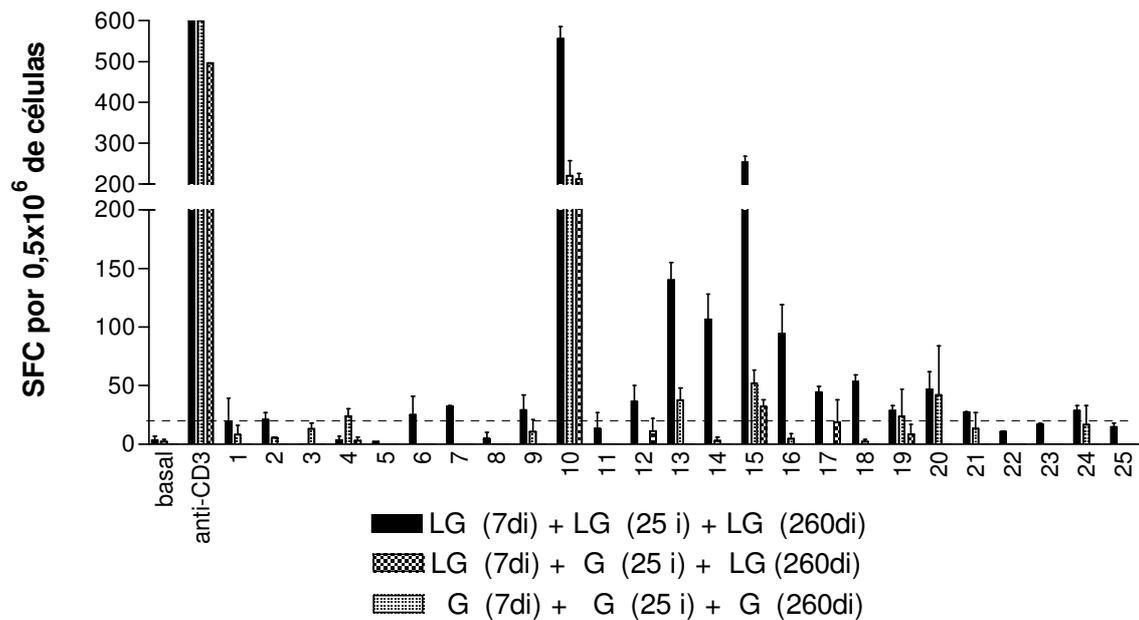
reconhecem os peptídeos de classe I e II da Gag, porém, em menor número comparado aos que foram imunizados aos sete dias de idade (Figura 16), evidenciando a indução de células de memória no período neonatal com a vacina *LAMP/gag*.

Na tentativa de caracterizar fenotipicamente as células de longa duração que respondem ao epítipo imunodominante de classe I, foram avaliadas a expressão de CD127, CD44 e CD69, bem como a expressão intracelular de citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e a desgranulação (CD107a/granzima ou perforina). Grupos de neonatos imunizados com 5  $\mu$ g de *LAMP/gag* ou *gag* também foram avaliados em relação a duração da resposta celular e observou-se, aos seis meses de idade, que a vacinação neonatal com uma ou duas doses de *LAMP/gag* é capaz de gerar aumento na frequência de células CD8 que expressam granzima e com uma dose de *LAMP/gag* detectou-se porcentagem superior de células CD8+/CD69+ em relação a *gag*. A polifuncionalidade das células CD4+ e CD8+ estimuladas com p24 e peptídeo imunodominante de classe I da Gag, respectivamente, foram analisadas pela co-expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  não diferiu entre os grupos analisados (dados não demonstrados).

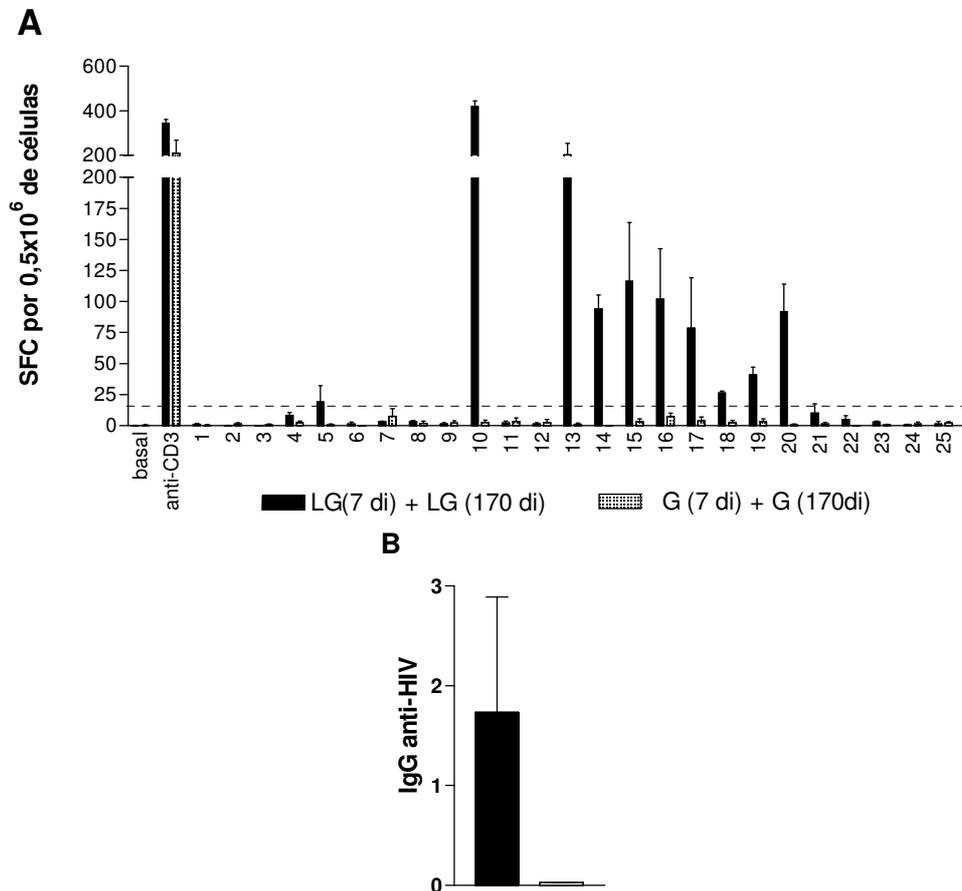
Os resultados evidenciam desta maneira que a associação do antígeno viral ao gene *LAMP* é necessária para ativar células T CD4+ e gerar resposta de memória antígeno-específica.



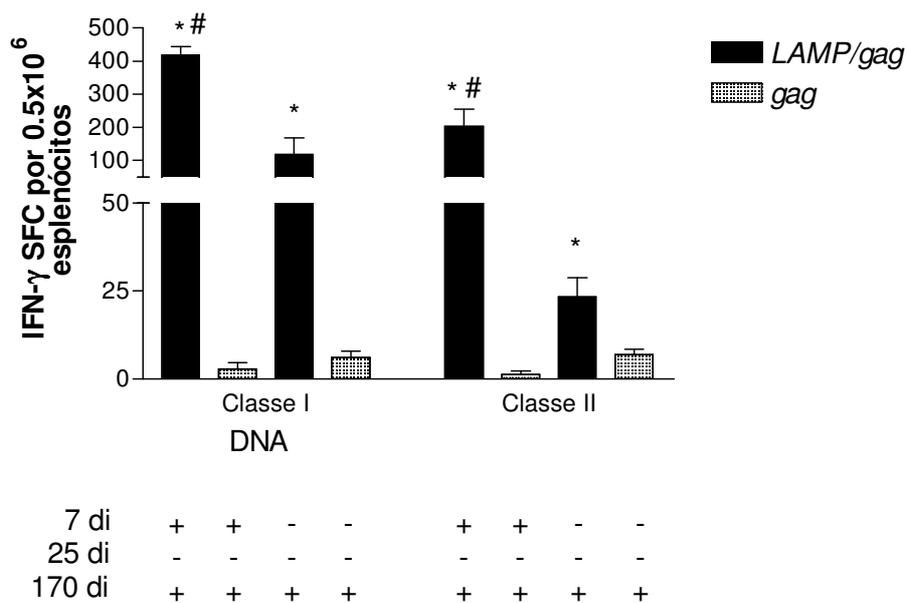
**Figura 13 – Cinética da produção de anticorpos IgG anti-Gag após imunização neonatal com a vacina quimérica.** (A) Camundongos foram imunizados aos sete e 25 dias de idade com 1 $\mu$ g de DNA (*LAMP/gag*, *gag* e *LAMP*) e reforçados com 25  $\mu$ g de DNA aos 260 dias de idade. As amostras de soro foram coletadas aos 30, 90, 180 e 270 dias de idade. Os níveis de IgG anti-Gag foram determinados em amostras de soro (4-6 animais/grupo) por ELISA (1:50). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  quando comparado com *gag*;



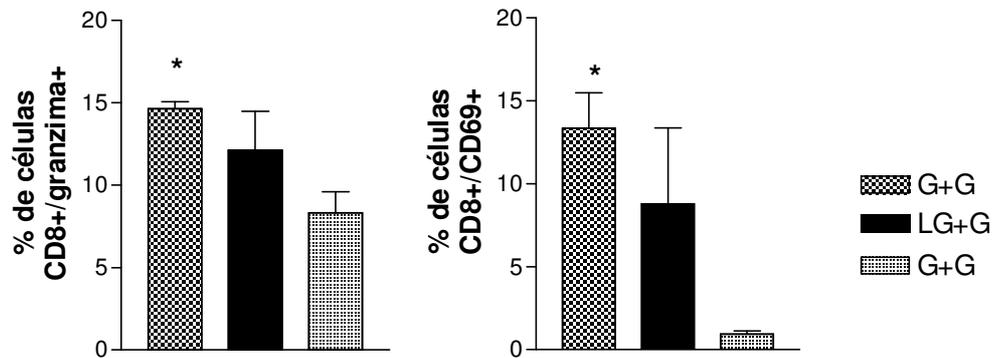
**Figura 14 – Vacinação neonatal com *LAMP/gag* induz potente resposta de células T após nove meses da imunização.** Camundongos foram imunizados aos sete e 25 dias de idade com 1 µg de DNA (*LAMP/gag*, *gag* e *LAMP*) e reforçados com 25 µg de DNA aos 260 dias de idade. Os esplenócitos coletados dez dias após o reforço (2-3 animais por experimento) foram cultivados com 10µg/mL dos 25 pools de peptídeos por 18 horas e analisados quanto ao número de células secretoras de IFN-γ aos peptídeos da Gag por ELISPOT. A figura é representativa de 1 experimento/grupo (2-3 animais/experimento). As barras ilustram a média ± EP..



**Figura 15** – Uma dose de *LAMP/gag* no período neonatal é capaz de induzir potente resposta a peptídeos da Gag após 6 meses da imunização. Camundongos foram imunizados aos sete dias com  $1\mu\text{g}$  de DNA (*LAMP/gag* e *gag*) e reforçados com  $25\mu\text{g}$  de DNA aos 170 (di). A) Os esplenócitos coletados dez dias após o reforço (2-3 animais por experimento) foram cultivados com  $10\mu\text{g/mL}$  dos 25 pools de peptídeos por 18 horas e analisados quanto ao número de células secretoras de  $\text{IFN-}\gamma$  aos peptídeos da Gag por ELISPOT. A figura é representativa de 2 experimentos/grupo (2-3 animais/experimento). B) As amostras de soro foram coletadas após dez dias. Os níveis de IgG anti-Gag foram determinados em amostras de soro (3-6 animais/grupo) por ELISA (1:50). As barras ilustram a média  $\pm$  EP. \* $P < 0.05$  quando comparado com Gag..



**Figura 16 – Apenas uma dose de *LAMP/gag* no período neonatal induz resposta de memória aos peptídeos de classe I e II da Gag do HIV-1.** Camundongos foram imunizados ou não aos sete dias de idade (di) com 1 µg de DNA (*LAMP/gag* e *gag*) e reforçados com 25 µg de DNA aos 170 di. Os esplenócitos coletados dez dias após o reforço (2-3 animais/experimento) foram cultivados com 10 µg/mL de peptídeos da Gag restritos a classe I e II do MHC por 18 horas e analisados quanto ao número de células secretoras de IFN-γ aos peptídeos da Gag por ELISPOT. A figura é representativa de 2-3 experimentos/grupo (2-3 animais/experimento). As barras ilustram a média e erro padrão. \* $P < 0.05$  quando comparado com *gag*, # $P < 0.05$  quando comparado com o grupo que não recebeu a vacina na idade neonatal.

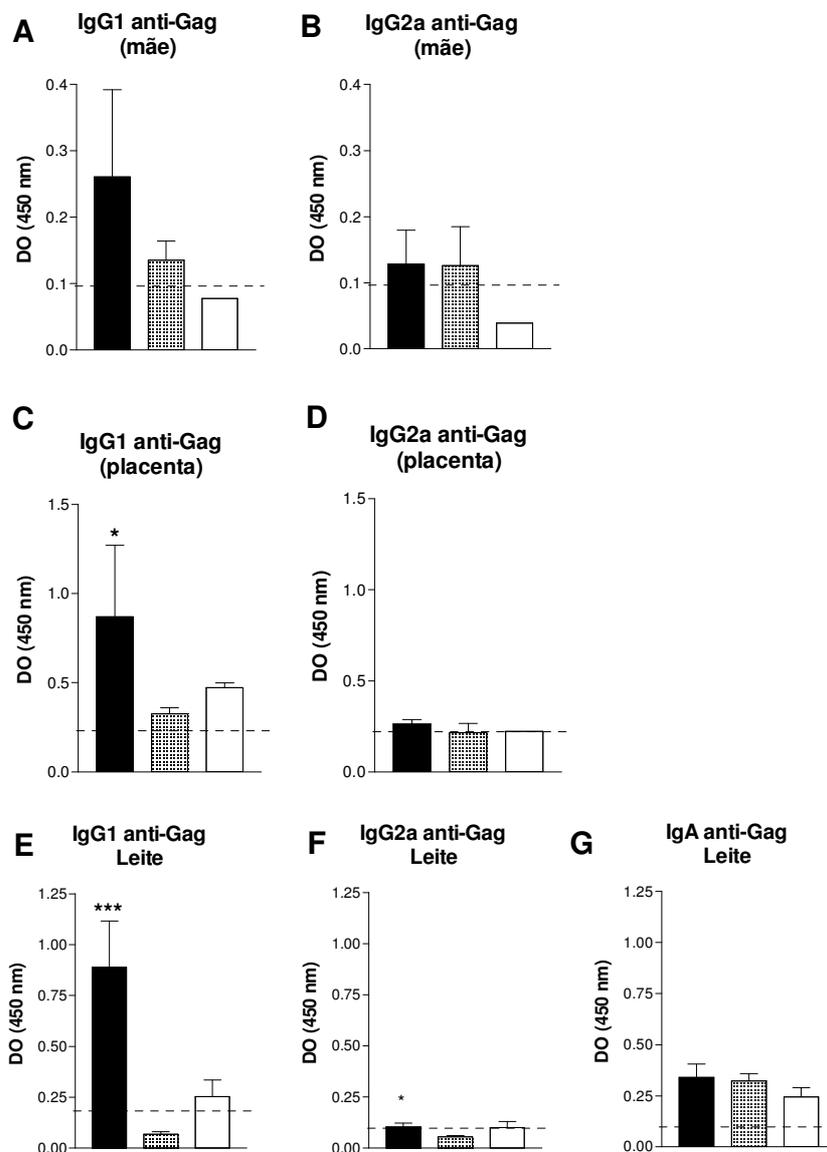


**Figure 17. Resposta de longa duração de células T CD8+ após imunização neonatal com a vacina de DNA quimérica *LAMP/gag*.** Camundongos neonatos foram imunizados com 5  $\mu$ g das vacinas de DNA aos sete e 25 dias de idade seguindo os protocolos: *LAMP/gag* + *gag* (LG+G); *LAMP/gag* + *LAMP/gag* (LG+LG); *gag*+*gag* (G+G) e analisados aos seis meses de idade. Os esplenócitos foram cultivados com peptídeo da Gag imunodominante de classe I e brefeldina A por 14 horas para avaliação intracelular de expressão de granzima B (A) e expressão extracelular de CD69 (B) por citometria de fluxo. Os resultados representam a média  $\pm$  EP de 5-6 animais. \* $P$ <0.05 quando comparado com os camundongos imunizados com *gag*.

## 4.4 Efeito da imunização materna na prole não imunizada

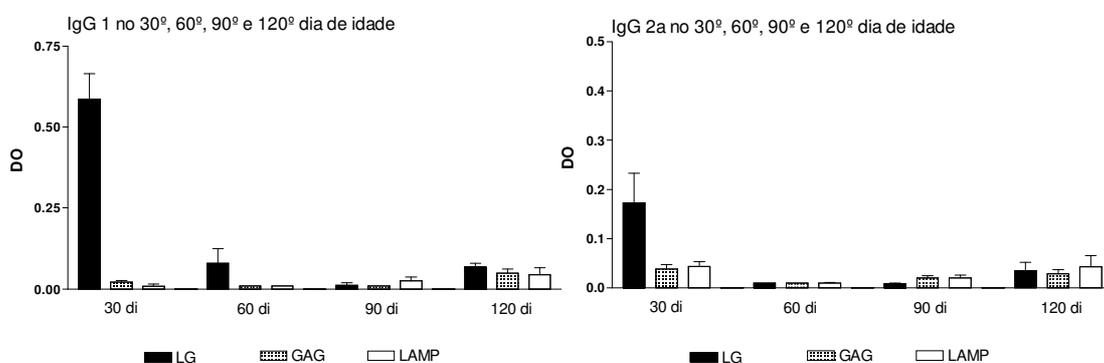
### 4.4.1 Transferência de anticorpos maternos e permanência no soro da prole

Para avaliarmos a contribuição das via transplacentária e pelo leite materno na transferência de anticorpos à prole, as fêmeas adultas foram imunizadas com as vacinas gênicas e na gestação a termo, o soro da mãe foi coletado e a cesárea foi realizada para obtenção de soro fetal (placentário). O leite foi diretamente coletado do estômago das proles de 5 dias de idade. A Figura 18 mostra que no soro de mães imunizadas com *LAMP/gag* há predomínio de anticorpos IgG1 anti-Gag os quais são transferidos via placenta para os fetos. Como esperado, níveis mais baixos de anticorpos IgG1 foram transferidos pelas mães vacinadas com *gag*. Posteriormente, avaliamos o tempo de permanência dos anticorpos maternos nos soros de proles que foram sangradas a cada trinta dias (Figura 19). Observamos que a imunização materna com *LAMP/gag* transfere preferencialmente anticorpos IgG1 anti-Gag, os quais permanecem na prole até os 60 dias de idade (Figura 19). Enquanto que anticorpos IgG2a anti-Gag foram detectados apenas até os 30 dias de idade (Figura 19). Não há alteração nos níveis de anticorpos IgA anti-Gag nas amostras de leite de mães imunizadas com as vacinas de DNA, ocorrendo predominantemente transferência de IgG. Detectamos os níveis de IgG1, IgG2a e IgA no soro materno após 5 dias do nascimento da prole, e observamos que IgG1 anti-Gag está aumentado nas mães imunizadas com *LAMP/gag* em relação à imunização com *gag* (dados não demonstrados). Os resultados mostram que a imunização materna com a vacina quimérica, possibilita intensa transferência passiva de anticorpos anti-Gag nos períodos pré e pós-natal, ou seja, pelas vias placentária e pela amamentação.



**Figura 18 – Transferência transplacentária e pela amamentação de anticorpos maternos.**

Camundongos fêmeas adultos (2 meses) foram imunizados duas vezes com intervalo de 20 dias com 50 µg de DNA (*LAMP/gag*, *gag* ou *Lamp*) e acasalados. A cesárea a termo foi procedida e os soros maternos (A e B) e placentários foram coletados (C e D). O leite foi coletado diretamente do estômago de neonatos de cinco dias de idade (E, F e G). A presença de IgG1, IgG2a e IgA anti-Gag foi determinada por ELISA. Os resultados de 4-6 e 8-12 animais por grupo estão expressos com média ± EP, para os soros (1:50) e leite (1:20), respectivamente. \* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$  comparado com *gag*.



**Figura 19 – Permanência de anticorpos maternos na prole.** Camundongos fêmeas adultos (2 meses) foram imunizados duas vezes com intervalo de 20 dias com 50 µg de DNA (*LAMP/gag*, *gag* ou *Lamp*) e acasalados. O soro das proles foram coletados a cada trinta dias após o nascimento (1:50). A presença de IgG1 (A) e IgG2a (B) anti-Gag foi determinada por ELISA. Os resultados de 4-6 animais por grupo estão expressos com média ± EP. \* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$  comparado com *gag*

#### 4.4.2 Presença de citocinas e quimiocinas em fluídos de mães imunizadas com as vacinas de DNA

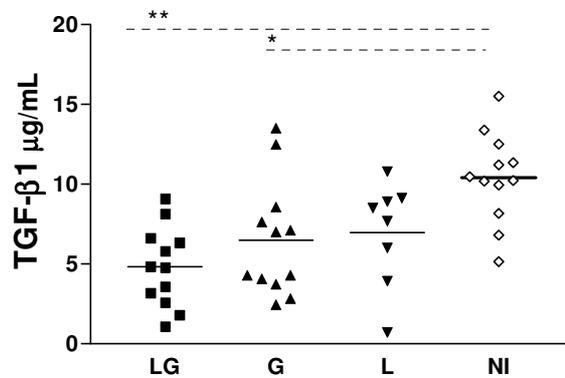
Para avaliar a contribuição da gestação, após imunização com as vacinas gênicas, na transferência de citocinas e quimiocinas à prole, foram analisadas a presença de: IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , G-CSF, GM-CSF, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e RANTES no soro materno, placentário e no líquido amniótico, coletados no momento da cesárea a termo. A Tabela 1 mostra a dosagem de G-CSF, GM-CSF, IP-10, MCP-1 e MIP-1 $\alpha$  nas amostras de soro materno, soro placentário e líquido amniótico de mães imunizadas ou não com as vacinas de DNA antes da concepção. Outras citocinas/quimiocinas como IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e RANTES não foram mostradas considerando os níveis indetectáveis ou muito baixos encontrados nos fluídos. A imunização com *LAMP/gag* promoveu aumento de MIP- $\alpha$  no líquido amniótico em relação a imunização com *gag*, vale lembrar que MIP-1 $\alpha$  é um bloqueador natural da infecção pelo HIV-1. A imunização com *gag*, diminuiu os níveis de IL-15 e MIP-1 $\alpha$  no soro materno em relação as mães não imunizadas. Quanto a dosagem de citocinas/quimiocinas no leite materno, coletado no 5º dia de vida diretamente do estômago da prole, observou-se que os níveis de TGF- $\beta$ 1 após imunização com *LAMP/gag* ou *gag* apresentaram-se diminuídos em relação aos níveis encontrados nas amostras de prole de mães não imunizadas (Figura 20).

A imunização materna pré-concepção com as vacinas gênicas alterou a concentração de algumas citocinas e quimiocinas transferidas durante o desenvolvimento fetal e no período pós-natal pelo leite materno.

**Tabela 1 – Efeito da imunização materna com as vacinas de DNA na concentração de citocinas em fluidos biológicos na gestação.**

	<i>n</i>	G-CSF pg/mL		GM-CSF pg/mL		IP-10 pg/mL		MCP-1 pg/mL		MIP-1a pg/mL	
		mediana <sup>a</sup>	EP	mediana	EP	mediana	EP	mediana	EP	mediana	EP
<b>Soro Materno</b>											
<i>LAMP/gag</i>	5	980	520	3	9	5515	981	20	3	19	6
<i>Gag</i>	5	1330	247	9	54	7573	864	25	4	10 <sup>#</sup>	6
Não imunizado	4	2048	888	6	3	7154	1417	11	2	30	15
<b>Líquido Amniótico</b>											
<i>LAMP/gag</i>	7	1601	611	58	58	3028	347	1918	407	<b>185*</b>	53
<i>Gag</i>	5	2944	754	70	37	3165	544	4692	1712	27	12
Não imunizado	4	2754	1334	181	220	2644	363	2261	469	58	22
<b>Soro Placentário</b>											
<i>LAMP/gag</i>	7	344	796	<b>52*</b>	19	7583	1074	131	40	26	23
<i>Gag</i>	5	186 <sup>#</sup>	826	23 <sup>#</sup>	9	6825	488	118 <sup>#</sup>	27	17	5
Não imunizado	4	547	3130	132	31	11350	1088	364	51	50	3

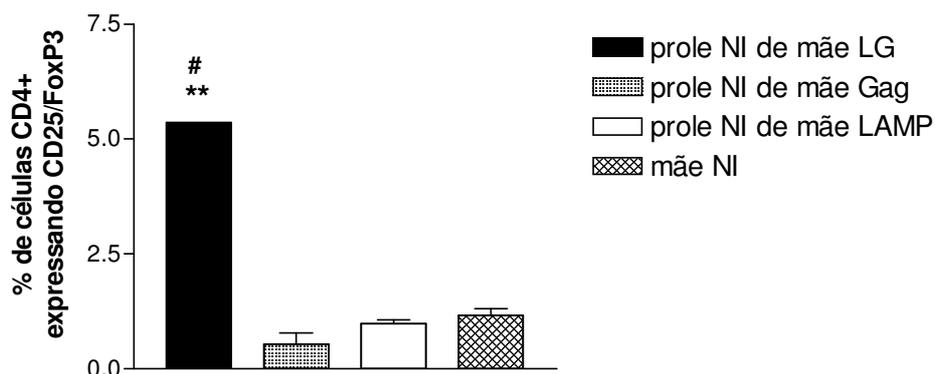
Camundongos fêmeas foram imunizados com 50µg de DNA (*LAMP/gag* ou *gag*) e acasalados. Os soros materno, placentário e líquido amniótico foram coletados no dia da cesárea. As concentrações de citocinas foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como mediana ± EP. \**P*<0.05 quando comparado com *gag*; #*P*<0.05 quando comparado com o não imunizado.



**Figura 20 - TGF- $\beta$ 1 no leite de mães imunizadas.** Fêmeas foram imunizadas com as vacinas de DNA (*LAMP/gag* (LG), *gag* (G) e *LAMP* (L), reforçadas e acasaladas. Após o nascimento da prole, o leite foi coletado diretamente do estômago de neonatos de cinco dias de idade. Os níveis de TGF- $\beta$ 1 foram determinados por ELISA. A barra indica a média, \*  $P < 0.05$  e \*\*  $P < 0.01$  quando comparado com amostras de leite de mães não imunizadas.

#### **4.4.3 Efeito da imunização gênica na porcentagem de células T CD4+CD25+FoxP3+ dos neonatos aos sete dias de idade**

Analizamos a porcentagem de células T CD4+CD25+FoxP3+ em camundongos neonatos de sete dias de idade provenientes de mães imunizadas com *LAMP/gag*, *gag* e *LAMP* e mães não imunizadas. As proles provenientes de mães imunizadas com *LAMP/gag* apresentaram um aumento na porcentagem de esplenócitos CD4+ que expressam CD25 e FoxP3.



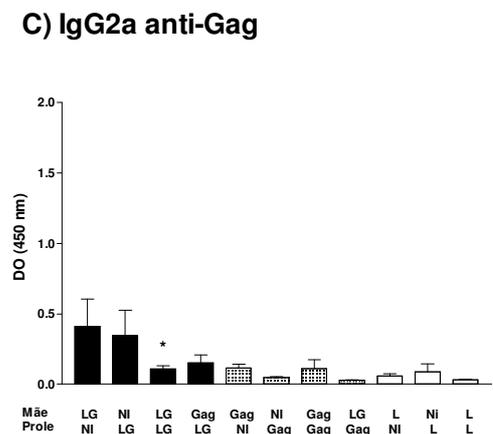
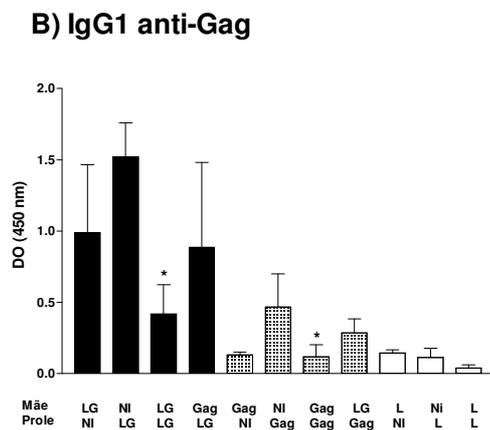
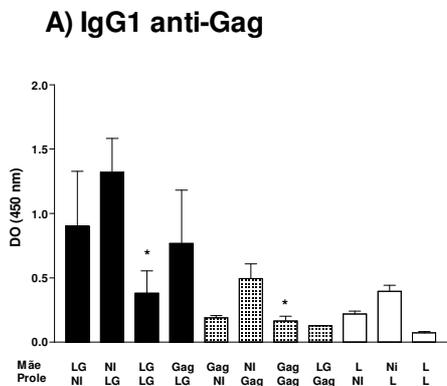
**Figura 21 - Porcentagem de células CD4+ que expressam CD25+/FoxP3 em neonatos de 7 dias de idade provenientes de mães imunizadas com as vacinas de DNA.** Esplenócitos CD4+ de camundongos de sete dias de idade provenientes de mães imunizadas com 50µg de *LAMP/gag*, *gag*, *LAMP* ou não imunizada (NI) foram analisados quanto a expressão de CD25 extracelular e FoxP3 intracelular através da citometria de fluxo. \* $P < 0.05$  comparado a *gag*; # $P < 0.05$  comparado a não imunizado (NI)

## **4.5 Efeito da imunização materna na resposta vacinal da prole**

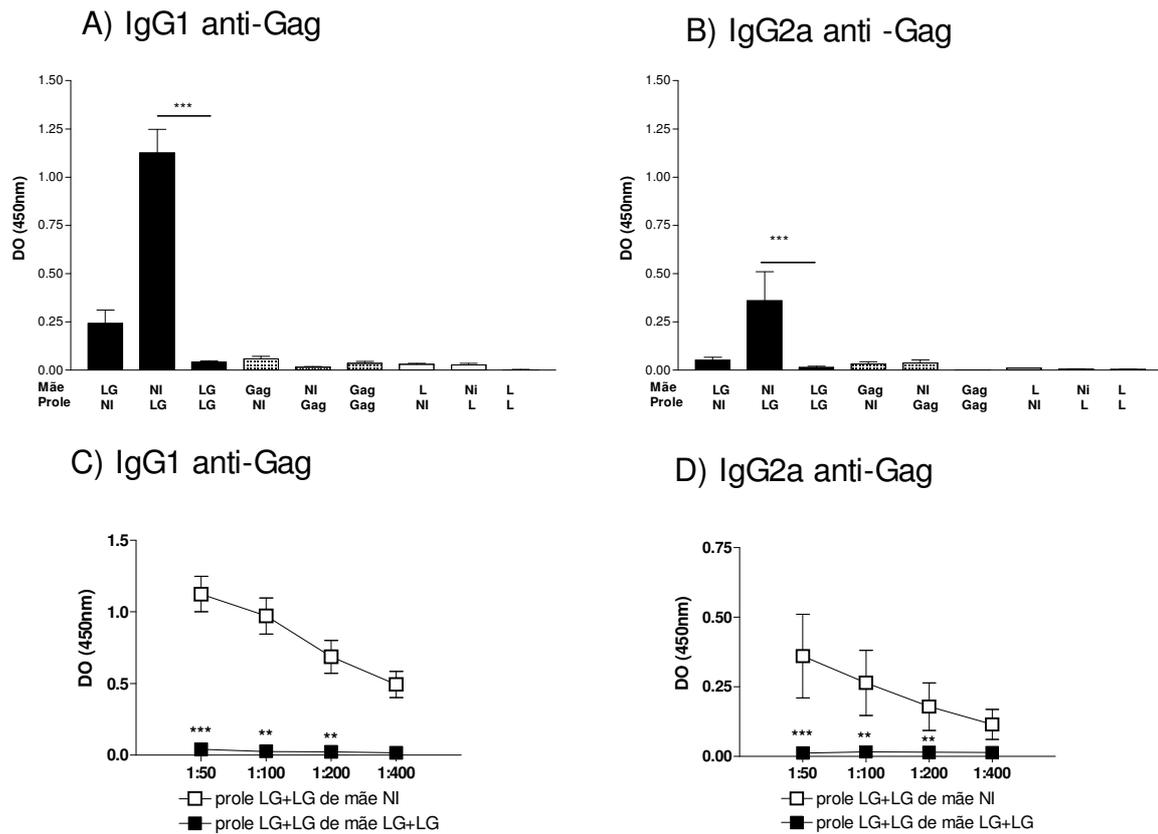
### **4.5.1 Efeito da imunização materna na produção de IgG anti-Gag na prole imunizada**

A influência da imunização materna na produção de anticorpos da prole imunizada foi avaliada. Neonatos de mães imunizadas foram vacinados com *LAMP/gag* ou *gag* e comparados com neonatos vacinados de mães não imunizadas (controles). Os níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a anti-Gag transferidos às proles apresentou-se diminuído quando estas foram imunizadas, evidenciando diminuição da produção de anticorpos com a imunização materna (Figura 22). Efeito similar, porém em menor intensidade, para IgG e IgG1 foi observado com a imunização materna com *gag*. O efeito inibitório da imunização materna foi mais pronunciado na produção de IgG1 da prole, considerando ser a subclasse predominante na imunização neonatal.

A Figura 23 mostra que mesmo aos 60 dias de idade, período no qual ocorre queda dos níveis de anticorpos maternos na circulação da prole representados pelo grupo mãe LG e prole NI, ainda visualiza-se intensa diminuição da produção de anticorpos quando as proles são imunizadas com a mesma vacina materna. Os resultados mostram que a imunização materna interfere na resposta humoral da prole vacinada, entretanto é necessário ainda avaliar se este efeito é transitório, ou se interfere na sensibilização da prole na resposta vacinal.



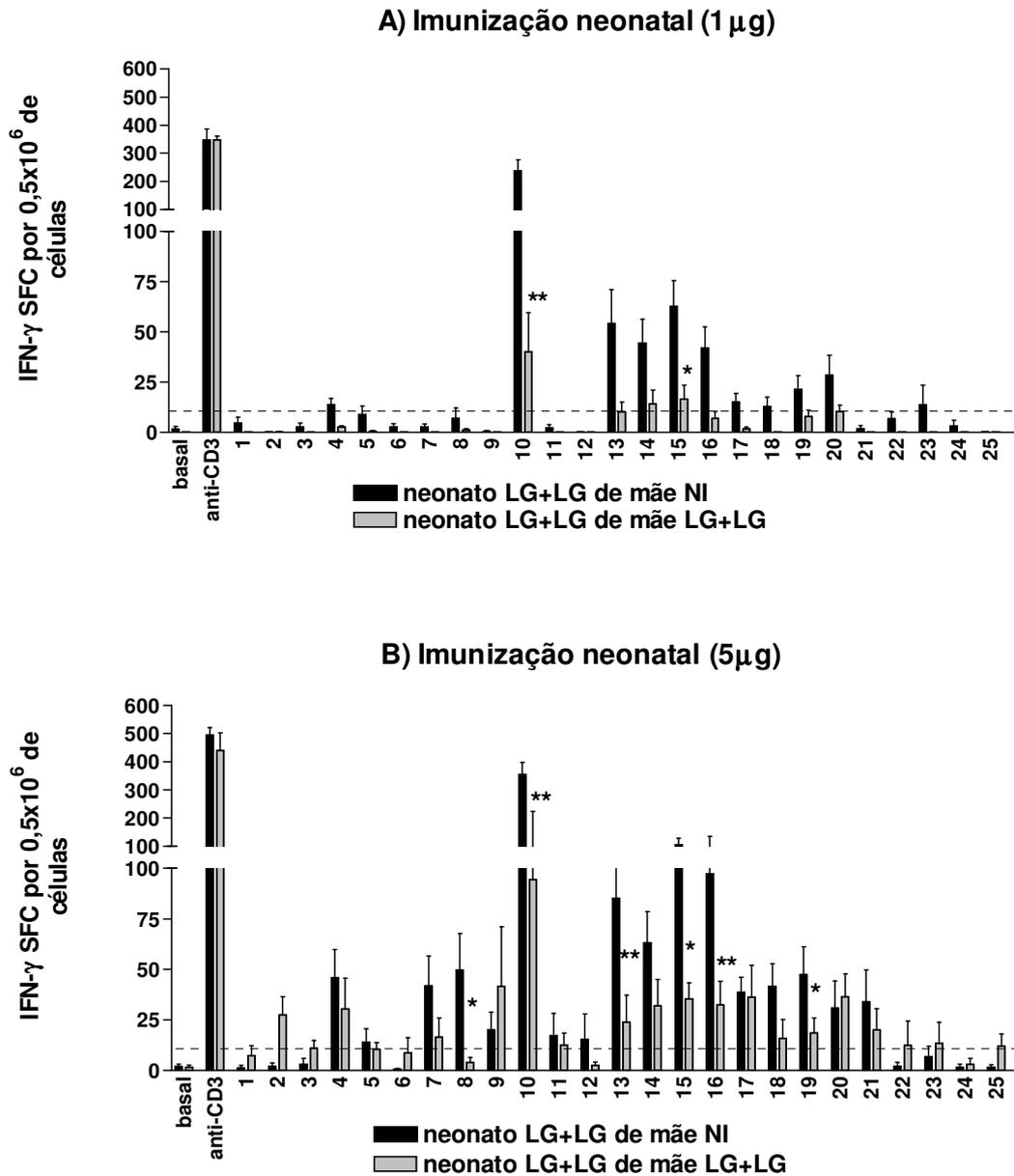
**Figura 22 – Efeito da imunização materna com as vacinas de DNA na produção anticorpos anti-Gag aos 30 dias de idade da prole imunizada.** Mães imunizadas ou não com as vacinas de DNA *LAMP/gag*, *gag* e *Lamp* (protocolo de imunização adulta – 50 µg de DNA com intervalo de duas semanas) foram acasaladas e as proles foram vacinadas em período neonatal (protocolo de imunização neonatal com 5µg de DNA). O soro dos neonatos foi coletado aos 30 dias de idade (3-8 animais/grupo). IgG (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) anti-Gag foram avaliados por ELISA utilizando lisado viral de HIV-1 (diluição 1:50). As barras ilustram a média e erro padrão. \* $p < 0.05$  quando comparado com o respectivo grupo controle (neonatos imunizados de mães NI x neonatos imunizados de mães imunizadas). LG = *LAMP/gag* + *LAMP/gag*; Gag = *gag* + *gag*; L = *Lamp* + *Lamp*; NI = não imunizada.



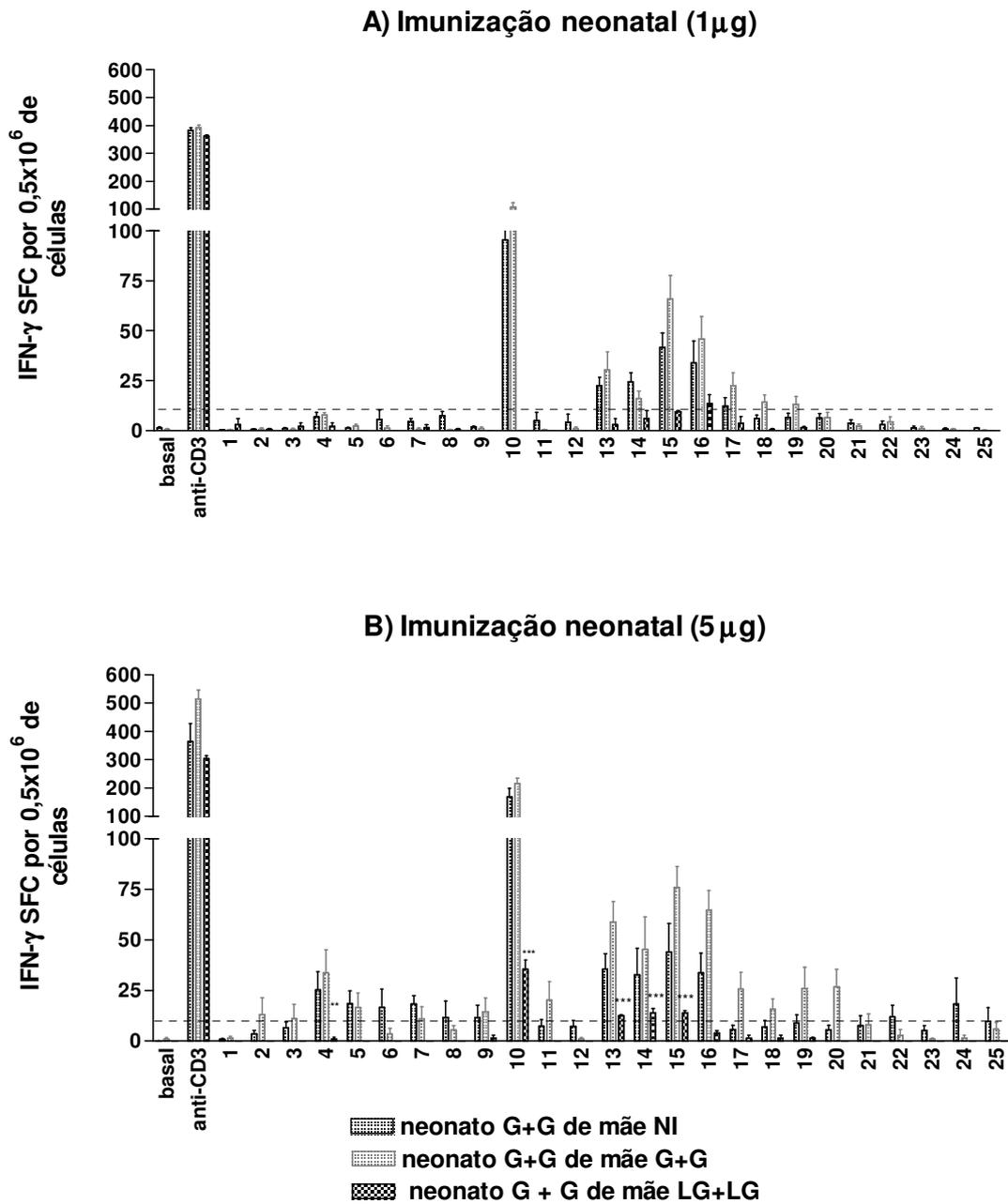
**Figura 23 – Efeito da imunização materna com as vacinas de DNA na produção de anticorpos anti-Gag aos 60 dias de idade da prole imunizada com a vacina de DNA quimérica *LAMP/gag*.** Mães imunizadas ou não com as vacinas de DNA *LAMP/gag*, *gag* e *Lamp*, foram acasaladas e as proles foram vacinadas em período neonatal (protocolo de 5 µg de DNA). O soro dos neonatos foi coletado aos 60 dias de idade (3-8 animais/grupo). IgG1 e IgG2a anti-Gag foram avaliados por ELISA utilizando lisado viral de HIV-1 (diluição 1:50 ou em diluições seriadas). As barras ilustram a média e erro padrão. \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  quando comparados grupo controle (neonatos imunizados de mães NI x neonatos imunizados de mães imunizadas). LG = *LAMP/gag* + *LAMP/gag*; Gag = *gag*+*gag*; L = *Lamp*+*Lamp*; NI = não imunizada.

#### **4.5.2 Efeito da imunização materna com *LAMP/gag* na resposta celular da prole imunizada no período neonatal**

Procedemos à análise de SFC de IFN- $\gamma$  de proles imunizadas com *LAMP/gag* ou *gag* provenientes de mães imunizadas ou não. Assim, observamos que as proles imunizadas com 1  $\mu\text{g}$  de *LAMP/gag* provenientes de mães imunizadas apresentaram diminuição no número de células produtoras de IFN- $\gamma$  para o *pool* 10 que contém o peptídeo imunodominante e para o *pool* 15 comparada às proles imunizadas de mães não imunizadas (Figura 24A). O efeito inibitório da imunização materna foi mais evidente nos neonatos imunizados com 5  $\mu\text{g}$  (Figura 24B), na qual houve diminuição significativa do número de células produtoras de IFN- $\gamma$  para seis *pools* de peptídeos (*pools*: 8, 10, 13, 15, 16 e 19). Já a imunização materna com *gag* não interfere na resposta da prole imunizada seja com 1  $\mu\text{g}$  ou 5  $\mu\text{g}$  de *gag* (Figura 25A e B), enfatizando que na escassez de anticorpos maternos não ocorre inibição da resposta vacinal da prole. Em contraste, quando as proles imunizadas com *gag* (5  $\mu\text{g}$ ) de mães imunizadas com as vacinas quiméricas houve importante redução do número de células secretoras de IFN- $\gamma$  para para os *pools* 4, 10, 13, 14 e 15 quando comparado com o grupo controle (Figura 25B). Os resultados mostram que a imunização materna com o plasmídeo contendo o gene quimérico *LAMP/gag* reduz a resposta imunológica vacinal da prole, principalmente para a imunização com *LAMP/gag*, em ambos os parâmetros, produção de anticorpos anti-Gag e frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  aos peptídeos da Gag.



**Figura 24 – Efeito da imunização materna com a vacina quimérica *LAMP/gag* na produção de IFN- $\gamma$  pela prole imunizada.** Camundongos neonatos de mães imunizadas e não imunizadas foram vacinados (protocolo 1 e 5  $\mu\text{g}$  de *LAMP/gag*). Células esplênicas foram estimuladas com 25 pools de peptídeos da Gag do HIV-1 e analisadas quanto às células produtoras de IFN- $\gamma$  por ELISPOT. A figura representa 4 ou 5 experimentos/grupo (1-3 animais/experimento). As barras ilustram a média e erro padrão. \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ , quando comparado com a prole imunizada de mãe não imunizada. LG = *LAMP/gag* + *LAMP/gag*; NI = não imunizada.

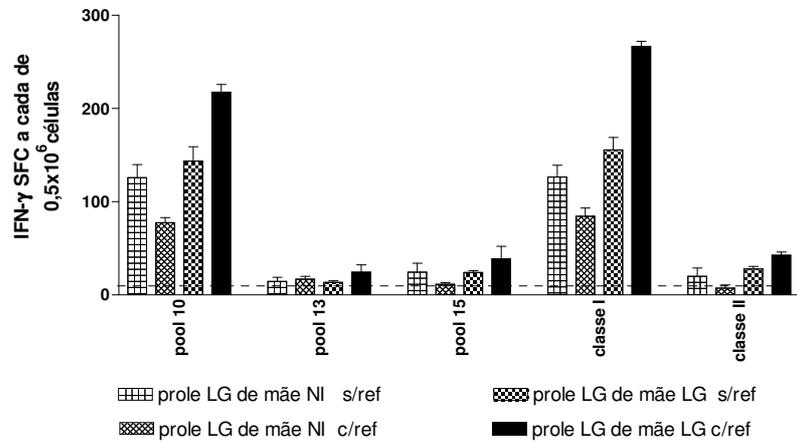


**Figura 25 – Efeito da imunização materna com a vacina *gag* na produção de IFN- $\gamma$  da prole imunizada.** Camundongos neonatos de mães imunizadas com *gag* ou *LAMP/gag* ou não imunizadas foram vacinados (protocolo de 1 e 5µg). As células esplênicas foram estimuladas com 25 pools de peptídeos da Gag do HIV-1 e analisadas quanto à produção de IFN- $\gamma$  por ELISPOT. A figura representa 1 a 5 experimentos/grupo (2-3 animais/experimento). As barras ilustram a média e erro padrão, \* $P < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $P < 0.001$  quando comparado com o grupo imunizado com *gag* de mãe não imunizada. G = *gag* + *gag*; G = *LAMP/gag* + *LAMP/gag*; NI = não imunizada.

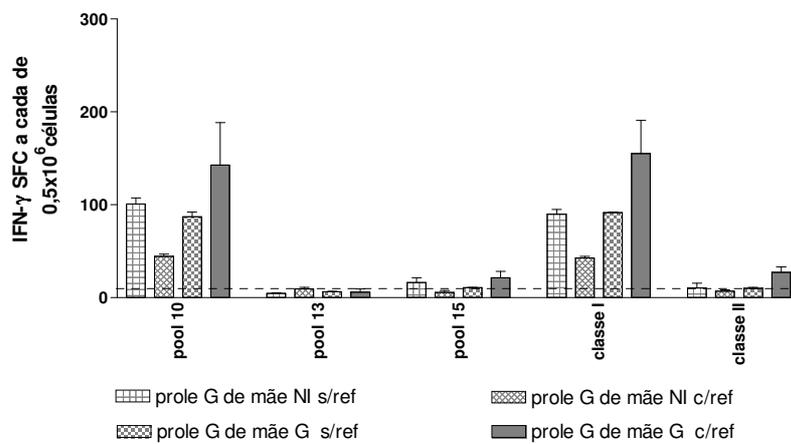
#### **4.5.3 Efeito da imunização materna com *LAMP/gag* na produção de IFN- $\gamma$ da prole imunizada após seis meses de idade**

Com a finalidade de avaliar se a diminuição da resposta imune dos neonatos imunizados com *LAMP/gag* de mães imunizadas interfere na geração de resposta imunológica, os neonatos imunizados com 5  $\mu$ g foram analisados aos seis meses de idade após reforço ou não com 25 $\mu$ g de *LAMP/gag* aos 170 dias de idade e comparados com os neonatos imunizados de mães não imunizadas. A produção de IFN- $\gamma$  aos pools de peptídeos da Gag restrito a classe I (pool 10) e classe II (pool 13) ou peptídeos de classe I e II isolados foi avaliada. Observamos que a prole imunizada com *LAMP/gag* de mães imunizadas com *LAMP/gag* apresenta SFC de IFN- $\gamma$  que reconhecem pools de peptídeos que contém epítomos de classe I e classe II, recebendo ou não o reforço de 25  $\mu$ g (Figura 25A). É interessante notar que a imunização materna com *gag* aumenta o número de células de memória produtoras de IFN- $\gamma$  para o peptídeo de classe I após o reforço quando comparada com a prole imunizada com *gag* proveniente de mãe não imunizada (Figura 25B). Os resultados mostram que a diminuição da resposta celular observada com a imunização da prole com *LAMP/gag* de mães imunizadas com a mesma vacina é transitória e que não interferem na geração de resposta de memória imunológica no período neonatal. A produção de anticorpos IgG anti-Gag é parcialmente detectável após o reforço aos 170 dias de idade (Figura 26).

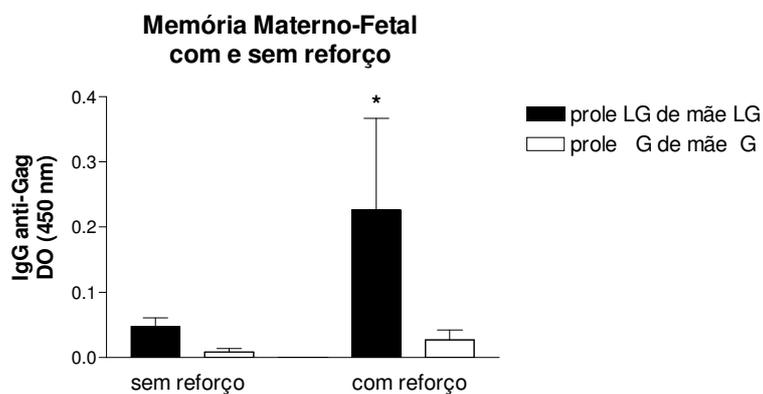
A



B



**Figure 25 – Efeito da imunização materna na resposta imune às vacinas de DNA da prole aos seis meses de idade.** Camundongos neonatos de mães imunizadas com *LAMP/gag* (A) ou *gag* (G) e não imunizadas foram vacinados (protocolo de 5  $\mu$ g) e receberam ou não reforço aos 170 dias de idade com 25  $\mu$ g das mesmas vacinas. Células esplênicas foram estimuladas com os pools 10,13 e 15 e com os peptídeos imunodominantes de classe I e II da Gag do HIV-1 e analisadas quanto a produção de IFN- $\gamma$  por ELISPOT. A figura representa 1 a 3 experimentos/grupo (2-3 animais/experimento). As barras ilustram a média e erro padrão, \* $p < 0.05$  quando comparado com o grupo imunizado com o respectivo grupo controle. s/ = sem; c/ = com; G = *gag* +*gag*; G = *LAMP/gag* +*LAMP/gag*; NI = não imunizada.



**Figure 26– Efeito da imunização materna na produção de anticorpos da prole imunizada avaliada aos seis meses de idade.** Camundongos neonatos de mães imunizadas com *LAMP/gag* ou *gag* e não imunizadas foram vacinados (protocolo de 5 µg), e receberam ou não reforço de 25 µg de DNA aos 170 dias de idade com as mesmas vacinas. O soro da prole foi coletado aos 6 meses de idade. A figura representa de 3-6 animais por grupo. As barras representam a média ± EP. \* $P < 0.05$  quando comparado com a prole com o respectivo grupo imunizado com *gag*. LG= *LAMP/gag*; G = *gag*; NI = não imunizada. s/r = sem reforço; c/r = com reforço.

## **4.6 Imunogenicidade materno-fetal das vacinas de DNA por via intravenosa**

Objetivando imunizar a mãe durante a gestação para primar o feto e evitar a transferência de anticorpos maternos inibitório, avaliamos um protocolo de imunização em fêmeas na última semana da gestação com 100 µg das vacinas gênicas administradas por via intravenosa.

### **4.6.1 Detecção de RNAm de *gag* nos tecidos da prole de mães imunizadas com as vacinas de DNA por via intravenosa (iv)**

Inicialmente foi avaliada a possível expressão de Gag no neonato de mães imunizadas com as vacinas gênicas por via iv. As proles de mães imunizadas foram sacrificadas no 1º dia de vida e os órgãos retirados (timo, baço, fígado, pulmão e coração) para análise da presença de RNA mensageiro de Gag por PCR em tempo real. A presença de RNAm de Gag foi detectável no baço, pulmão, coração e timo da prole proveniente de mãe imunizada com *LAMP/gag* e na de mãe imunizada com *gag* apenas não foi detectado no pulmão (Tabela 2). Os resultados mostram que há transferência do plasmídeo para o feto e que estes plasmídeos são processados em RNA mensageiro em variados órgãos, inclusive órgãos linfóides.

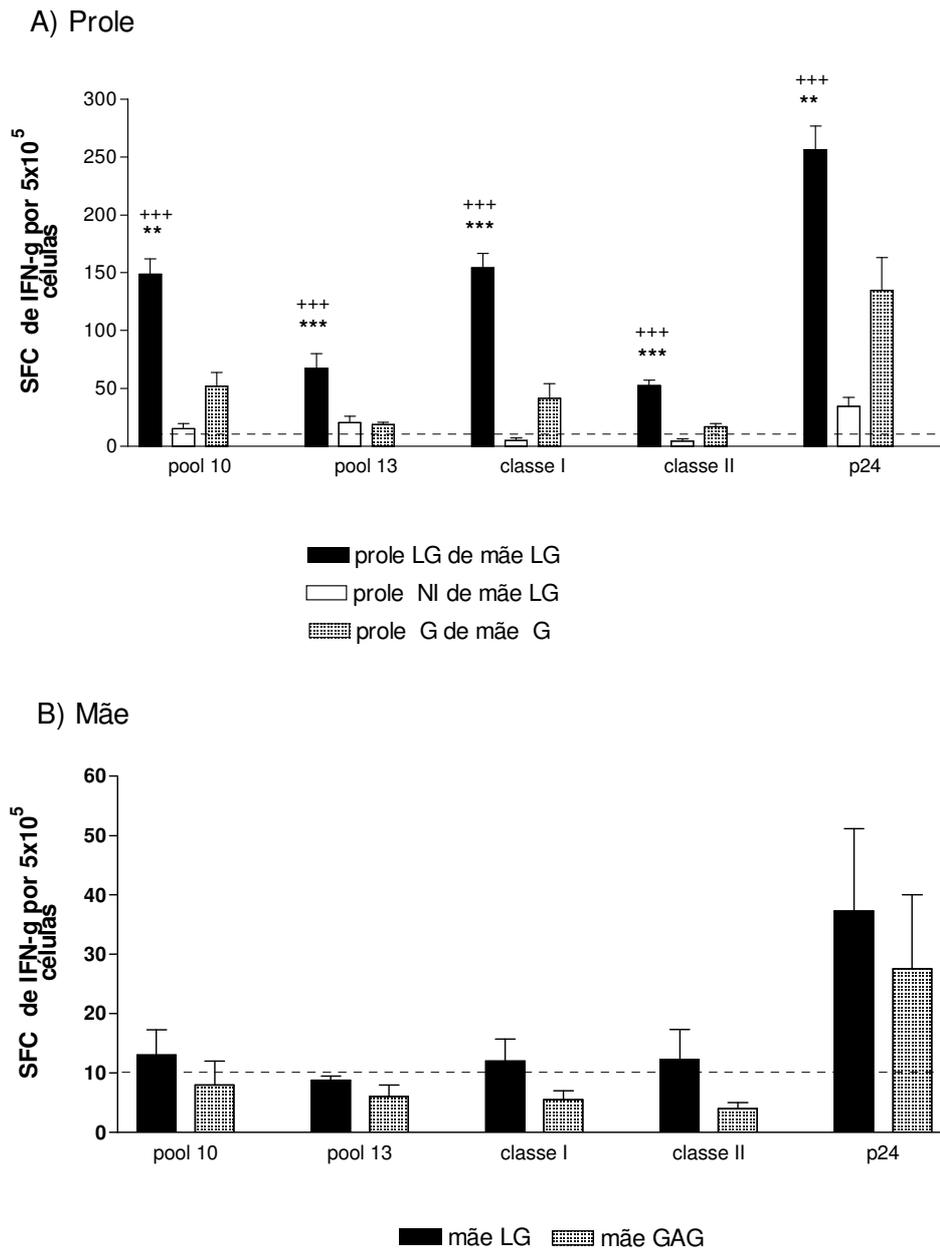
**Tabela 2 – Distribuição de RNA nos tecidos de proles provenientes de mães imunizadas com as vacinas de DNA intravenosamente.**

	Expressão de RNA de gag				
	BAÇO	FÍGADO	PULMÃO	CORAÇÃO	TIMO
Não imune					
<i>LAMP/gag</i>	+	-	+	+	+
<i>gag</i>	+	+	-	+	+

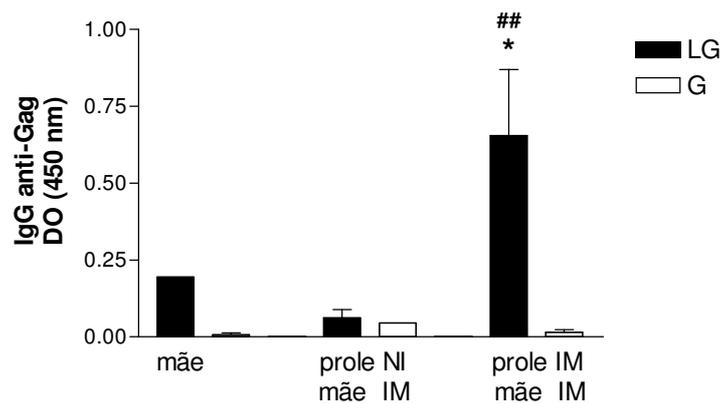
Camundongos fêmeas foram imunizados na terceira semana da gestação por via intravenosa com 100 µg de DNA (*LAMP/gag* ou *gag*) na última semana da gestação. Os tecidos das proles de 1 dia de idade foram obtidas assepticamente. O RNA foi detectado através da transcrição reversa do RNA em cDNA e este foi amplificado por PCR em tempo real.

#### 4.6.2 Efeito da imunização materna via intravenosa com as vacinas de DNA durante a gestação na resposta imune celular e humoral da prole

As proles de mães imunizadas durante a gestação por via iv com *LAMP/gag* que não foram imunizadas aos 7 dias de idade reconheceram a proteína de 24 quilodaltons (p24) da Gag do HIV-1 mas não responderam aos epítomos imunodominantes de classe I e II de Gag, demonstrando que houve sensibilização *in utero*. Já com a imunização das proles aos sete dias houve número significativo de células produtoras de IFN- $\gamma$  aos epítomos de classe I e II da Gag, mostrando que a imunização aos 7 dias funcionou como o reforço da sensibilização que ocorreu durante o desenvolvimento fetal (Figura 27). A imunização materna iv com *gag* gerou clones de esplenócitos nas proles imunizadas que reconheceram os epítomos de classe I e II de e para p24 da Gag. Além disso, a imunização materna por via intravenosa com as vacinas de DNA é capaz de promover a sensibilização do sistema imune materno, induzindo um baixo número de SFC de IFN- $\gamma$  à p24 em número inferior ao observado nas proles (Figura 27). A sensibilização intrauterina com *LAMP/gag* fica evidente quando detectamos anticorpos IgG anti-Gag na prole imunizada aos sete dias (Figura 28), vale lembrar que a imunização neonatal de apenas uma dose não promove produção de anticorpos detectável (Figura 3A). Os resultados mostram que é possível sensibilizar o sistema imune materno e fetal às vacinas gênicas, evitando assim a presença de anticorpos inibitórios e geração de resposta específica em período precoce de vida.



**Figure 27 – Imunização por via intravenosa durante a gestação é capaz de sensibilizar o sistema imune fetal e materno.** Camundongos fêmeas foram imunizados na última semana da gestação com 100  $\mu$ g de *LAMP/gag* ou *gag* e as proles foram ou não imunizadas aos sete dias de idade com 5  $\mu$ g da respectiva vacina materna. O número de esplenócitos produtores de IFN- $\gamma$  aos de peptídeos e a proteína p24 da Gag do HIV-1 foi avaliado por ELISPOT de proles de 35 dias de idade e mães após 35 dias do nascimento. A figura representa 2-3 experimentos por grupo (2-3 animais/grupo). A barra representa a média e EP. \*\* $P < 0.01$  e \*\*\* $P < 0.001$ , quando comparado ao grupo *gag* e +++ $P < 0.001$  quando comparado com o grupo LG. LG = *LAMP/gag* + *LAMP/gag*; G = *gag* + *gag*; NI = não imunizada.



**Figura 28 – Produção de IgG anti-Gag de mães e proles de camundongos de mães imunizadas com as vacinas de DNA por via intravenosa (iv).** Camundongos fêmeas foram imunizados por iv na ultima semana da gestação com 100 µg de *LAMP/gag* ou *gag* e as proles foram ou não imunizadas aos sete dias de idade com 5 µg da respectiva vacina recebida pela mãe. O soro da mãe e da prole foi coletado 35 dias após o nascimento da prole. A presença de IgG anti-Gag foi avaliada por ELISA utilizando lisado viral do HIV-1. A figura representa experimentos utilizando 4-5 animais por grupo. As barras ilustram a média e EP. \* $P < 0.05$ , quando comparado a prole imunizada de mãe imunizada.  $##P < 0.01$ , quando comparado a prole NI LG = *LAMP/gag* + *LAMP/gag*; G = *gag* + *gag*; NI = não imunizada; IM = imunizada.

*Discussão*

## 5 Discussão

O aumento do número de mulheres infectadas pelo HIV e conseqüentemente a transmissão da mãe para criança (TMC) leva ao aumento do número de crianças infectadas. O uso de HAART nas gestantes HIV soropositivas, a substituição do leite de mãe infectadas e a opção pelo parto eletivo são medidas eficazes na redução da TMC. Entretanto, em regiões da África, atingidas pela pobreza, desnutrição e falta de acesso à HAART entre outros medicamentos, o número de crianças infectadas é alarmante (UNAIDS, 2008). A progressão da infecção pelo HIV para AIDS em crianças é mais rápida, e apesar da HAART aumentar a expectativa destas, aproximadamente 70% dos infectados pelo HIV-1 não tem acesso ao tratamento (OMS, 2007), além promover vários efeitos colaterais nas crianças. Salienta-se então a importância de estudos de formulações vacinais que induzam imunidade de longa duração (profilática) ou melhores a resposta ao HIV-1 (terapêutica) em período precoce de vida ou que transfiram imunidade da mãe para a criança, o que enfatiza o papel de vacinação jovens/adultos na prevenção da transmissão vertical deste vírus. Deste modo, estudamos o potencial imunogênico da vacina quimérica de DNA *LAMP/gag* em camundongos BALB/c em período neonatal, bem como a duração desta resposta e o efeito da imunização materna na resposta vacinal da prole.

Inicialmente, avaliamos a expressão da proteína Gag em células HEK-293 humanas transfectadas com as vacinas *LAMP/gag* e *gag* e observamos que a expressão da proteína Gag é maior semi-quantitativamente usando o plasmídeo *LAMP/gag*. A transfecção com *LAMP/gag* gera a proteína Gag nativa (55 Kd), além de proteínas com peso molecular superiores e inferiores a p55 pela provável multimerização e proteólise destas proteínas (Chikhlikar et al., 2004). A maior expressão da Gag na transfecção com *LAMP/gag* não é devida a concentrações diferentes de células transfectadas ou proteínas submetidas a eletroforese, visto que as condições das técnicas foram similares. A expressão da Gag é conhecida por ser limitada na ausência da proteína Rev do HIV-1 devido a seqüências inibitórias que atuam em *cis* no RNA mensageiro (Maldarelli et al., 1991). Assim, a maior expressão de *Gag* com a quimera *LAMP/gag* também pode ser atribuída a elementos de transcrição da *Lamp* que sobrepõe os efeitos de regulação negativa na ausência da Rev do HIV-1 (Chikhlikar et al., 2004), e também pelo plasmídeo pITR que regula a expressão gênica através dos elementos ITR (Xin et al., 2003). Este aumento *in vitro* da expressão da proteína

Gag com *LAMP/gag* pode influenciar, *in vivo*, na maior produção da proteína intracelular para direcionar aos compartimentos ricos em moléculas de classe II do MHC. Isto pode favorecer a apresentação antigênica para as células T CD4+ e consequente ativação destas com o aumento de citocinas que amplificarão a resposta mediada por células antígeno-específicas.

Na imunização dos camundongos BALB/c em período neonatal utilizamos 1 e 5µg de DNA por via intradérmica, doses relativamente baixas comparadas aos protocolos de imunização com vacinas de DNA em camundongos neonatos administradas por via intramuscular (Zhang et al., 2002; Xin et al., 2002; Capozzo et al., 2006). Os neonatos foram imunizados aos sete dias de idade, fase descrita em murinos como correspondente ao estágio de imaturidade imunológica encontrada em recém-nascidos humanos (Siegrist, 2000). Evidenciamos que foi preciso o uso da construção quimérica *LAMP/gag* na geração da resposta imune no período neonatal, sugerindo sua eficácia para estimular células T CD4+, sua cooperação com os linfócitos B e produção de anticorpos. Os níveis de produção de IgG, independente da dose da vacina *LAMP/gag* utilizada na imunização neonatal, foram inferiores ao observado em camundongos adultos. Este fato evidencia que apesar da imunização neonatal com a vacina de DNA quimérica propiciar a produção de anticorpos, a imaturidade imunológica encontrada neste período proporciona menor produção de anticorpos em relação a imunização em adultos. Provavelmente, devido à maior proporção de células B imaturas (IgM+IgD<sup>low/-</sup>) no baço de neonatos, falha na regulação de moléculas co-estimulatórias (CD80/CD86) e de classe II do MHC que resultam na interação inadequada com as células T (Adkins, Leclerc e Marshall-Clarck, 2004). Contudo, a vacina quimérica parece transpor, em parte, esta imaturidade neonatal, já que a vacinação com *gag* nativa não é imunogênica nesta fase de vida.

O perfil das subclasses de IgG do grupo imunizado em idade neonatal com 5µg de *LAMP/gag* foi semelhante ao encontrado em animais adultos imunizados, enquanto que a imunização em período neonatal com 1µg de DNA quimérico induz preferencialmente IgG1. A produção de anticorpos IgG1 e IgG2a, isótipos dependentes de citocinas Th1 e Th2, respectivamente, sugere a participação de IFN-γ e IL-4 produzidas por linfócitos CD4+ ativados nos animais imunizados com 5µg de *LAMP/gag*. Previamente foi demonstrado que a imunização com a vacina *LAMP/gag* em camundongos adultos induz a produção de IFN-γ e IL-4 e de anticorpos IgG2a e IgG1, respectivamente (Marques et al., 2003; De Arruda et al., 2006). Não há descrições quanto a capacidade neutralizante do HIV-1 pelos anticorpos anti-Gag, sendo a Gag uma proteína estrutural viral interna, apenas anticorpos contra as

glicoproteínas do envelope do HIV-1 (gp120 e gp41) foram descritos como neutralizantes (Zolla-Pazner, 2004). Sugerimos que estes anticorpos possam estar envolvidos no *clearance* de células infectadas pelo HIV-1, por ADCC (*antibody dependent cell mediated cytotoxicity*), cuja expressão da Gag acontece duas horas após infecção como citado anteriormente.

O protocolo com uma dose inicial de *LAMP/gag* (1µg) em camundongos neonatos seguido a um reforço com *gag* promoveu níveis similares de anticorpos ao grupo imunizado com duas doses de 5µg de *LAMP/gag*. Este resultado mostra que o *priming* neonatal com a vacina quimérica em baixa concentração seguido do plasmídeo contendo *gag* nativo é capaz de estimular células T CD4+ antígeno específicas, que secretam citocinas do padrão Th2 e Th1, proporcionando a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a, respectivamente, em contraste com os animais imunizados com duas doses da vacina quimérica (1µg), que produz essencialmente anticorpos IgG1. É provável que o direcionamento da proteína Gag pela proteína LAMP-1 aos compartimentos ricos em moléculas de classe II do MHC seja importante apenas na imunização primária para a geração de células de memória em idade precoce de vida. Visto que o mesmo efeito não é observado no protocolo de imunização realizada apenas com *gag*.

As vacinas de DNA são ferramentas interessantes na indução de imunidade contra infecções virais, devido à capacidade de indução de CTLs, necessárias para o controle ou erradicação viral (Estcourt, McMichael e Hanke, 2004). A vacinação com *LAMP/gag* em camundongos neonatos desenvolveu um padrão de resposta de IFN-γ aos peptídeos da Gag do HIV em magnitude superior à imunização com *gag*, além de ampliar o número de *pools* de peptídeos reconhecidos pelas células T. Efeito observado principalmente nos camundongos neonatos que receberam uma dose de *LAMP/gag* e reforço com *gag*. O número de células secretoras de IFN-γ após imunização neonatal mostrou-se similar ou superior para alguns peptídeos comparado aos camundongos adultos imunizados com *LAMP/gag*. Desta maneira, a imunização com *LAMP/gag* em neonatos é capaz de estabelecer resposta imune celular anti-Gag equivalente ou até melhor que aos animais adultos para alguns epítomos de Gag, como observado ao peptídeo imunodominante de classe I do MHC da Gag.

A maior amplitude de reconhecimento de *pools* de peptídeos da Gag utilizando a vacina *LAMP/gag* no período neonatal, em relação a imunização com *gag*, se deve provavelmente ao direcionamento da proteína quimérica aos compartimentos lisossomal/endossomal contendo moléculas de classe II do MHC que possui processamento antigênico diferente das proteínas citosólicas no proteassoma. As proteínas derivadas das

vacinas *LAMP/gag* e *gag* localizam-se em compartimentos intracelulares distintos, sendo que o direcionamento da proteína Gag aos compartimentos MIIC devido ao tráfego pela LAMP, possibilita o reconhecimento dos epítomos por células T CD4+ (Marques et al., 2003; De Arruda et al., 2006).

De Arruda et al. (2006) demonstraram que camundongos adultos imunizados com *LAMP/gag* desenvolvem um repertório de células T que reconhecem tanto epítomos em comum aos reconhecidos pelos animais imunizados com *gag*, como epítomos adicionais. Os autores mapearam os epítomos da Gag restritos a apresentação pelas moléculas de classe I e II do MHC, por células CD4+ e células CD8+ isoladas de camundongos imunizados com os plasmídeos contendo *LAMP/gag* e *gag*. Baseado neste estudo, verificamos que os peptídeos reconhecidos por moléculas de classe I do MHC estão localizados nos *pools* 3, 10 e 11 e os de classe II nos *pools* 4, 7, 13, 14, 15, 16 e 20, utilizados neste projeto. Assim, foi observado que a imunização neonatal com *LAMP/gag* promove o reconhecimento de epítomos de classe I e II do MHC, pelos esplenócitos secretores de IFN- $\gamma$ . A imunização neonatal com *LAMP/gag* aumentou significativamente o número de T CD8+ secretoras de IFN- $\gamma$  ao peptídeo imunodominante restrito a classe I do MHC em relação aos imunizados com *gag* nativo, mais uma vez sugerindo a participação das células T CD4+ no aumento da resposta de células T CD8+.

Na imunização com duas doses de 5 $\mu$ g de *LAMP/gag* em idade neonatal foi observado uma resposta superior de células secretoras de IFN- $\gamma$  para oito *pools* de peptídeos em relação ao plasmídeo contendo o *gag* nativo. Enquanto que a imunização em idade adulta realizada com duas doses de 50  $\mu$ g com *LAMP/gag* promoveu aumento apenas para dois *pools* de peptídeos em relação a vacinação com *gag*. Este fato enfatiza a flexibilidade da resposta imunológica na fase neonatal, que, quando apropriadamente estimulada, pode induzir ampla e eficaz resposta de células T (Siegrist, 2001; Adkins, Leclerc e Marshall-Clarke, 2004).

Em determinadas condições de vacinação, os neonatos murinos são capazes de estabelecer vigorosa resposta de células T CD8+ citotóxicas, por exemplo, quando utilizada a dose ideal de vacinas (Marchant et al., 2003; Sedegah et al., 2003; Capozzo et al., 2006). Provavelmente pelas APCs serem competentes no processamento de antígenos e apresentação via moléculas de classe I do MHC (Gold et al., 2007). Desta forma, evidenciamos que camundongos neonatos imunizados com *LAMP/gag* em resposta ao peptídeo imunodominante restrito ao reconhecimento por moléculas de classe I do MHC de haplótipo H-2K<sup>d</sup>, ou seja, mediado por células CD8+, produzem significantes níveis de IFN- $\gamma$  (protocolo de 5 $\mu$ g) e

TNF- $\alpha$  (protocolo 1 $\mu$ g) em relação aos imunizados com *gag*. Estas citocinas estão envolvidas na citotoxicidade anti-HIV mediada por células T CD8+ em indivíduos infectados pelo HIV-1 (Lichterfeld et al., 2004). Além disto, os animais que receberam o plasmídeo *LAMP/gag* aos sete dias de idade responderam com maior proporção de células T CD8+ antígeno-específicas, produção de granzima, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , mais uma vez confirmando que o *priming* em idade neonatal com *LAMP/gag* é mais eficiente do que com o plasmídeo contendo *gag*.

Como tentativa de analisar a citotoxicidade, foi avaliada a expressão de granzima e perforina em células T CD8+ que expressam CD107a (LAMP-1). A habilidade de analisar a função de células T *in vitro* pela desgranulação de células T pela exposição de CD107a vem sendo extensivamente utilizada (Suni, Maino e Maecker, 2005). Entretanto, a porcentagem de T CD8+CD107+ foi semelhante entre os grupos imunizados em idade neonatal com *LAMP/gag* ou *gag* (dados não demonstrados), provavelmente esta similaridade entre os resultados se deva a falta de um desafio potente como o uso de vetores virais que expressem a Gag do HIV-1. Além disto, em nosso laboratório tem sido avaliado o potencial imunogênico das vacinas gênicas em induzir imunidade de mucosa e sistêmica em camundongos neonatos. Para tal, os animais são imunizados por via nasal e intra-dérmica, simultaneamente. Os camundongos foram avaliados quanto a resposta CTL e foi observado que há uma similar resposta citotóxica ao peptídeo imunodominante de classe I do MHC entre os imunizados *LAMP/gag* e *gag* (Goldoni, 2009, tese de doutorado).

Para avaliar a duração da resposta imunológica após imunização neonatal com 1 $\mu$ g das vacinas de DNA *LAMP/gag* e *gag*, a cinética de produção de anticorpos foi avaliada até oito meses de idade. Apenas os animais que receberam o *priming* com a vacina quimérica (*LAMP/gag*) aos sete dias, independente de receber o reforço com a vacina quimérica ou com *gag* nativo, produziram anticorpos detectáveis até 260 dias de idade. Além disso, o grupo que recebeu uma dose de *LAMP/gag* aos sete dias de idade e reforço aos 150 dias com o mesmo plasmídeo produziu considerável nível de anticorpos IgG anti-Gag, evidenciando o provável potencial deste plasmídeo de gerar plasmócitos de longa duração e/ou células B de memória. Como esperado, no primeiro protocolo, os animais primados com *LAMP/gag* e reforçados com *gag* apresentaram níveis superiores de anticorpos em relação aos que receberam as duas doses de *LAMP/gag*. Este achado enfatiza a vantagem do direcionamento do antígeno derivado da vacina genética ao compartimento contendo moléculas de classe II do MHC para possibilitar a ativação das células T CD4+ aos 7 dias de idade. A presença dos anticorpos anti-Gag após longo período de vacinação neonatal, corrobora com os achados de

camundongos adultos infectados com o vírus da estomatite vesicular que produzem anticorpos até 300 dias pós infecção, anticorpos derivados de plasmócitos de vida curta e/ou de plasmócitos de vida longa (Dörner e Radbruch, 2007). Da mesma maneira, em humanos vacinados contra o poxvirus os anticorpos podem ser detectáveis até 75 anos após imunização (Dörner e Radbruch, 2007). A geração de plasmócitos de longa duração e de células T de memória é dependente da ativação de células T CD4+, embora a manutenção destes plasmócitos independam da presença destes linfócitos e do antígeno (Dörner e Radbruch, 2007; Chan et al., 2001; Maecker et al., 1998). Os mecanismos de manutenção das células B de memória e plasmócitos de longa duração ainda não foram elucidados, entretanto alguns fatores são requeridos (CXCL12, IL-6, BAFF, CD44), mas não são essenciais para sobrevivência e manutenção de plasmócitos (Cassese et al., 2003). As células B de memória podem também ser mantidas por ativação via receptores associados a padrões moleculares ou ainda via receptores de citocinas (Bernasconi et al., 2002).

A resposta celular de memória após imunização neonatal com o plasmídeo *LAMP/gag* foi avaliada em dois protocolos, um no qual os neonatos receberam duas doses das vacinas de DNA (1 µg) aos 7 e 25 dias de idade, e posteriormente foram reforçados aos 260 dias de idade e outro no qual os animais foram imunizados aos sete dias de idade (1 µg) e apenas receberam o reforço vacinal aos 170 dias de idade. Os resultados mostram que o *priming* neonatal com *LAMP/gag* é mais eficiente para promover o reconhecimento de peptídeos da Gag, até oito meses de idade. O segundo protocolo confirma eficiente resposta de IFN-γ para os epítomos de classe I do MHC, ou seja, pelas células de memória T CD8+ (pool 10) e aos epítomos de classe II pelas células CD4+ (pools 13, 14, 15, 16 e 20). A resposta de memória foi decorrente ao *priming* neonatal (1µg), considerando que o grupo controle que recebeu uma dose de plasmídeos aos 170 dias de idade gerou baixo número de células secretoras de IFN-γ à Gag.

Avaliamos ainda, as características fenotípicas das células que respondem ao epítomo imunodominante de classe I após seis meses da imunização neonatal, pela expressão de CD127, CD44 e CD69, bem como a expressão intracelular de citocinas IL-2, IFN-γ e TNF-α e a desgranulação (CD107a/granzima ou CD107a/perforina) e observou-se que a imunização neonatal com *LAMP/gag* promoveu aumento de células T CD8+ que expressam CD69 ou granzima. Provavelmente a baixa dose da vacina administrada na idade neonatal não permita visualização das mudanças fenotípicas que caracterizam as populações de memória aos 6 meses de idade entre os grupos imunizados com *LAMP/gag* ou *gag*, provavelmente devido ao

fato de que neste período ocorra contração das populações de memória, como evidenciado após imunização com DNA em camundongos adultos (Arrode et al., 2007). Foi evidenciado em camundongos adultos imunizados com alta dose de DNA a existência de ondas de expansão de células T que começam na 2ª semana após imunização, sofrem contração a partir da 10ª semana e voltam a se expandir perto da 63ª semana de idade (Arrode et al., 2007).

Assim, foi possível mostrar que a estratégia de imunização neonatal com *LAMP/gag* gera resposta de memória de células T e B de longa duração, evidenciada pela produção de anticorpos e IFN- $\gamma$ , granzima e marcador de ativação de células T aos peptídeos da Gag do HIV-1. Vale lembrar que para expansão e manutenção de células T de memória são necessárias as citocinas Th1 e Th2 como o IFN- $\gamma$ , a IL-4 e a IL-2 (Schuluns e Lefrancois, 2003) que são elicitadas com a vacinação usando *LAMP/gag* (Marques et al., 2003, De Arruda et al., 2006). Entretanto, outras citocinas podem estar envolvidas na manutenção de células de memória como a IL-15, IL-7 que não foram avaliadas neste modelo experimental. Em camundongos adultos uma única dose (100 $\mu$ g) de vacina de DNA anti-HIV promove resposta de células T produtoras de IFN- $\gamma$  com manutenção da população de memória até 63 semanas após a imunização (Arrode et al., 2007). Células T CD4+ e CD8+ de memória persistem na ausência do antígeno e proliferam para manter a homeostase imunológica (Amanna et al., 2006).

Outra abordagem do Projeto foi verificar o efeito da imunização materna na resposta vacinal da prole, ou seja, avaliar se a vacinação gênica pode realmente transpor os efeitos inibitórios mediados pelos anticorpos maternos, possibilitando a sensibilização da prole em resposta à imunização neonatal. A vacinação com antígenos protéicos em período neonatal pode ser influenciada pelos anticorpos maternos, entre outros fatores, inibindo a resposta imunológica após a imunização (Siegrist et al., 1998; Fusaro et al., 2002; Victor et al., 2003; Fusaro et al., 2007; Siegrist, 2007; Rigato et al., 2009). A imunização pré-concepção com *LAMP/gag* transfere por via placentária e pelo leite materno altos níveis de anticorpos IgG1 anti-Gag para o feto e recém-nato, respectivamente, detectáveis na circulação da prole até os 60 dias de idade. Em roedores, o leite materno é outra importante via de transferência passiva de imunidade, com predominância de IgG em relação à IgA (Ghetie e Waard, 1997). Os anticorpos presentes no leite são transferidos à circulação do neonato através dos receptores FcRn expressos pelas células do epitélio intestinal (Ghetie e Waard, 1997).

O fato de não detectarmos anticorpos IgA anti-Gag no leite de mães imunizadas com *LAMP/gag* pode se relacionar com os baixos níveis de TGF- $\beta$ 1, considerando que as vacinas

gênicas *LAMP/gag*, *gag* e o controle *LAMP*, mostraram efeito modulatório neste compartimento de mucosa, diminuindo os níveis de TGF- $\beta$ 1 em relação ao leite das mães não imunizadas. O TGF- $\beta$  é uma citocina imunomodulatória responsável pela mudança de classe de isotipos de imunoglobulina nas células B para IgA (Kramer et al., 1995) e amplamente encontrada no fluídos corporais como no leite materno (Altman et al., 1990 e Lang e Searle, 1994). Entretanto, não foi avaliada se a queda de TGF- $\beta$ 1 influenciou nos níveis totais de IgA no leite .

Ainda foi avaliado se as vacinas gênicas exercem efeito imunomodulatório ou mudam o perfil de citocinas nos fluídos maternos, como soro placentário e líquido amniótico. Foram detectadas alterações de alguns fatores dentre as doze citocinas analisadas, entretanto, grande parte destes fatores apresentaram-se em níveis indetectáveis ou muito baixos. É interessante ressaltar que as alterações na transferência de fatores ao feto foram evidenciadas nas mães imunizadas com *gag* em relação às mães não imunes. Como verificado pela menor concentração de G-CSF, GM-CSF e MCP-1 encontrado no soro placentário/fetal. Já com a construção quimérica *LAMP/gag* estas modificações que ocorreram com o *gag* nativo foram atenuadas, apesar da intensa passagem de anticorpos. Este fato sugere que a interferência da imunização materna na resposta vacinal da prole parece ser mediado pelos anticorpos maternos. Além disto, a diminuição dos fatores de crescimento, envolvidos no desenvolvimento fetal, transferidos com a vacinação com *gag* não parece ter interferido no sucesso/falha na gestação ou na quantidade de neonatos/prole, que foi semelhante com o obtido com as mães imunizadas com o plasmídeo controle (*LAMP*).

De fato, a imunização materna com *LAMP/gag* inibiu significativamente a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-Gag das proles imunizadas em relação às proles imunizadas de mães não imunizadas (controles). Este efeito inibitório da resposta primária se mantém em período posterior como aos 6 meses de idade da prole, sendo que o declínio dos níveis de anticorpos maternos ocorre aos 2 meses de idade, sugerindo que após a imunização da prole possa ocorrer neutralização do antígeno produzido pelas células dos neonatos. Da mesma forma, a imunização materna com *LAMP/gag* diminuiu a magnitude da resposta celular, avaliada pelo número de células produtoras de IFN- $\gamma$  da prole imunizada. Enfatizando o papel inibitório dos anticorpos maternos no momento da vacinação da prole, enquanto que a vacinação materna com *gag* não interfere na resposta celular/humoral da prole imunizada com *gag* ou mesmo quando a prole é imunizada com *LAMP/gag*, o que se relaciona com os baixos níveis de anticorpos transferidos quando as mães são imunizadas com *gag*.

Conseqüentemente, a imunização materna com *LAMP/gag* e da prole com *gag* reduz o reconhecimento de epítomos pelas células T CD8+ (pool 10) e promove quase completa inibição dos epítomos reconhecidos pelas células T CD4+ (pools 13,14 e 15) da prole imunizada. Deste modo, observamos que a imunização materna com o plasmídeo *LAMP/gag* interferiu na magnitude da resposta humoral e celular da prole vacinada, embora não tenha influenciado a geração de células T de memória.

O caráter inibitório dos anticorpos maternos na resposta vacinal na prole de camundongos é descrito tanto para as vacinas convencionais ou de DNA contra o sarampo (Siegrist et al., 1998), e esta influência depende do nível de anticorpos maternos. A imunização neonatal em camundongos com vacina de DNA contra o vírus da leucemia murina ou vírus da herpes promove resposta celular e de anticorpos específicos mesmo na presença de anticorpos maternos. Entretanto, os anticorpos maternos são gerados após infecção com os vírus e não com a vacina de DNA utilizada na imunização da prole (Hassett et al., 1997). É possível, neste caso, que os anticorpos maternos sejam direcionados a epítomos que não são evidenciados na estrutura da proteína que é expressa após a transcrição do antígeno presente na vacina, sugerindo que para uma vacinação eficaz materna pré-concepção contra a infecção pelo HIV-1, esta deva ser realizada com um composto vacinal diferente ao que será administrado no recém-nascido, ou também podem indicar que os anticorpos maternos de mães infectadas pelo HIV-1 não inibam a geração de resposta a uma vacina de DNA nos recém-nascidos.

Algumas hipóteses sugerem que os antígenos sintetizados após transfecção com vacinas de DNA permaneçam no interior das células transfectadas, favorecendo um escape dos anticorpos maternos inibitórios e assim, possibilitando a apresentação antigênica para as células T (Pertmer et al., 2000; Manickan et al., 1997; Premenko-Lanier et al., 2003; Siegrist et al., 1998). Entretanto, a proteína Gag é detectada em níveis superiores no sobrenadante de células transfectadas com *LAMP/gag* em relação ao plasmídeo contendo *gag* (Marques et al., 2003; Chikhilikar et al., 2004). Desta maneira, além da apresentação direta da proteína recém-sintetizada no contexto de moléculas de classe II do MHC e cruzadamente pelas de classe I, ocorre a secreção da proteína Gag que poderia ser captada pelas células dendríticas e células B. Reforça que possa ocorrer o reconhecimento do antígeno e ativação das células T CD4+ além da sensibilização direta de linfócitos B específicos. É provável que a forma secretada da Gag seja passível à neutralização via anticorpos maternos decorrente da imunização com *LAMP/gag*. Contudo, mesmo na presença dos anticorpos maternos, ressalta-se que ocorre sensibilização antigênica no compartimento de células T com a vacina *LAMP/gag* na prole,

mesmo que em menor magnitude, evidenciada pela presença de células produtoras de IFN- $\gamma$  aos peptídeos da Gag.

Para averiguar a duração deste efeito inibitório, após o clearance natural dos anticorpos maternos na prole, avaliou-se a resposta após 6 meses da imunização neonatal, e evidenciou-se então que a imunização materna com *LAMP/gag* não interferiu na geração de resposta de memória imunológica nestas proles em relação a resposta observada em camundongos imunizados no período neonatal de mães não imunizadas. Evidenciou-se células produtoras de IFN- $\gamma$  aos peptídeos da Gag nas proles imunizadas com *LAMP/gag* de mães imunizadas com a mesma vacina, aos seis meses de idade, mostrando que ocorreu o *priming* de células T no período neonatal, a despeito dos anticorpos maternos.

Os possíveis mecanismos inibitórios mediados pelos anticorpos maternos podem não só ser reflexo da neutralização da proteína secretada na vacinação da prole, impedindo adequada sensibilização das células B e diminuindo a sensibilização de linfócitos T, como também, ser derivada de outros fatores regulatórios gerados pela imunização materna. De fato, nos neonatos de mães imunizadas com *LAMP/gag* foi evidenciado um percentual elevado de células CD4+CD25+FoxP3+ no baço, com fenótipo regulador. Embora ensaios funcionais para constatação da função regulatória não tenham sido realizados, é possível que estas células estejam relacionadas ao controle da ativação da resposta imune gerada pela imunização com a vacina *LAMP/gag*, que direciona o antígeno via classe II do MHC pela LAMP-1, promovendo melhor/maior ativação das células T CD4+. Além disto, não se sabe se a presença de anticorpos maternos promova interação idiotípica com os receptores de células T favorecendo a diferenciação destas em células com fenótipo CD4+CD25+FoxP3+. Alguns estudos começaram a ser feitos no sentido de entender o papel regulatório das Tregs em infecções na infância, a depleção de Tregs em cordão umbilical antes ou depois do nascimento mostram que há um aumento na atividade das células T específicas em crianças expostas à malária (Brustoski et al., 2006). As Tregs regulam a inflamação no caso de infecções, porém, quando em número aumentado pode suprimir a resposta antiviral. Recentemente foi demonstrado que a infecção de células T CD4+CD25+ pelo HIV-1 promove aumento da função regulatória destas células e direcionamento destas para os tecidos linfóides contribuindo com a imunossupressão característica na infecção crônica (Ji e Cloyd, 2009). Por outro lado, o aumento das células Treg em crianças expostas e não infectadas pelo HIV-1 pode diminuir a ativação de células T CD4+, reduzindo o potencial de células alvos que poderiam ser infectadas (Legrand et al., 2006).

Nosso grupo tem estudado a interação materno-fetal em modelo murino de hipersensibilidade tipo I através da imunização materna pré e/ou pós concepcional com alérgenos, como ácaros ou ovalbumina. A imunização materna com alérgenos realizada antes do acasalamento é capaz de proteger a prole imunizada pela inibição da resposta IgE, através da transferência de anticorpos maternos inibitórios (Fusaro et al., 2006; Victor et al., 2003; Fusaro et al., 2002). Os mecanismos envolvidos na regulação mediada pelos anticorpos maternos estão em análise, seja quanto sua interferência em células dendríticas ou pelos receptores inibitórios de células B. Propõe-se outros mecanismos quanto a inibição da resposta imune em prole imunizada de mães imunizadas como: a interação entre os anticorpos anti-idiotipos maternos que podem interagir com o BCR ou TCR nas células B e T da prole, promovendo um sinal negativo (Hiernaux, Bona e Barker, 1981; Vakil et al., 1986), inibindo-as; a ligação dos anticorpos maternos em receptores inibitórios dos linfócitos B, como FcRIIb, CD22 ou CD72 (Rigato et al., 2009) e a transferência de citocinas como observado em proles que apresentaram resposta alérgica diminuída quando as mães sensibilizadas com OVA foram imunomoduladas para desenvolver resposta Th1 frente ao antígeno (Matson, et al., 2007; Lima et al., 2005). A estratégia vacinal das mães com alérgenos previne o desenvolvimento da resposta alérgica da prole, sendo portanto, oportuna se a inibição for mediada pelos anticorpos maternos. Em contraste, a vacinação materna com *LAMP/gag*, no caso do HIV-1, por um lado transfere anticorpos, que no caso não são neutralizantes, porém pode diminuir, mas não inibir a resposta celular ao antígeno no infante, quando comparada com a resposta que pode ser gerada quando a mãe não é imunizada.

Desta forma, foi avaliada uma estratégia vacinal com *LAMP/gag* durante a gestação, na tentativa de escapar do efeito dos anticorpos maternos anti-Gag. A imunização intra-útero tem sido bem sucedida em modelos murinos e outros mamíferos (Rinaldi et al., 2006; Xin et al., 2002; Okuda et al., 2001; Gerdtts et al., 2000). Após imunização com *LAMP/gag* e *gag* por via intravenosa de fêmeas na última semana da gestação, houve sensibilização *in utero*, evidenciada expressão de RNA de Gag nos tecidos fetais. Este RNA é provavelmente traduzido em proteína e que então primou o sistema imune fetal *in utero*, pois após ao nascimento, uma única dose aos 7 dias de vida promove produção de anticorpos anti-Gag aos 30 dias de idade. Vale lembrar que para induzir produção de anticorpos ou resposta celular em neonatos ou adultos foram necessárias duas doses do plasmídeo *LAMP/gag*.

A imunização transplacentária com plasmídeo de DNA mostrou geração de resposta imune humoral e celular, protetora ao vírus influenza em camundongos (Okuda et al., 2001). Quanto mais próximo ao nascimento acontece a administração das vacinas nas mães, melhor

o potencial para desenvolver resposta imune na prole (Okuda et al., 2001). A transferência de plasmídeos pela placenta e fluido amniótico aos fetos é questionada quanto à indução de tolerância ao produto gênico na prole, porém observamos que ocorre a geração da resposta imune anti-Gag nas proles imunizadas, corroborando com os dados de outros estudos (Rinaldi et al., 2006; Xin et al., 2002; Okuda et al., 2001; Gerds et al., 2000).

A imunização materna com ambas as vacinas gênicas por via intravenosa mostrou que ocorre distribuição do plasmídeo em órgãos linfóides primários (timo) e secundários (baço), além de outros órgãos como pulmão, coração e fígado. Entretanto, somente a imunização materna com *LAMP/gag* foi capaz de primar o sistema imune fetal, que respondeu com número considerável de células produtoras de IFN- $\gamma$  quando a prole foi vacinada com o mesmo plasmídeo aos 7 dias de idade. Estes dados sugerem que uma única dose por via intravenosa durante a gestação sensibiliza a prole, porém necessita de uma dose de reforço após o nascimento para gerar resposta imunológica humoral e celular na prole.

Em conjunto, os resultados evidenciam que a vacina quimérica *LAMP/gag* é imunogênica em período neonatal, sendo eficaz na geração de resposta humoral e celular anti-Gag de longa duração até a fase adulta. Além disso, a imunização materna com a vacina *LAMP/gag* promove transferência de anticorpos anti-Gag por via placentária e pela amamentação à prole, os quais, provavelmente, são responsáveis pela inibição da resposta humoral e diminuição da magnitude da resposta celular aos peptídeos da Gag na prole imunizada, e interferem na geração de células de memória imunológica. Já a estratégia de imunizar as mães durante a gestação com *LAMP/gag* por via intravenosa, não promoveu produção de anticorpos, e a resposta neonatal aos antígenos Gag se desenvolveu em magnitude superior a imunização com o plasmídeo que codifica o *gag* nativo, contornando o possível efeito inibitório dos anticorpos maternos.

*Conclusões*

## 6 Conclusões

Baseados nas evidências deste trabalho é possível concluir que:

1. A vacina de DNA quimérica *LAMP/gag* é potencialmente imunogênica quando administrada em período neonatal em relação à vacina *gag* promovendo resposta humoral e celular anti-Gag do HIV-1 de longa duração, que persiste até a idade adulta em camundongos, sugerindo que a vacina de DNA quimérica proporciona adequada ativação das células T CD4+ antígeno-específica para gerar resposta de memória;
2. A imunização materna pré-concepcional com a vacina quimérica de DNA transfere por via amniótica, placentária e leite materno anticorpos específicos e citocinas/quimiocinas que podem estar relacionados com a diminuição transitória da resposta vacinal da prole, sem contudo interferir no desenvolvimento de memória imunológica;
3. Uma única dose de *LAMP/gag* administrada por via intravenosa no período gestacional induz a expressão de RNAm da Gag nos tecidos fetais e propicia a sensibilização tanto do sistema imune neonatal como do materno, sugerindo ser um protocolo que evita a ação de anticorpos maternos inibitórios.

# *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;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;160(9):4217-24.

Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2004;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;170(9):4548-56.

Adkins B. Heterogeneity in the CD4 T Cell Compartment and the Variability of Neonatal Immune Responsiveness. *Curr Immunol Rev.* 2007;3(3):151-159.

Adkins B. T-cell function in newborn mice and humans. *Immunol Today.* 1999;20(7):330-5.

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;272(5270):1955-8.

Altman DJ, Schneider SL, Thompson DA, Cheng HL, Tomasi TB. A transforming growth factor beta 2 (TGF-beta 2)-like immunosuppressive factor in amniotic fluid and localization of TGF-beta 2 mRNA in the pregnant uterus. *J Exp Med.* 1990;172(5):1391-401.

Amanna IJ, Slifka MK, Crotty S. Immunity and immunological memory following smallpox vaccination. *Immunol Rev.* 2006;211:320-37.

Anne Croy B, van den Heuvel MJ, Borzychowski AM, Tayade C. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunol Rev.* 2006;214:161-85.

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;178(4):2318-27.

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;177(4):2265-75.

Asakura Y, Lundholm P, Kjerrstrom A, Benthin R, Lucht E, Fukushima J, et al. DNA-plasmids of HIV-1 induce systemic and mucosal immune responses. *Biol Chem.* 1999;380(3):375-9.

---

\* **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> [2004 May 06].

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;26(11):2666-70.

Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF, Heath WR. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med.* 1997;186(1):65-70.

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.

Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science.* 2002;298(5601):2199-202.

Bertoletti A, Cham F, McAdam S, Rostron T, Rowland-Jones S, Sabally S, et al. Cytotoxic T cells from human immunodeficiency virus type 2-infected patients frequently cross-react with different human immunodeficiency virus type 1 clades. *J Virol.* 1998;72(3):2439-48.

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;102(12):4512-7.

Bosco N, Ceredig R, Rolink A. Transient decrease in interleukin-7 availability arrests B lymphopoiesis during pregnancy. *Eur J Immunol.* 2008;38(2):381-90.

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

Bot A, Bot S, Bona C. Enhanced protection against influenza virus of mice immunized as newborns with a mixture of plasmids expressing hemagglutinin and nucleoprotein. *Vaccine.* 1998;16(17):1675-82.

Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta.* 2002;23(4):257-73.

Bowen JM, Chamley L, Mitchell MD, Keelan JA. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women. *Placenta.* 2002;23(4):239-56.

Boyle CM, Robinson HL. Basic mechanisms of DNA-raised antibody responses to intramuscular and gene gun immunizations. *DNA Cell Biol.* 2000;19(3):157-65.

Brave A, Johansen K, Palma P, Benthin R, Hinkula J. Maternal immune status influences HIV-specific immune responses in pups after DNA prime protein boost using mucosal adjuvant. *Vaccine.* 2008;26(47):5957-66.

Brustoski K, Moller U, Kramer M, Hartgers FC, Kremsner PG, Krzych U, et al. Reduced cord blood immune effector-cell responsiveness mediated by CD4+ cells induced in utero as a consequence of placental *Plasmodium falciparum* infection. *J Infect Dis.* 2006;193(1):146-54.

Bunders MJ, Bekker V, Scherpbier HJ, Boer K, Godfried M, Kuijpers TW. Haematological parameters of HIV-1-uninfected infants born to HIV-1-infected mothers. *Acta Paediatr.* 2005;94(11):1571-7.

Capozzo AV, Ramirez K, Polo JM, Ulmer J, Barry EM, Levine MM, et al. Neonatal immunization with a Sindbis virus-DNA measles vaccine induces adult-like neutralizing antibodies and cell-mediated immunity in the presence of maternal antibodies. *J Immunol.* 2006;176(9):5671-81.

Cassese G, Arce S, Hauser AE, Lehnert K, Moewes B, Mostarac M, et al. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol.* 2003;171(4):1684-90.

Center of Disease Control. 2006. Disponible em: <http://www.cdc.gov/> [2008 Jan 12].

Chan K, Lee DJ, Schubert A, Tang CM, Crain B, Schoenberger SP, et al. The roles of MHC class II, CD40, and B7 costimulation in CTL induction by plasmid DNA. *J Immunol.* 2001;166(5):3061-6.

Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, et al. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol.* 2002;53(1-2):241-56.

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;18(19):2015-22.

Chen J, Zhang F, Fang F, Chang H, Chen Z. Vaccination with hemagglutinin or neuraminidase DNA protects BALB/c mice against influenza virus infection in presence of maternal antibody. *BMC Infect Dis.* 2007;7:118.

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;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.

Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* 1995;270(5243):1811-5.

Contramaestre AP, Sifontes F, Marin R, Camejo MI. Secretion of stem cell factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by mouse embryos in culture: influence of group culture. *Zygote.* 2008;16(4):297-301.

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;168(5):2219-24.

- 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;312(5996):763-7.
- De 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;112(1):126-33.
- Dobano C, Rogers WO, Gowda K, Doolan DL. Targeting antigen to MHC Class I and Class II antigen presentation pathways for malaria DNA vaccines. *Immunol Lett*. 2007;111(2):92-102.
- Dorner T, Radbruch A. Antibodies and B cell memory in viral immunity. *Immunity*. 2007;27(3):384-92.
- Durandy A, De Saint Basile G, Lisowska-Groszpiette B, Gauchat JF, Forveille M, Kroczeck RA, et al. Undetectable CD40 ligand expression on T cells and low B cell responses to CD40 binding agonists in human newborns. *J Immunol*. 1995;154(4):1560-8.
- Estcourt MJ, McMichael AJ, Hanke T. DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1. *Immunol Rev*. 2004;199:144-55.
- Faas MM, Bouman A, Veenstra van Nieuwenhoven AL, van der Schaaf G, Moes H, Heineman MJ, et al. Species differences in the effect of pregnancy on lymphocyte cytokine production between human and rat. *J Leukoc Biol*. 2005;78(4):946-53.
- Fadel SA, Cowell LG, Cao S, Ozaki DA, Kepler TB, Steeber DA, et al. Neonate-primed CD8+ memory cells rival adult-primed memory cells in antigen-driven expansion and anti-viral protection. *Int Immunol*. 2006;18(2):249-57.
- Fadel SA, Ozaki DA, Sarzotti M. Enhanced type 1 immunity after secondary viral challenge in mice primed as neonates. *J Immunol*. 2002;169(6):3293-300.
- Feiterna-Sperling C, Weizsaecker K, Buhner C, Casteleyn S, Loui A, Schmitz T, et al. Hematologic effects of maternal antiretroviral therapy and transmission prophylaxis in HIV-1-exposed uninfected newborn infants. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007;45(1):43-51.
- 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;272(5263):872-7.
- Fernandez MA, Puttur FK, Wang YM, Howden W, Alexander SI, Jones CA. T regulatory cells contribute to the attenuated primary CD8+ and CD4+ T cell responses to herpes simplex virus type 2 in neonatal mice. *J Immunol*. 2008;180(3):1556-64.
- Fusaro AE, Brito CA, Victor JR, Rigato PO, Goldoni AL, Duarte AJ, et al. Maternal-fetal interaction: preconception immunization in mice prevents neonatal sensitization induced by allergen exposure during pregnancy and breastfeeding. *Immunology*. 2007;122(1):107-15.

Fusaro AE, Maciel M, Victor JR, Oliveira CR, Duarte AJ, Sato MN. Influence of maternal murine immunization with *Dermatophagoides pteronyssinus* extract on the type I hypersensitivity response in offspring. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127(3):208-16.

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

Gerdtts V, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den H, Griebel PJ. Fetal immunization by a DNA vaccine delivered into the oral cavity. *Nat Med*. 2000;6(8):929-32.

Ghetie V, Ward ES. FcRn: the MHC class I-related receptor that is more than an IgG transporter. *Immunol Today*. 1997;18(12):592-8.

Gold MC, Robinson TL, Cook MS, Byrd LK, Ehlinger HD, Lewinsohn DM, et al. Human neonatal dendritic cells are competent in MHC class I antigen processing and presentation. *PLoS ONE*. 2007;2(9):e957.

Goulder PJ, Jeena P, Tudor-Williams G, Burchett S. Paediatric HIV infection: correlates of protective immunity and global perspectives in prevention and management. *Br Med Bull*. 2001;58:89-108.

Goldoni AL. Indução de imunidade de mucosa pela vacina de DNA quimérica LAMP/p55-*gag* em neonatos murinos [qualificação da dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2009

Graham BS, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Enama ME, Moodie Z, et al. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 DNA candidate vaccine. *J Infect Dis*. 2006;194(12):1650-60.

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;268(3):1941-6.

Hassett DE, Zhang J, Whitton JL. Neonatal DNA immunization with a plasmid encoding an internal viral protein is effective in the presence of maternal antibodies and protects against subsequent viral challenge. *J Virol*. 1997;71(10):7881-8.

Hiernaux J, Bona C, Baker PJ. Neonatal treatment with low doses of anti-idiotypic antibody leads to the expression of a silent clone. *J Exp Med*. 1981;153(4):1004-8.

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;31(3):217-24.

Howarth M, Elliott T. The processing of antigens delivered as DNA vaccines. *Immunol Rev*. 2004;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;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;451(7179):725-9.
- Ji J, Cloyd MW. HIV-1 binding to CD4 on CD4+CD25+ regulatory T cells enhances their suppressive function and induces them to home to, and accumulate in, peripheral and mucosal lymphoid tissues: an additional mechanism of immunosuppression. *Int Immunol.* 2009;21(3):283-94.
- 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;181(2):976-90.
- Kim B, Feng N, Narvaez CF, He XS, Eo SK, Lim CW, et al. The influence of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells on the immune response to rotavirus infection. *Vaccine.* 2008;26(44):5601-11.
- Kim SY, Byrn R, Groopman J, Baltimore D. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol.* 1989;63(9):3708-13.
- Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, van Veen CJ, van Hellemond JJ, Neefjes JJ, Kast WM, et al. MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J Immunol.* 1995;154(11):5715-24.
- Kovarik J, Gaillard M, Martinez X, Bozzotti P, Lambert PH, Wild TF, et al. Induction of adult-like antibody, Th1, and CTL responses to measles hemagglutinin by early life murine immunization with an attenuated vaccinia-derived NYVAC(K1L) viral vector. *Virology.* 2001;285(1):12-20.
- Kovarik J, Siegrist CA. Optimization of vaccine responses in early life: the role of delivery systems and immunomodulators. *Immunol Cell Biol.* 1998;76(3):222-36.
- Kramer DR, Sutherland RM, Bao S, Husband AJ. Cytokine mediated effects in mucosal immunity. *Immunol Cell Biol.* 1995;73(5):389-96.
- Lang AK, Searle RF. The immunomodulatory activity of human amniotic fluid can be correlated with transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and beta 2 activity. *Clin Exp Immunol.* 1994;97(1):158-63.
- Langrish CL, Buddle JC, Thrasher AJ, Goldblatt D. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clin Exp Immunol.* 2002;128(1):118-23.
- Lee HH, Hoeman CM, Hardaway JC, Guloglu FB, Ellis JS, Jain R, et al. Delayed maturation of an IL-12-producing dendritic cell subset explains the early Th2 bias in neonatal immunity. *J Exp Med.* 2008;205(10):2269-80.

- 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;88(3):945-54.
- Legrand FA, Nixon DF, Loo CP, Ono E, Chapman JM, Miyamoto M, et al. Strong HIV-1-specific T cell responses in HIV-1-exposed uninfected infants and neonates revealed after regulatory T cell removal. *PLoS ONE*. 2006;1:e102.
- 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;20(4):429-40.
- Lichterfeld M, Yu XG, Waring MT, Mui SK, Johnston MN, Cohen D, et al. HIV-1-specific cytotoxicity is preferentially mediated by a subset of CD8(+) T cells producing both interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Blood*. 2004;104(2):487-94.
- Lima C, Souza VM, Faquim-Mauro EL, Hoshida MS, Bevilacqua E, Macedo MS, et al. Modulation of the induction of lung and airway allergy in the offspring of IFN-gamma-treated mother mice. *J Immunol*. 2005;175(6):3554-9.
- Lu CY, Calamai EG, Unanue ER. A defect in the antigen-presenting function of macrophages from neonatal mice. *Nature*. 1979;282(5736):327-9.
- Lu S, Wang S, Grimes-Serrano JM. Current progress of DNA vaccine studies in humans. *Expert Rev Vaccines*. 2008;7(2):175-91.
- 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;21(17-18):2178-89.
- Maecker HT, Umetsu DT, DeKruyff RH, Levy S. Cytotoxic T cell responses to DNA vaccination: dependence on antigen presentation via class II MHC. *J Immunol*. 1998;161(12):6532-6.
- 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;65(11):5732-43.
- Mandelbrot L, Peytavin G, Firtion G, Farinotti R. Maternal-fetal transfer and amniotic fluid accumulation of lamivudine in human immunodeficiency virus-infected pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;184(2):153-8.
- Manickan E, Yu Z, Rouse BT. DNA immunization of neonates induces immunity despite the presence of maternal antibody. *J Clin Invest*. 1997;100(9):2371-5.
- Marchant A, Appay V, Van Der Sande M, Dulphy N, Liesnard C, Kidd M, et al. Mature CD8(+) T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J Clin Invest*. 2003;111(11):1747-55.

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;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;100(2):141-51.

Martin JE, Pierson TC, Hubka S, Rucker S, Gordon IJ, Enama ME, et al. A West Nile virus DNA vaccine induces neutralizing antibody in healthy adults during a phase 1 clinical trial. *J Infect Dis.* 2007;196(12):1732-40.

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;94(16):8726-31.

Matson AP, Zhu L, Lingenheld EG, Schramm CM, Clark RB, Selander DM, et al. Maternal transmission of resistance to development of allergic airway disease. *J Immunol.* 2007;179(2):1282-91.

Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007;449(7164):819-26.

Min B, Legge KL, Bell JJ, Gregg RK, Li L, Caprio JC, et al. Neonatal exposure to antigen induces a defective CD40 ligand expression that undermines both IL-12 production by APC and IL-2 receptor up-regulation on splenic T cells and perpetuates IFN-gamma-dependent T cell anergy. *J Immunol.* 2001;166(9):5594-603.

Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico AIDS. 2005. Disponível em: <http://www.aids.gov.br> [2004 Nov 25].

Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico AIDS. 2007. Disponível em: <http://www.aids.gov.br> [2006 Fev 12]

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

Mitchell MD, Trautman MS, Dudley DJ. Cytokine networking in the placenta. *Placenta.* 1993;14(3):249-75.

Morein B, Abusugra I, Blomqvist G. Immunity in neonates. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;87(3-4):207-13.

Morein B, Blomqvist G, Hu K. Immune responsiveness in the neonatal period. *J Comp Pathol.* 2007;137 Suppl 1:S27-31.

Muthukkumar S, Goldstein J, Stein KE. The ability of B cells and dendritic cells to present antigen increases during ontogeny. *J Immunol.* 2000;165(9):4803-13.

Nahmias AJ, Kourtis AP. The great balancing acts. The pregnant woman, placenta, fetus, and infectious agents. *Clin Perinatol*. 1997;24(2):497-521.

Nilsson J, Boasso A, Velilla PA, Zhang R, Vaccari M, Franchini G, et al. HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood*. 2006;108(12):3808-17.

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;20(3):315-25.

Okuda K, Xin KQ, Haruki A, Kawamoto S, Kojima Y, Hirahara F, et al. Transplacental genetic immunization after intravenous delivery of plasmid DNA to pregnant mice. *J Immunol*. 2001;167(9):5478-84.

Organização Mundial da saúde. 2007. Disponível em: <http://www.who.int/hiv/topics/universalaccess/en/index.html> [2009 May 6].

Pacheco SE, McIntosh K, Lu M, Mofenson LM, Diaz C, Foca M, et al. Effect of perinatal antiretroviral drug exposure on hematologic values in HIV-uninfected children: An analysis of the women and infants transmission study. *J Infect Dis*. 2006;194(8):1089-97.

Peng S, Trimble C, Ji H, He L, Tsai YC, Macaes B, et al. Characterization of HPV-16 E6 DNA vaccines employing intracellular targeting and intercellular spreading strategies. *J Biomed Sci*. 2005;12(5):689-700.

Pertmer TM, Oran AE, Moser JM, Madorin CA, Robinson HL. DNA vaccines for influenza virus: differential effects of maternal antibody on immune responses to hemagglutinin and nucleoprotein. *J Virol*. 2000;74(17):7787-93.

Pihlgren M, Friedli M, Tougne C, Rochat AF, Lambert PH, Siegrist CA. Reduced ability of neonatal and early-life bone marrow stromal cells to support plasmablast survival. *J Immunol*. 2006;176(1):165-72.

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;31(3):939-46.

Premenko-Lanier M, Rota PA, Rhodes G, Verhoeven D, Barouch DH, Lerche NW, et al. DNA vaccination of infants in the presence of maternal antibody: a measles model in the primate. *Virology*. 2003;307(1):67-75.

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;206(4):923-36.

Pulendran B, Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell*. 2006;124(4):849-63.

- Rigato PO, Fusaro AE, Victor JR, Sato MN. Maternal immunization to modulate the development of allergic response and pathogen infections. *Immunotherapy*. 2009;1:141-56.
- Rinaldi M, Signori E, Rosati P, Cannelli G, Parrella P, Iannace E, et al. Feasibility of in utero DNA vaccination following naked gene transfer into pig fetal muscle: transgene expression, immunity and safety. *Vaccine*. 2006;24(21):4586-91.
- 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.
- Rose S, Lichtenheld M, Foote MR, Adkins B. Murine neonatal CD4+ cells are poised for rapid Th2 effector-like function. *J Immunol*. 2007;178(5):2667-78.
- 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;155(4):1818-28.
- Rowland-Jones SL. Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nat Rev Immunol*. 2003;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;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;178(5):2746-54.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol*. 2005;24(3-4):211-26.
- Sarzotti M, Robbins DS, Hoffman PM. Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science*. 1996;271(5256):1726-8.
- Schallert N, Pihlgren M, Kovarik J, Roduit C, Tougne C, Bozzotti P, et al. Generation of adult-like antibody avidity profiles after early-life immunization with protein vaccines. *Eur J Immunol*. 2002;32(3):752-60.
- Schluns KS, Lefrancois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):269-79.
- Sedegah M, Belmonte M, Epstein JE, Siegrist CA, Weiss WR, Jones TR, et al. Successful induction of CD8 T cell-dependent protection against malaria by sequential immunization with DNA and recombinant poxvirus of neonatal mice born to immune mothers. *J Immunol*. 2003;171(6):3148-53.

- 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.
- Siegrist CA, Barrios C, Martinez X, Brandt C, Berney M, Cordova M, et al. Influence of maternal antibodies on vaccine responses: inhibition of antibody but not T cell responses allows successful early prime-boost strategies in mice. *Eur J Immunol*. 1998;28(12):4138-48.
- Siegrist CA. Development of new pediatric vaccines: progress and challenges. *Rev Med Suisse Romande*. 1998;118(4):395-401.
- Siegrist CA. Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine*. 2003;21(24):3406-12.
- Siegrist CA. Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine*. 2001;19(25-26):3331-46.
- Siegrist CA. The challenges of vaccine responses in early life: selected examples. *J Comp Pathol*. 2007;137 Suppl 1:S4-9.
- Siegrist CA. Vaccination in the neonatal period and early infancy. *Int Rev Immunol*. 2000;19(2-3):195-219.
- Simpson CC, Woods GM, Muller HK. Impaired CD40-signalling in Langerhans' cells from murine neonatal draining lymph nodes: implications for neonatally induced cutaneous tolerance. *Clin Exp Immunol*. 2003;132(2):201-8.
- Stevenson FK. DNA vaccines and adjuvants. *Immunol Rev*. 2004;199:5-8.
- Stockinger B. Neonatal tolerance mysteries solved. *Immunol Today*. 1996;17(6):249.
- 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;203(3):777-88.
- Suni MA, Maino VC, Maecker HT. Ex vivo analysis of T-cell function. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(4):434-40.
- 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;23(10):1258-64.
- Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol*. 1999;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;72(7):5648-53.
- United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). AIDS Epidemic update December 2005. Geneva, Switzerland. UNAIDS. 2005. 1-98.
- United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). AIDS Epidemic update December 2006. Geneva, Switzerland. UNAIDS. 2006. 1-95.

United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). AIDS Epidemic update December 2006. Geneva, Switzerland. UNAIDS. 2007. 1-60.

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

Vakil M, Kearney JF. Functional characterization of monoclonal auto-anti-idiotypic antibodies isolated from the early B cell repertoire of BALB/c mice. *Eur J Immunol.* 1986;16(9):1151-8.

Victor JR Jr, Fusaro AE, Duarte AJ, Sato MN. Preconception maternal immunization to dust mite inhibits the type I hypersensitivity response of offspring. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(2):269-77.

Walker BD. Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med.* 2007;15(4):134-6.

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;92(25):11671-5.

Xin KQ, Ooki T, Jounai N, Mizukami H, Hamajima K, Kojima Y, et al. A DNA vaccine containing inverted terminal repeats from adeno-associated virus increases immunity to HIV. *J Gene Med.* 2003;5(5):438-45.

Xin KQ, Sasaki S, Kojima Y, Jounai N, Kumamoto Y, Hashimoto K, et al. Detection of Progeny Immune Responses after Intravenous Administration of DNA Vaccine to Pregnant Mice. *Biol Proced Online.* 2002;3:91-101.

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;77(21):11596-602.

Zhang F, Chen J, Fang F, Zhou Y, Wu J, Chang H, et al. Maternal immunization with both hemagglutinin- and neuraminidase-expressing DNAs provides an enhanced protection against a lethal influenza virus challenge in infant and adult mice. *DNA Cell Biol.* 2005;24(11):758-65.

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;76(23):11911-9.

Zolla-Pazner S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(3):199-210.

*Anexos*

## Anexos

### Anexo A – Células formadoras de spot (SFC) de IFN- $\gamma$ de camundongos neonatos imunizados com 1 $\mu$ g das vacinas de DNA.

	LG+LG média			G+G média			L+L média			LG + G média			G+LG média		
	SFC	EP	N	SFC	EP	N	SFC	EP	N	SFC	EP	N	SFC	DP	N
basal	2	1	10	1	1	8	0	0	2	1	0	4	15	15	2
anti-CD3	346	40	10	382	10	8	486	8	2	96	30	4	53	2	2
(1) 1-31	5	3	10	0	0	8	0	0	2	68	49	4	0	0	2
(2) 21-51	0	0	10	1	0	8	0	0	2	26	25	4	0	0	2
(3) 41-71	3	2	10	1	1	8	2	0	2	9	9	4	0	0	2
(4) 61-91	14	3	10	7	2	8	0	0	2	21	15	4	0	0	2
(5) 81-111	9	4	10	1	1	8	0	0	2	7	6	4	0	0	2
(6) 101-131	3	2	10	6	5	8	2	1	2	21	15	4	34	34	2
(7) 121-151	3	1	10	5	1	8	23	4	2	8	3	4	7	7	2
(8) 141-171	7	5	10	7	2	8	0	0	2	3	1	4	0	0	2
(9) 161-191	1	0	10	2	1	8	2	2	2	21	13	4	0	0	2
(10) 181-211	237	40	10	95	15	8	6	1	2	337	34	4	19	19	2
(11) 201-231	2	2	10	5	4	8	4	4	2	30	16	4	0	0	2
(12) 221-251	0	0	10	4	4	8	0	0	2	29	17	4	0	0	2
(13) 241-271	54	17	10	23	4	8	1	1	2	45	31	4	1	1	2
(14) 261-291	45	12	10	24	5	8	0	0	2	55	28	4	0	0	2
(15) 281-311	63	13	10	42	7	8	6	6	2	62	30	4	32	32	2
(16) 301-331	42	11	10	34	11	8	4	4	2	108	44	4	34	11	2
(17) 321-351	15	4	10	12	4	8	2	2	2	69	39	4	1	1	2
(18) 341-371	13	5	10	6	2	8	0	0	2	39	16	4	21	21	2
(19) 361-391	22	7	10	7	2	8	2	2	2	68	36	4	23	23	2
(20) 381-411	28	10	10	6	2	8	0	0	2	74	41	4	0	0	2
(21) 401-431	2	2	10	4	2	8	2	2	2	39	37	4	0	0	2
(22) 421-451	7	3	10	3	2	8	0	0	2	33	28	4	11	11	2
(23) 441-471	14	10	10	1	1	8	1	1	2	28	16	4	0	0	2
(24) 461-491	3	3	8	1	0	8	1	1	2	0	0	4	0	0	2
(25) 481-500	0	0	8	1	0	8	0	0	2	1	1	4	0	0	2
PEP 7921	246	39	10	95	14	8	0	0	2	334	30	4	0	0	2

Notas: Camundongos neonatos foram imunizados aos sete dias e reforçados no 25º dia de idade com 1 $\mu$ g as vacinas *LAMP/gag* (LG), *gag* (G), *Lamp* (l) em cinco grupos experimentais (*LAMP/gag+LAMP/gag*=LG+LG; *gag+gag* (G+G), *Lamp+Lamp* (L+L), *LAMP/gag+gag* (LG+G) e *gag+LAMP/gag* (G+LG). Os esplenócitos coletados dez dias após o reforço (2-3 animais por experimento) foram cultivados com 10 $\mu$ g/mL de cada um dos 25 pools de peptídeos (1-25). A numeração ao lado do número dos pools corresponde a posição inicial dos aminoácidos da proteína Gag do primeiro peptídeo e a final do último de cada pool. Peptídeo 7921 se refere ao peptídeo imunodominante (AMQMLKETINNAE) de classe I testado separadamente do pool 10. A Tabela mostra a média do número de SFC (por 0.5x10<sup>6</sup> células) dos experimentos (1-5/grupo), representando N o número de duplicatas (uma por experimento) e o erro padrão (EP). Em cinza estão representados os *pools* que foram considerados positivos considerando SFC>10.

**Anexo B – Células formadoras de spot (SFC) de IFN- $\gamma$  de camundongos neonatos  
imunizados com 5 $\mu$ g das vacinas de DNA.**

	LG+LG			G+G		
	média SFC	EP	N	média SFC	EP	N
basal	<b>2</b>	1	10	<b>0</b>	0	8
anti-CD3	<b>494</b>	27	10	<b>365</b>	63	8
(1) 1-31	<b>1</b>	1	10	<b>1</b>	0	8
(2) 21-51	<b>2</b>	2	10	<b>4</b>	2	8
(3) 41-71	<b>3</b>	3	10	<b>7</b>	3	8
(4) 61-91	<b>46</b>	14	10	<b>25</b>	9	8
(5) 81-111	<b>14</b>	7	10	<b>19</b>	6	8
(6) 101-131	<b>1</b>	0	10	<b>17</b>	9	8
(7) 121-151	<b>42</b>	15	10	<b>18</b>	4	8
(8) 141-171	<b>50</b>	18	10	<b>12</b>	8	8
(9) 161-191	<b>20</b>	9	10	<b>12</b>	6	8
(10) 181-211	<b>355</b>	43	10	<b>169</b>	30	8
(11) 201-231	<b>17</b>	11	10	<b>7</b>	3	8
(12) 221-251	<b>15</b>	13	10	<b>7</b>	3	8
(13) 241-271	<b>85</b>	16	10	<b>35</b>	8	8
(14) 261-291	<b>63</b>	16	10	<b>33</b>	13	8
(15) 281-311	<b>106</b>	23	10	<b>44</b>	14	8
(16) 301-331	<b>97</b>	19	10	<b>34</b>	10	8
(17) 321-351	<b>39</b>	7	10	<b>6</b>	2	8
(18) 341-371	<b>42</b>	11	10	<b>7</b>	3	8
(19) 361-391	<b>48</b>	14	10	<b>9</b>	4	8
(20) 381-411	<b>31</b>	13	10	<b>6</b>	2	8
(21) 401-431	<b>34</b>	16	10	<b>8</b>	5	8
(22) 421-451	<b>2</b>	2	10	<b>12</b>	6	8
(23) 441-471	<b>7</b>	5	10	<b>5</b>	2	8
(24) 461-491	<b>2</b>	1	10	<b>18</b>	13	8
(25) 481-500	<b>2</b>	1	10	<b>10</b>	7	8
Peptídeo 7921	<b>365</b>	46	10	<b>154</b>	33	8

Notas: Camundongos neonatos foram imunizados aos sete dias e reforçados no 25º dia de idade com 5 $\mu$ g as vacinas *LAMP/gag* (LG) e *gag* (G) em dois grupos experimentais (*LAMP/gag+LAMP/gag=LG+LG*; *gag+gag=G+G*). Os esplenócitos coletados dez dias após o reforço (2-3 animais por experimento) foram cultivados com 10 $\mu$ g/mL de cada um dos 25 pools de peptídeos (1-25). A numeração ao lado do número dos pools corresponde a posição inicial dos aminoácidos da proteína Gag do primeiro peptídeo e a final do último de cada pool. Peptídeo 7921 se refere ao peptídeo imunodominante (AMQMLKETINNAEE) de classe I testado separadamente do pool 10. A Tabela mostra a média do número de SFC (por 0.5x10<sup>6</sup> células) dos experimentos (1-5/grupo), representando N o número de duplicatas (uma por experimento) e o erro padrão (EP). Em cinza estão representados os *pools* que foram considerados positivos considerando SFC>10.

**Anexo C – Células formadoras de spot (SFC) de IFN- $\gamma$  de camundongos adultos  
imunizados com 50  $\mu$ g das vacinas de DNA.**

	LG+LG			G+G		
	média SFC	EP	N	média SFC	EP	N
basal	<b>3</b>	8	10	<b>2</b>	4	8
anti-CD3	<b>408</b>	123	10	<b>434</b>	154	8
(1) 1-31	<b>6</b>	20	10	<b>2</b>	4	8
(2) 21-51	<b>5</b>	10	10	<b>0</b>	0	8
(3) 41-71	<b>16</b>	24	10	<b>6</b>	15	8
(4) 61-91	<b>19</b>	28	10	<b>14</b>	27	8
(5) 81-111	<b>4</b>	9	10	<b>2</b>	3	8
(6) 101-131	<b>4</b>	9	10	<b>31</b>	86	8
(7) 121-151	<b>2</b>	3	10	<b>80</b>	144	8
(8) 141-171	<b>3</b>	4	10	<b>48</b>	123	8
(9) 161-191	<b>18</b>	46	10	<b>21</b>	55	8
(10) 181-211	<b>153</b>	86	10	<b>148</b>	77	8
(11) 201-231	<b>17</b>	22	10	<b>24</b>	45	8
(12) 221-251	<b>16</b>	27	10	<b>15</b>	24	8
(13) 241-271	<b>76</b>	49	10	<b>32</b>	20	8
(14) 261-291	<b>53</b>	41	10	<b>27</b>	20	8
(15) 281-311	<b>82</b>	57	10	<b>33</b>	17	8
(16) 301-331	<b>31</b>	41	10	<b>31</b>	37	8
(17) 321-351	<b>13</b>	29	10	<b>28</b>	72	8
(18) 341-371	<b>31</b>	34	10	<b>11</b>	4	8
(19) 361-391	<b>23</b>	35	10	<b>29</b>	59	8
(20) 381-411	<b>23</b>	35	10	<b>10</b>	17	8
(21) 401-431	<b>15</b>	42	10	<b>7</b>	16	8
(22) 421-451	<b>0</b>	0	10	<b>0</b>	0	8
(23) 441-471	<b>16</b>	30	10	<b>0</b>	0	8
(24) 461-491	<b>21</b>	35	10	<b>15</b>	39	8
(25) 481-500	<b>9</b>	16	10	<b>3</b>	9	8
Peptídeo 7921	<b>180</b>	76	10	<b>106</b>	55	8

Notas: Camundongos adultos (2 meses) foram imunizados e reforçados 20 dias depois com 50 $\mu$ g as vacinas *LAMP/gag* (LG) e *gag* (G) em dois grupos experimentais (*LAMP/gag+LAMP/gag*=LG+LG; *gag+gag*=G+G). Os esplenócitos coletados dez dias após o reforço (2-3 animais por experimento) foram cultivados com 10 $\mu$ g/mL de cada um dos 25 pools de peptídeos (1-25). A numeração ao lado do número dos pools corresponde a posição inicial dos aminoácidos da proteína Gag do primeiro peptídeo e a final do último de cada pool. Peptídeo 7921 se refere ao peptídeo imunodominante (AMQMLKETINNAEAE) de classe I testado separadamente do pool 10. A Tabela mostra a média do número de SFC (por 0.5 $\times$ 10<sup>6</sup> células) dos experimentos (1-5/grupo), representando N o número de duplicatas (uma por experimento) e o erro padrão (EP). Em cinza estão representados os *pools* que foram considerados positivos considerando SFC>10.

**Anexo D – Resposta de células produtoras de IFN- $\gamma$  (SFC/0.5x10<sup>6</sup> esplenócitos) 9 meses após imunização neonatal.**

	(LG+LG) + LG			(G+G) + G			(LG+G) + LG		
	média SFC	EP	N	média SFC	EP	N	média SFC	EP	N
basal	4	4	2	2	2	2	0	0	2
anti-CD3	600	0	2	600	0	2	497	0	2
(1) 1-31	20	20	2	8	8	2	0	0	2
(2) 21-51	21	6	2	6	1	2	0	0	2
(3) 41-71	0	0	2	13	5	2	0	0	2
(4) 61-91	4	4	2	24	6	2	3	3	2
(5) 81-111	2	0	2	0	0	2	0	0	2
(6) 101-131	25	16	2	0	0	2	0	0	2
(7) 121-151	33	1	2	0	0	2	0	0	2
(8) 141-171	5	5	2	0	0	2	0	0	2
(9) 161-191	29	13	2	11	11	2	0	0	2
(10) 181-211	557	30	2	221	38	2	213	14	2
(11) 201-231	14	14	2	0	0	2	0	0	2
(12) 221-251	37	14	2	0	0	2	11	11	2
(13) 241-271	140	15	2	38	11	2	0	0	2
(14) 261-291	107	22	2	3	3	2	0	0	2
(15) 281-311	254	15	2	52	11	2	32	6	2
(16) 301-331	95	25	2	5	5	2	0	0	2
(17) 321-351	45	5	2	0	0	2	19	19	2
(18) 341-371	54	6	2	2	2	2	0	0	2
(19) 361-391	29	5	2	24	24	2	9	9	2
(20) 381-411	47	15	2	42	42	2	0	0	2
(21) 401-431	28	1	2	14	14	2	0	0	2
(22) 421-451	11	1	2	0	0	2	0	0	2
(23) 441-471	17	1	2	0	0	2	0	0	2
(24) 461-491	29	5	2	17	17	2	0	0	2
(25) 481-500	15	4	2	0	0	2	0	0	2
Peptídeo 7921	501	18	2	163	8	2	254	53	2

Notas: Camundongos neonatos foram imunizados com 1 $\mu$ g aos sete dias de idade e reforçados 25 di e na idade adulta receberam um reforço com 25 $\mu$ g (260 di) com as vacinas *LAMP/gag* (LG) e *gag* (G) em três grupos experimentais LG+LG (LG); G+G (G) e LG+G (LG). Os esplenócitos coletados dez dias após o reforço (2-3 animais por experimento) foram cultivados com 10 $\mu$ g/mL de cada um dos 25 pools de peptídeos (1-25). A numeração ao lado do número dos pools corresponde a posição inicial dos aminoácidos da proteína Gag do primeiro peptídeo e a final do último de cada pool. Peptídeo 7921 se refere ao peptídeo imunodominante (AMQMLKETINNAE) de classe I testado separadamente do pool 10. A Tabela mostra a média do número de SFC (por 0.5x10<sup>6</sup> células) dos experimentos (1-5/grupo), representando N o número de duplicatas (uma por experimento) e o erro padrão (EP). Em cinza estão representados os *pools* que foram considerados positivos considerando SFC>10.

**Anexo E – Resposta de células produtoras de IFN- $\gamma$  (SFC/0.5x10<sup>6</sup> esplenócitos) 6 meses após imunização neonatal.**

	(LG+LG) + LG			(G+G) + G		
	média SFC	EP	N	média SFC	EP	N
basal	0	0	4	1	0	4
anti-CD3	344	18	4	209	60	4
(1) 1-31	1	1	4	1	0	4
(2) 21-51	0	0	4	2	1	4
(3) 41-71	0	0	4	1	1	4
(4) 61-91	8	2	4	3	1	4
(5) 81-111	19	13	4	1	1	4
(6) 101-131	2	2	4	0	0	4
(7) 121-151	3	0	4	8	7	4
(8) 141-171	4	1	4	2	2	4
(9) 161-191	2	1	4	2	2	4
(10) 181-211	418	27	4	3	2	4
(11) 201-231	2	1	4	4	3	4
(12) 221-251	2	1	4	3	3	4
(13) 241-271	202	52	4	1	1	4
(14) 261-291	94	11	4	0	0	4
(15) 281-311	116	47	4	3	2	4
(16) 301-331	102	41	4	7	3	4
(17) 321-351	79	41	4	4	3	4
(18) 341-371	27	1	4	3	2	4
(19) 361-391	41	6	4	4	2	4
(20) 381-411	92	22	4	1	1	4
(21) 401-431	10	8	4	2	1	4
(22) 421-451	5	3	4	0	0	4
(23) 441-471	3	1	4	1	0	4
(24) 461-491	1	0	4	2	1	4
(25) 481-500	2	2	4	2	1	4
Peptídeo 7921	402	26	4	3	3	4

Notas: Camundongos neonatos foram imunizados aos sete dias de idade e reforçados 170 di com 25 $\mu$ g (260 di) com as vacinas *LAMP/gag* (LG) e *gag* (G) em dois grupos experimentais LG+LG e G+G . Os esplenócitos coletados dez dias após o reforço (2-3 animais por experimento) foram cultivados com 10 $\mu$ g/mL de cada um dos 25 pools de peptídeos (1-25). A numeração ao lado do número dos pools corresponde a posição inicial dos aminoácidos da proteína Gag do primeiro peptídeo e a final do último de cada pool. Peptídeo 7921 se refere ao peptídeo imunodominante (AMQMLKETINNAEE) de classe I testado separadamente do pool 10. A Tabela mostra a média do número de SFC (por 0.5x10<sup>6</sup> células) dos experimentos (1-5/grupo), representando N o número de duplicatas (uma por experimento) e o erro padrão (EP). Em cinza estão representados os *pools* que foram considerados positivos considerando SFC>10.