Juliana de Souza Apostolico

**Influência da imunização inicial com a vacina
codificando epítomos para linfócitos T CD4⁺ do HIV na
resposta imune direcionada a proteína env.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Santoro Rosa

**São Paulo
2013**

Juliana de Souza Apostolico

**Influência da imunização inicial com a vacina
codificando epítomos para linfócitos T CD4⁺ do HIV na
resposta imune direcionada a proteína env.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Santoro Rosa

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Apostolico, Juliana de Souza

Influência da imunização inicial com a vacina codificando epítomos para
linfócitos T CD4⁺ do HIV na resposta imune direcionada a proteína env / Juliana
de Souza Apostolico. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Daniela Santoro Rosa.

Descritores: 1.HIV/imunologia 2.Glicoproteínas 3.Epitomos de linfócito T
4.Síndrome de imunodeficiência adquirida 5.Linfócitos B 6.Camundogos
endogâmicos Balb C 7.Vacinas contra a aids 8.Adjuvantes imunológicas

USP/FM/DBD-367/13

“Quanto mais um homem se aproxima de suas metas, tanto mais crescem as dificuldades” (Goethe)

**Aos meus pais, Mauricio e Adriana, á
minha irmã Mariana e ao meu noivo
Renato, pelo todo apoio e amor em
cada passo de minha vida!**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Daniela Santoro Rosa, por todos os ensinamentos e conselhos que com certeza foram de grande valia, pela paciência, pelo carinho e principalmente por ter acreditado e confiado em mim para a realização desse trabalho.

À Prof^a Dr^a Silvia Boscardin, praticamente a minha co-orientadora, por ter abertos as portas de seu laboratório para a realização de algumas etapas de meu trabalho, pela confiança e principalmente pelas sugestões.

À toda minha família em especial meu pai Mauricio e minha mãe Adriana pelo apoio incondicional, por sempre acreditarem em mim e sempre me estimularem a seguir em frente.

Ao meu noivo Renato, pelo imenso amor, carinho, ajuda, descontração, principalmente compreensão e paciência e também por sempre acreditar em mim.

À minha amiga Liane, pelo companheirismo infinito e pela imensa ajuda principalmente na reta final, pelas conversas, risadas e também choros... Obrigada por tudo amiga!

À minha amiga Mônica, pelos conselhos, pelas conversas e pelo momentos de descontração e pelo todo apoio à distancia!

Às minhas amigas do ICB II - USP, Eline, Kelly e Raquel, pela enorme ajuda no inicio, meio e fim do meu trabalho, aprendi muito com vocês. Obrigada pela amizade e pelo carinho.

Ao Marcio, pela imensa ajuda durante as transfecções e produção da proteína, sem suas mãos mágicas não teríamos conseguido nem metade.

À minha amiga do coração Bianca, (minha irmã mais velha), por tudo que vivemos juntas. Obrigada pela a sua amizade e pela sua torcida mesmo não estando atualmente trabalhando juntas.

À minha amiga Valéria, pelo seu apoio, por muitas conversas que me tranquilizavam nos momentos de ansiedade.

Às meninas Carol, Vivis, Márcia, Vanessa, Ana e Nathalia pelo todo apoio nesses últimos meses.

À amiga Vanessinha, pela sua preocupação, apoio e carinho mesmo estando longe por um tempo.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	3
1.2 Filogenia do HIV	4
1.3 Ciclo de vida do HIV	5
1.4 Patogênese da infecção pelo HIV	8
1.5 Resposta imune específica contra o HIV	11
1.5.1 A resposta de anticorpos	11
1.5.2 A resposta de linfócitos T CD8 ⁺	14
1.5.3 A resposta de linfócitos T CD4 ⁺	15
1.6 Linfócitos T CD4 ⁺ auxiliar foliculares (T Helper foliculares) e células B do centro germinativo	18
1.7 A glicoproteína (gp) do envelope do HIV	20
1.8 Vacinas contra HIV-1	21
1.9 Vacinas baseadas em epítopos conservados e ligadores de múltiplas moléculas MHC de classe II do HIV	24
1.10 Adjuvantes	25
1.10.1 Adjuvante completo de Freund (ACF) e Adjuvante incompleto de Freund (AIF)	27
1.10.2 Hidróxido de alumínio (alum)	28
1.10.3 Monofosforil lipídeo A (MPL)	29
1.10.4 CpG ODN Monofosforil lipídeo A (MPL)	30
1.10.5 poly IC	31
1.10.6 Imiquimod (R837) e Resiquimod (R848)	31
1.10.7 Muramil dipeptídeo (MDP)	32

2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivo específicos	35
3. METODOLOGIA	36
3.1 Plasmídeo que codifica a gp140	37
3.2 Plasmídeo que codifica a vacina HIVBr18	37
3.3 Transformação de bactérias <i>E. coli</i> DH5 α competentes com os plasmídeos	37
3.4 Purificação em larga escala do DNA plasmidial	37
3.5 Quantificação e avaliação da integridade dos plasmídeos purificados	39
3.6 Transfecção de células HEK 293T	39
3.7 Purificação e expressão da proteína recombinante gp140	40
3.8 <i>Western Blot</i>	40
3.9 Camundongos e imunizações	41
3.10 Avaliação da resposta imune Humoral – ELISA	42
3.11 Avaliação da resposta imune celular	44
1.11.1 Suspensão celular	44
1.11.2 Ensaio para detecção de IFN- γ ELISPOT	44
1.11.3 Ensaio de ELISPOT para detecção de células secretoras de anticorpos específicos	45
1.11.4 Avaliação fenotípica de células T auxiliares foliculares e de células B do centro germinativo	46
1.11.5 Citometria Multiparamétrica	48
4. RESULTADOS	51
4.1 Produção dos plasmídeos que codificam a gp140 e o HIVBr18	52
4.2 Purificação da proteína recombinante que representa o trímero da gp140	54
4.3 Avaliação da imunogenicidade do trímero de gp140	56
4.4 Avaliação da influência da imunização inicial com HIVBr18 na resposta imune humoral ao trímero de gp140	57
4.5 Avaliação da influência da imunização inicial com HIVBr18 na resposta imune celular à gp140	68
4.6 Avaliação da influência da imunização inicial com o plasmídeo Yu2-gp140 na resposta imune ao trímero de gp140	75

4.7 Influência de diferentes adjuvantes na resposta imune ao tríplice de gp140.....	81
5. DISCUSSÃO	92
6. CONCLUSÃO	103
7. ANEXOS	106
7.1 ANEXO - Figura.....	107
7.2 ANEXO - Tabela.....	110
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
9. MANUSCRITO	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa epidemiológico do número de pessoas infectadas pelo HIV-1	4
Figura 2. Organização do vírus HIV-1	6
Figura 3. Esquema representativo da infecção de uma célula alvo pelo HIV-1	7
Figura 4. Curso natural da infecção pelo HIV-1	10
Figura 5. Anticorpos neutralizantes contra o HIV-1	13
Figura 6. Efeitos protetores dos linfócitos T CD4 ⁺	16
Figura 7. A célula T auxiliar folicular e a célula B do centro germinativo	20
Figura 8. Os adjuvantes ativam diferentes receptores da imunidade inata (receptores semelhantes a Toll-(TLR) e semelhantes a NOD (NLR)	27
Figura 9. Estratégia de análise para identificação de células T auxiliares foliculares (THF) e células B do Centro Germinativo (CG)	48
Figura 10. Esquema representativo das construções da gp140 do HIV	52
Figura 11. Análise da integridade do plasmídeo Yu2gp140 após purificação	53
Figura 12. Análise da integridade dos plasmídeos pVAX e HIVBr18 após purificação	54
Figura 13. Análise da purificação do trímero de gp140 em coluna de cobalto ...	55
Figura 14. Reconhecimento da proteína recombinante gp140 pelo soro de paciente infetado pelo HIV-1.	56
Figura 15. Títulos de anticorpos induzidos pela imunização com trímero gp140.	57
Figura 16. Imunização com o trímero induz elevados títulos de anticorpos na presença de diferentes adjuvantes	59
Figura 17. A imunização inicial com HIVBr18 não altera a magnitude da resposta humoral contra gp140 na presença de diferentes adjuvantes	60
Figura 18. Imunização com o trímero gp140 na presença dos adjuvantes induz diferentes subclasses de imunoglobulinas (IgG).	62
Figura 19. A imunização inicial com HIVBr18 não altera a magnitude da resposta humoral contra gp140 na presença de diferentes adjuvantes	64
Figura 20. A imunização com o trímero induz diferentes subclasses de imunoglobulinas (IgG) na presença dos adjuvantes	65
Figura 21. A imunização inicial com HIVBr18 não altera a longevidade da resposta humoral contra gp140 na presença de diferentes adjuvantes.	66

Figura 22. A imunização inicial com HIVBr18 não influencia na afinidade dos anticorpos produzidos contra gp140 na presença de diferentes adjuvantes	67
Figura 23. A imunização inicial com a vacina HIVBr18 e com a proteína recombinante gp140 na presença de diferentes adjuvantes é capaz de induzir produção de IFN- γ	69
Figura 24. A imunização inicial com a vacina HIVBr18 e com a proteína recombinante gp140 na ausência de adjuvante é capaz de induzir produção de IFN- γ	71
Figura 25. Avaliação da proliferação celular específica utilizando citometria de fluxo	72
Figura 26. Avaliação da proliferação e produção de citocina intracelular específica pelos LT CD4 ⁺	74
Figura 27. A imunização inicial com DNA que codifica a gp140 não aumenta a magnitude da resposta imune humoral independente do número de doses administradas	76
Figura 28. A imunização inicial com DNA que codifica a gp140 não altera a frequência de células B do centro germinativo e T auxiliar foliculares independente do número de doses administradas	77
Figura 29. A imunização inicial com o plasmídeo Yu2-gp140 não altera o número de células secretoras de anticorpos gp140-específicos	78
Figura 30. A imunização inicial com DNA que codifica a proteína Gp140 não altera a produção de IFN- γ independente do numero de doses administradas. ..	79
Figura 31. Avaliação proliferação celular específica por citometria de fluxo	80
Figura 32. A imunização com a proteína gp140 na presença dos adjuvantes induz elevados títulos de anticorpos	82
Figura 33. A imunização com o trímero na presença dos adjuvantes induz diferentes subclasses de imunoglobulinas (IgG).	83
Figura 34. A imunização com o trímero na presença de diferentes adjuvantes gera anticorpos específicos de alta afinidades	84
Figura 35. A imunização com a proteína gp140 na presença de diferentes adjuvantes é capaz de induzir a formação de células do centro germinativo (CG) e células T auxiliar foliculares (THF).	85
Figura 36. A imunização com a proteína gp140 na presença de diferentes adjuvantes induz elevados títulos de anticorpos.	86
Figura 37. A imunização com a proteína gp140 na presença dos diferentes adjuvantes induz células secretoras de anticorpos IgG gp140-específicos	87

Figura 38. A imunização com a proteína recombinante gp140 na presença de diferentes adjuvantes induz a produção de IFN- γ	88
Figura 39. Avaliação da proliferação específica pelos LT CD4 ⁺ e CD8 ⁺ por citometria de fluxo.	89
Figura 40. Avaliação da produção de citocinas intracelulares específica por LT CD4 ⁺ utilizando citometria de fluxo multiparamétrica	90
Figura 41. Avaliação da produção de citocinas intracelulares específica pelos LT CD8 ⁺ utilizando citometria de fluxo multiparamétrica	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Painéis de citometria.....	47
Tabela 1: Painel de citometria multiparamétrica	50
Tabela 1: Esquema de imunização com o DNA Yu-2 gp140 e a proteína recombinante gp140	75

LISTA DE ABREVIATURAS

2-ME	-	2-mercaptoetanol
Abs	-	Absorbância
ACF	-	Adjuvante Completo de Freund
ADCC	-	Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
ADCVI	-	Inibição Viral por Anticorpos Dependente de células
AEC	-	3-amino-9-ethyl-carbazole
AIDS	-	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AIF	-	Adjuvante Incompleto de Freund
Alum	-	Hidróxido de Alumínio
AMP	-	Ampicilina
APC	-	Alofocianina
ARV	-	Antiretroviral
BSA	-	Albumina Sérica Bovina
CaCl ₂	-	Cloreto de Cálcio
CMSP	-	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CO ₂	-	Dióxido de Carbono
CpG	-	Citidina-fosfato-guanosina
CpG ODN	-	oligodeoxinucleotídeos CpG
CS	-	Circunsporozoíta
CTL	-	Linfócito T citotóxico
CWS	-	cell wall skeleton from a tubercule bacillus
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
DO	-	Densidade Óptica
DP	-	Desvio Padrão
dsRNA	-	RNA de fita dupla
DTH	-	Hipersensibilidade do tipo tardia
E.coli	-	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	-	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	-	“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”
ELISPOT	-	“Enzyme Immunospot Assay”
env	-	Envelope viral
FCS	-	<i>Forward Scatter</i> – dispersão frontal da luz
FITC	-	Isoticianato de fluoresceína
GALT	-	Tecido linfóide associado ao intestino
GC	-	Centro germinativo
gp	-	Glicoproteína
HAART	-	Terapia antiretroviral altamente ativa
HAV	-	Vírus da hepatite A
HBV	-	Vírus da hepatite B
HEK	-	Célula do rim embrionárias humana
HIV	-	Vírus da imunodeficiência Humana
HLA	-	Antígeno leucocitário Humano

HPV	-	Vírus do papiloma humano
HSV	-	Vírus da Herpes Humana
IgA	-	Imunoglobulina A
IgG	-	Imunoglobulina G
IgM	-	Imunoglobulina M
IL	-	Interleucina
INF- γ	-	Interferon-gama
kDa	-	Quilo Dalton
KHCO ₃	-	Bicarbonato de Potássio
L	-	Litro
LB	-	Luria Bertani
LPS	-	lipopolissacarídeo
M	-	Molar
MB	-	Macs Buffer
MDA5	-	Gene 5 de diferenciação associado ao melanoma
MDP	-	Muramil dipeptídeo
MDP	-	Muramil dipeptídeo
mg	-	Miligrama
MHC	-	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	-	Mililitro
mM	-	Milimolar
MOPS	-	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MPER	-	Região proximal a membrana externa
MPL	-	Monofosforil lipídeo A
mRNA	-	RNA mensageiro
MYD88	-	Myeloid differentiation primary response gene 88
N	-	Normal
nAbs	-	Anticorpos neutralizantes
NaCl	-	Cloreto de Sódio
NaH ₂ PO ₄	-	Fosfato de Sódio Bibásico
NaOH	-	Hidróxido de Sódio
ng	-	Nanograma
NH ₄ Cl	-	Cloreto de Amônio
NK	-	Células assassinas naturais - "Natural Killer"
NLR	-	Receptor semelhante a NOD
nM	-	Nanomol
nm	-	nanômetro
NO	-	Óxido Nítrico
ODN	-	Oligodeoxinucleotídeo
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
OPD	-	Ortofenilenodiamina
pb	-	Pares de Bases
PBS	-	Tampão fosfato-salina
PBST	-	Tampão fosfato salina <i>tween</i> 20
PE	-	Ficoeritrina
PEG	-	Polietilenoglicol

PEI	-	polietilenimina
PercP	-	Proteína clorofilperidina
poly I:C	-	Polyinosinic-polycytidylic acid
PRR	-	Receptores de Reconhecimento de Padrões
R10	-	Meio RPMI suplementado com 10% de SFB
rcf	-	Força Centrífuga Relativa
RNA	-	Ácido Ribonucléico
RNase	-	Ribonuclease
rpm	-	Rotações por Minuto
RPMI	-	Roswell Park Memorial Institute
SDS	-	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	-	Soro Fetal Bovino
SHIV	-	Vírus da imunodeficiência Símia-Humana
SIV	-	Vírus da imunodeficiência Símia
SPF	-	Specific Pathogen Free (livres de agente patogênicos)
SSC	-	<i>Side Scatter</i> – dispersão lateral da luz
SUS	-	Sistema Único de Saúde
TCR	-	Receptor de célula T
TDM	-	Trehalose dicorynomycolate
TFH	-	Célula T helper folicular
TLR	-	Receptor semelhante a Toll
TNF- α	-	Fator de necrose tumoral
TRIF	-	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
UFS	-	Unidade Formadora de Spots
μg	-	Micrograma
μL	-	Microlitro
μM	-	Micromolar

RESUMO

RESUMO

A epidemia causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é a mais importante das últimas décadas. Apesar dos avanços no conhecimento da patogenia do vírus e da resposta imune à infecção, até o momento não existe uma vacina eficaz contra a aquisição do HIV. Diversas linhas de evidência indicam que anticorpos neutralizantes ou ligadores, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ desempenham um papel importante na imunidade contra o HIV. Os anticorpos que são capazes de neutralizar o HIV são direcionados principalmente à glicoproteína do envelope do vírus (env), mas os candidatos vacinais baseados na proteína de envelope gp120 monomérica testados até hoje falharam em induzir proteção nos ensaios de eficácia. Avanços no entendimento da estrutura e função da glicoproteína env tem facilitado o desenvolvimento de uma nova geração de imunógenos baseada em trímeros mais estáveis e solúveis da glicoproteína gp140. Em uma formulação vacinal além da escolha do antígeno, os adjuvantes desempenham um papel fundamental. Os adjuvantes são conhecidos por aumentar a imunogenicidade das vacinas, e nos últimos anos vários compostos, incluindo agonistas de receptores do tipo Toll (TLR) e NOD (NLR) têm demonstrado eficácia em ensaios clínicos. Em estudos prévios, nosso grupo demonstrou que a imunização de camundongos com uma vacina de DNA codificando 18 epítopos para linfócitos T CD4⁺ do HIV-1 (HIVBr18), foi capaz de induzir resposta específica e ampla de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Devido ao importante papel do efeito auxiliar de linfócitos T CD4⁺ na resposta humoral nas imunizações assistidas por diversos adjuvantes, o objetivo central do trabalho foi verificar se a imunização inicial com a vacina de DNA HIVBr18 seria capaz de aumentar a magnitude/qualidade de resposta imune humoral e celular induzida pelo trímero de gp140 na presença de diferentes adjuvantes. Para tal, camundongos BALB/c foram imunizados inicialmente com a vacina HIVBr18 ou com o vetor vazio e posteriormente com a proteína gp140 na presença dos adjuvantes: completo de Freund (ACF), poly IC, CpG ODN 1826, Monofosforil lipídeo A (MPL), Muramildipeptídeo (MDP), Imiquimod (R837), e Resiquimod (R848). Observamos que a imunização inicial com HIVBr18 foi capaz de fornecer um auxílio cognato para a proliferação específica de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e também para a produção da citocina IFN γ . A análise da

resposta humoral mostrou que a imunização inicial com a vacina HIVBr18, foi capaz de influenciar a produção das subclasses de imunoglobulinas, independente do adjuvante testado. No presente trabalho, também analisamos a influência dos adjuvantes na imunogenicidade da gp140. Os animais que receberam os adjuvantes MPL, poly IC e CpG ODN 1826 apresentaram títulos de anticorpos estatisticamente superiores quando comparados aos animais que receberam os adjuvantes Alum, MDP, R837 e R848. Observamos que os animais imunizados com a gp140 na presença dos diferentes adjuvantes desenvolveram células B do centro germinativo e células TCD4+ auxiliar foliculares. Estes resultados nos permitem concluir que a imunização inicial com HIVBr18 é capaz de alterar a qualidade da resposta humoral e celular gp140-específica. Assim, essa formulação poderia ser utilizada para auxiliar e/ou direcionar a resposta imune induzida por outros imunógenos como por exemplo o trímico de gp140. Podemos concluir também que diferentes formulações de adjuvantes que se encontram em ensaios clínicos como poly IC, CpG ODN e MPL podem ser capazes de induzir uma resposta imune humoral e celular tão ou mais potente que aquela induzida pelo ACF.

Descritores: HIV/imunologia; Glicoproteínas; Epitopos de linfócito T; Síndrome de imunodeficiência adquirida; Linfócitos B; Camundongos endogâmicos Balb C; Vacinas contra a aids; Adjuvantes imunológicos.

ABSTRACT

ABSTRACT

The epidemic caused by the human immunodeficiency virus (HIV) is the most important in the last decades. Despite advances in the knowledge about virus pathogenesis and immune response to infection, until now there is not an effective vaccine against HIV acquisition. Several evidences indicate that neutralizing or binding antibodies, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes play an important role in immunity against HIV. The antibodies that are able to neutralize HIV are primarily directed against the virus envelope glycoprotein (env), but the vaccine candidates based on monomeric gp120 envelope protein tested so far failed to induce protection in efficacy trials. Advances in understanding the structure and function of the env glycoprotein have facilitated the development of a new generation of immunogens based on trimers, a more stable and soluble form of gp140 glycoprotein. In a vaccine formulation, in addition to the antigen, adjuvants play a pivotal role. Adjuvants are known to increase the immunogenicity of vaccines and, in the last years, several compounds, including agonists of Toll-like receptors (TLR) and NOD (NLR), have presented efficacy in clinical trials. In previous work, our group demonstrated that immunization of mice with a DNA vaccine (HIVBr18) encoding 18 CD4⁺ T cells epitopes from HIV-1 was able to induce a broad CD4⁺ T and CD8⁺ T cells specific response.. Given the important role of CD4⁺ T cells in the humoral response after adjuvant-assisted immunization, the aim of the study was to verify whether an initial immunization with the DNA vaccine HIVBr18 could increase the magnitude/quality of humoral and cellular immune response induced by gp140 trimer in the presence of different adjuvants. Therefore, BALB/c mice were initially immunized with the vaccine HIVBr18 or empty vector and then with gp140 in the presence of the following adjuvants: Freund's complete (CFA), poly IC, CpG ODN 1826, monophosphoryl lipid A (MPL), Muramyl dipeptide (MDP), Imiquimod (R837), and Resiquimod (R848). We observed that initial immunization with HIVBr18 was able to provide cognate help for specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells proliferation and also for IFN- γ production. Analysis of humoral response showed that initial immunization with the HIVBr18 vaccine was able to alter the production of immunoglobulin subclasses independent of the adjuvant

tested. This work also analyzed the influence of adjuvants on the immunogenicity of gp140. Mice that received the adjuvant MPL, poly IC and CpG ODN 1826 presented higher antibody titers when compared to animals that received Alum, MDP, R837 and R848. We observed that mice immunized with gp140 in the presence of all adjuvants tested developed germinal center B cells and follicular helper T cells (TFH). We conclude that initial immunization with HIVBr18 is able to alter the quality of specific humoral and cellular immune responses.. Therefore, this formulation could be used in combination with other immunogens, such as gp140, to help/redirect the immune response. We also conclude that the adjuvants that are in clinical trials such as poly IC, MPL and CpG ODN 1826 may be able to induce stronger humoral and cellular response than CFA.

Descriptors: HIV/immunology; Glycoproteins; Epitopes, T-lymphocyte; Acquired immunodeficiency syndrome; B-lymphocytes; Mice, inbred Balb C; Aids vaccine; Adjuvants, immunologic

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma imunodeficiência secundária identificada em meados de 1981, nos EUA, a partir da observação de um número elevado de pacientes adultos do sexo masculino, homossexuais que apresentavam sarcoma de Kaposi, pneumonia por *Pneumocystis carinii* (atualmente *Pneumocystis jirovecii*) e comprometimento do sistema imune. Essa observação levou à conclusão de que se tratava de uma nova doença, ainda não classificada, de etiologia provavelmente infecciosa e transmissível. Posteriormente, foi demonstrado que a AIDS é uma infecção crônica, causada pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). O HIV infecta células que expressam a molécula CD4 e os receptores de quimiocinas CCR5 ou CXCR4 na sua superfície como por exemplo, linfócitos T CD4⁺ e monócitos. A transmissão do vírus ocorre principalmente pelo sangue e hemoderivados, sêmen, secreção vaginal e leite materno (Quinn, 2008).

A infecção pelo HIV se caracteriza por um período de latência, que pode durar semanas e até meses. Inicialmente, os indivíduos infectados podem apresentar sintomas semelhantes ao de uma gripe. Com o passar do tempo, ocorre a depleção progressiva dos linfócitos T CD4⁺ e uma queda gradual das funções imunológicas culminando em um estado de profunda imunodeficiência (AIDS) deixando o indivíduo vulnerável à doenças oportunistas geralmente seguido de morte (Marcello, 2006, Klimas *et al.*, 2008)

O tratamento para infecção com HIV é feito com o auxílio de drogas antiretrovirais (ARV) e até o momento mais de 20 drogas estão disponíveis para uso. Embora o tratamento tenha assegurado maior qualidade de vida e longevidade aos pacientes, existem problemas relacionados ao desenvolvimento de resistência por seleção de vírus mutantes. A inclusão da Terapia Antiretroviral Altamente Ativa (HAART- "*Highly Active Antiretroviral Therapy*"), que consiste na administração combinada de pelo menos três drogas ARVs em 1996, foi o marco principal na redução da propagação da epidemia (Fonseca and Bastos, 2007) No Brasil, onde a terapia é distribuída

gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS), houve uma drástica redução na incidência das doenças oportunistas, das internações, e consequentemente das mortes relacionadas à AIDS.

Entretanto, apesar dos avanços no conhecimento da patogenia causada pelo vírus e da resposta imune à infecção, até o momento não existe uma vacina eficaz contra a infecção pelo HIV.

1.1. Epidemiologia do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

A epidemia causada pelo HIV-1 é a mais importante das últimas décadas, com mais de 34 milhões de indivíduos infectados no mundo. O HIV-1 afeta principalmente jovens entre 14 e 25 anos de idade, grupo esse correspondendo a aproximadamente 40% das novas infecções (UNAIDS/WHO, 2012).

No ano de 2011 foram relatados 2,5 milhões de novas infecções e 1,7 milhões de indivíduos foram a óbito em decorrência de doenças relacionadas à AIDS. Aproximadamente dois terços dos adultos e crianças infectadas pelo HIV se encontram na África subsaariana e no sudeste asiático (figura 1). No Brasil, onde se encontra um terço da população infectada da América do Sul e Central, foram notificados 630 mil casos de infecção pelo HIV-1 e 122 mil óbitos como consequência da AIDS até junho de 2011 (**Boletim epidemiológico AIDS**. Julho, 2011).

Figura 1. Mapa epidemiológico do número de pessoas infectadas pelo HIV-1. Adaptado do relatório da UNAIDS/WHO 2012 e (Boletim epidemiológico AIDS. Julho, 2011).

A epidemia de HIV/AIDS no Brasil tem se disseminado de forma mais lenta nos últimos anos devido a alguns fatores como a modificação do comportamento nos seguimentos populacionais de elevado risco e a implementação de medidas preventivas. Outro fator importante nesse contexto, foi a utilização em maior escala das terapias antiretrovirais que, ao controlar a carga viral em pessoas infectadas, contribui para a redução das taxas de transmissão.

Apesar de existir uma tendência na redução no número de novas infecções pelo HIV-1, estima-se que o elevado índice de mortalidade ainda se mantém, devido ao acesso inadequado à prevenção e limitado ao tratamento em muitos países (Kates and Levi, 2007).

1.2. Filogenia do HIV

Análises filogenéticas do HIV-1 sugerem três transmissões independentes no início do século XX, gerando os 3 grupos de HIV-1: M (major), O (outlier) e N (*non major* e *non outlier*) (Keele *et al.*, 2006, Korber *et al.*, 2000). Linhagens relacionadas aos grupos M e N foram encontradas em chimpanzés. Evidências recentes sugerem que o tipo O do HIV-1 pode ter sido originário de gorilas, nos quais foram encontradas cepas de maiores

semelhança a este grupo (Van Heuverswyn *et al.*, 2006). O grupo M é a forma circulante predominante, sendo dividida em vários subtipos ou clados, denominados por letras (A, B, C, D, F, G, H, J e K) (Hemelaar *et al.*, 2006), e sub-subtipos designados por números, além de formas recombinantes circulantes (FRC) (Mccutchan *et al.*, 2000). Na última década, avanços no sequenciamento genômico do HIV-1 levaram à identificação dessas formas recombinantes circulantes (FRCs). Mais de 20 FRCs foram definidas apenas no grupo M (Kantor *et al.*, 2005).

A variação genética do HIV é uma de suas principais características, e pode influenciar na patogenicidade dos diferentes subtipos (Sharp *et al.*, 1999). Variações na sequência genômica dentro de um subtipo podem atingir de 15 a 20%, enquanto variações entre os subtipos usualmente atingem entre 25 a 35% (Hemelaar *et al.*, 2006). No total de pessoas infectadas no mundo, cerca de 50% dos indivíduos estão infectados pelo HIV-1 subtipo C, seguidos pelo subtipo A. O subtipo B é predominante nos países industrializados, posicionando-se como o terceiro mais frequente no mundo, correspondendo a cerca de 10% das infecções. Entretanto, outros subtipos do HIV-1 (A, D, F e FRCs) estão amplamente disseminados na África e Ásia (Potts *et al.*, 1993). Com relação à prevalência dos subtipos virais no Brasil, a estimativa mais recente identificou os subtipos B (77,2%), C (3,3%), D (0,5%) e F (6,4%), bem como formas recombinantes B/F e B/C (Morgado *et al.*, 1994, Guimaraes *et al.*, 2002).

A distribuição global dos subtipos e das formas recombinantes circulantes reflete a complexidade da epidemiologia do HIV -1.

1.3. Ciclo de vida do HIV

O HIV, agente etiológico da AIDS, é um retrovírus pertencente a família *lentiviridae* (Figura 2A) que foi derivado do Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) (Salemi *et al.*, 2001). O genoma do HIV é composto de 2 fitas de RNA (ácido ribonucleico) que codificam 3 proteínas estruturais (gag, pol e env) e 6 proteínas acessórias/reguladoras (vif, vpu, vpr, tat, ver, nef) (figura 2B). Como todo retrovírus, o HIV utiliza a maquinaria celular para a sua replicação.

Figura 2. Organização do vírus HIV-1. (A) Esquema representativo do vírus HIV. Em vermelho está representado a parte estrutural composta pelas proteínas do envelope gp120 e gp41. A transcriptase reversa é a enzima responsável pela conversão do RNA viral em DNA proviral; (B) Esquema representativo do genoma do HIV. O HIV-1 é um retrovírus com 2 fitas de RNA (9800 pares de bases) e possui os genes estruturais (gag, pol e env) e os genes reguladores (vif, vpr, vpu, tat, ver, nef). Adaptada de (Potter *et al.*, 2004) (Burger and Poles, 2003).

O HIV infecta células que expressam em sua superfície a molécula CD4⁺, a qual está presente em aproximadamente 60% dos linfócitos T circulantes, assim como em precursores de células T na medula óssea e timo, em monócitos/macrófagos, eosinófilos, células dendríticas e células da microglia no sistema nervoso central (Fanales-Belasio *et al.*, 2010). A infecção de células alvo pelo HIV tem início com a interação entre as proteínas do envelope viral com os receptores na superfície da célula do hospedeiro.

O envelope do HIV é um complexo proteico trimérico, composto das glicoproteínas gp120 e gp41 (figura 3 A). Inicialmente, a glicoproteína gp120 se liga ao receptor CD4 da célula alvo, o que leva a um rearranjo estrutural, expondo um domínio específico da gp120 que é capaz de se ligar à receptores de quimiocinas na membrana celular, como o CCR5 ou CXCR4 (figura 3 B e C). A ligação da proteína gp120 com a molécula CD4 e o receptor de quimiocinas é estável, permitindo que a porção N-terminal da gp41 penetre na membrana celular (da célula alvo) aproximando ambas as membranas, levando então a fusão (figura 3 D e E) das mesmas para

posterior inserção do genoma viral (figura 3 F) (Fanales-Belasio *et al.*, 2010, Melikyan *et al.*, 2000, Forsell *et al.*, 2009, Markosyan *et al.*, 2003). Os domínios externos da glicoproteína do envelope do HIV (gp120 e ectodomínio da gp41, conjuntamente conhecido como gp140) contêm os epítomos neutralizantes conhecidos (Mascola and Montefiori, 2010).

Figura 3. Esquema representativo da infecção de uma célula alvo pelo HIV-1. A) Vírus HIV-1 e as glicoproteínas do envelope gp120 e gp41; **B)** O HIV se liga primeiro ao receptor CD4 via gp120; **C)** Posteriormente, a glicoproteína do envelope sofre mudanças conformacionais expondo sítios para ligação ao co-receptor CCR5; **D)** Uma vez ligada a CD4 e ao CCR5, a glicoproteína do envelope do HIV sofre uma segunda mudança conformacional que permite a inserção do domínio de fusão hidrofóbico da gp41 para a membrana da célula hospedeira; **E)** Cada uma das três moléculas de gp41 dobram-se, aproximando as duas membranas; **F)** A membrana viral e a membrana da célula alvo se fundem e o conteúdo do vírus é depositado no citoplasma da célula alvo. Adaptado de (Lederman *et al.*, 2006).

Após a fusão das membranas, o vírus libera o RNA viral no citoplasma, e ocorre a conversão do RNA viral em DNA (ácido desoxirribonucleico) proviral devido à ação da transcriptase reversa (Fanales-Belasio *et al.*, 2010). A ausência da atividade de revisão da transcriptase reversa torna-se, nesse momento, fundamental para geração de mutações (mutações pontuais,

deleções e inserções) e, consequente diversidade genética do HIV (Bebenek *et al.*, 1989) (Boyer *et al.*, 1992). Quando a célula infectada é ativada, ocorre a transcrição do DNA proviral. O mRNA viral (produto da transcrição do DNA proviral), migra para o citoplasma, onde as proteínas estruturais dos novos vírions serão sintetizadas. As proteínas codificadas pelos genes pol e gag formam o *core* da partícula viral em maturação. O gene env codifica para a proteína gp160, que posteriormente sofre clivagem e dá origem às proteínas do envelope, gp120 e gp41. A clivagem de tais partículas pela protease viral é necessária para a geração das partículas virais infecciosas (Gomez and Hope, 2005, Fanales-Belasio *et al.*, 2010). Durante o processo de brotamento, a membrana lipídica do vírus incorpora várias proteínas da célula hospedeira e fica enriquecida com fosfolipídios e colesterol. Uma única célula infectada pode produzir até 10^{10} vírus por dia (Coffin, 1995) e o processo de replicação viral pode resultar na morte das células T CD4⁺ (Klimas *et al.*, 2008)

1.4. Patogênese da infecção pelo HIV

A patogênese da infecção pelo HIV-1 e a progressão para a AIDS dependem das propriedades do vírus infectante e do sistema imune do hospedeiro. O equilíbrio entre esses dois componentes determina a evolução diferencial da doença, culminando em um quadro de imunodeficiência ou de sobrevivência por longo período (Fanales-Belasio *et al.*, 2010) (Simon *et al.*, 2006). O processo de infecção pelo HIV ainda é cercado por algumas incertezas. Não se sabe ao certo se o vírus é transmitido como partículas livres ou associado a células do muco cervicovaginal ou do sêmen. Sabe-se, entretanto, que o SIV pode ser transmitido sob as duas formas (Lai SK, 2009). Os vírus que alcançam e cruzam o epitélio de mucosa possivelmente o fazem por transcitose ou por contato direto com células dendríticas intraepiteliais. Mucosas danificadas por trauma físico ou infecções genitais permitem que os vírus cruzem mais facilmente a barreira epitelial e estabeleçam a infecção (Galvin and Cohen, 2004) (Haaland *et al.*, 2009).

As células infectadas podem ser lisadas ou estabelecer uma infecção latente, particularmente em macrófagos e células T CD4⁺ quiescentes, que se tornam reservatórios permanentes (Alexaki *et al.*, 2008)

entre 10-12 dias após a infecção pelo HIV-1 (figura 4), ocorre uma fase denominada de “eclipse”, na qual o RNA viral pode ser detectado no plasma (Fiebig *et al.*, 2003). Ao final da fase de “eclipse, partículas virais e/ou células infectadas chegam ao linfonodos drenantes, onde ocorre a infecção de células T CD4⁺CCR5⁺ ativadas. Células dendríticas podem internalizar partículas virais e levá-las a células T ativadas, exacerbando ainda mais o processo (Geijtenbeek *et al.*, 2000). O tecido linfóide associado à mucosa (“Gut Associated Lymphoid Tissue- GALT) por ser rico na população de linfócitos T CD4⁺CCR5⁺ torna-se alvo principal do vírus. Aproximadamente 20% das células T CD4⁺ neste local são infectadas e até 60% das células não infectadas são ativadas e morrem por apoptose. Isso acarreta uma depleção maciça de células T CD4⁺ nas 3 primeiras semanas após a infecção (McMichael *et al.*, 2010).

Enquanto o vírus se replica intensamente no GALT e em outros tecidos linfóides, a viremia no plasma aumenta exponencialmente e atinge um pico (superior a 1 milhão de cópias de RNA viral por mL de sangue), geralmente 21-28 dias após infecção. Esse aumento na viremia coincide com a fase de soroconversão que ocorre entre três e cinco semanas após o contato com o vírus (Fiebig *et al.*, 2003) (Lindback *et al.*, 2000) (Little *et al.*, 1999). O número de linfócitos TCD4⁺ diminui durante o pico da viremia, retornando posteriormente a níveis normais no sangue, mas não no GALT.

A fase seguinte é caracterizada pela queda da viremia, que ocorre durante um período de 12 a 20 semanas após o contato com o vírus. A viremia cai até 100 vezes, atingindo um nível estável denominado *set point* viral (Kahn and Walker, 1998) a partir de onde se inicia a fase crônica da doença. Na ausência de terapia antiretroviral, o *set point* viral é mantido devido a um balanço entre o *turnover* viral e a resposta imune do hospedeiro (McMichael *et al.*, 2010).

Figura 4. Curso natural da infecção pelo HIV-1. Viremia no plasma (superior), e dinâmica de alterações no compartimento celular e humoral (inferior). A fase aguda da infecção é caracterizada por uma elevada viremia plasmática (linha vermelha-superior), queda de células CD4⁺ (linha verde – inferior), e ausência de anticorpos específicos (linha tracejada laranja – inferior). A viremia decai com o aparecimento de células CD8⁺ citotóxicas (CTL) específicas (linha tracejada azul – inferior) e o “set point” viral é atingido (linha vermelha tracejada – superior). Com o passar dos anos, ocorre uma disfunção progressiva do sistema imune e a carga viral volta a subir. É nesse momento que começam a aparecer os primeiros sintomas clínicos da AIDS. O risco de transmissão é maior nas primeiras semanas durante o pico de viremia (círculos preenchidos – superior). GALT = tecido linfóide associado ao intestino. Adaptado de (Simon *et al.*, 2006)

Embora não ocorra depleção de linfócitos B durante a fase inicial da infecção pelo HIV, a resposta é prejudicada devido a destruição em massa dos centros germinativos das placas de Peyer's do trato gastrointestinal nos primeiros 80 dias de infecção (Levesque *et al.*, 2009).

A ativação de células T e B é uma característica da infecção pelo HIV e alguns trabalhos mostram uma correlação positiva entre marcadores de

ativação em células T e a progressão para AIDS (Gasper-Smith *et al.*, 2008) (Liu ZY, 1997). Diversos eventos são relacionados à ativação imunológica, ainda que isso não esteja claramente definido. Entre eles destaca-se a infecção viral direta das células do sistema imunológico, produção de citocinas pró-inflamatórias por células da resposta inata, translocação microbiana, perda de células T reguladoras e co-infecção crônica por micobactérias e vírus (McMichael *et al.*, 2010).

Uma característica importante da infecção pelo HIV é a disfunção progressiva do sistema imunológico (Bussmann *et al.*, 2010) (Douek *et al.*, 2003) (Foley *et al.*, 1992, Opravil *et al.*, 1991). A progressão da doença se caracteriza pela destruição dos tecidos linfóides, uma consequência da replicação viral e da ativação crônica das células do sistema imune. Este fato leva a difusão do vírus para outras células T CD4⁺, e favorece a propagação do HIV-1 em outros tecidos linfóides. Esses fenômenos levam ao aparecimento de doenças oportunistas como Sarcoma de Kaposi, Pneumocistose recorrente, neurotoxoplasmose, entre outras, o que caracteriza a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

1.5. Resposta imune específica contra o HIV.

Diversas linhas de evidência indicam que a resposta humoral e celular mediada por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ específicos desempenham um importante papel na imunidade adaptativa contra o HIV (Gandhi and Walker, 2002). A resposta adaptativa contra o HIV tem seu início marcado pelo aparecimento de anticorpos e linfócitos T específicos contra o vírus pouco antes do pico da viremia ser estabelecido. Esse fenômeno culmina com a redução progressiva da carga viral (McMichael *et al.*, 2010).

1.5.1. A resposta de anticorpos

Os anticorpos específicos são capazes de neutralizar o vírus, impedindo dessa maneira sua entrada na célula hospedeira. A maioria dos anticorpos neutraliza vírions livres, antes que ocorra a infecção de uma célula alvo (Klasse and Sattentau, 2002). Os anticorpos capazes de neutralizar o HIV são direcionados principalmente às glicoproteínas do envelope do vírus (gp). Os domínios externos da gp120 e ectodomínio da gp41, conjuntamente

conhecido como gp140, contêm os epítomos neutralizantes conhecidos (Mascola and Montefiori, 2010). A grande diversidade das glicoproteínas assim como sua extensa glicosilação, dificultam o desenvolvimento de uma resposta humoral neutralizante eficaz (McCutchan *et al.*, 2000, McKnight and Aasa-Chapman, 2007, Pantophlet and Burton, 2006).

Embora a maioria dos anticorpos induzidos durante a infecção sejam anticorpos não neutralizantes ou cepa-específicos, estudos recentes indicam que 10-25% dos pacientes produzem anticorpos amplamente neutralizantes (bNAbs) durante o curso da infecção por HIV-1 (Stamatatos *et al.*, 2009). De um modo geral, os anticorpos autólogos surgem devagar, aproximadamente 12 semanas após a transmissão do vírus. A identificação e o estudo dos anticorpos neutralizantes produzidos naturalmente em indivíduos que controlam a replicação viral, podem fornecer pistas para o desenvolvimento de novos imunógenos (Stamatatos *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, vários métodos foram desenvolvidos com o objetivo de isolar e mapear a especificidade de alguns anticorpos neutralizantes presentes no soro de indivíduos infectados capazes de controlar a viremia (Scheid *et al.*, 2011, Walker *et al.*, 2011, Walker *et al.*, 2009). Alguns desses anticorpos, denominados anticorpos amplamente reativos, como por exemplo PG9/PG16, VRC01, VRC03, PGV04, 2G12 reconhecem sítios diferentes de vulnerabilidade no HIV (Figura 5). Os anticorpos PG9 e PG16 reconhecem um epítomo quaternário trímero-específico e dependente de glicano, em regiões relativamente conservadas da alça variável V2 e V3 da gp120 (Walker *et al.*, 2009); o 2G12 reconhece um epítomo na superfície da gp120 (Trkola *et al.*, 1996). Os anticorpos VRC01-03, VRC-PG04 e 3BNC60 tem como alvo o local de ligação de CD4 na gp120 com forte atividade neutralizante (revisto por (Clapham and McKnight, 2001). Mais recentemente, um outro grupo de anticorpos neutralizantes, denominados de "anticorpos PGT", foi identificado, que reagem com epítomos dependentes de glicano perto da base da alça V3 (Walker *et al.*, 2011). Existem outros anticorpos neutralizantes, como 2F5 e 4E10, que interagem com a região em gp41 adjacente à membrana viral chamada " região proximal à membrana externa" (MPER) (Stiegler *et al.*, 2001).

Figura 5. Anticorpos neutralizantes contra o HIV-1. Estrutura do complexo trimérico da glicoproteína (gp) do envelope e a localização da especificidade dos anticorpos neutralizantes identificados até o momento Adaptado de (Koff, 2012).

Uma vez a célula infectada, é difícil imaginar um papel para os anticorpos neutralizantes. A neutralização não é, portanto, o único mecanismo de defesa humoral do hospedeiro contra o HIV. A relevância dos anticorpos não neutralizantes que são capazes de mediar outras funções efetoras como inibição viral por anticorpos dependente de células (ADCVI), citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), ativação do complemento e fagocitose vem sendo também avaliada (Hoxie, 2010). Anticorpos IgG1 HIV-específicos se ligam a epítomos que são expressos nas células infectadas. Então, a região Fc desses anticorpos se ligam aos receptores FcγIII em diferentes tipos celulares como células NK (*Natural Killer*), monócitos e neutrófilos que podem ativar o mecanismo de ADCC e ADCVI, levando a morte da célula infectada (Baum, 2010).

Acredita-se que esses mecanismos são capazes de formar uma segunda linha de defesa para eliminar células que se infectam por vírus que escaparam da neutralização. Anticorpos capazes de induzir ADCC estão frequentemente presentes em títulos elevados em indivíduos infectados pelo HIV, e diversos estudos têm correlacionado esse tipo de resposta com uma

progressão mais lenta da infecção (Chung *et al.*, 2008). Estudos longitudinais feitos em coortes de indivíduos denominados “*long-term survivors*” mostraram que esses possuem cerca de 10.000 vezes mais anticorpos capazes de induzir ADCC do que os indivíduos que progridem rapidamente para AIDS (Linda Baum, 1996). Outros trabalhos mostraram que algumas mulheres além de possuírem esse tipo de anticorpo no soro, também o possuem no fluido genital e isso correlaciona com uma menor carga viral no trato genital (Battle-Miller *et al.*, 2002, Pratip Nag, 2004). Além disso, estudos de transferência passiva de anticorpos utilizando macacos infectados pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV) têm sugerido que a ADCC desempenha um papel importante na imunidade protetora (Hessell *et al.*, 2007, Florese *et al.*, 2009, Gomez-Roman *et al.*, 2005).

1.5.2. A resposta de linfócitos TCD8⁺

Vários estudos demonstram a contribuição dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) específicos para o HIV-1 no controle da viremia (Allen *et al.*, 2000, Borrow *et al.*, 1994). As células T CD8⁺ vírus-específicas são capazes de lisar as células infectadas pelo HIV-1 através do reconhecimento de peptídeos virais expostos na superfície da célula infectada juntamente com moléculas de HLA de classe I. Desta maneira, a resposta de CTLs elimina células infectadas antes que a progênie de vírions seja liberada, demonstrando a potencial atividade antiviral dessas células que influencia no controle da progressão para doença clínica (Carmichael, 1993, Connor, 1993). Esses efeitos foram evidenciados em estudos realizados com macacos *rhesus* uma vez que após o tratamento com anticorpos monoclonais que depletam linfócitos T CD8⁺ não foi possível observar o controle da infecção pelo SIV (Jin *et al.*, 1999).

Os linfócitos T CD8⁺ podem controlar a replicação viral por outros mecanismos além da resposta citotóxica contra células infectadas, sendo um deles a secreção de quimiocinas β , como MIP-1 α , MIP- 1 β e RANTES. Essas quimiocinas se ligam aos co-receptores do vírus na superfície dos linfócitos T CD4⁺ e impedem a infecção dos mesmos (Gandhi and Walker, 2002). Todavia, somente a presença e a magnitude das respostas mediadas por

CTLs não são suficientes para controlar a infecção aguda ou crônica pelo HIV (McElrath and Haynes, 2010).

1.5.3. A resposta de linfócitos TCD4⁺

A destruição maciça dos LT CD4⁺ na infecção pelo HIV propicia o aparecimento de doenças oportunistas que caracterizam a AIDS. Nos últimos anos, extenso trabalho vem sendo feito com o objetivo de elucidar o papel dos linfócitos T CD4⁺ (LTCD4⁺) HIV - específicos. Durante a infecção pelo HIV, assim como pelo SIV, os LTCD4⁺ específicos podem desempenhar diferentes funções protetoras (figura 6). Primeiro, os LTCD4⁺ específicos podem suprimir diretamente a replicação viral através de duas vias: (i) efeito citotóxico direto mediado por perforina e granzima e (ii) produção de fatores antivirais solúveis como as quimiocinas que se ligam ao CCR5 (CCL3, CCL4, CCL5) impedindo assim a infecção de novas células alvos. Em segundo lugar, os subtipos de LTCD4⁺ -T *helper* 2 (Th2) e T *helper* folicular (Tfh)-facilitam o desenvolvimento de respostas de células B específicas para o HIV e as células Th1 são importantes para as respostas protetoras de células CD8⁺ (Klatt and Silvestri, 2012). O subtipo de LTCD4⁺ que produz IL-17 (Th17) é importante para a manutenção da imunidade de mucosa, prevenindo assim infecções bacterianas e fúngicas oportunistas (Klatt and Brenchley, 2010). O subtipo de células T CD4⁺ reguladoras (Treg) pode influenciar na infecção pelo HIV suprimindo as respostas de células T vírus-específicas, e também reduzindo a ativação da resposta imune induzida pelo vírus. (Klatt and Silvestre; 2012).

Figura 6. Efeitos protetores dos linfócitos T CD4⁺. Células T CD4⁺ desempenham diversas funções em resposta a infecção por HIV. Adaptada de (Klatt and Silvestri, 2012).

Indivíduos que conseguem controlar a viremia sem a ajuda da terapia antiretroviral apresentam uma resposta persistente e vigorosa de linfócitos T CD4⁺ vírus-específicos, resultando na produção de Interferon gama (IFN- γ) e quimiocinas β (Rosenberg *et al.*, 1997). Em suporte ao papel protetor dos LT CD4⁺, em indivíduos que controlam a viremia na ausência de terapia antiretroviral (controladores de elite) foi demonstrada a presença de LTCD4⁺ específicos citotóxicos (Soghoian *et al.*, 2012) e também polifuncionais nas regiões de mucosa (Ferre *et al.*, 2010). Além disso, as respostas precoces de LTCD4⁺ HIV-específicos podem ser utilizadas como um fator de bom prognóstico na infecção pelo HIV-1 (Pancre *et al.*, 2007). Em outro estudo constatou-se que indivíduos com uma resposta de linfócitos T CD4⁺ forte e específica contra p24 na fase inicial da infecção estabeleciam valores mais reduzidos de carga viral nas fases posteriores, quando comparados a indivíduos que desenvolviam uma resposta fraca contra p24 na fase inicial da infecção (Gloster *et al.*, 2004). Respostas de células T CD4⁺ contra Gag foram associadas a uma menor carga viral e maior contagem de células T CD4⁺ em pacientes cronicamente infectados pelo subtipo C do HIV-1 (Ramduth *et al.*, 2009). Além disso, observou-se que indivíduos que progridem lentamente para AIDS possuíam uma resposta de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ e IL-2 contra Gag que se correlacionava negativamente com a carga viral e positivamente com a resposta de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ contra a mesma proteína (Boaz *et al.*, 2002).

Linfócitos T CD4⁺ vírus - específicos também já foram descritos como capazes de controlar a replicação viral em macrófagos infectados pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV) (Sacha *et al.*, 2009). A presença de LTCD4⁺ com fenótipo citotóxico está associada ao controle da viremia em macacos depletados de linfócitos T CD8⁺ e infectados pelo SIV (von Gegerfelt *et al.*, 2010). Além disso, macacos infectados pelo SIV que são capazes de controlar a infecção, possuem uma resposta ampla de LTCD4⁺ SIV específicos e certos alelos de classe II estão associados com controle da carga viral (Giraldo-Vela *et al.*, 2008).

1.6. Linfócitos T CD4 auxiliar foliculares (T *Helper* Foliculares) e células B do Centro Germinativo

Os linfócitos T CD4⁺ desempenham um importante papel na indução de respostas imunes adaptativas funcionais através de mecanismos diretos (função citotóxica) ou indiretos (efeito auxiliar). Devido ao seu efeito auxiliar, os LTCD4⁺ promovem a expansão/ manutenção do status funcional de memória das CTLs (Shedlock, 2003) e auxiliam na mobilização de CTLs para os locais periféricos de infecção (Nakanishi *et al.*, 2009). Além disso, os chamados linfócitos T auxiliares (*helper*) também são capazes de auxiliar linfócitos B na produção de anticorpos e diferenciação em células de memória.

Recentemente, foi descrito um outro subtipo de célula T auxiliar, as chamadas células T auxiliar foliculares (célula T *helper* folicular- THF). As THF foram descritas em 2001 quando diversos grupos de pesquisa observaram em amídalas de indivíduos saudáveis uma população de LT CD4⁺ que expressavam o receptor 5 de quimiocinas (CXCR5⁺) (Schaerli P, 2000) (Kim *et al.*, 2001). É a expressão da molécula CXCR5 que garante a migração das células T para o folículo de células B localizados nos centros germinativos (CG) dentro dos órgão linfóides secundários. As células THF fornecem diversos estímulos para as células B como: maturação (hipermutação somática), diferenciação em células B produtoras de anticorpos (plasmócitos) e células B de memória (Fazilleau *et al.*, 2009). A grande maioria das respostas de anticorpos neutralizantes contra patógenos são dependente das células T CD4⁺ auxiliares, e as células THF são especializadas em proporcionar o auxílio para as células B produzirem esse tipo de anticorpo (Crotty, 2011).

Alguns trabalhos sugerem que a habilidade de rapidamente desenvolver anticorpos de alta afinidade através desse processo no CG é o único caminho no qual o organismo pode competir com a rápida evolução dos patógenos, particularmente vírus de RNA, que possuem elevada taxa de mutação e que portanto produzem múltiplas gerações por dia (Crotty *et al.*, 2001).

A célula T CD4 naíve é ativada quando encontra a célula dendrítica que apresenta o antígeno via MHC-II dentro da zona de célula T nos órgãos

linfóides secundários. Os sinais dos receptores de células T (TCR), juntamente com a co-estimulação fornecida por CD28-B7, OX40-OX40L e citocinas como a interleucina 21 (IL-21), são capazes de iniciar o processo de diferenciação em THF (Figura 7). Uma vez ativadas, elas migram para o folículo onde encontram as células B. As células B também vão apresentar o antígeno e fornecer sinais de co-estimulação que permitem a sinalização para as células T, que então mantém o fenótipo de células THF e fornece auxílio para as células B através de estímulo via CD40L e secreção de citocinas tais como a IL-21. Essa sequência de sinais permitem a formação do centro germinativo (GC), que é mantido pelo contato das células THF e B envolvendo uma gama de moléculas co-estimulatórias e citocinas (Deenick *et al.*, 2011, Crotty, 2011). As células THF são identificadas fenotipicamente pela expressão da molécula de superfície CD4, PD-1 (CD279), ICOS, o receptor de quimiocinas CXCR5, pelo fator de transcrição Bcl-6 e também pela secreção da citocina IL-21 (Francisco *et al.*, 2010, Greenwald *et al.*, 2005).

Figura 7. A célula T auxiliar folicular e a célula B do centro germinativo. (A) A célula T é ativada quando encontra o antígeno apresentado pelas células dendríticas na zona de célula T. A sinalização através do receptor de célula T (TCR) conjuntamente com o co-estímulo fornecido pelas moléculas CD28-B7, OX40-OX40L e a secreção de IL-21, estimula a célula T auxiliar a se diferenciar em folicular (THF). A célula THF migra para o folículo onde encontra as células B; (B) Células B cognatas também apresentam o antígeno e fornecem sinais co-estimulatórios para as células T que mantêm o fenótipo de THF. Ao mesmo tempo, células THF auxiliam as células B através do estímulo via CD40L e secreção de IL-21; (C) Esses sinais permitem a formação dos centros germinativos (CG). Adaptado de (Deenick and Ma, 2011).

A importância das células THF foi recentemente demonstrada em um estudo em primatas não humanos infectados pelo SIV. Essas células foram identificadas nos linfonodos e a presença dessas correlacionou com a magnitude da resposta de imunoglobulina tipo G (IgG) específica, a magnitude de resposta do centro germinativo e a avididade de IgG SIV-específica (Petrovas *et al.*, 2012).

1.7. A glicoproteína (gp) do envelope do HIV

A glicoproteína (gp) do envelope do HIV é a responsável pela primeira interação entre o vírus e a célula alvo. A gp160 é a glicoproteína precursora do envelope do HIV que sofre modificações pós traducionais e é clivada em duas cadeias: a proteína de superfície gp120 e a proteína de transmembrana gp41. A proteína madura do envelope consiste de um complexo trimérico,

composto de heterodímeros das proteínas gp120 e gp41 não covalentemente associadas – (gp120)₃ (gp41)₃. Os anticorpos capazes de neutralizar o HIV são direcionados principalmente aos domínios externos da gp120 e ectodomínio da gp41, (conjuntamente conhecido como gp140) (Mascola and Montefiori, 2010).

As tentativas iniciais de produzir trímeros da glicoproteína do envelope HIV-1 (gp140) foram frustradas devido a labilidade dessas estruturas. Entretanto, estudos mais recentes têm avaliado novas estratégias para geração de trímeros de Env recombinantes solúveis e mais estáveis (Yang *et al.*, 2000). Dentre essas, podemos citar modificações no sítio de clivagem entre a gp120-gp41, substituição do aminoácido arginina por serina na posição 508 e 511 e adição da sequência de trimerização da fibrina do bacteriófago T4 no domínio carboxi-terminal (Yang *et al.*, 2002). Nessa nova geração de recombinantes, os epítomos da gp120 reconhecidos pelos anticorpos neutralizantes permanecem intactos e expostos nos trímeros de gp140. Os trímeros de gp140 mais estáveis vêm sendo avaliados também quanto a sua capacidade de induzir elevados títulos de anticorpos em modelos animais. A imunização com esses trímeros mais estáveis têm se mostrado capaz de induzir resposta de anticorpos mais efetivas do que aquela observada após imunização com a gp120 monomérica (Grundner *et al.*, 2005, Kovacs *et al.*, 2012). Foi demonstrado que a imunização de primatas não humanos com o trímero de gp140 do HIV-1 foi capaz de induzir anticorpos de maior magnitude e amplitude (contra diferentes clados) do que a observada após imunização com a gp120 monomérica utilizada no ensaio clínico de fase 3 (VAX04) (Sundling *et al.*, 2010).

1.8. Vacinas contra o HIV-1

Em países onde o acesso ao tratamento antiretroviral pela população é limitado, somente uma vacina eficaz poderia fazer frente à epidemia. Apesar dos avanços no conhecimento da patogenia do vírus e da resposta imune à infecção, até o momento não existe uma vacina eficaz contra a infecção pelo HIV.

Uma vacina eficaz contra o HIV deverá ser capaz de: i) prevenir a infecção (induzir imunidade estéril) através da indução de anticorpos

neutralizantes ou ii) reduzir a carga viral, progressão para doença clínica após infecção e transmissão do vírus através da indução de imunidade celular (Barouch *et al.*, 2010).

Embora a necessidade de uma vacina contra o HIV seja urgente, até hoje somente quatro candidatos vacinais completaram os ensaios clínicos de eficácia. A vacina candidata AIDSVAX, desenhada para indução de anticorpos direcionados para a proteína gp120, foi utilizada em dois estudos de eficácia de fase III, conduzidos nos Estados Unidos e Tailândia e em ambos não foi observado proteção contra aquisição da infecção (Pitisuttithum *et al.*, 2006, Flynn *et al.*, 2005). O ensaio clínico de fase IIb (STEP), baseou-se em uma vacina trivalente composta por um adenovírus sorotipo 5 codificando para as proteínas Gag, Pol e Nef do HIV-1. Este ensaio visava à indução de uma resposta imunológica celular e foi encerrado em 2007 por ausência de eficácia. Foram observadas frequências similares de resposta de linfócitos T CD8⁺ específicos contra Gag tanto em participantes que receberam a vacina como no grupo controle (40% vs 42%, respectivamente) (McElrath *et al.*, 2008). Não houve proteção contra infecção e nem mesmo redução da viremia nos indivíduos vacinados e infectados.

O mais recente ensaio de eficácia, denominado RV144, composto pelas vacinas ALVAC e AIDSVAX teve como objetivo induzir uma resposta celular e humoral, respectivamente. Os indivíduos receberam quatro doses iniciais (“prime”) com o vetor recombinante *Canarypox* codificando a gp120, Gag e protease (ALVAC). Em seguida, foram administradas duas doses auxiliares (“Boost”) da proteína gp120 (AIDSVAX). Os indivíduos vacinados apresentaram uma redução de 30% na taxa de aquisição da infecção, mas não houve efeito sobre a carga viral (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009). As respostas imunológicas mais consistentes entre os participantes que receberam as vacinas foram proliferação de linfócitos T CD4⁺ e anticorpos contra gp120, além de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (McElrath, 2010). Um estudo realizado posteriormente com células mononucleares do sangue periférico (CMSP) dos indivíduos vacinados e não infectados, mostrou que a proliferação de linfócitos TCD4⁺ foi HIV-específica e apresentava perfil citotóxico (CD107⁺). Ensaios realizados com as células obtidas, também mostraram que a que a maioria das respostas de células T

foram direcionadas para a região V2 do envelope do HIV e também foram polifuncionais (de Souza *et al.*, 2012).

Os resultados desse último ensaio clínico demonstrando uma modesta eficácia, assim como os gerados em vacinas contra o SIV em primatas não humanos (Hansen *et al.*, 2009, Wilson *et al.*, 2009, Hansen *et al.*, 2013) sugerem que uma imunidade protetora contra o HIV é um objetivo que pode ser alcançado (Walker and Burton, 2010). Nos últimos anos, um contínuo aperfeiçoamento no desenho racional dos imunógenos vem sendo realizado com o objetivo de facilitar o desenvolvimento de novos candidatos capazes de induzir anticorpos ligadores e/ou neutralizantes e células T HIV - específicas.

Em relação ao desenvolvimento de vacinas baseadas na indução de imunidade celular, acredita-se que a geração de respostas imunes amplas e funcionalmente relevantes, contra epítomos conservados de LTCD4⁺ e CD8⁺, na maioria dos indivíduos, seja um pré-requisito essencial para novos candidatos a vacina (Sekaly, 2008, Watkins *et al.*, 2008). Embora vacinas indutoras de imunidade celular não sejam capazes de bloquear a infecção viral, modelos animais têm demonstrado que essa abordagem é eficiente no controle da replicação do vírus (Hansen *et al.*, 2009, Wilson *et al.*, 2009, Hansen *et al.*, 2013).

As vacinas indutoras de resposta celular contra o HIV-1 desenvolvidas até o momento são em sua maioria destinadas a induzir respostas mediadas por linfócitos T CD8⁺ (Watkins *et al.*, 2008). Entretanto, a participação dos linfócitos T CD4⁺ na imunidade contra o HIV-1, evidenciada por estudos com pacientes infectados, e modelos de vacinas experimentais têm corroborado com a importância do desenvolvimento de uma vacina indutora de tal subtipo celular. De fato, foi observado que a vacinação de macacos *rhesus* com o vírus SIV atenuado induziu alta frequência de células T CD4⁺ efectoras e resultou no controle da viremia após desafio com um vírus homólogo ou heterólogo (Gauduin *et al.*, 2006, Reynolds *et al.*, 2008, Wyand *et al.*, 1999). A grande diversidade genética do HIV-1 exige o desenvolvimento de vacinas que sejam capazes de induzir uma imunidade protetora ampla, contra as diversas variantes circulantes do vírus. Até o momento, nenhuma vacina foi desenhada para induzir, com grande cobertura populacional, uma

resposta ampla de linfócitos T CD4⁺ contra peptídeos conservados entre os vários subtipos circulantes do HIV-1.

1.9. Vacinas baseadas em epítomos conservados e ligadores de múltiplas moléculas MHC de classe II do HIV

Devido ao papel fundamental das células CD4⁺ na indução, manutenção e diferenciação das respostas mediadas por linfócitos B e/ou CD8⁺ e também do efeito protetor direto, a inclusão de epítomos apropriados do HIV-1 reconhecidos por células T CD4⁺ pode desempenhar um papel essencial nas imunizações candidatas à vacina contra o HIV.

Nos últimos anos, o nosso grupo se dedicou a mapear epítomos de células T CD4⁺ do HIV-1. Para tal, o genoma completo do HIV-1 (clado B) foi avaliado com o algoritmo TEPITOPE e dezoito epítomos conservados do consenso do subtipo B do HIV-1 foram selecionados com a propriedade de se ligarem a pelo menos dois terços das 25 moléculas HLA-DR cobertas pelo algoritmo (Fonseca *et al.*, 2006). Os peptídeos foram reconhecidos por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de mais de 90% dos indivíduos infectados pelo HIV-1, e efetivamente se ligavam *in vitro* a múltiplas moléculas HLA-DR (Fonseca *et al.*, 2006).

Recentemente, o nosso grupo mostrou que uma vacina de DNA codificando os epítomos promíscuos (HIVBr18) foi capaz de induzir resposta imune específica e ampla de células T CD4⁺, e também de CD8⁺, em camundongos transgênicos para diversas moléculas de HLA de classe II humanas (HLA-DR2,-DR4,-DQ6, DQ8), sugerindo que tal vacina pode induzir respostas imunes no contexto de múltiplas moléculas HLA de classe II e portanto poderia ter ampla cobertura em uma população humana (Ribeiro *et al.*, 2010). Em combinação com os resultados obtidos de pacientes infectados por HIV, estes resultados sugerem que a maioria dos indivíduos poderia reconhecer múltiplos peptídeos contidos na vacina. O estudo onde se avaliou o perfil funcional das respostas de células T HIV- específicas induzidas pela vacina em camundongos BALB/c mostrou que HIVBr18 foi capaz de induzir uma resposta de magnitude elevada, ampla e polifuncional de células T CD4⁺ e CD8⁺, e 8/18 peptídeos foram reconhecidos. Além disso, a vacina foi capaz de induzir células T CD4⁺ de memória central e efetora de longa duração

(Rosa *et al.*, 2011). Também demonstramos que a pré-imunização com essa vacina aumentou a magnitude e amplitude das respostas de LTCD8⁺ induzidas por vacinas de DNA codificando as proteínas Vif e Gag do HIV-1, através de um mecanismo de auxílio cognato, uma vez que a vacina HIVBr18 compartilhava epítomos com tais proteínas (Ribeiro *et al.*, 2009).

1.10. Adjuvantes

O termo adjuvante deriva do latim *adjuvare*, que significa ajudar ou adicionar (Cox and Coulter, 1997). Os adjuvantes podem ser definidos como substâncias que quando adicionadas as formulações vacinais aumentam a imunogenicidade das mesmas. A escolha do adjuvante para fins de vacinação é determinada por um balanço entre a adjuvantividade requerida e os efeitos adversos.

Os adjuvantes vem sendo tradicionalmente utilizados na formulação de diversas vacinas com o objetivo de: 1) aumentar a resposta a uma vacina na população em geral, aumentando os títulos de anticorpos e/ou a porcentagem de indivíduos protegidos; 2) aumentar a taxa de soroconversão na população com capacidade de resposta reduzida devido a idade (crianças e idosos), doenças ou intervenções terapêuticas; 3) facilitar o uso de quantidades mais baixas de antígeno e 4) reduzir o número de doses da vacina necessário para alcançar proteção (Coffman *et al.*, 2010).

Os adjuvantes podem ser classificados de acordo com a sua propriedade físico-química, origem, e seus mecanismos de ação. Baseado nos seus mecanismos dominantes de ação os adjuvantes podem ser divididos em imunoestimulatórios (potenciadores imunes), particulados (sistemas de liberação) que incluem várias categorias, e os de mucosa (Pashine *et al.*, 2005). Os adjuvantes possuem diversos mecanismos de ação e devem ser selecionados para uso baseados na rota de administração e no tipo de resposta imune necessária para uma vacina em particular. Os mecanismos de ação dos adjuvantes incluem aumento da meia-vida biológica ou imunológica de vacinas, ação direta ou indireta nas células apresentadoras de antígenos (células dendríticas), indução de citocinas imunomoduladoras, ajuda no direcionamento do antígeno aos órgãos linfóides, entre outros (Coffman *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado que os agonistas de receptores da imunidade inata, como os receptores semelhantes a Toll (“*Toll Like Receptores*”- TLRs) possuem potente atividade adjuvante (Mbow *et al.*, 2010). Os adjuvantes classificados como imunoestimulatórios podem desempenhar seu papel atuando em nível de citocinas, moléculas MHC, sinais coestimulatórios ou por sinalizações intracelulares. Alguns exemplos dessa classe seriam os ligantes de TLRs como o CpG ODN, poly IC, Imiquimod, Resiquimod (Figura 8), receptores semelhantes a NOD (“*NOD like receptors*”- NLR), entre outros.

Os adjuvantes particulados, como os sais de alumínio são utilizados em vacinações humanas por mais de 5 décadas. Além do uso humano, estes adjuvantes compõem a maioria das vacinas veterinárias sendo, portanto, o adjuvante mais utilizado para fins de vacinação (Lindblad, 2004). Dentro dessa classe, encontram-se também os adjuvantes que contém partículas lipídicas como por exemplo o adjuvante completo de Freund (ACF), que é uma emulsão de água e óleo que contém também *Mycobacterium (tuberculosis* ou *butyricum*) morta pelo calor e seca. Os adjuvantes microparticulados possuem dimensões semelhantes aos patógenos e por esse motivo dependem da fagocitose das micropartículas pelas células apresentadoras para a capacitação do antígeno (Lutsiak *et al.*, 2002, Newman *et al.*, 2002)

Apesar do limitado número de adjuvantes licenciados para uso em humanos (Hidróxido de Alumínio (Alum), MF59, ASO3 e ASO4), inúmeros compostos vem sendo avaliados em ensaios clínicos e tem se verificado a eficácia e segurança dos mesmos como, por exemplo, CpG ODN, imiquimod, poly IC (Coffman *et al.*, 2010). Alguns destes adjuvantes estão disponíveis para uso em pesquisa e no presente trabalho utilizamos algumas dessas formulações.

Figura 8. Os adjuvantes ativam diferentes receptores da imunidade inata (receptores semelhantes a Toll-(TLR) e semelhantes a NOD (NLR). Adaptado de (Takeda and Akira, 2005).

1.10.1. Adjuvante Completo de Freund (ACF) e Adjuvante Incompleto de Freund (AIF)

Em 1930 Jules Freund desenvolveu um potente adjuvante imunológico composto de uma emulsão água-óleo mineral, surfactante (“mannide monooleate”) e que contém micobactérias (*Mycobacterium tuberculosis* ou *butyricum*) mortas pelo calor e secas (Opie and Freund, 1937). O adjuvante completo de Freund (ACF) é considerado o “padrão ouro devido a sua capacidade de induzir uma resposta imune extremamente potente. Apesar de altamente eficaz, o ACF é reatogênico não podendo ser utilizado em seres humanos, pois induz no local da injeção uma reposta inflamatória crônica que resulta na formação de granulomas, abscessos estéreis e necrose ulcerativa. Acredita-se que esse processo ocorra devido a impurezas presentes no óleo mineral e pelo fato de não ser biodegradável (Rajesh K. Gupta, 1993).

De um modo geral, o ACF é amplamente utilizado em ensaios de avaliação da imunogenicidade de antígenos em modelo murino e também na indução de doenças autoimunes (Billiau and Matthys, 2001). Para indução de autoimunidade, evidências sugerem que os componentes da micobactéria

direcionam os linfócitos T a adquirirem um padrão de resposta do tipo Th1 que medeiam a hipersensibilidade do tipo tardia (DTH).

O adjuvante incompleto de Freund (AIF) também é uma emulsão água-em-óleo e difere do ACF por ser composto somente de óleo mineral e surfactante, sem a micobactéria. Na década de 50, o AIF foi utilizado como adjuvante em seres humanos juntamente com o vírus da influenza e foi capaz de induzir títulos de anticorpos de maior magnitude e longevidade quando comparado aos títulos dos indivíduos que receberam somente a vacina sem adjuvante (Salk and Laurent, 1952). A principal ressalva em relação à utilização do AIF em seres humanos está relacionada a possíveis efeitos adversos. Um levantamento feito pela Organização Mundial da Saúde (OMS) mostrou que na imunização de aproximadamente um milhão de indivíduos com AIF, 40 apresentaram efeitos adversos locais mais graves, como abscessos estéreis (Miller *et al.*, 2005).

A atividade adjuvante é resultado de uma liberação contínua do antígeno do depósito oleoso e estímulo da imunidade inata local. Um componente essencial nessa resposta é uma reação inflamatória intensa no local que estimula a infiltração de leucócitos.

1.10.2. Hidróxido de alumínio (Alum)

O adjuvante hidróxido de alumínio (Alum) é clinicamente licenciado para o uso em humanos, e vem sendo utilizado há mais de 50 anos com milhares de doses sendo administradas nesse período. Além do uso humano, como componente das vacinas HAV (hepatite A), HBV (hepatite B), HPV (papiloma) e *Haemophilus influenza*, este adjuvante compõe a maioria das vacinas veterinárias sendo, portanto, o adjuvante mais utilizado para fins de vacinação (Lindblad, 2004).

Apesar de sua utilização por mais de meio século, o mecanismo de ação deste adjuvante ainda é desconhecido em muitos sentidos. Inicialmente, acreditava-se que o único mecanismo de ação do Alum seria adsorver os antígenos presentes na vacina permitindo que o complexo alum-antígeno funcionasse como um depósito, o que poderia levar a uma liberação lenta e constante do antígeno. Trabalhos realizados a partir de 2008 por diversos grupos mostraram que o Alum é também capaz de ativar a resposta imune

inata através da diferenciação de monócitos em células dendríticas. Esse fenômeno pode ocorrer pela ativação direta do inflamossomo NALP3 pelos cristais de Alum assim como pela ativação indireta através da liberação de ácido úrico endógeno, ambos contribuindo para sua adjuvanticidade (Lambrecht *et al.*, 2009).

Existem limitações quanto ao uso do Alum pois em muitos casos não atende às necessidades para o desenvolvimento de vacinas (Pashine *et al.*, 2005). Estudos comparativos mostraram que o Alum é um adjuvante fraco na indução de imunidade celular mediada por linfócitos T do tipo Th1, não é efetivo na indução de uma resposta de imunoglobulina A na mucosa e pode induzir resposta humoral de imunoglobulina E (Bajaj *et al.*, 1997). O uso de camundongos geneticamente modificados que não produzem IL-4 mostrou um aumento dramático nos títulos de IgG2a, resultados que suportam o conceito de que o Alum induz células produtoras de IL-4 e uma resposta predominantemente do tipo Th2 (Lindblad, 2004). Uma outra limitação é a incapacidade deste adjuvante em induzir significativa resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺. Em doenças que requerem uma resposta imune celular forte do tipo Th1 ou a presença de linfócitos T CD8⁺ este adjuvante provavelmente não será utilizado sozinho (Lindblad, 2004).

1.10.3. Monofosforil lipídeo A (MPL)

O Monofosforil Lipídeo A (*Monophosphoryl Lipid A*- MPL) é um composto derivado do lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas (*Salmonella minnesota* R595). A remoção de um resíduo de fosfato do LPS gera o MPL que possui somente 0,1% da toxicidade da molécula parental, o LPS.

Estudos recentes demonstraram que o MPL, assim como o LPS, medeia a ativação imune pela interação com TLR4, que pode ser expresso em vários tipos celulares, incluindo neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos, células T e B, células NK e células dendríticas (Duthie *et al.*, 2011). Em diversos estudos pré-clínicos, o MPL foi capaz de induzir a produção de citocinas do tipo 1 (IL-12, IFN- γ , etc.) que promovem a geração de respostas do tipo Th1.

O MPL já está licenciado para uso em humanos em alguns países, compondo uma vacina contra a alergia (*Pollinex Quattro*) (Hopkins *et al.*, 2001) e fazendo parte de uma vacina contra melanoma no Canadá (Melacine). Neste caso, o MPL potencializa a resposta induzida contra a vacina e diminui o número de doses requeridas. Diversos ensaios clínicos vêm sendo realizados nos quais o MPL é utilizado conjuntamente com antígenos de malária, hepatite B e leishmaniose (Coffman *et al.*, 2010).

Atualmente, o MPL pode ser formulado em conjunto com o Alum (ASO₄) e faz parte da vacina contra o vírus da hepatite B (HBV) e vírus do papiloma humano (HPV) sendo capaz de polarizar para uma resposta imune do tipo Th1 ao contrário da resposta Th2 que se observa quando o Alum é administrado sozinho (Casella and Mitchell, 2008, Didierlaurent *et al.*, 2009). O MPL também pode estar associado com o “*trehalose dicorynomycolate* (TDM)” compondo o sistema Ribi de adjuvante (*Ribi Adjuvant System*-RAS).

1.10.4. CpG ODN

O adjuvante CpG ODN é um oligodeoxinucleotídeo (ODN) sintético não metilado composto de 18-25 bases nitrogenadas e motivos CG (citidina-fosfato-guanosina) inseridos em contextos restritos de base e que agem em receptores específicos. Estudos recentes mostram que ocorre uma interação entre os dinucleotídeos não metilados CpG e o TLR9 resultando na ativação de fatores de transcrição. A molécula de TLR9 murina é ativada preferencialmente pelo motivo GACGTT enquanto que a sequência ideal para a molécula de TLR9 humana é GTCGTT (Krieg, 2003).

O CpG ODN do tipo “B” possui toda sua sequência em fosforotioato, o que protege da ação das nucleases, estimula a proliferação e produção de IL-6 e IgM pelos linfócitos B, maturação e produção de IL-6 e TNF- α pelas células dendríticas (Hemmi *et al.*, 2003, Klinman, 2004). De um modo geral, o CpG-ODN é capaz de aumentar a resposta de anticorpos e polarizar fortemente para um perfil Th1.

Um dos ensaios clínicos mais promissores com CpG demonstrou que a vacina da hepatite B administrada conjuntamente com o adjuvante foi capaz de induzir soroproteção mais rápida, com elevados títulos de

anticorpos e com menor número de doses na população normalmente hiporresponsiva à vacina (Barry and Cooper, 2007).

1.10.5. poly IC

O poly IC (polyinosinic: polycutidylic acid) é um RNA sintético de fita dupla (dsRNA), que mimetiza o RNA viral e que pode ser reconhecido pelo TLR3 nos endossomos (Alexopoulou *et al.*, 2001) ou pelas helicases de ácido ribonucleico (RNA) citosólicas como o gene induzível de ácido retinóico-1 (RIG-I) e o gene 5 de diferenciação associado ao melanoma (MDA5) (Kato *et al.*, 2006). O TLR3 é o único entre o TLRs conhecidos que sinaliza unicamente através de TRIF/TRAM para ativar NF- κ B. Esta sinalização resulta em uma resposta protetora do tipo Th1, fazendo dos ligantes de TLR3 uma opção atrativa para vacinas de combate a patógenos intracelulares (O'Neill *et al.*, 2009).

O poly IC é um forte indutor de IFN tipo 1 produzido pelas células dendríticas e monócitos (Longhi *et al.*, 2009), é capaz de ativar células NK a produzirem IFN γ e também estimula linfócitos T e B (Kolumam *et al.*, 2005, Le Bon, 2006). No modelo murino, recentemente um trabalho demonstrou que o poly IC foi o adjuvante mais eficaz em induzir uma resposta do tipo CD4⁺ Th1 utilizando anticorpos quiméricos contendo a proteína gag do HIV (Longhi *et al.*, 2009).

Um análogo do poly IC (poly ICLC) mais resistente a ação da RNase foi estabilizado com poli-L-lisina (Longhi *et al.*, 2009; Stahl-Hennig *et al.*, 2009), produzido em larga escala e vem sendo utilizado na imunoterapia de indivíduos com câncer (Morse *et al.*, 2011) e também em ensaios clínicos que utilizam um anticorpo quimérico expressando a proteína Gag do HIV-1 (<http://www.clinicaltrials.gov>).

1.10.6. Imiquimod (R837) e Resiquimod (R848)

O Imiquimod (R837; 1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amine) e o Resiquimod (R848, 4-amino-2-(etoximetil)-a, a-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolina-1-etanol) fazem parte da família das imidazoquinolinas e vem sendo estudada extensivamente nos últimos anos. As imidazoquinolinas

de um modo geral, possuem certas propriedades antivirais (inclusive na mucosa genital), como por exemplo, a redução da recorrência da infecção viral (Weeratna *et al.*, 2005, Bernstein *et al.*, 2001, Harrison *et al.*, 1994).

O imiquimod tem sido utilizado com sucesso no tratamento de várias condições dermatológicas, incluindo carcinoma basocelular e verrugas causadas pelo HPV 1, 2, 4 e 7. O Imiquimod está registrado no Brasil, com o nome comercial de Aldara®/ Ixium/ Modik/ Imoxy para o tratamento de verrugas externas presentes nas regiões genital e perianal (Hengge *et al.*, 2000).

O resiquimod também possui atividade antiviral e já é utilizado na clínica na forma de creme para o tratamento de lesões da pele causadas pelo vírus Herpes Humano (HSV) (Fife *et al.*, 2008).

Além da utilização na terapia contra infecções já estabelecidas, esses adjuvantes vem sendo avaliados quanto a capacidade de aumentar a imunogenicidade das vacinas e na terapia contra tumores, como por exemplo o carcinoma de célula basal e também tumores do sistema nervoso central (Dockrell and Kinghorn, 2001, Prins *et al.*, 2006).

O imiquimod é capaz de ativar o TLR7 enquanto que o resiquimod ativa o TLR7 e TLR8. Ambos são capazes de induzir a produção de IFN- α dentre outras citocinas tanto *in vitro* quanto *in vivo* por diferentes tipos celulares (Hemmi *et al.*, 2003). Além da produção de citocinas pró-inflamatórias, um dos efeitos indiretos desses adjuvantes é a produção de IFN- γ , pelas células T CD4⁺ Th1 que auxiliam no estímulo aos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, contribuindo dessa maneira, para a apoptose de células infectadas por patógenos intracelulares e células tumorais (Hengge, 2001, Miller, 2002, Stanley, 2002). Alguns estudos demonstraram que esses adjuvantes possuem a capacidade de estimular diretamente as células produtoras de anticorpos, uma vez que mimetizam os sinais do CD40, normalmente enviados por células T (Bishop *et al.*, 2001).

1.10.7. Muramil dipeptídeo (MDP)

O muramil dipeptídeo, (MDP) é o menor motivo bioativo dos peptideoglicanos comuns a todas as bactérias sendo portanto, considerado

um fragmento análogo ao da parede bacteriana. A parede celular das micobactérias é extremamente imunogênica e acredita-se que essa característica seja devido ao MDP presente.

O MDP é capaz de ativar NOD2 e induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias ($\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8, e citocinas do padrão Th2), óxido nítrico (NO), aumento da citotoxicidade e o aumento da expressão de moléculas de adesão (Dzierzbicka *et al.*, 2011)

Alguns ensaios clínicos com o adjuvante MDP já se encontram em andamento, como por exemplo, um ensaio clínico de fase I que pretende avaliar a imunogenicidade e segurança de uma vacina contra tumores sólidos (ver www.clinicaltrials.gov; NCT01376505).

2. OBJETIVOS

2.Objetivo

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi verificar se a imunização inicial com a vacina de DNA HIVBr18 é capaz de melhorar a magnitude e/ou a qualidade da resposta imune humoral e ou/ celular para gp140 na presença de adjuvantes licenciados para uso em humanos.

2.2. Objetivos específicos

1. Produzir e purificar o trímero da gp140;
2. Verificar se a imunização inicial com vacina HIVBr18 é capaz de aumentar a magnitude/qualidade da resposta imune humoral gp140-específica na presença de adjuvantes licenciados para uso em humanos;
3. Verificar se a imunização inicial com vacina HIVBr18 é capaz de aumentar a magnitude/qualidade da resposta imune celular gp140-específica na presença de adjuvantes licenciados para uso em humanos;
4. Avaliar a influência de diferentes adjuvantes na resposta imune humoral após imunização com o trímero da gp140;
5. Avaliar a influência de diferentes adjuvantes após imunização com o trímero da gp140 quanto a capacidade em induzir células T auxiliar foliculares e células B do centro germinativo.

3. METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. Plasmídeo que codifica a gp140

O plasmídeo que codifica para o trímero da gp140 (Yu2gp140) (Yang et al., 2002) foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Michel Nussenzweig (The Rockefeller University, EUA) e utilizado para transformar bactérias *E. coli* DH5 α competentes.

3.2. Plasmídeo que codifica a vacina HIVBr18

O plasmídeo pVAXHIVBr18 que codifica para os dezoito (Tabela anexa 1) epítomos para linfócitos T CD4⁺ provenientes do HIV-1, assim como o vetor vazio pVAX foram utilizados para transformar bactérias *E.coli* DH5 α competentes.

3.3. Transformação de bactérias *E. coli* DH5 α competentes com os plasmídeos

Para a transformação, 150-200ng dos plasmídeos pVAXHIVBr18, pVAX ou Yu2gp140 foram adicionados a tubos de microcentrífuga contendo alíquotas de 10 μ L de bactérias *E. coli* DH5 α competentes e 90 μ L de solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,1M. Após incubação em gelo por 30 minutos, os tubos foram colocados a 42°C por 35 segundos e recolocados em gelo por 5 minutos. Em seguida, foram acrescentados 500 μ L de meio LB (Invitrogen) sem antibiótico e os tubos foram incubados à 37°C por 1 hora, sob agitação constante (250rpm). Após esse período, os tubos foram centrifugados por 2 minutos à 500 rcf e 400 μ L do sobrenadante foram descartados. O pellet foi ressuspensionado no volume restante e 100 μ L foram semeados em placas de LB sólido contendo 100 μ g/mL de ampicilina para o plasmídeo Yu2 gp140 e 50 μ g/mL de canamicina para os plasmídeos pVAXHIVBr18 e pVAX. A placa foi incubada à 37°C por 16 horas para a seleção dos clones resistentes ao antibiótico.

3.4. Purificação em larga escala do DNA plasmidial

Para purificação dos plasmídeos pVAXHIVBr18, pVAX e Yu2 gp140, um clone resistente ao antibiótico foi selecionado para purificação em larga

escala utilizando o “kit” comercial Giga Plasmid Purification, EndoFree (Qiagen) conforme descrito abaixo.

Inicialmente foi realizada a cultura de bactérias *E. coli* DH5 α transformadas individualmente com cada plasmídeo em 5 mL de meio LB líquido (Invitrogen) contendo ampicilina (100 μ g/mL) para o plasmídeo Yu2gp140 e 50 μ g/mL de canamicina para os plasmídeos pVAX e pVAXHIVBr18. A cultura das bactérias transformadas com cada plasmídeo foi incubada durante 8 horas a 37°C sob agitação constante (250 rpm). A seguir, cada cultura foi diluída na razão de 1:500 em 2,5 litros de LB líquido, contendo ampicilina (100 μ g/mL) ou canamicina (50 μ g/mL) e incubada novamente a 37°C sob agitação constante (250rpm) durante 16 horas. Após esse período, o material foi centrifugado à 6000g por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet de bactérias foi ressuspendido em 125 mL de tampão P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM e RNase). Posteriormente, foram adicionados 125mL de tampão P2 (NaOH 200 mM; SDS 1 %); a solução foi homogeneizada suavemente e esperou-se 5 minutos para a completa lise da parede bacteriana. Em seguida, adicionou-se 125 mL do tampão P3 (acetato de potássio 3M, pH 5,5) para neutralização da reação. A solução com as bactérias lisadas foi então transferida para um filtro proveniente do “kit” e mantida em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, para que todo o material composto da parede e genoma bacterianos flutuasse sobre o líquido contendo o DNA de interesse. Após esse período o líquido foi filtrado à vácuo, lavado com 50mL do tampão FWB2 (acetato de potássio 1M, pH 5,0) e mantido no gelo por 30 minutos após adição de 30mL de tampão para remoção de endotoxinas. O filtrado foi aplicado em uma coluna de sefarose (Qiagen) previamente equilibrada com 75mL de tampão QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15% e Triton X-100 0,15 %). Após a aplicação do filtrado, a resina foi lavada com 600mL de tampão QC (NaCl 1,0 M; MOPS 50mM pH 7,0; etanol 15 %) e o DNA plasmidial foi eluído com 100mL de tampão QN (NaCl, 0,25 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %). O DNA eluído foi precipitado com 70mL de isopropanol e centrifugado à 14.000g por 30 minutos à 4°C. Posteriormente, o DNA foi lavado com 10mL de etanol 70% (em água livre de endotoxinas) e

centrifugado à 14.000g por 10 minutos à 4°C. Por último, o pellet foi ressuspendido em 2,0 mL de água estéril livre de endotoxinas.

3.5. Quantificação e avaliação da integridade dos plasmídeos purificados

Após a purificação dos plasmídeos conforme descrito acima, foi realizada a quantificação e avaliação da qualidade dos mesmos. A quantificação dos plasmídeos foi realizada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 a 280nm, utilizando-se o aparelho Nanodrop Spectrophotometer ND-100.

A avaliação da integridade dos plasmídeos foi realizada por análise de restrição com as endonucleases HindIII e XhoI para os plasmídeos pVAHIVBr18 e Yu2gp140. O produto de digestão assim como os plasmídeos não digeridos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL). Por último, as construções foram sequenciadas para confirmar a correta orientação do inserto.

3.6. Transfecção de células HEK 293T

Células HEK 293T foram semeadas em placas de 15 cm de diâmetro em meio DMEM acrescido de 2mM L-glutamina, 10U/mL penicilina, 1mM piruvato de sódio e 5% de soro fetal bovino com baixa concentração de IgG (Invitrogen). Após dois dias em cultura (quando a confluência alcançou em torno de 70%), as células foram transfectadas com o plasmídeos Yu2gp140. Brevemente, 20µg do plasmídeo foi dissolvido em 1mL de uma solução de 150mM de NaCl. Após curta agitação, 100µL de uma solução de polietilenimina (PEI, Sigma-aldrich) 0,45 mg/mL foram adicionados e a mistura foi submetida à agitação por 10 segundos, seguida de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. O volume final de 1,1mL foi então adicionado a cada placa utilizando-se uma pipeta de 1mL. Após 5 dias em cultura, os sobrenadantes das culturas foram coletados, filtrados, e acondicionados em membrana de diálise com sacarose para redução do volume durante 4 horas à 4°C. Após esse período, o material foi dialisado 2x contra tampão contendo NaCl 300mM, NaH₂PO₄ 50mM e Imidazol 10mM para posterior purificação.

3.7. Purificação e expressão da proteína recombinante gp140

Após diálise, o material foi incubado com resina de cobalto (HisPur Co⁺⁺, Thermo Scientific) para purificação por cromatografia de afinidade. Após a realização de alguns testes foi determinado que o tampão de lavagem deveria conter 500mM de NaCl e 10mM de imidazol. A proteína gp140 foi eluída em tampão contendo NaCl 500mM, NaH₂PO₄ 50mM e Imidazol 150mM, em diferentes alíquotas e aquelas que continham uma maior quantidade da proteína purificada foram dialisadas contra PBS à 4°C durante 16 horas.

A integridade da proteína recombinante foi analisada em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE em condições redutoras seguido de coloração por Coomassie Blue. A proteína recombinante foi quantificada pelo método de Bradford e estocada a -20°C até uso.

3.8 Western Blot

Para avaliar o reconhecimento da proteína recombinante gp140 produzida pelo soro de um indivíduo infectado pelo HIV-1 realizamos um ensaio de western blot. A proteína purificada foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) e a transferência para a membrana de nitrocelulose (hybond-C extranitrocelulose GE Healthcare) foi feita pelo sistema de transferência semi-seco. A eficiência da transferência foi verificada pela detecção da proteína na membrana com o reagente Ponceau-S (Sigma-aldrich). Após a transferência, a membrana foi incubada com solução de bloqueio (5% de leite desnatado e 2,5% de BSA em PBS-Tween 20 0,02%) durante a noite à 4°C sob agitação. Após o bloqueio, a membrana foi incubada por 2 horas sob agitação com soro de paciente infectado pelo HIV (carga viral 69067 cópias/mL), diluído em solução de bloqueio (diluição 1:5000). Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-Tween 20 0,05% e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG humano (1:1000) conjugado a peroxidase (Sigma-aldrich) por 1 hora. Decorrido esse período, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-Tween 20 por 10 minutos cada lavagem. A revelação da membrana foi feita por quimioluminescência utilizando-se os reagentes do sistema ECL (GE Healthcare) e exposição a filmes autoradiográficos Hyperfilm (Kodak).

3.9. Camundongos e imunizações

Camundongos isogênicos fêmeas de 6 a 8 semanas de idade da linhagem BALB/c (H-2^d) provenientes do centro de desenvolvimento de modelos animais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) foram utilizados para os experimentos de imunização. Os animais foram mantidos e manipulados em condições SPF (*Specific Pathogen Free*) no biotério do Laboratório de Imunologia do Edifício de Ciências Biomédicas da UNIFESP. A realização desse estudo foi aprovada pelo comitê de ética da UNIFESP (número 0421/11) e também pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (número 122/11).

Em experimento preliminar para determinar se a proteína recombinante produzida seria imunogênica, camundongos BALB/c foram imunizados com 10µg da proteína recombinante gp140 na presença do adjuvante completo de Freund- ACF (Sigma-aldrich) pela via subcutânea. Após quinze dias, os animais receberam uma segunda dose com 10µg de gp140 emulsificada em adjuvante incompleto de Freund-AIF (Sigma-aldrich) também pela via subcutânea.

A fim de testar a hipótese do trabalho, grupos de 6 camundongos BALB/c receberam uma imunização inicial com duas doses de 100µg da vacina de DNA que codifica os 18 epítomos para células TCD4⁺ (HIVBr18) ou vetor vazio (pVAX) pela via intramuscular. Quinze dias após a última dose, os animais receberam 2 doses com 10, 1 ou 0,1µg da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença de diferentes adjuvantes: Adjuvante completo de Freund (ACF), adjuvante incompleto de Freund (AIF), 50µg poly IC (InvivoGen), 10µg CpG ODN 1826 (TCCATGACCGTTCCTGACGTT) (InvivoGen); 1mg/ml MPL+ TDM- Ribi (Sigma- aldrich); 10µg muramyl dipeptide- MDP (InvivoGen); 20µg Imiquimod- R837 (InvivoGen); 20µg Resiquimod- R848 (InvivoGen) e 1mg Hidróxido de Alumínio - Alum (Sigma-aldrich).

Os grupos controles consistiram de camundongos BALB/c imunizados inicialmente com 2 doses de 100µg de HIVBr18 ou pVAX e que posteriormente receberam 2 doses do adjuvante em teste diluído em salina.

Cada animal recebeu 4 doses no total com intervalo de 15 dias. Após cada dose, os animais imunizados foram sangrados pelo plexo retro-orbital. O sangue coletado foi centrifugado para a separação do soro e o mesmo foi estocado à -20°C até o momento do uso.

A fim de verificar a influência somente dos diferentes adjuvantes, grupos de 6 camundongos BALB/c receberam duas doses com o intervalo de quinze dias com 10µg da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença de diferentes adjuvantes: Adjuvante completo de Freund (ACF), adjuvante incompleto de Freund (AIF), 50µg poly IC (InvivoGen), 10µg CpG ODN 1826 (TCCATGACCGTTCCTGACCGTT) (InvivoGen); 1mg/ml MPL (InvivoGen); 10µg muramyl dipeptide- MDP (InvivoGen); 20µg Imiquimod-R837 (InvivoGen); 20µg Resiquimod- R848 (InvivoGen) e 1mg Hidróxido de Alumínio - Alum (Sigma-aldrich).

Os grupos controles consistiram de camundongos BALB/c imunizados com 2 doses somente com os adjuvantes diluído em salina.

Cada animal recebeu 2 doses no total com intervalo de 15 dias. Após cada dose, os animais imunizados foram sangrados pelo plexo retro-orbital. O sangue coletado foi centrifugado para a separação do soro e o mesmo foi estocado à -20°C até o momento do uso.

3.10. Avaliação da resposta imune Humoral – ELISA

O ensaio para detecção de anticorpos específicos contra a gp140 foi realizado utilizando soro de paciente infectado pelo HIV ou soro de animais imunizados.

Placas de 96 poços (High Binding, Costar) foram sensibilizadas com 5 µg/mL da proteína recombinante gp140 diluída em tampão carbonato 0,05M e incubadas à temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte, as placas foram lavadas 2 vezes com PBS-Tween 20 0,02% (PBST), e bloqueadas com 150µL/poço de solução de bloqueio (5% de leite desnatado e 1% de BSA em PBS-Tween 20 0,02%) e incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente. Após o período da incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e incubadas com 100µL/poço do soro dos animais imunizados ou do paciente infectado com HIV em diluições seriadas

por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e adicionado 50µL/poço do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Jackson Laboratories) diluído em solução de bloqueio (diluição 1:10.000) ou anti-IgG de humano (Sigma-aldrich) diluído em solução de bloqueio (1:5.000) e incubado por 2 horas à temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo secundário, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e adicionado 100µL/poço da solução de revelação (fostato de sódio 0,2M; ácido cítrico; peróxido de hidrogênio e OPD). Após 15 minutos a reação foi interrompida pela adição de 50µL/poço de ácido sulfúrico 4N.

A densidade ótica (DO) foi determinada em um leitor de placas (Labsystems multiscan MS, Uniscience) no comprimento de onda de 492nm. O título individual foi determinado como sendo a maior diluição do soro que apresentava densidade ótica (DO) maior que 0,1.

Para a detecção das subclasses de imunoglobulinas, o ensaio de ELISA foi realizado conforme descrito acima, exceto os anticorpos secundários que foram específicos para as diferentes subclasses de IgG. Utilizamos os anticorpos anti-IgG1, IgG2a e IgG2b conjugados à peroxidase (Southern Biotech), na diluição de 1:4000.

A afinidade dos anticorpos produzidos foi determinada por ELISA. O ensaio de ELISA para determinação da constante de dissociação dos anticorpos foi realizado de maneira similar ao descrito anteriormente, adicionando uma etapa extra. Após a incubação com os pools de soros correspondentes, as placas foram lavadas e concentrações crescentes de tiocianato de amônio (0; 0,125; 0,250; 0,5; 1; 2; 4 e 8M) foram adicionadas e as placas incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. A constante de dissociação foi determinada considerando a concentração de tiocianato de amônio necessária para dissociar 50% dos anticorpos ligados.

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se ANOVA unidirecional (One way ANOVA) seguida de Tukey HSD disponível no software GraphPad Prism Versão 5.0a.

3.11. Avaliação da resposta imune celular

3.11.1. Suspensão celular

Camundongos BALB/c imunizados foram sacrificados 2 semanas após a última dose e tiveram os baços e/ou linfonodos drenantes retirados. As células foram obtidas após maceração do órgão, lavadas com 10 mL de meio RPMI (Gibco) e centrifugadas a 1700rpm por 6 minutos à 4°C. Em seguida, as células foram tratadas com tampão hemolítico ACK (NH_4Cl 0,15M; KHCO_3 1mM; Na_2EDTA 0.1mM) e lavadas duas vezes com meio RPMI (10 mL por lavagem). Ao final das lavagens, as células foram ressuspensas em 1mL de meio RPMI completo (meio RPMI suplementado com L-glutamina 2 mM (Gibco), solução de aminoácidos não essenciais (1% vol/vol) (Gibco), piruvato de sódio 1mM (Gibco), 2-Mercaptoetanol $5 \times 10^{-5}\text{M}$ (Sigma), 10% vol/vol de soro fetal bovino (Gibco) e os antibióticos Gentamicina (40 $\mu\text{g/mL}$) e Peffacin (20 $\mu\text{g/mL}$).

3.11.2. Ensaio para detecção de IFN- γ ELISPOT

O ensaio de ELISPOT foi realizado utilizando-se o set *anti-mouse* IFN- γ (BD) de acordo com instruções do fabricante. Brevemente, o anticorpo de captura (*anti-mouse* IFN- γ purificado) foi adicionado à placa na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ em volume final de 100 μL e a placa estocada durante a noite à 4°C. Em seguida, os poços foram lavados com 200 μL de RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com 200 μL /poço de meio R10 (RPMI completo+ 10% SFB) por 2 horas a temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados os estímulos: meio RPMI, como controle negativo, Concanavalina A (2,5 μg /poço) como controle positivo, peptídeo do HIV-1 (5 μM) ou proteína gp140 (5 $\mu\text{g/mL}$) em um volume final de 100 μL . Foram adicionadas ao poço as suspensões celulares na concentração de 3×10^5 células/poço também em volume final de 100 μL , sendo todos preparados em meio R10 contendo 30U/mL de IL-2 recombinante humana. A placa foi incubada à 37° C em estufa contendo 5% de CO_2 durante a noite. Posteriormente, as placas foram lavadas 2x com água deionizada e 3x com PBS-0,05%Tween 20. O anticorpo de detecção (anti IFN- γ biotilado) foi diluído em PBS-10% SFB e adicionado

aos poços (volume 100 µL/poço) na concentração final de 2µg/mL e a placa incubada durante 2hs à temperatura ambiente. Após lavagem dos poços 3x com PBS-0,05%Tween 20, o conjugado enzimático (streptavidina-peroxidase) foi diluído em PBS-10% SFB e adicionado aos poços (100µL/poço), seguido de mais uma etapa de incubação de 1h à temperatura ambiente. Para revelação, os poços foram lavados 4x com PBS-0,05%Tween 20 e posteriormente 2x com PBS. Foram adicionados então 100µL da solução AEC (3-amino-9-ethylcarbazole - BD) por poço e a formação de spots foi monitorada por 5 – 60 minutos. Passado esse período, a reação foi interrompida com 5 lavagens da placa com água deionizada. A contagem dos *spots* foi realizada em microscópio automatizado (Zeiss) com auxílio do *software* KS-ELISPOT (Zeiss) e os resultados foram expressos em unidades formadoras de *spots* (UFS) por 10⁶ células. Foram considerados positivos os estímulos cujo número de UFS/milhão de células foi superior ao *cutoff*. O *cutoff* foi definido como sendo a média de *UFS* mais 3 desvios padrões, obtido na análise do grupo imunizado com pVAX1 vazio, estimulado com os mesmos estímulos. O valor determinado para o *cutoff* foi de 15 UFS/milhão de células.

3.11.3. Ensaio de ELISPOT para detecção de células secretoras de anticorpos específicos.

Os ensaios de ELISPOT foram realizados utilizando-se placas de 96 poços (Millipore Multi-Screen IP- MAIPS 4510), que foram sensibilizadas com 5µg/mL da proteína recombinante gp140 em volume final de 100µL e a placa estocada durante a noite a temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados com 200µL de PBS 1x e foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com 200µL/poço de meio R10 por 1 hora a 37°C. Foram adicionadas aos poços as suspensões celulares na concentração de 1 x 10⁶ células/poço em volume final de 200µL, preparadas em meio R10. A placa foi incubada a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ por 16 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas 4x com PBS 1x. O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Jackson Laboratories) diluído em diluído em PBS 1x (1:1000) foi adicionado aos poços

(volume 100 μ L/poço) e a reação incubada durante 2hs a temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados 3x com PBS 1x. Para a revelação, foram adicionados 100 μ L da solução AEC (3-amino-9-ethylcarbazole - BD) por poço e a formação de spots foi monitorada por 5 – 60 minutos. Passado esse período, a reação foi interrompida com 5 lavagens da placa com água deionizada

3.11.4. Avaliação fenotípica de células T auxiliares foliculares e de células B do centro germinativo.

Para determinar a presença de células T auxiliares foliculares (THF) e de células B do centro germinativo (CG), os linfonodos inguinais e poplíteos dos camundongos imunizados foram retirados e processados conforme descrito acima. Após a contagem das células, 2×10^6 células foram lavadas com “*Macs Buffer*” (MB) (0,5% BSA; 2mM EDTA em PBS) para a marcação com os anticorpos. A marcação foi realizada em volume final de 50 μ L de MB com os anticorpos listados no painel abaixo. A placa foi incubada no escuro a 4°C por 30 minutos. Subsequente a incubação, os poços foram lavados duas vezes com 150 μ L de MB. Após as lavagens, as células foram ressuspensas em volume final de 200 μ L de MB. As amostras foram adquiridas em citômetro FACScanto II (BD Biosciences) e analisadas com o auxílio do *software* FlowJo (versão 9.5.2, Tree Star). Um milhão de eventos foram adquiridos no “*gate*” de linfócitos para análise dos diferentes subtipos celulares. Para ajuste das voltagens foram utilizadas *beads* (BD Biosciences) marcadas com os fluorocromos individualmente (tabela 1).

A estratégia de análise utilizada se encontra ilustrada na Figura 9. Em síntese foi feito um “*gate*” inicial em linfócitos baseado no tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) das células. Posteriormente foi feito um “*gate*” nas células B220⁺CD4⁻ e B220⁻CD4⁺ para células B do centro germinativo (CG) e células THF, respectivamente. Em cada subpopulação de linfócitos, a porcentagem de células que expressava os marcadores de THF (CXCR5 e CD279) e de CG (CD95 e GL7) simultaneamente foi definida.

Tabela 1: Painéis de citometria

Painel	Anticorpos	Clone
Células THF	CXCR5 Biotinilado	2G8
	CD4 Pacific Blue	RM4-5
	B220 PerCP	RA3-6B2
	CD279 PE	J43
	Streptavidina APC	-----
Células B do Centro Germinativo	CD4 PerCP	RM4-5
	B220 Pacific Blue	RA3-6B2
	CD95 PE	Jo2
	GL7 FITC	GL7

Figura 9: Estratégia de análise para identificação de células T auxiliares foliculares (THF) e células B do Centro Germinativo (CG). Duas semanas após a última dose, células dos linfonodos drenantes de camundongos BALB/c imunizados foram isoladas e marcadas com os anticorpos específicos para (A) THF e (B) CG. Para a análise de células THF, inicialmente foi feito um *gate* nos linfócitos, determinado pelo tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células. Posteriormente, a população $CD4^+B220^-$ foi selecionada e nesta avaliada a expressão de CXCR5 e CD279. As células duplo-positivas foram consideradas como THF. (B) Para a população de células B do centro germinativo, inicialmente foi feito um *gate* em linfócitos seguido de um *gate* na população $CD4^-B220^+$. Dentro dessa população foi selecionada a duplo positivas para GL7 e CD95.

3.11.5. Citometria Multiparamétrica

Para monitorar a proliferação das células T, os esplenócitos dos camundongos imunizados foram marcados com CFSE (carboxyfluorescein

succinimidyl ester), conforme descrito por Rosa et al., 2011. Em síntese, esplenócitos recém isolados (concentração de 50×10^6 células/mL) foram ressuspensos em PBS pré-aquecido (37°C) e marcados com $1,25 \mu\text{M}$ de CFSE (Molecular Probes) durante 10 minutos à 37°C . Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de meio R10 (RPMI contendo 10% de SFB) e o material foi centrifugado a 1700 rpm por 5 minutos. Após 3 lavagens com 5 mL de R10, as células foram ressuspensas em meio R10 na concentração de $2,5 \times 10^6/\text{mL}$. As células foram cultivadas por 4 dias na estufa a 37°C e 5% CO_2 em placas de 96 poços de fundo U (Nunc) na concentração de 5×10^5 células em volume final de $200 \mu\text{L}$ por poço (em triplicata) na presença de Concanavalina A (sigma - $2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$) como controle positivo, peptídeo do HIV-1 ($5 \mu\text{M}$), proteína gp140 ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) ou somente meio (como controle negativo). Após 4 dias de incubação, as células foram re-estimuladas na presença de anti-CD28 ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$ – BD Pharmingen), Concanavalina A (sigma - $2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$) como controle positivo, peptídeo do HIV-1 ($5 \mu\text{M}$), proteína gp140 ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$). Após uma hora na estufa a 37°C contendo 5% de CO_2 , $0,2 \mu\text{L}/\text{poço}$ de Brefeldina GolgiPlugTM (BD Pharmingen) foi adicionada à cultura e as células incubadas por mais 12 horas.

Após o período de incubação, as células foram coletadas e lavadas com “*Macs Buffer*” (MB) (0,5% BSA; 2mM EDTA em PBS) para marcação com os anticorpos monoclonais de superfície (CD4 PerCP e CD8 Pacific Blue) por 30 minutos no escuro à 4°C . As células foram fixadas e permeabilizadas utilizando o “kit Cytotfix/Cytoperm^T” (BD Pharmingen). Após a fixação e permeabilização, as células foram lavadas com tampão Perm/Wash (BD Biosciences) e marcadas com os anticorpos monoclonais (CD3 APCCy7, IL-2 PE, TNF- α PeCy7 e IFN- γ APC) por 30 minutos no escuro à 4°C . Após marcação, as células foram lavadas 2 vezes e ressuspensas em $200 \mu\text{L}$ de MB. Todos os anticorpos monoclonais utilizados são da BD Pharmingen. As amostras foram adquiridas em um citômetro FACScanto II (BD Biosciences) e analisadas com o auxílio do *software* FlowJo (versão 9.5.2, Tree Star). Para ajuste das voltagens foram utilizadas *beads* (BD Biosciences) marcadas com os fluorocromos individualmente (tabela 2). Foram adquiridos um milhão de eventos no “gate” de linfócitos. A estratégia de análise esta ilustrada na figura

anexa 1. Em síntese foi feito um “gate” inicial em linfócitos baseado no tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) das células. Posteriormente foi feito um “gate” nas células CD3⁺. Subseqüentemente, os linfócitos T foram subdivididos em populações majoritárias, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (figura anexa 1 A). Dentro de cada população específica, foi avaliado a proliferação através da diluição do CFSE e a produção de citocinas (figura anexa 1 B). A porcentagem das células específicas que proliferam e produzem citocinas foi calculada após subtração do valor das células não estimuladas.

Tabela 2: Painel de citometria multiparamétrica

Painel	Anticorpos	Clone	Tipo de marcação
Detecção de citocina intracelular	IL2 PE	JES6-5H4	Intracelular
	TNF PeCy7	MP6-XT22	Intracelular
	IFN- γ APC	XMG1.2	Intracelular
	CD3 APCCy7	145-2C11	Intracelular
	CD4 PerCP	RM4-5	Superfície
	CD8 Pacific Blue	53-6.7	Superfície

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Produção dos plasmídeos que codificam a gp140 e o HIVBr18

O plasmídeo Yu2gp140 que codifica o trímero da gp140 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Michel Nussenzweig da Universidade Rockefeller- EUA. Essa construção (figura 10) contém um motivo de trimerização proveniente da fibritina do bacteriófago T4 (sequência **GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWLLSTFL**) fusionado a região C-terminal dos ectodomínios da gp140 e que tem como objetivo aumentar a estabilidade e a solubilidade (Yang et al., 2002) da gp140. Os ectodomínios possuem trocas de Arginina por Serina na posição 508 e 511 que impedem a clivagem entre a gp120 e a gp41 (Yang et al., 2000).

Figura 10. Esquema representativo das construções da gp140 do HIV. Acima, o esquema representativo da sequência selvagem contendo uma região de transmembrana (TM). Abaixo, a construção utilizada que possui na região C-terminal um motivo de trimerização proveniente da fibritina (FT) do bacteriófago T4. Pode-se observar também a localização das trocas de Arginina por Serina (SS) nas posições 508 e 511.

O plasmídeo que codifica para os 18 epítomos conservados para linfócitos TCD4 do HIV-1, denominado pVAXHIVBr18 (HIVBr18), foi construído anteriormente pelo nosso grupo (Ribeiro et al., 2010).

Inicialmente, para obter maior quantidade dos plasmídeos Yu2gp140, HIVBr18 e do vetor vazio pVAX, transformamos bactérias DH5 α competentes e utilizamos o Kit de purificação comercial Giga Plasmid Purification, EndoFree (Qiagen). Após a purificação, a avaliação da integridade dos plasmídeos foi realizada através da análise de restrição com as enzimas

HindIII e XhoI. Após a digestão e/ou linearização dos plasmídeos, os mesmos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose. A Figura 11 mostra o resultado da purificação do plasmídeo Yu2-gp140 após linearização com a enzima HindIII ou digestão com as enzimas HindIII e XhoI. A análise após digestão e corrida em gel de agarose revelou uma banda de aproximadamente 5400pb (canaleta 3) e outra de 2680pb (canaleta 4) coincidentes com o tamanho esperado para o plasmídeo e para o inserto respectivamente.

Figura 11. Análise da integridade do plasmídeo Yu2gp140 após purificação. Gel de agarose 1,2% após purificação do plasmídeo Yu2gp140. 1- peso molecular (Ready-load 1Kb plus DNA ladder, Invitrogen); 2- Yu2gp140 circular após purificação; 3- Yu2gp140 linearizado com HindIII; 4- Yu2gp140 digerido com HindIII e Xho I.

Na Figura 12 podemos observar a análise em gel de agarose após purificação dos plasmídeos pVAX e HIVBr18. A linearização do vetor pVAX 1 com a enzima HindIII revelou uma banda com tamanho aproximado de 3 kb (Figura 12A– canaleta 3) enquanto que a digestão do plasmídeo HIVBr18 (Figura 12B – canaleta 4) com as enzimas HindIII e Xho I revelou uma banda de 3kb referente ao vetor pVAX e outra de aproximadamente 1kb referente ao inserto.

Figura 12. Análise da integridade dos plasmídeos pVAX e HIVBr18 após purificação. **(A)** 1 - peso molecular (Ready-load 1Kb plus DNA ladder, Invitrogen), 2 - pVAX circular, 3 - pVAX linearizado com Hind III; **(B)** 1 - peso molecular (Ready-load 1Kb plus DNA ladder, Invitrogen), 2 - HIVBr18 circular, 3 - HIVBr18 linearizado com Hind III, 4 - HIVBr18 digerido com Hind III e Xho I.

É importante ressaltar também que não se observou contaminação dos plasmídeos com DNA ou RNA genômicos.

A análise do sequenciamento da construção Yu2gp140 e HIVBr18 confirmou a presença e correta orientação dos genes (dados não mostrados).

4.2. Purificação da proteína recombinante que representa o trímero da gp140

A produção da proteína recombinante foi realizada por transfecção transiente de células HEK293T conforme descrito no item 3.6. Após testar diferentes protocolos de purificação, o que utiliza a coluna de Cobalto e uma concentração de 500mM de NaCl no tampão de lavagem foi selecionado por apresentar maior rendimento e ausência de bandas contaminantes.

A figura 13 mostra a análise em SDS-PAGE sob condições redutoras contendo as diferentes concentrações da proteína purificada após a eluição. Desses experimentos podemos concluir que a produção do trímero da gp140

foi alcançada com sucesso, o que nos permitiu realizar a próxima etapa do trabalho.

Figura 13. Análise da purificação do trímero de gp140 em coluna de cobalto. SDS- PAGE da proteína recombinante gp140 em condições redutoras após purificação em coluna de cobalto. O peso molecular está indicado à esquerda em kDa e a quantidade da proteína recombinante está indicada acima de cada canaleta.

Para verificar se a proteína recombinante produzida e purificada seria reconhecida durante a infecção natural, realizamos um *western blot* com o soro de paciente HIV positivo. A figura 14 mostra que o soro de paciente infectado pelo HIV reconhece de maneira específica uma banda do tamanho esperado. Como controle negativo, utilizamos a proteína circunsporozoíta (CS) do protozoário *Plasmodium falciparum* (Figura 14, última canaleta) e não observamos nenhuma reatividade com o soro de paciente HIV⁺. Desses resultados podemos concluir que a proteína recombinante representando o trímero da gp140 produzida reteve a sua capacidade antigênica.

Figura 14. Reconhecimento da proteína recombinante gp140 pelo soro de paciente infectado pelo HIV-1. *Western Blot* após SDS-PAGE contendo três concentrações diferentes da proteína purificada (fração 2) na coluna de cobalto, em condições redutoras. Peso molecular em kDa a direita; CS= proteína circunsporozoíta (CS) de *Plasmodium falciparum*.

4.3. Avaliação da imunogenicidade do trímero de gp140

Inicialmente, afim de verificar se o trímero de gp140 que produzimos era imunogênico, realizamos um experimento de imunização utilizando camundongos da linhagem BALB/c. Os animais foram imunizados com a gp140 na presença do adjuvante completo de Freund (ACF) na primeira dose e do adjuvante incompleto de Freund (AIF) na segunda dose. O sangue foi coletado após cada dose e o soro estocado para realização do ensaio de ELISA para detecção de anticorpos específicos.

A Figura 15 mostra os títulos de anticorpos no soro dos camundongos imunizados com o trímero de gp140 na presença de ACF/AIF. Como pode ser observado, os camundongos imunizados responderam com elevados títulos de anticorpos contra a gp140 e esses títulos aumentaram após a segunda dose.

Figura 15. Títulos de anticorpos induzidos pela imunização com trímero gp140.

Camundongos BALB/c foram imunizados com 10µg de gp140 na presença de adjuvante completo de Freund pela via subcutânea. Quinze dias após a primeira dose, os animais foram imunizados novamente com o trímero na presença de adjuvante incompleto de Freund. Quinze dias após a última dose, foi realizado ensaio de ELISA com o soro dos animais imunizados utilizando a gp140 adsorvida na placa. O gráfico mostra o título de anticorpo (IgG total) em escala logarítmica após a 1ª e 2ª dose.

Desse resultado podemos concluir que o trímero de gp140 produzido é capaz de induzir uma resposta imune específica em camundongos BALB/c na presença do adjuvante completo de Freund.

4.4. Avaliação da influência da imunização inicial com HIVBr18 na resposta imune humoral ao trímero de gp140

Em seguida, para testarmos a hipótese do trabalho, grupos de camundongos BALB/c receberam uma imunização prévia (*prime*) com duas doses de 100µg da vacina de DNA que codifica os 18 epítomos para linfócitos TCD4⁺ (HIVBr18) ou vetor vazio (pVAX) pela via intramuscular. Posteriormente, os animais receberam 2 ou 3 doses de reforço (*boost*) com 10µg da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença de diferentes adjuvantes como, Adjuvante completo de Freund (ACF), adjuvante incompleto de Freund (AIF), poly IC e CpG ODN 1826, também com intervalo de quinze dias. O sangue foi coletado 15 dias após cada dose e o soro foi separado para a

realização do ensaio de ELISA para a detecção de anticorpos IgG total e subclasses.

Inicialmente fomos determinar o número mínimo de doses da proteína recombinante para induzir elevados títulos de anticorpos. Para tal, o sangue foi coletado 15 dias após cada dose e o soro separado para a realização do ensaio de ELISA para a detecção de anticorpos IgG total.

Como se pode observar na figura 16, camundongos imunizados com a gp140 na presença de adjuvante completo de Freund (ACF) ou dos adjuvantes como poly IC ou CpG ODN 1826 apresentaram títulos de anticorpos após a segunda e terceira dose estatisticamente superiores quando comparados aos títulos observados após a primeira dose. Não foi observado diferença estatística quando comparamos a segunda e a terceira dose, o que sugere que duas doses de gp140 são suficientes para atingir elevados títulos de anticorpos. Esse fenômeno foi observado nos animais que receberam pVAX ou HIVBr18 como *prime* (Figura 16 A e B respectivamente) independente do adjuvante testado (ACF, poly IC, CpG ODN 1826).

Figura 16. Imunização com o trímico induz elevados títulos de anticorpos na presença de diferentes adjuvantes. Camundongos BALB/c receberam duas imunizações com 100µg do vetor vazio pVAX (A) ou com HIVBr18 (B) e posteriormente receberam 3 doses com 10µg de gp140 na presença de diferentes adjuvantes. Posteriormente, foi realizado ensaio de ELISA com o soro dos animais imunizados utilizando a gp140 adsorvida na placa. O gráfico mostra os títulos de anticorpos (IgG total) em escala logarítmica após a 1ª, 2ª e 3ª dose. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Quando comparamos os títulos de anticorpos contra gp140 induzidos após o *prime* com pVAX ou HIVBr18, não observamos diferença na magnitude independente do adjuvante testado (Figura 17). Em contraste, soro dos animais dos grupos controles apresentaram títulos indetectáveis de anticorpos.

Desse experimento podemos concluir que o *prime* com HIVBr18 não foi capaz de aumentar a magnitude da resposta humoral direcionada à gp140 quando comparado ao *prime* com pVAX.

Figura 17. A imunização inicial com HIVBr18 não altera a magnitude da resposta humoral contra gp140 na presença de diferentes adjuvantes. Camundongos BALB/c foram imunizados 2 vezes com 100μg do vetor vazio pVAX ou com HIVBr18 e posteriormente receberam 3 doses com 10μg de gp140 na presença de ACF (A), poly IC (B) ou CpG ODN 1826 (C). Posteriormente, foi realizado ensaio de ELISA com o soro dos animais imunizados utilizando a gp140 adsorvida na placa. O gráfico mostra os títulos de anticorpos (IgG total) em escala logarítmica após a 1^a, 2^a e 3^a dose.

Quando analisamos as subclasses de imunoglobulinas no soro dos animais imunizados, observamos a presença das subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b (Figura 18). Esse padrão foi observado independente do adjuvante testado (ACF/AIF, poly IC ou CpG ODN 1826). Quando analisamos a influência do *prime* na qualidade da resposta humoral através da razão IgG1/IgG2a verificamos que, independente do adjuvante testado, os animais que receberam o *prime* com a vacina HIVBr18 apresentaram uma redução da razão IgG1/IgG2a, sugerindo maior direcionamento para um padrão Th1.

Figura 18. Imunização com o trímero gp140 na presença dos adjuvantes induz diferentes subclasses de imunoglobulinas (IgG). Camundongos BALB/c foram imunizados com 100µg do vetor vazio pVAX ou com HIVBr18 e posteriormente receberam 3 doses com 10µg de gp140 na presença de diferentes adjuvantes. Posteriormente, foi realizado ensaio de ELISA com o soro dos animais imunizados utilizando a gp140 adsorvida na placa. O gráfico mostra os títulos de anticorpos das diferentes subclasses (IgG1, IgG2a, IgG2b) em escala logarítmica após a 2ª dose.

A fim de avaliar se a ausência de efeito do *prime* com HIVBr18 na magnitude da resposta humoral poderia ser devido a grande quantidade de proteína utilizada nas imunizações (10ug) realizamos experimentos utilizando uma quantidade 10 e 100 vezes reduzida (1µg e 0,1µg) da proteína recombinante. Grupos de camundongos BALB/c receberam uma imunização prévia com duas doses de 100µg de HIVBr18 ou pVAX pela via intramuscular. Posteriormente, os animais receberam 2 doses de reforço com 1µg da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença dos adjuvantes: Adjuvante completo de Freund (ACF)/ adjuvante incompleto de Freund (AIF), poly IC, CpG ODN 1826, Alum, Ribi, MDP, R837 e R848, também com intervalo de quinze dias.

O sangue dos animais foi coletado 15 dias após cada dose e o soro separado para a detecção de anticorpos IgG total e subclasses.

Os camundongos imunizados com 1µg de gp140 na presença dos diferentes adjuvantes testados apresentaram baixos títulos de anticorpos após a primeira dose (título menor do que 2 Log₁₀) mas que aumentaram

significativamente após a segunda dose. Quando comparamos os títulos de anticorpos entre os grupos que receberam o *prime* com pVAX ou com HIVBr18, não observamos diferença estatística entre os grupos independente do adjuvante testado (Figura 19). Quando analisamos as subclasses de imunoglobulinas observamos que na maioria dos grupos que receberam o *prime* com HIVBr18 houve uma redução da razão IgG1/IgG2a sugerindo um maior direcionamento da resposta para um padrão Th1. Esse fenômeno pode ser observado quando foi utilizado como adjuvante ACF, poly IC, Alum, Ribi, MDP, R837 e R848 (Figura 20).

Figura 19. A imunização inicial com HIVBr18 não altera a magnitude da resposta humoral contra gp140 na presença de diferentes adjuvantes. Camundongos BALB/c receberam duas doses com 100µg do vetor vazio pVAX ou com HIVBr18 e posteriormente receberam 2 doses com 1µg de gp140 na presença de ACF, poly IC, CpG ODN 1826, Alum, Ribi, MDP, R837 e R848. Após a segunda dose, os títulos de anticorpos IgG total presentes no soro foram determinados por ELISA e estão apresentados em escala logarítmica.

Figura 20. A imunização com o tríplice induz diferentes subclasses de imunoglobulinas (IgG) na presença dos adjuvantes. Camundongos BALB/c receberam duas doses com 100µg do vetor vazio pVAX ou com HIVBr18 e posteriormente receberam 2 doses com 1µg de gp140 na presença de ACF, poly IC, CpG ODN 1826, Alum, Rib, MDP, R837 e R848. Após a segunda dose de proteína recombinante, os títulos de anticorpos das diferentes subclasses presentes no soro foram determinados por ELISA e estão apresentados em escala logarítmica.

Desses resultados podemos concluir que, de maneira similar ao observado com a dose de 10µg, o *prime* com HIVBr18 não induziu incremento na magnitude da resposta humoral gp140-específica. Todavia, o *prime* altera a qualidade da resposta imune gerada.

A análise da longevidade da resposta humoral foi avaliada através do ensaio de ELISA. Como é possível observar na figura 21, a resposta de anticorpos anti-gp140 não apresentou queda significativa, até 150 dias depois da administração da última dose, independente do *prime* e do adjuvante testado. O grupo imunizado com o adjuvante Rib, apresentou uma queda significativa nos títulos quando comparamos o período de 15 dias após a última dose com os demais tempos analisados.

Figura 21. A imunização inicial com HIVBr18 não altera a longevidade da resposta humoral contra gp140 na presença de diferentes adjuvantes. Camundongos BALB/c foram imunizados inicialmente com 100µg do vetor vazio pVAX ou com HIVBr18 e posteriormente receberam 2 doses com 1µg de gp140 na presença de ACF, poly C, CpG ODN 1826, Alum, Rib e MDP. Quinze, 45, 95 e 150 dias após a segunda dose, os títulos de anticorpos IgG total presentes no soro foram determinados por ELISA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

A afinidade dos anticorpos produzidos foi avaliada através do ensaio de ELISA de afinidade, variando as concentrações de tiocianato de amônio (0 à 8 M). A constante de dissociação foi determinada considerando a concentração de tiocianato de amônio necessária para dissociar 50% dos anticorpos ligados. A figura 22 mostra que o *prime* não influenciou na afinidade dos anticorpos gerados e esse fenômeno foi independente do adjuvante testado.

Figura 22. A imunização inicial com HIVBr18 não influencia na afinidade dos anticorpos produzidos contra gp140 na presença de diferentes adjuvantes. Camundongos BALB/c foram imunizados inicialmente com 100µg do vetor vazio pVAX ou com HIVBr18 e posteriormente receberam 2 doses com 1µg de gp140 na presença de ACF, poly IC, CpG ODN 1826, Alum, Ribi, MDP, R837 e R848. Quinze dias após a segunda dose, a afinidade dos anticorpos (IgG total) presentes no soro foi determinada por ELISA de afinidade, variando as concentrações do tiocianato de amônio de 0 à 8 M.

Uma vez que no experimento anterior com uma dose mais baixa (1ug/animal) não foi observado o efeito do *prime* com HIVBr18 na magnitude da resposta humoral, resolvemos testar com uma dose cem vezes mais baixa que a testada no início do trabalho. Para tal, os animais receberam uma imunização prévia com 100µg de HIVBr18 ou pVAX e posteriormente, receberam duas doses de reforço com 0,1µg da proteína recombinante gp140 na presença dos adjuvantes: poly IC, CpG ODN 1826 ou Alum.

Nesse experimento administramos uma dose a mais, totalizando 3 doses, devido aos baixos títulos de anticorpos observados após segunda dose. Os camundongos imunizados com a gp140 na presença dos adjuvantes poly IC, CpG ODN ou Alum, também apresentaram títulos de anticorpos elevados, mas não foi possível observar diferença quando comparamos os títulos de anticorpos entre os grupos que receberam o *prime* com pVAX ou HIVBr18 (dados não mostrados).

Com base nos resultados obtidos até agora, podemos concluir que a imunização prévia com HIVBr18 não alterou a magnitude da resposta imune humoral contra o tríplice gp140, mesmo com a quantidade de proteína reduzida em 10 e 100 vezes e independente do adjuvante testado. O *prime* com HIVBr18 foi capaz de alterar a qualidade da resposta humoral, direcionando-a para uma resposta do tipo Th1.

Em seguida, fomos avaliar a resposta humoral direcionada à gp140 após o *prime* com HIVBr18 ou pVAX e boost com o tríplice de gp140 na ausência de adjuvante. Na ausência de adjuvante, a resposta humoral anti-gp140 foi significativamente inferior ($p < 0,0001$) quando comparado a mesma induzida na presença de adjuvantes (dados não mostrados).

4.5. Avaliação da influência da imunização inicial com HIVBr18 na resposta imune celular à gp140

Após a avaliação da influência do *prime* com HIVBr18 na resposta imune humoral fomos verificar se este poderia influenciar na resposta imune celular gp140-específica. Para tal, 15 dias após a última dose, os animais foram sacrificados e a produção de IFN γ pelos esplenócitos foi avaliada por ELISPOT (figura 23). As células do baço dos animais imunizados foram re-estimuladas *in vitro* com um peptídeo específico para o epítipo da gp140 (env4: gp160 (188-201)- NTSYRLISCNTSVI) que se encontra presente na vacina HIVBr18 e na proteína recombinante gp140. Esse epítipo, denominado env4 foi selecionado a partir de resultados anteriores do grupo (Rosa et al., 2011) onde observamos que o mesmo foi capaz de induzir produção de IFN γ / IL-2 e proliferação de linfócitos TCD4 $^{+}$ / CD8 $^{+}$ nos animais imunizados com HIVBr18. Na figura 23 A podemos observar que o baço dos animais que receberam o *prime* com

HIVBr18 e depois 10 μ g de gp140 na presença de poly IC apresentou maior número de células produtoras de IFN- γ específicas para o peptídeo env4 quando comparado ao grupo que recebeu pVAX como *prime* ($p < 0,0001$). Já nos grupos que receberam como adjuvante ACF/AIF essa diferença não foi significativa, ou seja, a resposta foi independente do *prime* (pVAX ou HIVBr18). Em relação ao grupo imunizado com CpG ODN o número de células produtoras de IFN γ foi inferior ao *cut off*.

Quando analisamos a resposta direcionada à gp140 recombinante, o número de células produtoras de IFN- γ foi independente do *prime* e do adjuvante testado (figura 23 B).

Figura 23. A imunização inicial com a vacina HIVBr18 e com a proteína recombinante gp140 na presença de diferentes adjuvantes é capaz de induzir produção de IFN- γ . Camundongos BALB/c foram imunizados inicialmente com 100 μ g do vetor vazio pVAX ou com HIVBr18 e posteriormente receberam 2 doses com 10 μ g de gp140 na presença de ACF/AIF, poly IC ou CpG ODN 1826. Posteriormente, o baço de cada animal foi removido e os esplenócitos cultivados, (A) na presença do peptídeo env4 do HIV-1 (5 μ M) ou (B) da proteína recombinante gp140 (5 μ g/mL), por 18h, a fim de avaliar a produção de IFN- γ pelo ensaio de ELISPOT. Respostas acima do limiar de 15 spots/10⁶ células foram consideradas positivas. *** $p < 0,0001$, NS: não significativo.

Apesar de só termos observado uma diferença significativa no grupo que recebeu o *prime* com HIVBr18 e posterior imunização com gp140 e poly IC

podemos observar que de uma maneira geral, o *prime* com HIVBr18 apresentou uma tendência a aumentar a resposta imune celular à gp140.

O mesmo tipo de análise foi feito com esplenócitos dos animais que receberam como boost 10 ou 100x menos trímero de gp140 (1 e 0,1µg, respectivamente) na presença de diferentes adjuvantes. Assim como o observado anteriormente, o *prime* com HIVBr18 e posterior imunização com 1µg gp140 na presença de poly IC foi capaz de aumentar o número de células produtoras de IFN γ específicas para o peptídeo env4. O mesmo não foi observado para o experimento que utilizou 0,1µg de gp140 uma vez que a magnitude da resposta ficou abaixo do cutoff (dados não mostrados).

Conjuntamente, esses dados sugerem que a resposta imune celular gp140-específica foi dependente do *prime* com HIVBr18 quando utilizamos o adjuvante poly IC. Em contrapartida, quando utilizamos outros adjuvantes observamos uma tendência a esse mesmo fenômeno porém não foi estatisticamente diferente.

Em seguida, fomos avaliar a resposta celular direcionada à gp140 após o *prime* com HIVBr18 ou pVAX e boost com o trímero de gp140 na ausência de adjuvante. A análise da resposta celular mostrou que na ausência de um adjuvante e com imunização inicial com a HIVBr18 houve produção de IFN γ direcionada ao peptídeo específico env4 (figura 24). Já nos animais que receberam o *prime* com pVAX esse fenômeno não foi observado.

Figura 24. A imunização inicial com a vacina HIVBr18 e com a proteína recombinante gp140 na ausência de adjuvante é capaz de induzir produção de IFN- γ . Camundongos BALB/c foram imunizados inicialmente com 100 μ g do vetor vazio pVAX ou com HIVBr18 e posteriormente receberam 2 doses com 10 μ g de gp140 na ausência de adjuvante. Posteriormente, o baço de cada animal foi removido e os esplenócitos colocados em cultura, na presença do peptídeo env4 do HIV-1 (5 μ M), por 18h, a fim de avaliar a produção de IFN- γ pelo ensaio de ELISPOT. Respostas acima do limiar de 15 *spots*/10⁶ células foram consideradas positivas. **p<0,001

Após a avaliação da influência do *prime* na produção de IFN γ fomos verificar se este poderia influenciar proliferação de linfócitos específicos para a gp140. Quinze dias após a última dose, os animais foram sacrificados e a proliferação celular foi avaliada por citometria de fluxo através da diluição de CFSE. As células do baço dos animais imunizados foram re-estimuladas *in vitro* com o peptídeo env4.. A estratégia de “*gate*” utilizada para avaliação da resposta proliferativa está mostrada na Figura anexa 1 . Os animais que receberam o pVAX como *prime* não apresentaram proliferação específica de LT CD4⁺ (figura 25 A) e T CD8⁺ (figura 25 B) significativa para o peptídeo env4, já os animais que receberam o *prime* com HIVBr18 apresentaram proliferação específica de LTCD4⁺ e LTCD8⁺ para o peptídeo adicionado em cultura. Esse fenômeno foi observado na presença dos adjuvantes ACF/AIF, poly IC e CpG ODN 1826.

Figura 25. Avaliação da proliferação celular específica utilizando citometria de fluxo. Camundongos BALB/c foram imunizados inicialmente com 100µg do vetor vazio pVAX ou com HIVBr18 e posteriormente receberam 2 doses com 10µg de gp140 na presença de ACF/AIF; poly IC e CpG ODN 1826. Posteriormente, o baço de cada animal foi removido, as células foram marcadas com a concentração de 1,25uM de CFSE e incubadas por 5 dias na presença do peptídeo env4 do HIV-1 (5µM). A proliferação das células T CD4⁺ (A) e células T CD8⁺ (B) estão representadas em porcentagem.

Em outro experimento independente onde os animais receberam a imunização inicial com o 100µg de pVAX ou HIVBr18 e posteriormente duas doses de 1µg da proteína recombinante gp140 na presença de adjuvantes, avaliamos simultaneamente a proliferação e a produção de citocinas intracelulares. Para tal, utilizamos a citometria de fluxo multiparamétrica, já

mencionada anteriormente e a estratégia de “gates” utilizada está demonstrada na figura anexa 1.

Como ser observado na figura 26, esplenócitos de animais que receberam a imunização inicial com a vacina HIVBr18 apresentaram uma maior porcentagem de células T CD4⁺ que proliferam e produzem as citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α simultaneamente (figuras 26 A, B e C, respectivamente) quando comparados com esplenócitos dos animais que receberam pVAX. Esse fenômeno foi observado na presença dos adjuvantes poly IC, CpG ODN, Alum, MPL e MDP. Para os LTCD8⁺ a magnitude foi inferior e não observamos diferença nos esplenócitos dos animais que receberam como *prime* o HIVBr18 ou pVAX, independente do adjuvante testado (dados não mostrados).

Esses dados sugere que a vacina HIVBr18 fornece um auxílio cognato para a resposta imune celular antígeno específica.

Figura 26. Avaliação da proliferação e produção de citocina intracelular específica pelos LT CD4⁺. Camundongos BALB/c foram imunizados inicialmente com 100 μ g do vetor vazio pVAX ou com HIVBr18 e posteriormente receberam 2 doses com 1 μ g de gp140 na presença de ACF/AIF; poly IC; CpG ODN 1826; Alum; MPL e MDP. Posteriormente, o baço de cada animal foi removido, as células foram marcadas com a concentração de 1,25uM de CFSE e incubadas na presença do peptídeo env4 do HIV-1 (5 μ M). A produção das citocinas INF- γ (A), IL-2 (B) e TNF- α (C) na população de LTCD4⁺ que proliferam está representada em porcentagem.

4.6. Avaliação da influência da imunização inicial com o plasmídeo Yu2-gp140 na resposta imune ao trímero de gp140

Como o *prime* com a vacina de epítomos de linfócitos T CD4⁺ HIVBr18 não influenciou a magnitude da resposta humoral gp140- específica, fomos avaliar se uma imunização inicial com a vacina de DNA que codifica o trímero gp140 (Yu2-gp140) poderia aumentar a resposta específica. Essa estratégia de utilizar um vetor no *prime* e depois utilizar outro vetor no *boost*, ambos codificando o mesmo antígeno, é denominado *prime-boost* heterólogo.

Grupos de camundongos BALB/c receberam uma imunização inicial de uma, duas ou três doses de 100µg do DNA Yu2-gp140 pela via intramuscular. Posteriormente, os animais receberam uma, duas ou três doses com 10µg da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença do adjuvante poly IC (tabela 3) também com intervalo de quinze dias.

Tabela 3: Esquema de imunização com o DNA Yu-2 gp140 e a proteína recombinante gp140.

1ª dose	2ª dose	3ª dose
Yu2-gp140	Yu2-gp140	Yu2-gp140
gp140+poly IC	gp140+poly IC	gp140+poly IC
Yu2-gp140	Yu2-gp140	gp140+poly IC
Yu2-gp140	gp140+poly IC	gp140+poly IC

O sangue dos animais foi coletado 15 dias após cada dose e o soro separado para detecção de anticorpos IgG total e subclasses.

Os animais que receberam 3 doses de DNA apresentaram títulos de anticorpos gp140-específicos significativamente inferiores ($p < 0,0001$) quando comparado aos demais grupos (figura 27). Em contraste, os animais que receberam 3 doses de proteína com o adjuvante poly IC apresentaram elevados títulos de anticorpos (IgG) e que não diferiram com os que receberam como *prime* uma ou 2 doses de DNA Yu2-gp140 seguido de 1 ou 2 doses da gp140 em poly IC (figura 27).

Figura 27. A imunização inicial com DNA que codifica a gp140 não aumenta a magnitude da resposta imune humoral independente do número de doses administradas. Camundongos BALB/c receberam imunização prévia com uma, duas ou três doses de 100µg da vacina de DNA que codifica a gp140 (Yu2-gp140). Posteriormente, os animais receberam 10µg da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença do adjuvante poly I:C. Com o soro dos animais imunizados foi realizado o ensaio de ELISA. Os títulos de anticorpos IgG total estão apresentados em escala logarítmica. *** $p < 0,0001$.

Afim de determinar se os diferentes protocolos de imunização seriam capazes de induzir a diferenciação em células T auxiliares foliculares (THF) e de células B do centro germinativo (CG), os linfonodos inguinais e poplíteos dos camundongos imunizados foram retirados e processados conforme descrito no item metodologia. Os animais que receberam 3 doses de DNA (Yu2-gp140) apresentaram frequência baixa de células THF e também de células B do centro germinativo (CG). Já os animais que receberam a proteína recombinante gp140 com o adjuvante poly I:C independente do número de doses apresentaram frequência superior de células THF e CG (figura 28 A e B, respectivamente). Como demonstrado na figura 28C, observamos uma correlação positiva entre a frequência de células THF e CG ($R=0,84$; $p=0,0005$).

Figura 28. A imunização inicial com DNA que codifica a gp140 não altera a frequência de células B do centro germinativo e T auxiliar foliculares independente do numero de doses administradas. Camundongos BALB/c receberam ou não a imunização inicial com 100µg da vacina de DNA Yu2-gp140. Posteriormente, os animais receberam ou não, 10µg da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença do adjuvante poly I:C.. (A) Frequência das células T auxiliares (THF) e (B) células B do centro germinativo; (C) gráfico de correlação entre as populações THF e CG. *** $p<0,0005$.

Para complementar os dados acima, realizamos o ensaio de ELISPOT para células B, onde verificamos as células secretoras de anticorpo IgG-

específicos. Para a realização deste ensaio, os esplenócitos recém isolados foram colocados em cultura por 16 horas para a detecção das células secretoras de imunoglobulinas. Os animais que receberam 3 doses de DNA apresentaram número de células secretoras de anticorpos gp140-específicos significativamente inferiores ($p < 0,0001$) quando comparado ao grupo que recebeu 3 doses da proteína recombinante com o adjuvante poly IC (figura 29). Os animais que receberam 3 doses de proteína com o adjuvante poly IC apresentaram número de células secretoras de anticorpos (IgG) significativamente superiores ($p < 0,001$) quando comparado com os animais que receberam como *prime* uma ou 2 doses de DNA Yu2-gp140 seguido de uma ou duas doses de gp140+ poly IC (figura 31).

Figura 29. A imunização inicial com o plasmídeo Yu2-gp140 não altera o número de células secretoras de anticorpos gp140-específicos. Camundongos BALB/c receberam ou não a imunização inicial com 100µg da vacina de DNA Yu2-gp140. Posteriormente, os animais receberam ou não, 10µg da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença do adjuvante poly IC. Posteriormente, o baço de cada animal foi removido e os esplenócitos colocados em cultura por 16 horas, a fim de avaliar o número de células secretoras de anticorpo gp140-específica. ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Com esses dados apresentados acima, podemos concluir que a imunização prévia com o DNA que codifica para gp140, não é capaz de aumentar a magnitude da resposta humoral gerada após imunização, quando

comparamos com o grupo que recebeu a proteína gp140 na presença de poly IC independente do número de doses.

Posteriormente, fomos avaliar se uma imunização prévia com a vacina de DNA que codifica para gp140 seria capaz de fornecer auxílio cognato e dessa maneira influenciar a resposta imune celular gp140-específica. Os camundongos foram imunizados com o mesmo esquema apresentado acima. Quinze dias após a última dose, os animais foram sacrificados e a produção de IFN γ pelos esplenócitos foi avaliada por ELISPOT. As células do baço dos animais imunizados foram re-estimuladas *in vitro* com a proteína gp140. Os animais que receberam 3 doses de DNA apresentaram número de células produtora de IFN- γ inferiores quando comparado com os demais grupos (Figura 30). O grupo de animais que recebeu 3 doses da proteína recombinante com o adjuvante poly IC não apresentou diferença significativa no número de células produtoras de IFN- γ quando comparado com os grupos que receberam uma ou duas dose de DNA, seguido de gp140 com o adjuvante poly IC.

Figura 30. A imunização inicial com DNA que codifica a proteína Gp140 não altera a produção de IFN- γ independente do numero de doses administradas. Camundongos BALB/c receberam ou não a imunização inicial com 100 μ g da vacina de DNA Yu2-gp140. Posteriormente, os animais receberam ou não, 10 μ g da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença do adjuvante poly I:C. Quinze dias após a última dose, o baço de cada animal foi removido e os esplenócitos colocados em cultura, na presença da proteína gp140 (5 μ g/mL), por 18h, a fim de

avaliar a produção de IFN- γ pelo ensaio de ELISPOT. Respostas acima do limiar de 15 spots/10⁶ células foram consideradas positivas.

Em seguida, avaliamos se a imunização inicial com a vacina de DNA que codifica a gp140 seria capaz de induzir a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ específicos. A estratégia de “gate” utilizada para avaliação da resposta proliferativa se encontra na figura anexa 1. Observamos que animais imunizados de todos os grupos apresentaram LT CD4⁺ (figura 31 A) e T CD8⁺ (figura 31 B) capazes de proliferar após re-estímulo *in vitro* com a proteína recombinante gp140. Quando comparamos os diferentes grupos, não observamos diferença na porcentagem de LTCD4⁺ que proliferaram (figura 31A). Entretanto, ao comparar a população de LTCD8⁺ (figura 31B) verificamos uma maior proliferação desse subtipo celular no grupo de animais que recebeu 3 doses do DNA Yu2-gp140 quando comparado ao grupo que recebeu 3 doses da gp140+ poly IC ou 1 dose de DNA combinada a 2 doses de gp140+ poly IC .

Figura 31. Avaliação proliferação celular específica por citometria de fluxo.

Camundongos BALB/c receberam ou não a imunização inicial com 100 μ g da vacina de DNA Yu2-gp140. Posteriormente, os animais receberam ou não, 10 μ g da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença do adjuvante poly I:C. Posteriormente, o baço de cada animal foi removido e os esplenócitos colocados em cultura, na presença da proteína gp140 (5 μ g/mL) a fim de avaliar a proliferação específica pelo ensaio de CFSE. A frequência das células estão representadas em porcentagem (%). *p<0,05.

4.7. Influência de diferentes adjuvantes na resposta imune ao trímero de gp140

Afim de avaliar somente a influência da administração dos diferentes adjuvantes na resposta contra gp140, os animais foram imunizados com 10ug da proteína recombinante gp140 na presença dos adjuvantes ACF/AIF, poly IC, CpG ODN 1826, Alum, MPL, MDP, R837 e R848. Posteriormente, analisamos os títulos de anticorpos, a frequência de células B do centro germinativo (CG), a frequência de células T auxiliar foliculares (THF), produção da citocina IFN- γ e a proliferação de LT CD4⁺ e T CD8⁺.

Na figura 32 podemos observar que o soro dos animais imunizados com a gp140 na presença de ACF/AIF apresentou títulos de anticorpos significativamente do que o soro dos animais imunizados com poly IC, Alum, MDP, R837 e R848. O soro dos animais que receberam a gp140 na presença do adjuvante CpG ODN apresentou títulos de anticorpos significativamente superiores ao dos animais que receberam a gp140 na presença dos adjuvantes Alum, MDP, R837 e R848. Já os animais que receberam a gp140 na presença do adjuvante MPL, apresentaram títulos de anticorpos significativamente mais elevados do que os animais imunizados na presença dos adjuvantes MDP, R837 e R848.

Figura 32. A imunização com a proteína gp140 na presença dos adjuvantes induz elevados títulos de anticorpos. Camundongos BALB/c receberam 2 doses de 10µg da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença dos adjuvantes ACF/AIF; poly I:C, CpG ODN, Alum, MPL, MDP, R837 ou R848. Após a segunda dose, os títulos de anticorpos IgG total presentes no soro foram determinados por ELISA e estão apresentados em escala logarítmica. **p<0,001, ***p<0,0001.

Quando analisamos as subclasses de imunoglobulinas observamos que a proteína recombinante gp140 na presença dos adjuvantes induziu elevados títulos das subclasses IgG1 e IgG2a. Pela análise da razão IgG1/IgG2a observamos que alguns adjuvantes como o ACF/AIF, poly IC, CpG induziram uma resposta imune mais direcionada para um padrão do tipo Th1 (menor razão IgG1/IgG2a). Em contraste, o alum, MDP e R848 induziram uma maior razão IgG1/IgG2a o que sugere um direcionamento da resposta para um padrão Th2. (Figura 33).

Figura 33. A imunização com o tríplice na presença dos adjuvantes induz diferentes subclasses de imunoglobulinas (IgG). Camundongos BALB/c receberam 2 doses de 10µg da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença dos adjuvantes ACF/AIF; poly I:C, CpG ODN, Alum, MPL, MDP, R837 ou R848. Após a segunda dose, os títulos de anticorpos das diferentes subclasses de IgG presentes no soro foram determinados por ELISA e estão apresentados em escala logarítmica.

A afinidade dos anticorpos produzidos foi avaliada através do ensaio de ELISA de afinidade, variando as concentrações de tiocianato de amônio (0 à 8 M). A figura 34 mostra que os anticorpos gerados na presença de CpG ODN 1826 apresentaram uma afinidade estatisticamente inferior aquela observada dos anticorpos produzidos na presença dos outros adjuvantes.

Figura 34. A imunização com o trímico na presença de diferentes adjuvantes gera anticorpos específicos de alta afinidades. Camundongos BALB/c receberam 2 doses com 10 μ g de gp140 na presença de ACF, poly I:C, CpG ODN 1826, Alum, MPL, MDP, R837 e R848. Quinze dias após a segunda dose, a afinidade dos anticorpos (IgG total) presentes no soro foi determinado por ELISA de afinidade, variando as concentrações do tiocianato de amônio de 0 à 8 M. *** $p < 0,0001$.

Após verificarmos que a imunização com a proteína gp140 na presença dos adjuvantes era capaz de gerar elevados títulos de anticorpos, analisamos também a capacidade de induzir células B do centro germinativo (CG) e células T auxiliar foliculares (THF). Os animais imunizados com a gp140 na presença dos diferentes adjuvantes apresentaram frequência das células do centro germinativo superior a 3% (figura 35 A). Os animais imunizados na presença do adjuvante R848 apresentaram frequência estatisticamente superior ao dos animais imunizados na presença de Alum e CpG ODN 1826. Quando analisamos a frequência de células TCD4⁺ auxiliar foliculares (THF) observamos uma frequência semelhante nos linfonodos dos animais imunizados (figura 35B). A figura 35C mostra que existe uma correlação positiva ($r=0,47$) entre a frequência de células B do centro germinativo e as células T auxiliar foliculares.

Figura 35. A imunização com a proteína gp140 na presença de diferentes adjuvantes é capaz de induzir a formação de células do centro germinativo (CG) e células T auxiliar foliculares (THF). Os camundongos BALB/c receberam 10µg da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença dos adjuvantes: ACF/AIF, poly IC, CpG ODN, Alum, MPL, R837 ou R848. Quinze dias após a última dose, os linfonodos drenantes foram retirados e a frequência de células B do centro germinativo (CG) e células T auxiliar foliculares (THF) foi determinada por citometria de fluxo. (A) Frequência de células B do centro germinativo e T auxiliar foliculares (B); (C) correlação entre as frequências dos subtipos celulares.* $p < 0,05$.

Uma vez que a proteína gp140 na dose mais alta (10ug) estava induzindo elevados títulos de anticorpos específicos, fomos verificar se com uma dose mais baixa, o padrão seria o mesmo. Para tal, utilizamos 1ug e da proteína recombinante gp140 em um experimento independente e utilizamos os seguintes adjuvantes: ACF/AIF, poly IC, CpG ODN 1826, Alum, MPL, MDP, R837 ou R848 (figura 36). Como podemos observar, a imunização com a gp140 na presença do diferentes adjuvantes foi capaz de induzir elevados títulos de anticorpos e algumas diferenças estatísticas significativas foram observadas. A imunização na presença de MPL foi capaz de induzir títulos de

anticorpos superiores quando comparado com os demais adjuvantes. Em contraste, o soro dos animais imunizados com alum apresentaram títulos de anticorpos significativamente inferiores quando comparados com o grupo imunizado com ACF, poly IC, CpG, Alum e MPL. Os animais imunizados na presença dos adjuvantes poly IC e CpG ODN 1826 apresentaram título de anticorpo superior daquela observada nos grupos imunizados com Alum, MDP, R837 e R848 (Figura 36).

Figura 36. A imunização com a proteína gp140 na presença de diferentes adjuvantes induz elevados títulos de anticorpos. Camundongos BALB/c receberam 1µg da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença dos adjuvantes: ACF/AlF, poly IC, CpG ODN, Alum, MPL, MDP, R837 ou R848. Os títulos de anticorpos IgG total presentes no soro foram dosados por ELISA e estão apresentados em escala logarítmica. **p<0,001 ***p<0,0001.

Em seguida avaliamos a presença de células secretoras de IgG gp140-específico (no linfonodo e no baço) e da citocina IFN- γ através do ensaio de ELISPOT para células B e T, respectivamente. Quando células dos linfonodos provenientes dos camundongos imunizados foram colocados em cultura, observamos um maior número de células produtoras de IgG-

específica nos animais que foram imunizados com a gp140 na presença de R848, R837 e CpG ODN (figura 37A). No baço observamos o mesmo padrão de resposta embora com magnitude inferior (figura 37B).

Figura 37. A imunização com a proteína gp140 na presença dos diferentes adjuvantes induz células secretoras de anticorpos IgG gp140-específicos. Camundongos BALB/c foram imunizados com 10µg da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença dos adjuvantes: CFA/IFA; poly IC, CpG ODN1826, Alum, MPL, MDP, R837 ou R848. Posteriormente, os linfonodos (A) e o baço (B) de cada animal foram removidos e as células colocadas em cultura por 16 horas, a fim de avaliar o número de células secretoras de anticorpos específicos. *p<0,05, **p<0,001, ***p<0,0001.

Em seguida avaliamos a secreção de IFN- γ através de ensaio de ELISPOT. Quando esplenócitos provenientes de camundongos imunizados com a proteína recombinante gp140 na presença dos adjuvantes foram re-estimulados *in vitro* com a gp140 observamos uma secreção significativa dessa citocina (Figura 38). O grupo de animais que recebeu o adjuvante poly IC apresentou uma produção significativamente superior quando comparado aos demais grupos. Já o grupo que recebeu o adjuvante CpG ODN apresentou diferença significativa com os grupos que receberam os adjuvantes Alum, MDP, R837 e R848.

Figura 38. A imunização com a proteína recombinante gp140 na presença de diferentes adjuvantes induz a produção de IFN- γ . Camundongos BALB/c receberam a imunização com 10 μ g da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença dos adjuvantes: CFA, poly I:C, CpG ODN, Alum, MPL, MDP, R837 e R848. Posteriormente, o baço de cada animal foi removido e os esplenócitos colocados em cultura, na presença da proteína gp140 (5 μ g/mL), por 18h, a fim de avaliar a produção de IFN- γ pelo ensaio de ELISPOT. Respostas acima do limiar de 15 spots/10⁶ células foram consideradas positivas. *p<0,05, **p<0,001, ***p<0,0001.

Avaliamos também a capacidade do nosso protocolo de imunização em induzir proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ específicos. A estratégia de “gate” utilizada para avaliação da resposta proliferativa está demonstrada na figura anexa 1. Após o re-estímulo *in vitro* com a proteína recombinante gp140, observamos na figura 39 que ambos os LT CD4⁺ (figura 39 A) e T CD8⁺ (figura 39 B) apresentaram proliferação específica.

Figura 39. Avaliação da proliferação específica pelos LT CD4⁺ e CD8⁺ por citometria de fluxo. Camundongos BALB/c receberam 10µg da proteína recombinante gp140 pela via subcutânea na presença dos adjuvantes ACF, poly IC, CpG ODN, Alum, MPL, MDP, R837 e R848. Posteriormente, o baço de cada animal foi removido e os esplenócitos cultivados, na presença da proteína gp140 (5µg/mL), a fim de avaliar a proliferação específica através da diluição do CFSE. A frequência das células estão representadas em porcentagem (%).

Em seguida fomos avaliar se a imunização com a proteína gp140 na presença dos adjuvantes seria capaz de induzir células produtoras de citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Através da citometria de fluxo multiparamétrica, observamos que a imunização foi capaz de gerar LT CD4⁺ (figura 40 A, B e C, respectivamente) e LTCD8⁺ (Figura 41 A, B, e C respectivamente) produtores das citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Na figura 40 podemos observar que os animais que receberam o adjuvante CpG ODN apresentaram uma maior porcentagem de LTCD4⁺ produtores de citocinas. Essa porcentagem foi significativamente superior quando avaliada a produção de IL-2 quando comparada com a observada no grupo que recebeu o adjuvante Alum (figura 40 B). Os LTCD4⁺ dos animais que receberam o adjuvante CpG ODN apresentaram maior produção da citocina TNF- α (figura 40 C) quando comparados aos demais grupos. Em relação a produção de citocinas pelos LT CD8⁺ (figura 41) não observamos diferença estatística entre os grupos avaliados.

Figura 40. Avaliação da produção de citocinas intracelulares específica por LT CD4⁺ utilizando citometria de fluxo multiparamétrica. Camundongos BALB/c foram imunizados inicialmente com receberam 2 doses com 10 μ g de gp140 na presença de ACF/AIF, poly IC, CpG ODN 1826, Alum, MPL, MDP, R837 ou R848. Posteriormente, o baço de cada animal foi removido, as células foram marcadas com 1,25 μ M de CFSE e incubadas na presença de gp140 (5 μ g/mL). A produção das citocinas INF- γ (A), IL-2 (B) e TNF- α (C) estão representadas em porcentagem (%). *p<0,05.

Figura 41. Avaliação da produção de citocinas intracelulares específica pelos LT CD8⁺ utilizando citometria de fluxo multiparamétrica. Camundongos BALB/c foram imunizados inicialmente com receberam 2 doses com 10 μ g de gp140 na presença de ACF/AIF, poly IC, CpG ODN 1826, Alum, MPL, MDP, R837 ou R848. Posteriormente, o baço de cada animal foi removido, as células foram marcadas com 1,25 μ M de CFSE e incubadas na presença de gp140 (5 μ g/mL). A produção das citocinas IFN- γ (A), IL-2 (B) e TNF- α (C) estão representadas em porcentagem (%).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os anticorpos neutralizantes (nAbs) fazem parte da resposta imune protetora induzida por todas as vacinas eficazes que fazem parte atualmente do calendário vacinal. De maneira similar, uma vacina ideal capaz de prevenir a infecção pelo HIV, deverá induzir uma resposta humoral composta de anticorpos neutralizantes, anticorpos ligadores e resposta celular. Embora a infecção natural e a imunização com proteínas do envelope viral (Env) consiga induzir nAbs, esses anticorpos que possuem a capacidade de neutralizar diferentes cepas de HIV não são comuns e nem de longa duração. O efeito protetor dos nAbs na infecção pelo HIV pode ser observado em estudos que mostraram que a administração passiva de anticorpos monoclonais é capaz de conferir proteção significativa em macacos desafiados com o Vírus da Imunodeficiência Símio-Humana (SHIV) (Mascola, 2002, Mascola and Montefiori, 2010, Montefiori and Mascola, 2009) e camundongos humanizados desafiados com o HIV (Klein et al., 2012, Diskin et al., 2013). Assim, um dos maiores desafios no campo da vacinologia do HIV é desenvolver imunógenos que induzam a produção de anticorpos capazes de neutralizar ou de se ligarem amplamente ao HIV (Mascola and Montefiori, 2010). Mais recentemente, outros tipos de anticorpos demonstraram seu importante papel na proteção como os que são capazes de (i) agregar os vírions e impedir o movimento através das camadas epiteliais (Hladik and Hope, 2009); (ii) os que se ligam aos receptores Fc nos monócitos e células NK e participam do processo de ADCC (Florese et al., 2009); (iii) os que inibem o HIV via ADCVI (Forthal et al., 2005, Hladik and Hope, 2009) ou (iv) que se ligam aos FcR e induzem quimiocinas e outros fatores antivirais (DeVico and Gallo, 2004).

As tentativas iniciais de induzir uma resposta humoral eficaz contra o HIV utilizando a glicoproteína do env monomérica (gp120) administrada com hidróxido de alumínio- Alum (VAX04) foram ineficientes, não sendo, portanto, capazes de conferir proteção. Em contraste, os resultados recentes do último ensaio clínico de eficácia realizado (RV144) mostraram que esquemas de imunização que incluem a proteína Env como reforço (*boost*) e indução (*prime*) com vetor viral, diminui o risco de aquisição do HIV em

aproximadamente 30% (Rerks-Ngarm et al., 2009). A análise da resposta imune dos indivíduos vacinados mostrou que elevados títulos de anticorpos específicos para a região da alça V2 do vírus correlaciona com uma diminuição do risco de infecção pelo HIV. Esse mecanismo de proteção mediado pelos anticorpos anti-V2 ainda é desconhecido, porém sabe-se que não é dependente de sua atividade neutralizante (Gorny et al., 2012).

No presente trabalho, avaliamos o efeito de uma imunização inicial (*prime*) com uma vacina de DNA codificando epítomos para linfócitos T CD4⁺ do HIV (HIVBr18) na magnitude e qualidade da resposta imune induzida contra uma proteína recombinante que representa o trímero da proteína envelope (gp140) do HIV. Experimentos de imunização feitos em camundongos BALB/c mostraram que a administração inicial (*prime*) da vacina HIVBr18 não altera a magnitude da resposta imune humoral específica para a gp140 independente do adjuvante e da quantidade de proteína recombinante utilizada. Ao que tange a qualidade da resposta humoral, observamos que no grupo imunizado previamente com a HIVBr18 houve uma tendência para maior indução de resposta específica de padrão Th1. Quando imunizamos os animais na ausência de adjuvantes, só observamos resposta celular específica quando os animais receberam o *prime* com HIVBr18. Além disso, avaliamos o efeito das diferentes formulações de adjuvantes e observamos que formulações de adjuvantes licenciados para uso em humanos podem ser utilizados uma vez que foram capazes de induzir títulos de anticorpos de magnitude similar a observada após imunização na presença do adjuvante completo de Freund, considerado padrão ouro.

As tentativas iniciais de produzir trímeros da glicoproteína do envelope (gp140) do HIV-1 foram frustradas, porém diversos estudos mostraram que modificações na sequência facilitam a solubilização e estabilidade do trímero de gp140 (Yang et al., 2000, Yang et al., 2002). Inicialmente nesse trabalho, fomos capazes de produzir uma proteína recombinante representando o trímero da gp140 do HIV-1 (figura 13). O gene (Yu2gp140) que codifica para a gp140 foi otimizado (figura 10) (Yang et al., 2002, Yang et al., 2000) e sofreu algumas modificações com o objetivo de aumentar a estabilidade do trímero e facilitar a solubilidade do mesmo. Esse trímero de gp140 também

vem sendo utilizado com o objetivo de isolar células B capazes de produzir anticorpos neutralizantes de indivíduos infectados que conseguem controlar a viremia e não progridem para AIDS (Scheid et al., 2011, Mouquet et al., 2011, Walker et al., 2009, Walker et al., 2011).

Uma vez que conseguimos produzir a proteína recombinante fomos testar se a capacidade antigênica da mesma foi mantida. Conforme mostrado na figura 14, soro de paciente infectado pelo HIV-1 reconheceu de maneira específica à proteína recombinante produzida. Em seguida avaliamos se o trímero de gp140 produzido era imunogênico, ou seja, capaz de induzir uma resposta imune antígeno-específica. Como as vacinas de subunidades geralmente são pouco imunogênicas se faz necessário a utilização de um adjuvante forte. Assim, os camundongos foram imunizados com a gp140 na presença do adjuvante completo de Freund (ACF) e verificamos a presença de elevados títulos de anticorpos IgG específicos após a segunda dose (figura 15). A utilização do ACF apesar de ser proibida em seres humanos, é ainda utilizada em modelos animais por ser considerado o “padrão ouro” em termos de adjuvanticidade. Outros trabalhos na literatura demonstraram que o trímero de gp140 na presença de ACF é bastante imunogênico em camundongos (Lai RP, 2012).

A importância da presença de um epítipo auxiliar forte de linfócitos T CD4⁺ nas imunizações com adjuvantes licenciados para uso em humanos e que são menos potentes que o adjuvante completo de Freund foi demonstrada anteriormente utilizando como modelo a imunização com a proteína 1 da superfície do merozoíta de *Plasmodium vivax* (Rosa et al., 2004). Baseado então na necessidade da utilização de um adjuvante licenciado para uso em humanos, e, portanto menos potente, resolvemos utilizar como fonte de epítopos para linfócitos T CD4⁺ uma vacina de DNA desenvolvida anteriormente pelo grupo que codifica 18 epítopos promíscuos de linfócitos T CD4⁺ do HIV-1 (Rosa et al., 2010, Ribeiro et al., 2010). Esses epítopos foram identificados pelo algoritmo TEPITOPE que determina as regiões capazes de se ligarem a 25 moléculas de HLA-DR humanas. Os 18 epítopos foram testados quanto a sua propriedade antigênica e foram reconhecidos por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de

90% dos indivíduos infectados pelo HIV (Fonseca et al., 2006). Além disso, cada indivíduo foi capaz de reconhecer em média 5 peptídeos.

Uma vacina de DNA (HIVBr18) foi produzida a partir desses epítomos e utilizada para imunizar camundongos BALB/c (Rosa et al., 2011) e transgênicos (Ribeiro et al., 2010) para diferentes moléculas de HLA classe II humanas (HLA-DR2,-DR4,-DQ6, DQ8). Os resultados desses trabalhos mostraram que a imunização com a vacina HIVBr18 foi capaz de induzir uma resposta ampla, proliferativa de linfócitos TCD4⁺, produtora de citocinas de padrão Th1, células de memória e células polifuncionais. Outro grupo, ao realizar um estudo de fase I, com 84 indivíduos saudáveis, observou que uma vacina contendo múltiplos epítomos para linfócitos T CD4⁺, foi capaz de induzir respostas polifuncionais em 68% dos indivíduos (Jin et al., 2009). Os autores sugerem que a mesma pode ser uma fonte de auxílio na geração de anticorpos assim como de respostas mediadas por linfócitos T CD8⁺.

O nosso grupo demonstrou em trabalho anterior, que o *prime* com a vacina HIVBr18 aumentou a magnitude e amplitude das respostas de células CD8⁺ induzidas por vacinas de DNA codificando as proteínas Vif e Gag do HIV-1, através de um mecanismo de auxílio cognato, uma vez que a vacina HIVBr18 compartilhava epítomos com tais proteínas (Ribeiro et al., 2009). No presente trabalho, observamos que o *prime* com HIVBr18 não foi capaz de aumentar a magnitude da resposta humoral contra a gp140 (figura 17), porém alterou a qualidade dessa resposta (figura 18) quando os animais foram imunizados com 10µg da gp140. Observamos que a razão IgG1/IgG2a diminuiu indicando um desvio para resposta para padrão Th1. Esse fenômeno pode ser observado na presença do adjuvante forte ACF, mas também com os adjuvantes licenciados para uso em humanos como o poly IC e CpG ODN 1826 ODN. Tendo em vista que a quantidade de 10µg de antígeno para imunização de camundongos é uma quantidade que poderia estar saturando o sistema (quantidade essa que corresponderia a 25mg em humanos), fomos avaliar se o *prime* com a vacina HIVBr18 influenciaria na magnitude da resposta humoral utilizando 10 ou 100x menos antígeno. Independente da quantidade de antígeno e do adjuvante testado, o *prime* não alterou a magnitude da resposta humoral (figura 19), porém, alterou a qualidade (figura 20) de maneira similar a observada nas

imunizações com 10 μ g de antígeno. Estes dados indicam que é possível diminuir a quantidade de gp140 do que é normalmente utilizada na imunização de camundongos na presença de diversos adjuvantes para induzir uma resposta imune humoral tão potente quanto aquela induzida pelo adjuvante completo de Freund. Uma hipótese é que a própria sequência da gp140 possua epítomos auxiliares (*helper*), suprimindo a necessidade de epítomos externos para conferir o auxílio necessário para a produção de anticorpos pelos linfócitos B mesmo na presença de adjuvantes normalmente menos potentes que o ACF. Esse fenômeno foi observado no trabalho de Rosa *et al.* 2004, onde a imunização com a proteína MSP1₁₉ (proteína de superfície do merozoíta do *plasmodium vivax*) juntamente com epítomo de células T CD4⁺ (PADRE) na presença de adjuvantes licenciados para uso em humano gerou títulos de anticorpos semelhantes aqueles induzidos na imunização assistida pelo ACF/AIF.

Uma característica importante de algumas vacinas, como a da febre amarela é a capacidade de induzir uma resposta imune de longa duração. Então analisamos a longevidade da resposta humoral 150 dias após a última dose e observamos que independente do *prime* e do adjuvante testado a resposta humoral específica para gp140 produzida não apresentou queda significativa (Figura 21). Analisando a qualidade dos anticorpos produzidos após a imunização, verificamos que o *prime* com a vacina HIVBr18 não alterou a afinidade (figura 22) dos anticorpos gp140-específicos gerados quando comparado com o *prime* com pVAX.

Estudos pré-clínicos realizados em primatas não humanos mostraram que respostas celulares funcionalmente relevantes de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺ específicas são um pré-requisito essencial para novos candidatos à vacina contra o HIV (McElrath *et al.*, 2008b, Sekaly, 2008, Watkins *et al.*, 2008, Hansen *et al.*, 2009). Além dessas evidências em modelos animais, o ensaio clínico de eficácia RV144 mostrou também que os indivíduos protegidos apresentaram uma resposta celular de linfócitos TCD4⁺ direcionados para env (de Souza *et al.*, 2012, Bansal *et al.*, 2010). Por esse motivo, fomos avaliar se o *prime* com HIVBr18 seria capaz de conferir auxílio e aumentar a resposta imune celular direcionada a env. Para tal, os esplenócitos dos animais imunizados foram avaliados quanto a sua

capacidade de produzir $\text{IFN}\gamma$ frente ao re-estímulo com a proteína gp140 e com um peptídeo de env (gp160 188-201) presente na vacina HIVBr18 assim como no trímero da gp140. Esse peptídeo já havia sido descrito pelo nosso grupo anteriormente (Fonseca et al., 2006) e se mostrou eficiente em induzir proliferação de linfócitos TCD4^+ e produção de $\text{IFN}\gamma$ (Rosa et al., 2011) em células do baço de camundongos BALB/c imunizados com a vacina HIVBr18. No presente trabalho, observamos que o esplenócitos dos animais que receberam o *prime* com HIVBr18 e o *boost* com a gp140 na presença do adjuvante poly IC e re-estimulados com o peptídeo env apresentaram um maior número ($p < 0,0001$) de células produtoras de $\text{IFN}\gamma$ (figura 23 A) do que o observado no grupo que recebeu pVAX como *prime*. Em contraste, essa diferença não foi observada com o adjuvante ACF ou CpG ODN 1826. Posteriormente, fomos avaliar se a imunização inicial com a vacina HIVBr18 seria capaz de aumentar a resposta proliferativa antígeno específica. Na figura 25 A e B observamos que somente os grupos que receberam a imunização inicial de HIVBr18 apresentaram proliferação de linfócitos T CD4^+ e T CD8^+ antígeno específica, independente do adjuvante utilizado.

Em outro experimento onde utilizamos a concentração de proteína 10x menor do que no experimento anterior, também observamos o mesmo fenômeno, independente do adjuvante utilizado (dados não mostrados). Neste mesmo experimento nos utilizamos a citometria de fluxo multiparamétrica para detectar a produção de citocinas intracelulares. Observamos que os grupos que receberam a imunização inicial HIVBr18 apresentaram maior produção dessas citocinas quando comparado com os grupos que receberam o pVAX como *prime*, independente do adjuvante utilizado (figura 26). O fato de termos observado respostas de LTCD8^+ específicos era esperado uma vez em trabalho anterior do grupo foi observado que o peptídeo env4 foi capaz de induzir resposta proliferativa de LTCD8^+ em camundongos BALB/c imunizados com a vacina HIVBr18 (Rosa et al., 2011).

Ao analisar a resposta nos animais que foram imunizados com a gp140 na ausência de adjuvante, somente células do baço dos animais que receberam HIVBr18 como *prime* foram capazes de produzir $\text{IFN}\gamma$ (figura 24).

Esse experimento mostra que na ausência de um adjuvante, provavelmente células de memória induzidas pela imunização com HIVBr18 forneceram o auxílio necessário para a produção de IFN γ env-específico.

Nos últimos anos várias evidências mostraram que a utilização de um esquema de imunização composto de *prime-boost* heterólogo é capaz de aumentar a magnitude e a qualidade da resposta imune à diversos patógenos, inclusive contra o HIV (Ratto-Kim S, 2012). O *prime-boost* heterólogo consiste na administração do mesmo antígeno utilizando vetores diferentes como adenovírus e DNA, DNA e proteína, assim imunizamos os animais com um *prime* com a vacina de DNA que codifica a gp140 e *boost* com a proteína recombinante gp140 na presença de poly IC. Neste mesmo experimento realizamos estratégias de *prime-boost* homólogo (DNA/DNA ou proteína/proteína). O grupo que recebeu somente DNA apresentou títulos de anticorpos (figura 27) estatisticamente inferiores quando comparado ao demais grupos testados. Esse fenômeno foi de certa maneira esperado, uma vez que vacinas de DNA não são bons imunógenos para estimular a produção de anticorpos. A resposta humoral nos animais que receberam o *prime/boost* heterólogo foi semelhante àquela observada nos grupos que receberam o *prime/boost* homólogo com a gp140 recombinante. Além disso, avaliamos a presença de células T auxiliadoras foliculares (THF) visto que essas células são frequentemente o fator limitante na determinação da magnitude da resposta do centro germinativo (Johnston et al., 2009, Nurieva et al., 2009). A presença das THF nos linfonodos de primatas não humanos correlaciona com a magnitude da resposta de IgG específica para o SIV, com a magnitude da resposta do centro germinativo e com a avidéz da IgG SIV-específica (Petrovas et al., 2012). Os animais que receberam uma, duas ou três doses de gp140 na presença de poly IC apresentaram células THF e células B do centro germinativo nos seus linfonodos drenantes (Figura 28). Esse fenômeno era esperado uma vez que esses animais apresentaram elevados títulos de anticorpos. Em contraste, os animais que receberam 3 doses de DNA, apresentaram baixa frequência desses tipos celulares. Na figura 29, mostramos que a imunização com 3 doses de DNA não é suficiente para gerar células secretoras de anticorpo (IgG). Em contraste, o grupo que recebeu 3 doses da proteína gp140 na presença do adjuvante poly

IC apresentou maior número de células secretoras de anticorpos específicos quando comparado aos demais grupos e esses dados corroboram com os apresentados para títulos de anticorpos, frequência de células B do centro germinativo e células THF.

A escolha do adjuvante pode alterar de maneira significativa a resposta imune induzida contra um antígeno vacinal. A imunização de camundongos com 20µg da gp120 na presença de ACF induziu títulos de anticorpos mais elevados do que o observado após imunização com Ribi (MPL+TDM). Quando coelhos foram imunizados com o trímero gp140 na presença dos adjuvantes MF59 e CpG ODN (ambos licenciados para uso em humanos) observou-se a produção de anticorpos amplamente neutralizantes (Burke et al., 2009). A imunização de primatas não humanos com o trímero da gp140 da mesma cepa utilizada nesse trabalho (YU2) na presença dos adjuvantes Abisco 100 e CpG 2395 foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes contra vírus dos clados A, B e C e conferir proteção contra o desafio com SHIV. Foi observado também que a resposta foi mais ampla do que no ensaio realizado com a gp120 monomérica utilizada no ensaio clínico VAX04 (Sundling et al., 2010).

No presente trabalho, realizamos experimentos de imunização com diferentes quantidades de gp140 e com diferentes adjuvantes. Inicialmente na comparação da influência dos diferentes adjuvantes na resposta imune contra a gp140, não observamos diferença estatística quando comparamos o grupos que recebeu ACF/AIF e CpG ODN 1826. Entretanto observamos diferença estatística significativa quando comparamos o grupo que recebeu ACF com os grupos que receberam poly IC, Alum, MDP, R837 e R848 (figura 32). Quando analisamos as subclasses e a razão entre IgG1/IgG2a, observamos que o CpG ODN 1826 foi capaz de diminuir esta razão, sugerindo um maior direcionamento para resposta de padrão Th1 (figura 33).

Quando avaliamos a afinidades dos anticorpos gp140-específicos (figura 34) observamos que a maioria dos adjuvantes necessitaram da concentração de 0,5 M de tiocianato de amônio para dissociar 50% dos anticorpos ligados mostrando que os anticorpos gerados possuem uma afinidade semelhante. Como a produção de anticorpos está diretamente relacionada com a indução de células THF e células B do centro germinativo

(Crotty, 2011) avaliamos esses subtipos celulares nos linfonodos drenantes após as imunizações com a gp40 na presença de diferentes adjuvantes. Os animais imunizados com os diferentes adjuvantes apresentaram células TFH e B do centro germinativo (figura 35). Observamos diferença significativa somente entre as células B do centro germinativo no grupo que recebeu como adjuvante R848 comparado ao grupo que recebeu Alum e CpG ODN 1826.

O Alum apesar de ser o adjuvante mais utilizado nas vacinas até os dias atuais, é um adjuvante considerado pouco potente na indução de respostas de padrão Th1. Os outros adjuvantes testados nesse trabalho (poly IC, CpG ODN 1826, MPL, MDP, R837 e R848), além de serem licenciados para o uso em humanos, , tendem a produzir uma resposta mais direcionada para o padrão Th1.

Uma das maneiras para evitar o escape imunológico é gerando respostas imunes celulares contra vários epítomos o que leva a um aumento da cobertura das respostas induzidas (Geluk et al., 1998, Kawamura et al., 2000). Alguns estudos clínicos utilizando vacinas que induzem as respostas de células T anti-HIV demonstraram que a indução de respostas imunes a antígenos conservados na maioria dos indivíduos é um fator importante para novos alvos à vacina (McElrath et al., 2008a, Sekaly, 2008, Watkins et al., 2008). A qualidade das respostas imunes é um fator crucial na definição de respostas protetoras (Seder et al., 2008). No nosso trabalho verificamos se a imunização com a proteína recombinante gp140 na presença dos diferentes adjuvantes licenciados para uso em humanos seria capaz de induzir respostas de células T CD4⁺ e T CD8⁺ antígeno específica. Observamos que as células dos animais imunizados na presença dos adjuvantes poly IC, CpG ODN 1826 e MPL apresentaram produção significativa de IFN- γ quando comparado com os demais adjuvantes (figura 38). A imunização com a gp140 na presença dos adjuvantes induziu a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (figura 39), e também LT CD4⁺ (figura 40) e T CD8⁺ (figura 41) capazes de produzir as citocinas IFN- γ ; IL-2 e TNF- α , sugerindo uma resposta de padrão Th1. Os animais que receberam o adjuvante CpG ODN apresentou produção da citocina TNF- α (figura 40 C) significativamente superior quando comparado

aos demais grupos. Alguns estudos com a vacina da varíola e também com vacina da febre amarela demonstraram que a indução de células T CD4⁺ e T CD8⁺ desempenham juntamente com os anticorpos, um papel importante na resposta imune contra a aquisição da doença (Gaucher et al., 2008, Precopio et al., 2007).

Dados os resultados apresentados deste trabalho, podemos concluir que dependendo do padrão de resposta humoral (Th1 ou Th2) e da resposta celular (por exemplo, produção de IFN- γ) a escolha do adjuvante pode influenciar na necessidade de um *prime* com uma vacina contendo epítopos para linfócitos T CD4⁺ como, por exemplo, a vacina HIVBr18. Em conjunto, os resultados demonstram que as imunizações dos camundongos foram suficientes para gerar elevados títulos de anticorpos e indução de células produtoras de citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Além disso, a imunização foi capaz de induzir células THF e células B do centro germinativo, que correlacionaram com os altos níveis de anticorpos. Os adjuvantes licenciados para uso humano, utilizado no presente trabalho podem oferecer uma plataforma universal para o desenvolvimento de vacinas contra pandemias e infecções emergentes, principalmente o HIV.

6.CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados nesse trabalho podemos concluir que:

- A proteína recombinante representando o trímero da gp140 foi capaz de ser reconhecida pelo soro de paciente infectado pelo HIV-1 demonstrando a sua antigenicidade;
- A proteína recombinante gp140 foi capaz de induzir resposta imune humoral específica em camundongos BALB/c na presença do adjuvante completo de Freund (ACF), demonstrando sua imunogenicidade;
- A imunização inicial com a vacina de DNA HIVBr18 não alterou a magnitude da resposta imune humoral específica após imunização com a gp140 na presença dos adjuvantes ACF/ AIF, poly IC, CpG ODN 1826, Alum, MPL, MDP, R837 e R848, independente da quantidade de proteína utilizada;
- A imunização inicial com HIVBr18 ou pVAX não alterou a longevidade da resposta imune humoral específica após imunização com a gp140 na presença de diferentes adjuvantes sendo esta de longa duração;
- Observamos um aumento resposta de padrão quando foi administrado o *prime* com a vacina HIVBr18, e posteriormente *boost* com a gp140 na presença dos diferentes adjuvantes;
- A imunização inicial com a vacina HIVBr18 aumentou o número de células produtoras de IFN γ específicas para um peptídeo da gp140 (env4) após imunização na presença do adjuvante poly IC;
- Na ausência de adjuvante, somente os animais que receberam a imunização inicial com HIVBr18 apresentaram células produtoras de IFN γ específicas para o peptídeo env4;
- A imunização inicial com a vacina HIVBr18 e posteriormente com a gp140 na presença dos diferentes adjuvantes, induziu a proliferação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ antígeno-específicas, tanto para o peptídeo env4 quanto para a proteína gp140.
- A administração de duas doses da proteína recombinante gp140 com ACF/AIF ou com os adjuvantes licenciados para uso em humanos

como poly IC, CpG ODN 1826, Alum, MDP, MPL, R837 e R848 foi capaz de induzir elevados títulos de anticorpos assim como células THF e células B do centro germinativo.

7. ANEXOS

7.1 ANEXO - Figura

Figura 1

Figura 1: Estratégia de análise para avaliação da proliferação celular e produção de citocina intracelular através de ensaio com CFSE.

“*Dot Plot*” representativo de ensaio de proliferação celular e de detecção de citocina intracelular. Camundongos BALB/c foram imunizados inicialmente (ou não) com 100µg do vetor vazio ou com HIVBr18 e posteriormente receberam duas doses com 10µg ou 1µg de gp140 na presença dos diferentes adjuvantes. Posteriormente, o baço de cada animal foi removido, as células foram marcadas com a concentração de 1,25µM de CFSE e incubadas por 5 dias na presença do peptídeo env4 (5µM) ou da proteína gp140 (5µg/mL). A proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (A) foi avaliada com a estratégia de análise mostrada. Primeiramente foi feito um *gate* em linfócitos baseados em tamanho (FSC) x granulosidade (SSC). Em seguida um *gate* nas células CD3⁺ (linfócitos T), seguido por *gates* nas populações CD4⁺ e CD8⁺. Dentro das duas sub-populações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) foi avaliada a diminuição da intensidade de fluorescência do CFSE, nos permitindo avaliar a proliferação específica induzida em cada grupo experimental. A secreção de citocinas foi avaliada como mostra a estratégia de análise mostrada na figura A. Após definirmos os *gates* de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, foram definidas, em cada sub-população de linfócitos, as células que secretam IFN-γ, TNF-α ou IL-2 isoladamente (B). Os dados mostrados são referentes à re-estímulo *in vitro* com Concanavalina A.

7.2 ANEXO - TABELA

Tabela 1: Sequência de aminoácidos dos epítomos identificados por Fonseca et al (2006).

Sequência de aminoácidos e localização na sequência consenso do subtipo B dos diferentes epítomos para linfócitos T CD4+ do HIV-1 utilizados nesse estudo. Esses epítomos foram descritos (Fonseca et al., 2006) e avaliados quando a sua imunogenicidade (Rosa et al., 2011, Ribeiro et al., 2010) anteriormente pelo nosso grupo.

Epítomo	Sequência de aminoácidos
p17(73-89)	EELRSLYNTVATLYCVH
p24(33-45)	SPEVIPMFSALSE
p24(131-150)	KRWIILGLNKIVRMYSPTSI
p6(32-46)	DKELYPLASLRSLFG
pol(63-77)	QRPLVTIKIGGQLKE
pol(136-150)	TPVNIIGRNLLTQIG
pol(785-799)	GKIILVAVHVASGYI
gp41(261-276)	RDLLLIVTRIVELLGR
gp160(19-31)	TMLLGMLMICSAA
gp160(174-185)	ALFYKLDVVPID
gp160(188-201)	NTSYRLISCNTSVI
gp160(481-498)	SELYLYKVVKIEPLGVAP
rev(11-27)	ELLKTVRLIKFLYQSNP
vpr(58-72)	EAIIRILQQLLFIHF
vpr(65-82)	QQLLFIHFRIGCRHSRIG
vif(144-158)	SLQYLALVALVAPKK
vpu(6-20)	VLAIVALVVATIIAI
nef(180-194)	VLEWRFD SRLAFHHV

8.REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS

- ALEXAKI, A., LIU, Y. & WIGDAHL, B. 2008. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr HIV Res*, 6, 388-400.
- ALEXOPOULOU, L., HOLT, A. C., MEDZHITOV, R. & FLAVELL, R. A. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413, 732-8.
- ALLEN, T. M., O'CONNOR, D. H., JING, P., DZURIS, J. L., MOTHE, B. R., VOGEL, T. U., DUNPHY, E., LIEBL, M. E., EMERSON, C., WILSON, N., KUNSTMAN, K. J., WANG, X., ALLISON, D. B., HUGHES, A. L., DESROSIERS, R. C., ALTMAN, J. D., WOLINSKY, S. M., SETTE, A. & WATKINS, D. I. 2000. Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature*, 407, 386-90.
- BAJAJ, A. K., GUPTA, S. C., PANDEY, R. K., MISRA, K., RASTOGI, S. & CHATTERJI, A. K. 1997. Aluminium contact sensitivity. *Contact Dermatitis*, 37, 307-8.
- BANSAL, G. P., MALASPINA, A. & FLORES, J. 2010. Future paths for HIV vaccine research: Exploiting results from recent clinical trials and current scientific advances. *Curr Opin Mol Ther*, 12, 39-46.
- BAROUCH, D. H. & KORBER, B. 2010. HIV-1 vaccine development after STEP. *Annu Rev Med*, 61, 153-67.
- BARRY, M. & COOPER, C. 2007. Review of hepatitis B surface antigen-1018 ISS adjuvant-containing vaccine safety and efficacy. *Expert Opin Biol Ther*, 7, 1731-7.
- BATTLE-MILLER, K., EBY, C. A., LANDAY, A. L., COHEN, M. H., SHA, B. E. & BAUM, L. L. 2002. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in cervical lavage fluids of human immunodeficiency virus type 1--infected women. *J Infect Dis*, 185, 439-47.
- BAUM, L. L. 2010. Role of humoral immunity in host defense against HIV. *Curr HIV/AIDS Rep*, 7, 11-8.
- BEBENEK, K., ABBOTTS, J., ROBERTS, J. D., WILSON, S. H. & KUNKEL, T. A. 1989. Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem*, 264, 16948-56.
- BERNSTEIN, D. I., HARRISON, C. J., TOMAI, M. A. & MILLER, R. L. 2001. Daily or weekly therapy with resiquimod (R-848) reduces genital recurrences in herpes simplex virus-infected guinea pigs during and after treatment. *J Infect Dis*, 183, 844-9.
- BILLIAU, A. & MATTHYS, P. 2001. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*, 70, 849-60.
- BISHOP, G. A., RAMIREZ, L. M., BACCAM, M., BUSCH, L. K., PEDERSON, L. K. & TOMAI, M. A. 2001. The immune response modifier resiquimod mimics CD40-induced B cell activation. *Cell Immunol*, 208, 9-17.
- BOAZ, M. J., WATERS, A., MURAD, S., EASTERBROOK, P. J. & VYAKARNAM, A. 2002. Presence of HIV-1 Gag-specific IFN-gamma+IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *J Immunol*, 169, 6376-85.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO AIDS. JULHO, M. D. S., SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. 2011.

BORROW, P., LEWICKI, H., HAHN, B. H., SHAW, G. M. & OLDSTONE, M. B. 1994. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, 68, 6103-10.

BOYER, P. L., FERRIS, A. L. & HUGHES, S. H. 1992. Cassette mutagenesis of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 66, 1031-9.

BURGER, S. & POLES, M. A. 2003. Natural history and pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Semin Liver Dis*, 23, 115-24.

BURKE, B., GOMEZ-ROMAN, V. R., LIAN, Y., SUN, Y., KAN, E., ULMER, J., SRIVASTAVA, I. K. & BARNETT, S. W. 2009. Neutralizing antibody responses to subtype B and C adjuvanted HIV envelope protein vaccination in rabbits. *Virology*, 387, 147-56.

BUSSMANN, B. M., REICHE, S., BIENIEK, B., KRZANARIC, I., ACKERMANN, F. & JASSOY, C. 2010. Loss of HIV-specific memory B-cells as a potential mechanism for the dysfunction of the humoral immune response against HIV. *Virology*, 397, 7-13.

CARMICHAEL, A., JIN, X., SISSONS, P., BORYSIEWICZ, L. 1993. Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. *J Exp Med*, 177, 249-56.

CASELLA, C. R. & MITCHELL, T. C. 2008. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. *Cell Mol Life Sci*, 65, 3231-40.

CHUNG, A., ROLLMAN, E., JOHANSSON, S., KENT, S. J. & STRATOV, I. 2008. The utility of ADCC responses in HIV infection. *Curr HIV Res*, 6, 515-9.

CLAPHAM, P. R. & MCKNIGHT, A. 2001. HIV-1 receptors and cell tropism. *Br Med Bull*, 58, 43-59.

COFFIN, J. M. 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*, 267, 483-9.

COFFMAN, R. L., SHER, A. & SEDER, R. A. 2010. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*, 33, 492-503.

CONNOR, R. I., MOHRI, H., CAO, Y., HO, D. D. 1993. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol*, 67, 1772-7.

COX, J. C. & COULTER, A. R. 1997. Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, 15, 248-56.

CROTTY, S. 2011. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*, 29, 621-63.

- CROTTY, S., CAMERON, C. E. & ANDINO, R. 2001. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6895-900.
- DE SOUZA, M. S., RATTO-KIM, S., CHUENAROM, W., SCHUETZ, A., CHANTAKULKIJ, S., NUNTAPINIT, B., VALENCIA-MICOLTA, A., THELIAN, D., NITAYAPHAN, S., PITISUTTITHUM, P., PARIS, R. M., KAEWKUNGWAL, J., MICHAEL, N. L., RERKS-NGARM, S., MATHIESON, B., MAROVICH, M., CURRIER, J. R. & KIM, J. H. 2012. The Thai phase III trial (RV144) vaccine regimen induces T cell responses that preferentially target epitopes within the V2 region of HIV-1 envelope. *J Immunol*, 188, 5166-76.
- DEENICK, E. K. & MA, C. S. 2011. The regulation and role of T follicular helper cells in immunity. *Immunology*, 134, 361-7.
- DEENICK, E. K., MA, C. S., BRINK, R. & TANGYE, S. G. 2011. Regulation of T follicular helper cell formation and function by antigen presenting cells. *Curr Opin Immunol*, 23, 111-8.
- DEVICO, A. L. & GALLO, R. C. 2004. Control of HIV-1 infection by soluble factors of the immune response. *Nat Rev Microbiol*, 2, 401-13.
- DIDIERLAURENT, A. M., MOREL, S., LOCKMAN, L., GIANNINI, S. L., BISTEAU, M., CARLSEN, H., KIELLAND, A., VOSTERS, O., VANDERHEYDE, N., SCHIAVETTI, F., LAROCQUE, D., VAN MECHELEN, M. & GARCON, N. 2009. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol*, 183, 6186-97.
- DISKIN, R., KLEIN, F., HORWITZ, J. A., HALPER-STROMBERG, A., SATHER, D. N., MARCOVECCHIO, P. M., LEE, T., WEST, A. P., JR., GAO, H., SEAMAN, M. S., STAMATATOS, L., NUSSENZWEIG, M. C. & BJORKMAN, P. J. 2013. Restricting HIV-1 pathways for escape using rationally designed anti-HIV-1 antibodies. *J Exp Med*, 210, 1235-49.
- DOCKRELL, D. H. & KINGHORN, G. R. 2001. Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *J Antimicrob Chemother*, 48, 751-5.
- DOUEK, D. C., PICKER, L. J. & KOUP, R. A. 2003. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol*, 21, 265-304.
- DUTHIE, M. S., WINDISH, H. P., FOX, C. B. & REED, S. G. 2011. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol Rev*, 239, 178-96.
- DZIERZBICKA, K., WARDOWSKA, A. & TRZONKOWSKI, P. 2011. Recent developments in the synthesis and biological activity of muramylpeptides. *Curr Med Chem*, 18, 2438-51.
- FANALES-BELASIO, E., RAIMONDO, M., SULIGOI, B. & BUTTO, S. 2010. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*, 46, 5-14.
- FAZILLEAU, N., MARK, L., MCHEYZER-WILLIAMS, L. J. & MCHEYZER-WILLIAMS, M. G. 2009. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity*, 30, 324-35.

- FERRE, A. L., HUNT, P. W., MCCONNELL, D. H., MORRIS, M. M., GARCIA, J. C., POLLARD, R. B., YEE, H. F., JR., MARTIN, J. N., DEEKS, S. G. & SHACKLETT, B. L. 2010. HIV controllers with HLA-DRB1*13 and HLA-DQB1*06 alleles have strong, polyfunctional mucosal CD4+ T-cell responses. *J Virol*, 84, 11020-9.
- FIEBIG, E. W., WRIGHT, D. J., RAWAL, B. D., GARRETT, P. E., SCHUMACHER, R. T., PEDDADA, L., HELDEBRANT, C., SMITH, R., CONRAD, A., KLEINMAN, S. H. & BUSCH, M. P. 2003. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*, 17, 1871-9.
- FIFE, K. H., MENG, T. C., FERRIS, D. G. & LIU, P. 2008. Effect of resiquimod 0.01% gel on lesion healing and viral shedding when applied to genital herpes lesions. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 477-82.
- FLORESE, R. H., DEMBERG, T., XIAO, P., KULLER, L., LARSEN, K., SUMMERS, L. E., VENZON, D., CAFARO, A., ENSOLI, B. & ROBERT-GUROFF, M. 2009. Contribution of nonneutralizing vaccine-elicited antibody activities to improved protective efficacy in rhesus macaques immunized with Tat/Env compared with multigenic vaccines. *J Immunol*, 182, 3718-27.
- FLYNN, N. M., FORTHAL, D. N., HARRO, C. D., JUDSON, F. N., MAYER, K. H. & PARA, M. F. 2005. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis*, 191, 654-65.
- FOLEY, P., KAZAZI, F., BITI, R., SORRELL, T. C. & CUNNINGHAM, A. L. 1992. HIV infection of monocytes inhibits the T-lymphocyte proliferative response to recall antigens, via production of eicosanoids. *Immunology*, 75, 391-7.
- FONSECA, M. G. & BASTOS, F. I. 2007. Twenty-five years of the AIDS epidemic in Brazil: principal epidemiological findings, 1980-2005. *Cad Saude Publica*, 23 Suppl 3, S333-44.
- FONSECA, S. G., COUTINHO-SILVA, A., FONSECA, L. A., SEGURADO, A. C., MORAES, S. L., RODRIGUES, H., HAMMER, J., KALLAS, E. G., SIDNEY, J., SETTE, A., KALIL, J. & CUNHA-NETO, E. 2006. Identification of novel consensus CD4 T-cell epitopes from clade B HIV-1 whole genome that are frequently recognized by HIV-1 infected patients. *AIDS*, 20, 2263-73.
- FORSELL, M. N., SCHIEF, W. R. & WYATT, R. T. 2009. Immunogenicity of HIV-1 envelope glycoprotein oligomers. *Curr Opin HIV AIDS*, 4, 380-7.
- FORTHAL, D. N., LANDUCCI, G., PHAN, T. B. & BECERRA, J. 2005. Interactions between natural killer cells and antibody Fc result in enhanced antibody neutralization of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 79, 2042-9.
- FRANCISCO, L. M., SAGE, P. T. & SHARPE, A. H. 2010. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*, 236, 219-42.
- GALVIN, S. R. & COHEN, M. S. 2004. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nat Rev Microbiol*, 2, 33-42.

- GANDHI, R. T. & WALKER, B. D. 2002. Immunologic control of HIV-1. *Annu Rev Med*, 53, 149-72.
- GASPER-SMITH, N., CROSSMAN, D. M., WHITESIDES, J. F., MENSALI, N., OTTINGER, J. S., PLONK, S. G., MOODY, M. A., FERRARI, G., WEINHOLD, K. J., MILLER, S. E., REICH, C. F., 3RD, QIN, L., SELF, S. G., SHAW, G. M., DENNY, T. N., JONES, L. E., PISETSKY, D. S. & HAYNES, B. F. 2008. Induction of plasma (TRAIL), TNFR-2, Fas ligand, and plasma microparticles after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission: implications for HIV-1 vaccine design. *J Virol*, 82, 7700-10.
- GAUCHER, D., THERRIEN, R., KETTAF, N., ANGERMANN, B. R., BOUCHER, G., FILALI-MOUHIM, A., MOSER, J. M., MEHTA, R. S., DRAKE, D. R., 3RD, CASTRO, E., AKONDY, R., RINFRET, A., YASSINE-DIAB, B., SAID, E. A., CHOUIKH, Y., CAMERON, M. J., CLUM, R., KELVIN, D., SOMOGYI, R., GRELLER, L. D., BALDERAS, R. S., WILKINSON, P., PANTALEO, G., TARTAGLIA, J., HADDAD, E. K. & SEKALY, R. P. 2008. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med*, 205, 3119-31.
- GAUDUIN, M. C., YU, Y., BARABASZ, A., CARVILLE, A., PIATAK, M., LIFSON, J. D., DESROSIERS, R. C. & JOHNSON, R. P. 2006. Induction of a virus-specific effector-memory CD4+ T cell response by attenuated SIV infection. *J Exp Med*, 203, 2661-72.
- GEIJTENBEEK, T. B., KWON, D. S., TORENSMA, R., VAN VLIET, S. J., VAN DUIJNHOFEN, G. C., MIDDEL, J., CORNELISSEN, I. L., NOTTET, H. S., KEWALRAMANI, V. N., LITTMAN, D. R., FIGDOR, C. G. & VAN KOOYK, Y. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, 100, 587-97.
- GELUK, A., TANEJA, V., VAN MEIJGAARDEN, K. E., DE VRIES, R. R., DAVID, C. S. & OTTENHOFF, T. H. 1998. HLA-DR/DQ transgenic, class II deficient mice as a novel model to select for HSP T cell epitopes with immunotherapeutic or preventative vaccine potential. *Biotherapy*, 10, 191-6.
- GIRALDO-VELA, J. P., RUDERSDORF, R., CHUNG, C., QI, Y., WALLACE, L. T., BIMBER, B., BORCHARDT, G. J., FISK, D. L., GLIDDEN, C. E., LOFFREDO, J. T., PIASKOWSKI, S. M., FURLOTT, J. R., MORALES-MARTINEZ, J. P., WILSON, N. A., REHRAUER, W. M., LIFSON, J. D., CARRINGTON, M. & WATKINS, D. I. 2008. The major histocompatibility complex class II alleles Mamu-DRB1*1003 and -DRB1*0306 are enriched in a cohort of simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaque elite controllers. *J Virol*, 82, 859-70.
- GLOSTER, S. E., NEWTON, P., CORNFORTH, D., LIFSON, J. D., WILLIAMS, I., SHAW, G. M. & BORROW, P. 2004. Association of strong virus-specific CD4 T cell responses with efficient natural control of primary HIV-1 infection. *AIDS*, 18, 749-55.
- GOMEZ-ROMAN, V. R., PATTERSON, L. J., VENZON, D., LIEWEHR, D., ALDRICH, K., FLORESE, R. & ROBERT-GUROFF, M. 2005. Vaccine-elicited antibodies mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity correlated with significantly reduced acute viremia in rhesus macaques challenged with SIVmac251. *J Immunol*, 174, 2185-9.
- GOMEZ, C. & HOPE, T. J. 2005. The ins and outs of HIV replication. *Cell Microbiol*, 7, 621-6.

- GORNY, M. K., PAN, R., WILLIAMS, C., WANG, X. H., VOLSKY, B., O'NEAL, T., SPURRIER, B., SAMPSON, J. M., LI, L., SEAMAN, M. S., KONG, X. P. & ZOLLA-PAZNER, S. 2012. Functional and immunohistochemical cross-reactivity of V2-specific monoclonal antibodies from HIV-1-infected individuals. *Virology*, 427, 198-207.
- GREENWALD, R. J., FREEMAN, G. J. & SHARPE, A. H. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 23, 515-48.
- GRUNDNER, C., LI, Y., LOUDER, M., MASCOLA, J., YANG, X., SODROSKI, J. & WYATT, R. 2005. Analysis of the neutralizing antibody response elicited in rabbits by repeated inoculation with trimeric HIV-1 envelope glycoproteins. *Virology*, 331, 33-46.
- GUIMARAES, M. L., DOS SANTOS MOREIRA, A., LOUREIRO, R., GALVAO-CASTRO, B. & MORGADO, M. G. 2002. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 18, 1261-9.
- HAALAND, R. E., HAWKINS, P. A., SALAZAR-GONZALEZ, J., JOHNSON, A., TICHACEK, A., KARITA, E., MANIGART, O., MULENGA, J., KEELE, B. F., SHAW, G. M., HAHN, B. H., ALLEN, S. A., DERDEYN, C. A. & HUNTER, E. 2009. Inflammatory genital infections mitigate a severe genetic bottleneck in heterosexual transmission of subtype A and C HIV-1. *PLoS Pathog*, 5, e1000274.
- HANSEN, S. G., JR, M. P., VENTURA, A. B., HUGHES, C. M., GILBRIDE, R. M., FORD, J. C., OSWALD, K., SHOEMAKER, R., LI, Y., LEWIS, M. S., GILLIAM, A. N., XU, G., WHIZIN, N., BURWITZ, B. J., PLANER, S. L., TURNER, J. M., LEGASSE, A. W., AXTHELM, M. K., NELSON, J. A., FRUH, K., SACHA, J. B., ESTES, J. D., KEELE, B. F., EDLEFSEN, P. T., LIFSON, J. D. & PICKER, L. J. 2013. Immune clearance of highly pathogenic SIV infection. *Nature*.
- HANSEN, S. G., VIEVILLE, C., WHIZIN, N., COYNE-JOHNSON, L., SIESS, D. C., DRUMMOND, D. D., LEGASSE, A. W., AXTHELM, M. K., OSWALD, K., TRUBEY, C. M., PIATAK, M., JR., LIFSON, J. D., NELSON, J. A., JARVIS, M. A. & PICKER, L. J. 2009. Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nat Med*, 15, 293-9.
- HARRISON, C. J., MILLER, R. L. & BERNSTEIN, D. I. 1994. Posttherapy suppression of genital herpes simplex virus (HSV) recurrences and enhancement of HSV-specific T-cell memory by imiquimod in guinea pigs. *Antimicrob Agents Chemother*, 38, 2059-64.
- HEMELAAR, J., GOUWS, E., GHYS, P. D. & OSMANOV, S. 2006. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS*, 20, W13-23.
- HEMMI, H., KAISHO, T., TAKEDA, K. & AKIRA, S. 2003. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol*, 170, 3059-64.
- HENGGE, U. R., BENNINGHOFF, B., RUZICKA, T., GOOS, M. 2001. Topical immunomodulators - progress towards treating inflammation, infection, and cancer. *Lancet Infect Dis*.

- HENGGE, U. R., ESSER, S., SCHULTEWOLTER, T., BEHRENDT, C., MEYER, T., STOCKFLETH, E. & GOOS, M. 2000. Self-administered topical 5% imiquimod for the treatment of common warts and molluscum contagiosum. *Br J Dermatol*, 143, 1026-31.
- HESSELL, A. J., HANGARTNER, L., HUNTER, M., HAVENITH, C. E., BEURSKENS, F. J., BAKKER, J. M., LANIGAN, C. M., LANDUCCI, G., FORTHAL, D. N., PARREN, P. W., MARX, P. A. & BURTON, D. R. 2007. Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature*, 449, 101-4.
- HLADIK, F. & HOPE, T. J. 2009. HIV infection of the genital mucosa in women. *Curr HIV/AIDS Rep*, 6, 20-8.
- HOPKINS, M., LEES, B. G., RICHARDSON, D. G., WORONIECKI, S. R. & WHEELER, A. W. 2001. Standardisation of glutaraldehyde-modified tyrosine-adsorbed tree pollen vaccines containing the Th1-inducing adjuvant, monophosphoryl lipid A (MPL). *Allergol Immunopathol (Madr)*, 29, 245-54.
- HOXIE, J. A. 2010. Toward an antibody-based HIV-1 vaccine. *Annu Rev Med*, 61, 135-52.
- [HTTP://WWW.CLINICALTRIALS.GOV](http://www.clinicaltrials.gov).
- JIN, X., BAUER, D. E., TUTTLETON, S. E., LEWIN, S., GETTIE, A., BLANCHARD, J., IRWIN, C. E., SAFRIT, J. T., MITTLER, J., WEINBERGER, L., KOSTRIKIS, L. G., ZHANG, L., PERELSON, A. S. & HO, D. D. 1999. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med*, 189, 991-8.
- JIN, X., NEWMAN, M. J., DE-ROSA, S., COOPER, C., THOMAS, E., KEEFER, M., FUCHS, J., BLATTNER, W., LIVINGSTON, B. D., MCKINNEY, D. M., NOONAN, E., DECAMP, A., DEFAWE, O. D. & WECKER, M. 2009. A novel HIV T helper epitope-based vaccine elicits cytokine-secreting HIV-specific CD4+ T cells in a Phase I clinical trial in HIV-uninfected adults. *Vaccine*, 27, 7080-6.
- JOHNSTON, R. J., POHOLEK, A. C., DITORO, D., YUSUF, I., ETO, D., BARNETT, B., DENT, A. L., CRAFT, J. & CROTTY, S. 2009. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*, 325, 1006-10.
- KAHN, J. O. & WALKER, B. D. 1998. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*, 339, 33-9.
- KANTOR, R., SHAFER, R. W. & KATZENSTEIN, D. 2005. The HIV-1 Non-subtype B Workgroup: An International Collaboration for the Collection and Analysis of HIV-1 Non-subtype B Data. *J Int AIDS Soc*, 7, 71.
- KATES, J. & LEVI, J. 2007. Insurance coverage and access to HIV testing and treatment: considerations for individuals at risk for infection and for those with undiagnosed infection. *Clin Infect Dis*, 45 Suppl 4, S255-60.
- KATO, H., TAKEUCHI, O., SATO, S., YONEYAMA, M., YAMAMOTO, M., MATSUI, K., UEMATSU, S., JUNG, A., KAWAI, T., ISHII, K. J., YAMAGUCHI, O., OTSU, K., TSUJIMURA, T., KOH, C. S., REIS E SOUSA, C., MATSUURA, Y., FUJITA, T. & AKIRA, S. 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441, 101-5.

- KAWAMURA, K., YAMAMURA, T., YOKOYAMA, K., CHUI, D. H., FUKUI, Y., SASAZUKI, T., INOKO, H., DAVID, C. S. & TABIRA, T. 2000. Hla-DR2-restricted responses to proteolipid protein 95-116 peptide cause autoimmune encephalitis in transgenic mice. *J Clin Invest*, 105, 977-84.
- KEELE, B. F., VAN HEUVERSWEYN, F., LI, Y., BAILES, E., TAKEHISA, J., SANTIAGO, M. L., BIBOLLET-RUCHE, F., CHEN, Y., WAIN, L. V., LIEGEOIS, F., LOUL, S., NGOLE, E. M., BIENVENUE, Y., DELAPORTE, E., BROOKFIELD, J. F., SHARP, P. M., SHAW, G. M., PEETERS, M. & HAHN, B. H. 2006. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*, 313, 523-6.
- KIM, C. H., ROTT, L. S., CLARK-LEWIS, I., CAMPBELL, D. J., WU, L. & BUTCHER, E. C. 2001. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med*, 193, 1373-81.
- KLASSE, P. J. & SATTENTAU, Q. J. 2002. Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *J Gen Virol*, 83, 2091-108.
- KLATT, N. R. & BRECHLEY, J. M. 2010. Th17 cell dynamics in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*, 5, 135-40.
- KLATT, N. R. & SILVESTRI, G. 2012. CD4+ T cells and HIV: A paradoxical Pas de Deux. *Sci Transl Med*, 4, 123ps4.
- KLEIN, F., HALPER-STROMBERG, A., HORWITZ, J. A., GRUELL, H., SCHEID, J. F., BOURNAZOS, S., MOUQUET, H., SPATZ, L. A., DISKIN, R., ABADIR, A., ZANG, T., DORNER, M., BILLERBECK, E., LABITT, R. N., GAEBLER, C., MARCOVECCHIO, P. M., INCESU, R. B., EISENREICH, T. R., BIENIASZ, P. D., SEAMAN, M. S., BJORKMAN, P. J., RAVETCH, J. V., PLOSS, A. & NUSSENZWEIG, M. C. 2012. HIV therapy by a combination of broadly neutralizing antibodies in humanized mice. *Nature*, 492, 118-22.
- KLIMAS, N., KONERU, A. O. & FLETCHER, M. A. 2008. Overview of HIV. *Psychosom Med*, 70, 523-30.
- KLINMAN, D. M. 2004. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immunoprotective agents. *Expert Opin Biol Ther*, 4, 937-46.
- KOFF, W. C. 2012. HIV vaccine development: challenges and opportunities towards solving the HIV vaccine-neutralizing antibody problem. *Vaccine*, 30, 4310-5.
- KORBER, B., MULDOON, M., THEILER, J., GAO, F., GUPTA, R., LAPEDES, A., HAHN, B. H., WOLINSKY, S. & BHATTACHARYA, T. 2000. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*, 288, 1789-96.
- KOVACS, J. M., NKOLOLA, J. P., PENG, H., CHEUNG, A., PERRY, J., MILLER, C. A., SEAMAN, M. S., BAROUCH, D. H. & CHEN, B. 2012. HIV-1 envelope trimer elicits more potent neutralizing antibody responses than monomeric gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 12111-6.

- KRIEG, A. M. 2003. CpG DNA: trigger of sepsis, mediator of protection, or both? *Scand J Infect Dis*, 35, 653-9.
- LAI RP, S. M., TONKS P, WEGMANN F, SEILLY DJ, FROST SD, LABRANCHE CC, MONTEFIORI DC, DEY AK, SRIVASTAVA IK, SATTENTAU Q, BARNETT SW, HEENEY JL. 2012. Mixed adjuvant formulations reveal a new combination that elicit antibody response comparable to Freund's adjuvants. *PLoS One*.
- LAI SK, H. K., SHUKAIR S, WANG YY, FIGUEIREDO A, CONE R, HOPE TJ, HANES J 2009. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Trapped by Acidic but Not by Neutralized Human Cervicovaginal Mucus. *Journal of Virology*, 83.
- LAMBRECHT, B. N., KOOL, M., WILLART, M. A. & HAMMAD, H. 2009. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol*, 21, 23-9.
- LEDERMAN, M. M., PENN-NICHOLSON, A., CHO, M. & MOSIER, D. 2006. Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment. *JAMA*, 296, 815-26.
- LEVESQUE, M. C., MOODY, M. A., HWANG, K. K., MARSHALL, D. J., WHITESIDES, J. F., AMOS, J. D., GURLEY, T. C., ALLGOOD, S., HAYNES, B. B., VANDERGRIFT, N. A., PLONK, S., PARKER, D. C., COHEN, M. S., TOMARAS, G. D., GOEPFERT, P. A., SHAW, G. M., SCHMITZ, J. E., ERON, J. J., SHAHEEN, N. J., HICKS, C. B., LIAO, H. X., MARKOWITZ, M., KELSOE, G., MARGOLIS, D. M. & HAYNES, B. F. 2009. Polyclonal B cell differentiation and loss of gastrointestinal tract germinal centers in the earliest stages of HIV-1 infection. *PLoS Med*, 6, e1000107.
- LINDA BAUM, K. J. C., KEVIN KNIGGE, ROLI KHATTRI, JOSEPH MARGOLICK, CHARLES RINALDO, CYNTHIA A. KLEEGERGER, PARUNAG NISHANIAN, DENIS R. HENRARD, AND JOHN PHAIR 1996. HIV-1 gp120-specific Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity Correlates with Rate of Disease Progression. *Journal of Immunology*
- LINDBACK, S., THORSTENSSON, R., KARLSSON, A. C., VON SYDOW, M., FLAMHOLC, L., BLAXHULT, A., SONNERBORG, A., BIBERFELD, G. & GAINES, H. 2000. Diagnosis of primary HIV-1 infection and duration of follow-up after HIV exposure. Karolinska Institute Primary HIV Infection Study Group. *AIDS*, 14, 2333-9.
- LINDBLAD, E. B. 2004. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol. Cell Biol.*, 82, 497-505.
- LITTLE, S. J., MCLEAN, A. R., SPINA, C. A., RICHMAN, D. D. & HAVLIR, D. V. 1999. Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *J Exp Med*, 190, 841-50.
- LIU ZY, C. W., HULTIN LE, PRINCE HE, DETELS R, GIORGI JV 1997. Elevated CD38 antigen expression on CD8(+) T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the multicenter AIDS cohort study than CD4(+) cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, 16, 83-92.
- LONGHI, M. P., TRUMPFHELLER, C., IDOYAGA, J., CASKEY, M., MATOS, I., KLUGER, C., SALAZAR, A. M., COLONNA, M. & STEINMAN, R. M. 2009. Dendritic cells require a

- systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J Exp Med*, 206, 1589-602.
- LUTSIAK, M. E., ROBINSON, D. R., COESTER, C., KWON, G. S. & SAMUEL, J. 2002. Analysis of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanosphere uptake by human dendritic cells and macrophages in vitro. *Pharm Res*, 19, 1480-7.
- MARCELLO, A. 2006. Latency: the hidden HIV-1 challenge. *Retrovirology*, 3, 7.
- MARKOSYAN, R. M., COHEN, F. S. & MELIKYAN, G. B. 2003. HIV-1 envelope proteins complete their folding into six-helix bundles immediately after fusion pore formation. *Mol Biol Cell*, 14, 926-38.
- MASCOLA, J. R. 2002. Passive transfer studies to elucidate the role of antibody-mediated protection against HIV-1. *Vaccine*, 20, 1922-5.
- MASCOLA, J. R. & MONTEFIORI, D. C. 2010. The role of antibodies in HIV vaccines. *Annu Rev Immunol*, 28, 413-44.
- MBOW, M. L., DE GREGORIO, E., VALIANTE, N. M. & RAPPUOLI, R. 2010. New adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol*, 22, 411-6.
- MCCUTCHAN, F. E., VIPUTTIGUL, K., DE SOUZA, M. S., CARR, J. K., MARKOWITZ, L. E., BUAPUNTH, P., MCNEIL, J. G., ROBB, M. L., NITAYAPHAN, S., BIRX, D. L. & BROWN, A. E. 2000. Diversity of envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 of recent seroconverters in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16, 801-5.
- MCEL RATH, M. J., DE ROSA, S. C., MOODIE, Z., DUBEY, S., KIERSTEAD, L., JANES, H., DEFAWE, O. D., CARTER, D. K., HURAL, J., AKONDY, R., BUCHBINDER, S. P., ROBERTSON, M. N., MEHROTRA, D. V., SELF, S. G., COREY, L., SHIVER, J. W. & CASIMIRO, D. R. 2008a. HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet*, 372, 1894-905.
- MCEL RATH, M. J., DE ROSA, S. C., MOODIE, Z., DUBEY, S., KIERSTEAD, L., JANES, H., DEFAWE, O. D., CARTER, D. K., HURAL, J., AKONDY, R., BUCHBINDER, S. P., ROBERTSON, M. N., MEHROTRA, D. V., SELF, S. G., COREY, L., SHIVER, J. W., CASIMIRO, D. R. & STEP STUDY PROTOCOL, T. 2008b. HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet*, 372, 1894-1905.
- MCEL RATH, M. J. & HAYNES, B. F. 2010. Induction of immunity to human immunodeficiency virus type-1 by vaccination. *Immunity*, 33, 542-54.
- MCKNIGHT, A. & AASA-CHAPMAN, M. M. 2007. Clade specific neutralising vaccines for HIV: an appropriate target? *Curr HIV Res*, 5, 554-60.
- MCMICHAEL, A. J., BORROW, P., TOMARAS, G. D., GOONETILLEKE, N. & HAYNES, B. F. 2010. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol*, 10, 11-23.
- MELIKYAN, G. B., MARKOSYAN, R. M., HEMMATI, H., DELMEDICO, M. K., LAMBERT, D. M. & COHEN, F. S. 2000. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol*, 151, 413-23.

- MILLER, L. H., SAUL, A. & MAHANTY, S. 2005. Revisiting Freund's incomplete adjuvant for vaccines in the developing world. *Trends Parasitol*, 21, 412-4.
- MILLER, R. 2002. Imiquimod stimulates innate and cell mediated immunity which controls virus infections and tumors. *Int J Dermatol*, 41 Suppl 1, 3-6.
- MONTEFIORI, D. C. & MASCOLA, J. R. 2009. Neutralizing antibodies against HIV-1: can we elicit them with vaccines and how much do we need? *Curr Opin HIV AIDS*, 4, 347-51.
- MORGADO, M. G., SABINO, E. C., SHPAER, E. G., BONGERTZ, V., BRIGIDO, L., GUIMARAES, M. D., CASTILHO, E. A., GALVAO-CASTRO, B., MULLINS, J. I., HENDRY, R. M. & ET AL. 1994. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 10, 569-76.
- MORSE, M. A., CHAPMAN, R., POWDERLY, J., BLACKWELL, K., KELER, T., GREEN, J., RIGGS, R., HE, L. Z., RAMAKRISHNA, V., VITALE, L., ZHAO, B., BUTLER, S. A., HOBEIKA, A., OSADA, T., DAVIS, T., CLAY, T. & LYERLY, H. K. 2011. Phase I study utilizing a novel antigen-presenting cell-targeted vaccine with Toll-like receptor stimulation to induce immunity to self-antigens in cancer patients. *Clin Cancer Res*, 17, 4844-53.
- MOUQUET, H., KLEIN, F., SCHEID, J. F., WARNCKE, M., PIETZSCH, J., OLIVEIRA, T. Y., VELINZON, K., SEAMAN, M. S. & NUSSENZWEIG, M. C. 2011. Memory B cell antibodies to HIV-1 gp140 cloned from individuals infected with clade A and B viruses. *PLoS One*, 6, e24078.
- NAKANISHI, Y., LU, B., GERARD, C. & IWASAKI, A. 2009. CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature*, 462, 510-3.
- NEWMAN, K. D., ELAMANCHILI, P., KWON, G. S. & SAMUEL, J. 2002. Uptake of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres by antigen-presenting cells in vivo. *J Biomed Mater Res*, 60, 480-6.
- NURIEVA, R. I., CHUNG, Y., MARTINEZ, G. J., YANG, X. O., TANAKA, S., MATSKEVITCH, T. D., WANG, Y. H. & DONG, C. 2009. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science*, 325, 1001-5.
- O'NEILL, L. A., BRYANT, C. E. & DOYLE, S. L. 2009. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol Rev*, 61, 177-97.
- OPIE, E. L. & FREUND, J. 1937. An Experimental Study of Protective Inoculation with Heat Killed Tubercle Bacilli. *J Exp Med*, 66, 761-88.
- OPRAVIL, M., FIERZ, W., MATTER, L., BLASER, J. & LUTHY, R. 1991. Poor antibody response after tetanus and pneumococcal vaccination in immunocompromised, HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol*, 84, 185-9.
- PANCRE, V., DELHEM, N., YAZDANPANA, Y., DELANOYE, A., DELACRE, M., DEPIL, S., MORALES, O., MOUTON, Y. & AURIAULT, C. 2007. Presence of HIV-1 Nef specific CD4 T cell response is associated with non-progression in HIV-1 infection. *Vaccine*, 25, 5927-37.

- PANTOPHLET, R. & BURTON, D. R. 2006. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu Rev Immunol*, 24, 739-69.
- PASHINE, A., VALIANTE, N. M. & ULMER, J. B. 2005. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med*, 11, S63-8.
- PETROVAS, C., YAMAMOTO, T., GERNER, M. Y., BOSWELL, K. L., WLOKA, K., SMITH, E. C., AMBROZAK, D. R., SANDLER, N. G., TIMMER, K. J., SUN, X., PAN, L., POHOLEK, A., RAO, S. S., BRENCHELEY, J. M., ALAM, S. M., TOMARAS, G. D., ROEDERER, M., DOUEK, D. C., SEDER, R. A., GERMAIN, R. N., HADDAD, E. K. & KOUP, R. A. 2012. CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. *J Clin Invest*, 122, 3281-94.
- PITISUTTITHUM, P., GILBERT, P., GURWITH, M., HEYWARD, W., MARTIN, M., VAN GRIENSVEN, F., HU, D., TAPPERO, J. W. & CHOOPANYA, K. 2006. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis*, 194, 1661-71.
- POTTER, S. J., CHEW, C. B., STEAIN, M., DWYER, D. E. & SAKSENA, N. K. 2004. Obstacles to successful antiretroviral treatment of HIV-1 infection: problems & perspectives. *Indian J Med Res*, 119, 217-37.
- POTTS, K. E., KALISH, M. L., BANDEA, C. I., ORLOFF, G. M., ST LOUIS, M., BROWN, C., MALANDA, N., KAVUKA, M., SCHOCHETMAN, G., OU, C. Y. & ET AL. 1993. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 strains in Kinshasa, Zaire. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 9, 613-8.
- PRATIP NAG, J. K., VYTAUTAS SAPIEGA, ALAN L. LANDAY, JAMES W. BREMER, SOMPRASONG LAINGAM, JIRI MESTECKY, PATRICIA REICHELDERFER, ANDREA KOVACS, JONATHAN JOHN, BARBARA WEISER AND LINDA L. BAUM. 2004. Women with Cervicovaginal Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity Have Lower Genital HIV-1 RNA Loads. *J Infect Dis.*, 190.
- PRECOPIO, M. L., BETTS, M. R., PARRINO, J., PRICE, D. A., GOSTICK, E., AMBROZAK, D. R., ASHER, T. E., DOUEK, D. C., HARARI, A., PANTALEO, G., BAILER, R., GRAHAM, B. S., ROEDERER, M. & KOUP, R. A. 2007. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med*, 204, 1405-16.
- PRINS, R. M., CRAFT, N., BRUHN, K. W., KHAN-FAROOQI, H., KOYA, R. C., STRIPECKE, R., MILLER, J. F. & LIAU, L. M. 2006. The TLR-7 agonist, imiquimod, enhances dendritic cell survival and promotes tumor antigen-specific T cell priming: relation to central nervous system antitumor immunity. *J Immunol*, 176, 157-64.
- QUINN, T. C. 2008. HIV epidemiology and the effects of antiviral therapy on long-term consequences. *AIDS*, 22 Suppl 3, S7-12.
- RAJESH K. GUPTA, E. H. R., ERIK B. LINDBLAD, BERNARD BIZZINI, SHLOMO BEN-EFRAIM, CHANDER KANTA GUPTA 1993. Adjuvants — a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*, 11.

- RAMDUTH, D., DAY, C. L., THOBAGALE, C. F., MKHWANAZI, N. P., DE PIERRES, C., REDDY, S., VAN DER STOK, M., MNCUBE, Z., NAIR, K., MOODLEY, E. S., KAUFMANN, D. E., STREECK, H., COOVADIA, H. M., KIEPIELA, P., GOULDER, P. J. & WALKER, B. D. 2009. Immunodominant HIV-1 Cd4+ T cell epitopes in chronic untreated clade C HIV-1 infection. *PLoS One*, 4, e5013.
- RATTO-KIM S, C. J., COX JH, EXCLER JL, VALENCIA-MICOLTA A, THELIAN D, LO V, SAYEED E, POLONIS VR, EARL PL, MOSS B, ROBB ML, MICHAEL NL, KIM JH, MAROVICH MA. 2012. Heterologous prime-boost regimens using rAd35 and rMVA vectors elicit stronger cellular immune responses to HIV proteins than homologous regimens. *PLoS One*.
- RERKS-NGARM, S., PITISUTTITHUM, P., NITAYAPHAN, S., KAEWKUNGWAL, J., CHIU, J., PARIS, R., PREMSRI, N., NAMWAT, C., DE SOUZA, M., ADAMS, E., BENENSON, M., GURUNATHAN, S., TARTAGLIA, J., MCNEIL, J. G., FRANCIS, D. P., STABLEIN, D., BIRX, D. L., CHUNSUTTIWAT, S., KHAMBOONRUANG, C., THONGCHAROEN, P., ROBB, M. L., MICHAEL, N. L., KUNASOL, P. & KIM, J. H. 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med*, 361, 2209-20.
- REYNOLDS, M. R., WEILER, A. M., WEISGRAU, K. L., PIASKOWSKI, S. M., FURLOTT, J. R., WEINFURTER, J. T., KAIZU, M., SOMA, T., LEON, E. J., MACNAIR, C., LEAMAN, D. P., ZWICK, M. B., GOSTICK, E., MUSANI, S. K., PRICE, D. A., FRIEDRICH, T. C., RAKASZ, E. G., WILSON, N. A., MCDERMOTT, A. B., BOYLE, R., ALLISON, D. B., BURTON, D. R., KOFF, W. C. & WATKINS, D. I. 2008. Macaques vaccinated with live-attenuated SIV control replication of heterologous virus. *J Exp Med*, 205, 2537-50.
- RIBEIRO, S. P., ALMEIDA, R. R., ROSA, D. S., KALLAS, E., KALIL, J. & CUNHA-NETO, E. 2009. Priming with a DNA vaccine encoding HIV CD4+ T cell epitopes enhances responses against subsequent immunization with plasmid encoding Vif. *Congresso AIDS Vaccine*. Paris.
- RIBEIRO, S. P., ROSA, D. S., FONSECA, S. G., MAIRENA, E. C., POSTOL, E., OLIVEIRA, S. C., GUILHERME, L., KALIL, J. & CUNHA-NETO, E. 2010. A vaccine encoding conserved promiscuous HIV CD4 epitopes induces broad T cell responses in mice transgenic to multiple common HLA class II molecules. *PLoS One*, 5, e11072.
- ROSA, D. S., RIBEIRO, S. P., ALMEIDA, R. R., MAIRENA, E. C., POSTOL, E., KALIL, J. & CUNHA-NETO, E. 2011. A DNA Vaccine Encoding Multiple HIV CD4 Epitopes Elicits Vigorous Polyfunctional, Long-Lived CD4 and CD8 T Cell Responses. *PLoS One*, 6, e16921.
- ROSA, D. S., RIBEIRO, S. P. & CUNHA-NETO, E. 2010. CD4+ T cell epitope discovery and rational vaccine design. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 58, 121-30.
- ROSA, D. S., TZELEPIS, F., CUNHA, M. G., SOARES, I. S. & RODRIGUES, M. M. 2004. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. *Immunol Lett*, 92, 259-68.
- ROSENBERG, E. S., BILLINGSLEY, J. M., CALIENDO, A. M., BOSWELL, S. L., SAX, P. E., KALAMS, S. A. & WALKER, B. D. 1997. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*, 278, 1447-50.

- SACHA, J. B., GIRALDO-VELA, J. P., BUECHLER, M. B., MARTINS, M. A., MANESS, N. J., CHUNG, C., WALLACE, L. T., LEON, E. J., FRIEDRICH, T. C., WILSON, N. A., HIRAOKA, A. & WATKINS, D. I. 2009. Gag- and Nef-specific CD4+ T cells recognize and inhibit SIV replication in infected macrophages early after infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 9791-6.
- SALEMI, M., STRIMMER, K., HALL, W. W., DUFFY, M., DELAPORTE, E., MBOUP, S., PEETERS, M. & VANDAMME, A. M. 2001. Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. *FASEB J*, 15, 276-8.
- SALK, J. E. & LAURENT, A. M. 1952. The use of adjuvants in studies on influenza immunization. I. Measurements in monkeys of the dimensions of antigenicity of virus-mineral oil emulsions. *J Exp Med*, 95, 429-47.
- SCHAERLI P, W. K., LANG AB, LIPP M, LOETSCHER P, MOSER B. 2000. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. . *J. Exp. Med.* , 192, 1553–62.
- SCHEID, J. F., MOUQUET, H., UEBERHEIDE, B., DISKIN, R., KLEIN, F., OLIVEIRA, T. Y., PIETZSCH, J., FENYO, D., ABADIR, A., VELINZON, K., HURLEY, A., MYUNG, S., BOULAD, F., POIGNARD, P., BURTON, D. R., PEREYRA, F., HO, D. D., WALKER, B. D., SEAMAN, M. S., BJORKMAN, P. J., CHAIT, B. T. & NUSSENZWEIG, M. C. 2011. Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science*, 333, 1633-7.
- SEDER, R. A., DARRAH, P. A. & ROEDERER, M. 2008. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*, 8, 247-58.
- SEKALY, R. P. 2008. The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med*, 205, 7-12.
- SHARP, P. M., BAILES, E., ROBERTSON, D. L., GAO, F. & HAHN, B. H. 1999. Origins and evolution of AIDS viruses. *Biol Bull*, 196, 338-42.
- SHEDLOCK, D. J., SHEN, H. 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science*, 300, 337-9.
- SIMON, V., HO, D. D. & ABDOOL KARIM, Q. 2006. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet*, 368, 489-504.
- SOGHOIAN, D. Z., JESSEN, H., FLANDERS, M., SIERRA-DAVIDSON, K., CUTLER, S., PERTEL, T., RANASINGHE, S., LINDQVIST, M., DAVIS, I., LANE, K., RYCHERT, J., ROSENBERG, E. S., PIECHOCKA-TROCHA, A., BRASS, A. L., BRENCHEY, J. M., WALKER, B. D. & STREECK, H. 2012. HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Sci Transl Med*, 4, 123ra25.
- STAHL-HENNIG, C., EISENBLATTER, M., JASNY, E., RZEHAK, T., TENNER-RACZ, K., TRUMPFHELLER, C., SALAZAR, A. M., UBERLA, K., NIETO, K., KLEINSCHMIDT, J., SCHULTE, R., GISSMANN, L., MULLER, M., SACHER, A., RACZ, P., STEINMAN, R. M., UGUCCIONI, M. & IGNATIUS, R. 2009. Synthetic double-stranded RNAs are adjuvants

- for the induction of T helper 1 and humoral immune responses to human papillomavirus in rhesus macaques. *PLoS Pathog*, 5, e1000373.
- STAMATATOS, L., MORRIS, L., BURTON, D. R. & MASCOLA, J. R. 2009. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat Med*, 15, 866-70.
- STANLEY, M. A. 2002. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol*, 27, 571-7.
- STIEGLER, G., KUNERT, R., PURTSCHER, M., WOLBANK, S., VOGLAUER, R., STEINDL, F. & KATINGER, H. 2001. A potent cross-clade neutralizing human monodonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 17, 1757-65.
- SUNDLING, C., FORSELL, M. N., O'DELL, S., FENG, Y., CHAKRABARTI, B., RAO, S. S., LORE, K., MASCOLA, J. R., WYATT, R. T., DOUAGI, I. & KARLSSON HEDESTAM, G. B. 2010. Soluble HIV-1 Env trimers in adjuvant elicit potent and diverse functional B cell responses in primates. *J Exp Med*, 207, 2003-17.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 17, 1-14.
- TRKOLA, A., PURTSCHER, M., MUSTER, T., BALLAUN, C., BUCHACHER, A., SULLIVAN, N., SRINIVASAN, K., SODROSKI, J., MOORE, J. P. & KATINGER, H. 1996. Human monodonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 70, 1100-8.
- UNAIDS/WHO 2012. Report on the global AIDS epidemic.
- VAN HEUVERSWYN, F., LI, Y., NEEL, C., BAILES, E., KEELE, B. F., LIU, W., LOUL, S., BUTEL, C., LIEGEOIS, F., BIENVENUE, Y., NGOLLE, E. M., SHARP, P. M., SHAW, G. M., DELAPORTE, E., HAHN, B. H. & PEETERS, M. 2006. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature*, 444, 164.
- VON GEGERFELT, A., VALENTIN, A., ALCEA, C., VAN ROMPAY, K. K., MARTHAS, M. L., MONTEFIORI, D. C., PAVLAKIS, G. N. & FELBER, B. K. 2010. Emergence of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic CD4+ T cells and increased humoral responses correlate with control of rebounding viremia in CD8-depleted macaques infected with Rev-independent live-attenuated simian immunodeficiency virus. *J Immunol*, 185, 3348-58.
- WALKER, L. M. & BURTON, D. R. 2010. Rational antibody-based HIV-1 vaccine design: current approaches and future directions. *Curr Opin Immunol*, 22, 358-66.
- WALKER, L. M., HUBER, M., DOORES, K. J., FALKOWSKA, E., PEJCHAL, R., JULIEN, J. P., WANG, S. K., RAMOS, A., CHAN-HUI, P. Y., MOYLE, M., MITCHAM, J. L., HAMMOND, P. W., OLSEN, O. A., PHUNG, P., FLING, S., WONG, C. H., PHOGAT, S., WRIN, T., SIMEK, M. D., KOFF, W. C., WILSON, I. A., BURTON, D. R. & POIGNARD, P. 2011. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature*, 477, 466-70.

- WALKER, L. M., PHOGAT, S. K., CHAN-HUI, P. Y., WAGNER, D., PHUNG, P., GOSS, J. L., WRIN, T., SIMEK, M. D., FLING, S., MITCHAM, J. L., LEHRMAN, J. K., PRIDY, F. H., OLSEN, O. A., FREY, S. M., HAMMOND, P. W., KAMINSKY, S., ZAMB, T., MOYLE, M., KOFF, W. C., POIGNARD, P. & BURTON, D. R. 2009. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science*, 326, 285-9.
- WATKINS, D. I., BURTON, D. R., KALLAS, E. G., MOORE, J. P. & KOFF, W. C. 2008. Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat Med*, 14, 617-21.
- WEERATNA, R. D., MAKINEN, S. R., MCCLUSKIE, M. J. & DAVIS, H. L. 2005. TLR agonists as vaccine adjuvants: comparison of CpG ODN and Resiquimod (R-848). *Vaccine*, 23, 5263-70.
- WILSON, N. A., KEELE, B. F., REED, J. S., PIASKOWSKI, S. M., MACNAIR, C. E., BETT, A. J., LIANG, X., WANG, F., THORYK, E., HEIDECKER, G. J., CITRON, M. P., HUANG, L., LIN, J., VITELLI, S., AHN, C. D., KAIZU, M., MANESS, N. J., REYNOLDS, M. R., FRIEDRICH, T. C., LOFFREDO, J. T., RAKASZ, E. G., ERICKSON, S., ALLISON, D. B., PIATAK, M., JR., LIFSON, J. D., SHIVER, J. W., CASIMIRO, D. R., SHAW, G. M., HAHN, B. H. & WATKINS, D. I. 2009. Vaccine-induced cellular responses control simian immunodeficiency virus replication after heterologous challenge. *J Virol*, 83, 6508-21.
- WYAND, M. S., MANSON, K., MONTEFIORI, D. C., LIFSON, J. D., JOHNSON, R. P. & DESROSIERS, R. C. 1999. Protection by live, attenuated simian immunodeficiency virus against heterologous challenge. *J Virol*, 73, 8356-63.
- YANG, X., FLORIN, L., FARZAN, M., KOLCHINSKY, P., KWONG, P. D., SODROSKI, J. & WYATT, R. 2000. Modifications that stabilize human immunodeficiency virus envelope glycoprotein trimers in solution. *J Virol*, 74, 4746-54.
- YANG, X., LEE, J., MAHONY, E. M., KWONG, P. D., WYATT, R. & SODROSKI, J. 2002. Highly stable trimers formed by human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins fused with the trimeric motif of T4 bacteriophage fibritin. *J Virol*, 76, 4634-42.
- ZHU, Q., EGELSTON, C., GAGNON, S., SUI, Y., BELYAKOV, I. M., KLINMAN, D. M. & BERZOFISKY, J. A. 2010. Using 3 TLR ligands as a combination adjuvant induces qualitative changes in T cell responses needed for antiviral protection in mice. *J Clin Invest*, 120, 607-16.

9.MANUSCRITO

PLOS ONE

Bupivacaine enhances the magnitude and longevity of HIV-specific immune response after immunization with a CD4 epitope-based DNA vaccine

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Bupivacaine enhances the magnitude and longevity of HIV-specific immune response after immunization with a CD4 epitope-based DNA vaccine
Short Title:	Bupivacaine enhances HIV-specific immune responses
Corresponding Author:	Daniela Santoro Rosa Federal University of São Paulo- UNIFESP São Paulo, São Paulo BRAZIL
Keywords:	Bupivacaine; adjuvant; DNA vaccine; CD4 epitopes; HIV
Abstract:	<p>The development of an effective HIV vaccine is still major challenge. HIV vaccine trials conducted until now were not able to induce broad neutralizing antibodies or effective cell mediated immune responses. More recently, CD4+ T cells have been shown to play an important role in viral control and better prognosis. We have recently developed a DNA vaccine encoding 18 conserved multiple HLA-DR-binding HIV-1 CD4 epitopes (HIVBr18), capable of eliciting broad CD4+ T cell responses in BALB/c and in multiple HLA class II transgenic mice. Despite the advantages of DNA vaccines and a large number of clinical trials, it has been a challenge to transfer the success of inducing potent immunity observed in animal models to humans. Here, we sought to evaluate the potential use of bupivacaine, a local anesthetic, as an adjuvant for HIVBr18. We observed that the concomitant administration of the local anesthetic bupivacaine with the DNA vaccine HIVBr18 was able to increase the magnitude of CD4+ and CD8+ T cell responses and cytokine production without compromising the response breadth. Furthermore, we demonstrate that coadministration of bupivacaine also impacted the longevity of specific immune responses. Since bupivacaine is used in clinical settings, we believe that this concept may contribute to overcome the limited immunogenicity of DNA vaccines in humans.</p>
Order of Authors:	Susan Pereira Ribeiro Juliana De Souza Apostólico Rafael Ribeiro Almeida Jorge Kalil Edecio Cunha-Neto Daniela Santoro Rosa
Suggested Reviewers:	Luis CS Ferreira University of São Paulo lcsf@usp.br Silvia B Boscardin University of São Paulo sbboscardin@gmail.com
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	

Question	Response
<p>Competing Interest For yourself and on behalf of all the authors of this manuscript, please declare below any competing interests as described in the "PLoS Policy on Declaration and Evaluation of Competing Interests."</p> <p>You are responsible for recognizing and disclosing on behalf of all authors any competing interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other relevant financial or competing interests.</p> <p>If no competing interests exist, enter: "The authors have declared that no competing interests exist."</p> <p>If you have competing interests to declare, please fill out the text box completing the following statement: "I have read the journal's policy and have the following conflicts"</p> <p>* typeset</p>	<p>The authors have declared that no competing interests exist. The use of the peptide combination for vaccination purposes, among others, has been patented (USPTO No. 8,338,582. Continuation-in-part of PCT/BR06/000175. Title: "Anti-HIV immunogens and methods for inducing an immune response").</p>
<p>Financial Disclosure Describe the sources of funding that have supported the work. Please include relevant grant numbers and the URL of any funder's website. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders and amend the aforementioned sentence as needed.</p> <p>* typeset</p>	<p>The study was funded by the Brazilian National Research Council (CNPq) and São Paulo State Research Funding Agency (FAPESP). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.</p>
<p>Ethics Statement All research involving human participants must have been approved by the authors' institutional review board or equivalent committee(s) and that board must be named by the authors in the manuscript. For research involving human participants, informed consent must have been obtained (or the reason for lack of consent explained, e.g. the data were analyzed anonymously) and all clinical investigation must have been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Authors should submit a statement from their ethics committee or institutional review board indicating the approval of the research. We also encourage authors to submit a sample of a patient consent form and may require submission of completed</p>	<p>All experiments were performed in accordance to the guidelines of the Ethics committee of Federal University of São Paulo (UNIFESP) and approved under protocol number 0121/11. Also, it was approved by the Ethics committee of University of São Paulo (CAPPesq- HCFMUSP) under protocol number 775-06.</p>

<p>forms on particular occasions.</p> <p>All animal work must have been conducted according to relevant national and international guidelines. In accordance with the recommendations of the Weatherall report, "The use of non-human primates in research" we specifically require authors to include details of animal welfare and steps taken to ameliorate suffering in all work involving non-human primates. The relevant guidelines followed and the committee that approved the study should be identified in the ethics statement.</p> <p>Please enter your ethics statement below and place the same text at the beginning of the Methods section of your manuscript (with the subheading Ethics Statement). Enter "N/A" if you do not require an ethics statement.</p>	
---	--

26th July 2013

Dear Editor,

Please find enclosed the manuscript entitled “Bupivacaine enhances the magnitude and longevity of HIV-specific immune response after immunization with a CD4 epitope-based DNA vaccine” by Ribeiro *et al.*, to be submitted for publication at PLoS ONE.

We observed that the concomitant administration of the local anesthetic bupivacaine with a DNA vaccine encoding multiple HIV epitopes was able to increase the magnitude of CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses and cytokine production without compromising the response breadth. Furthermore, we demonstrate that co-administration of bupivacaine also impacts the longevity of specific immune responses. Since bupivacaine is used in clinical settings, we believe that this concept may contribute to overcome the limited immunogenicity of DNA vaccines in humans.

The results presented in this manuscript have not and will not be submitted elsewhere. The final version of the manuscript has been approved by all authors, who took due care to ensure the integrity of the work.

Sincerely yours,

Daniela Santoro Rosa, PhD

Associate Professor

Laboratory of Experimental Vaccines

Division of Immunology

Federal University of São Paulo (UNIFESP)

T + 5511 55764848 ext.2309

Bupivacaine enhances the magnitude and longevity of HIV-specific immune response after immunization with a CD4 epitope-based DNA vaccine

Susan Pereira Ribeiro^{1,4}, Juliana de Souza Apostólico^{1,2}, Rafael Ribeiro Almeida^{1,4}, Jorge Kalil^{1,3,4}, Edecio Cunha-Neto^{1,3,4}, Daniela Santoro Rosa^{1,2,4}.

¹ Laboratory of Clinical Immunology and Allergy-LIM60, University of São Paulo- School of Medicine, Brazil;

² Division of Immunology, Federal University of São Paulo (UNIFESP), Brazil;

³ Heart Institute (InCor), University of São Paulo- School of Medicine, São Paulo, Brazil;

⁴ Institute for Investigation in Immunology-INCT, São Paulo, Brazil.

Corresponding author:
Daniela Santoro Rosa, PhD
dsantororosa@gmail.com
Associate Professor
Laboratory of Experimental Vaccines
Division of Immunology
Federal University of São Paulo (UNIFESP)
Rua Botucatu, 862, 4^o andar
04023-062, São Paulo, SP, Brazil

Abstract

The development of an effective HIV vaccine is still major challenge. HIV vaccine trials conducted until now were not able to induce broad neutralizing antibodies or effective cell mediated immune responses. More recently, CD4⁺ T cells have been shown to play an important role in viral control and better prognosis. We have recently developed a DNA vaccine encoding 18 conserved multiple HLA-DR-binding HIV-1 CD4 epitopes (HIVBr18), capable of eliciting broad CD4⁺ T cell responses in BALB/c and in multiple HLA class II transgenic mice. Despite the advantages of DNA vaccines and a large number of clinical trials, it has been a challenge to transfer the success of inducing potent immunity observed in animal models to humans. Here, we sought to evaluate the potential use of bupivacaine, a local anesthetic, as an adjuvant for HIVBr18. We observed that the concomitant administration of the local anesthetic bupivacaine with the DNA vaccine HIVBr18 was able to increase the magnitude of CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses and cytokine production without compromising the response breadth. Furthermore, we demonstrate that coadministration of bupivacaine also impacted the longevity of specific immune responses. Since bupivacaine is used in clinical settings, we believe that this concept may contribute to overcome the limited immunogenicity of DNA vaccines in humans.

Introduction

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection and the incurable disease it causes, the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), remain a major public health problem in endemic countries. Despite the successful development of new antiretroviral drugs in the last years, there is still no vaccine available.

In recent years, several studies aimed to uncover new strategies to develop an effective vaccine to prevent HIV infection. It is widely accepted that an effective prophylactic vaccine against HIV-1 should elicit neutralizing antibodies (Nabs) that if present at the time of transmission could block HIV acquisition. However, all vaccine candidates based on the induction of neutralizing antibodies failed to induce Nabs and also failed large-scale efficacy phase III trials [1,2]. Therefore, the HIV prophylactic vaccine research shifted to evaluating vaccine candidates capable of inducing cell-mediated immune responses (CMI). A vaccine that elicits CMI will be able to limit viral transmission and prevent HIV-1 associated disease progression by controlling viral loads in those individuals who become infected [3-5].

Although five candidate vaccine strategies were tested in phase IIb/III efficacy trials, only one demonstrated some level of protection [6]. The recent phase III clinical trial RV144 was the first to demonstrate a modest evidence of protection against acquisition of HIV-1 infection among vaccinees in the absence of serum-neutralizing antibodies, with an estimated vaccine efficacy of 31.2% [7,8].

Preliminary analysis of the induced immune responses behind the protection revealed that most vaccinated HIV-negative individuals presented predominantly polyfunctional effector CD4⁺ T cell responses against the V2 region of the envelope protein [9].

Control of viral infections is crucially dependent on CD4⁺ T cell responses [10]. In this scenario, CD4⁺ T cells are mainly implicated in helping CD8⁺ cytotoxic T cell

responses (CTL), as well as in supporting B cells through antibody class switch recombination and affinity maturation. During HIV infection, and also in simian immunodeficiency virus (SIV) infection in nonhuman primates, CD4⁺ T cells can suppress virus replication directly (through perforin and granzymes) or indirectly (through the release of soluble antiviral chemokines), maintain mucosal immunity by producing IL-17, and produce cytokines to help B and CD8⁺ T cells (for a review see [11]). In SIV infection, specific CD4⁺ T cells contribute directly to effective suppression of the virus by inhibiting SIV replication in macrophages [12]. More recently, it was demonstrated that HIV-infected individuals with lower set point viral load, slower disease progression and better clinical outcome in the absence of antiretroviral therapy, show a significant expansion of HIV-specific CD4⁺ T cell responses. Moreover, these subjects present enhanced CD4⁺ T cell cytolytic activity and a higher frequency of IFN- γ producing cells [13]. It is thus clear that a successful HIV vaccine should also induce strong CD4⁺ T cell responses [14].

We have recently identified a group of conserved CD4 epitopes from HIV that were able to bind to multiple HLA-DR molecules. Synthetic peptides representing such epitopes were recognized by PBMC from over 90% of HIV-1 infected individuals [15]. More recently, we reported that a DNA vaccine and a recombinant adenovirus encoding such epitopes (HIVBr18) were able to induce broad specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses in BALB/c [16,17] and in transgenic mice to common HLA class II alleles (HLA-DR2, -DR4, -DQ6, -DQ8) [18]. Analysis of the functional profile induced by these vaccines demonstrated that HIVBr18 was able to induce high magnitude, broad and polyfunctional CD4⁺/CD8⁺ T cell responses, and 8 out of 18 vaccine-encoded peptides were recognized. Moreover, the vaccine also generated long-lived central and effector memory CD4⁺ T cells [16].

Immunization using plasmid DNA is a promising technology for gene delivery. It offers several potential advantages over conventional approaches, including safety profile and feasible production method [19]. Despite the advantages and a large number of clinical trials, it has been a challenge to transfer the success of

inducing potent immunity observed in animal models to humans. The mechanism of such phenomenon is not fully understood, but it is likely that inefficient transfection is a major determinant [20]. Such observations have led to the pursuit of alternative strategies to enhance immune responses to the encoding antigen [21]. One alternative to improve the immunogenicity of DNA immunizations is the concomitant use of adjuvants. Adjuvants (from the latin *adjuvare*=help) are substances that when incorporated into vaccine formulations, enhance their immunogenicity. Addition of such adjuvants increases breadth, magnitude and also skews the type of the immune response [21]. They can also lead to a reduction of the dose and/or number of immunizations for a given vaccine [22-24] and even increase seroconversion rates in populations with reduced responsiveness [25,26]. To power the immunogenicity of DNA immunization using HIV antigens, genes coding cytokines [27-30] and also toll like receptors (TLRs) agonists [31,32] have been used.

Chemical compounds were evaluated as adjuvants for DNA vaccines [33]. One of such compounds is bupivacaine or marcaine, a local anesthetic drug belonging to the *amino amide* group that blocks neuron transmission. Bupivacaine is also a myotoxin that when injected destroys myofiber cells leading to the clearance of cell debris and proliferation of myoblasts [34]. In addition, the recruitment of inflammatory cells to the site of bupivacaine injection may allow for transfection of immune cells [35]. Pretreatment of muscle with 0.25–0.5% bupivacaine prior to DNA injection increases gene expression by 30–50-fold, resulting in an enhancement of the immune responses [34,36]. Also, the complex formed with bupivacaine protects DNA from nuclease degradation, and intramuscular immunization with this formulation results in greater immune responses against the encoded antigen [33,37]. Further in support of the adjuvant effect of bupivacaine, mucosal immunization with a DNA vaccine encoding an HIV-1 envelope protein was able to elicit vaginal immunoglobulins that specifically bound to the HIV-1 envelope and neutralized HIV-1 infectivity *in vitro* [38]. Recently, bupivacaine was used in combination with a DNA vaccine encoding *Streptococcus mutants* antigens, and intranasal or intramuscular

immunization induced immunoglobulins, IFN- γ production and significant reduction in dental caries lesions [39].

In the present study, we analyzed the adjuvant property of the concomitant use of bupivacaine on the cellular immune response against the epitopes encoded by the DNA vaccine HIVBr18. Our data suggest that the administration of a DNA vaccine encoding HIV CD4 T cell epitopes together with bupivacaine at the time of immunization results in enhancement of the magnitude and longevity of antigen-specific cellular immune responses.

Methods

DNA vaccine

We previously designed a multiepitope construct containing the mammalian codon optimized nucleotide sequences of the 18 HIV-1 CD4 epitopes described previously by [15]: p17 (73-89), p24 (33-45), p24 (131-150), p6 (32-46), pol (63-77), pol (136-150), pol (785-799), gp41 (261-276), gp160 (19-31), gp160 (174-185), gp160 (188-201), gp160 (481-498), rev (11-27), vpr (58-72), vpr (65-82), vif (144-158), vpu (6-20) and nef (180-194). The artificial gene (EZBiolab) was cloned into the pVAX1 vector (Invitrogen) to generate the HIVBr18 plasmid, as previously described [16,18]. The DNA vaccine was purified using the Endofree Plasmid Giga Kit from Qiagen according to manufacturer's instructions.

Mice and immunization

BALB/c mice were purchased from Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) and housed at the experimental animal facilities at the Division of Immunology, Federal University of São Paulo (UNIFESP) under specific pathogen-free conditions. In all experiments, groups of 6 mice were immunized intramuscularly (I.M) three times, 2 weeks apart, with 100 μ g of the DNA vaccine HIVBr18 in the presence or absence of 0,25% bupivacaine hydrochloride (Sigma-Aldrich). Control mice received 100 μ g of the empty vector pVAX in the presence of 0,25% bupivacaine

hydrochloride. A volume of 50 μ L was injected into each quadriceps. Two or twelve weeks after the last DNA injection, mice were euthanized with CO₂.

Ethics statement

All experiments were performed in accordance to the guidelines of the Ethics committee of Federal University of São Paulo (UNIFESP) and approved under protocol number 0121/11. Also, it was approved by the Ethics committee of University of São Paulo (CAPPesq- HCFMUSP) under protocol number 775-06.

Peptide synthesis

The eighteen multiple HLA-DR binding peptides derived from the conserved regions of HIV-1 B subtype consensus were synthesized by GL Biochem (Vancouver, Canada).

Spleen cells isolation

Mice were euthanized and the spleen was removed aseptically. After obtaining single cell suspensions, cells were washed in 10 mL of RPMI 1640. Cells were then resuspended in R-10 (RPMI supplemented with 10% of fetal bovine serum (GIBCO), 2 mM L-glutamine (Sigma), 10 mM Hepes (Sigma), 1 mM sodium pyruvate, 1% v/v non-essential aminoacids solution, 40 μ g/mL of Gentamicin, 20 μ g/mL of Peflacin and 5x10⁻⁵M 2- mercaptoetanol (SIGMA). The viability of cells was evaluated using 0.2% Trypan Blue exclusion dye to discriminate between live and dead cells. Cell concentration was estimated with the aid of a cell counter (Countess- Invitrogen) and adjusted in cell culture medium.

Enzyme-linked Immunospot Assays (ELISPOT)

Splenocytes from immunized mice were assayed for their ability to secrete IFN γ or IL-2 after *in vitro* stimulation with 5 μ M of individual or pooled HIV-1 peptides using the ELISPOT assay. The ELISPOT assay was performed using murine IFN- γ or IL-2 ELISPOT kit (BD Biosciences) according to manufacturer's

instructions. Spots were counted using an automated stereomicroscope (KS ELISPOT, Zeiss).

Cytometric Bead array

One million splenocytes were incubated for 120 hours at 37°C in the presence of 5 μ M pooled HIV-1 peptides. Supernatants harvested from cultures were stored at -20°C until cytokine analysis. IL-2, IL-4, IL-5, TNF α and IFN- γ were detected simultaneously using mouse Th1/Th2 Cytokine cytometric bead array (CBA) Kit (BD Biosciences), according to manufacturer's instructions. The range of detection was 20-5000 pg/mL for each cytokine.

CFSE-based proliferation assay

To monitor the expansion and proliferation of HIV-specific T cells, splenocytes from immunized mice were labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) [40]. Briefly, freshly isolated splenocytes were resuspended (50×10^6 /mL) in PBS and labeled with 1.25 μ M of CFSE (Molecular Probes) at 37°C for 10 minutes. The reaction was quenched with RPMI 1640 supplemented with 10% FBS (R10) and cells were washed with R10 before resuspending in RPMI 1640. Cells were cultured in 96 well round-bottomed plates (5×10^5 /well in triplicate) for 5 days at 37°C and 5% CO₂ with medium only or pooled HIV-1 peptides (5 μ M). Cells were then harvested, washed with 100 μ L of FACS buffer (PBS with 0.5% BSA and 2mM EDTA) and stained with anti-CD3 PE, anti-CD4 PerCP and anti-CD8 APC monoclonal antibodies (BD Pharmingen) for 45 minutes at 4°C. Cells were then washed and resuspended in FACS buffer. Samples were acquired on a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences) and then analyzed using FlowJo software (version 10, Tree Star).

Analysis of polyfunctional HIV-specific T cell responses

Splenocytes were labeled with CFSE as described above. CFSE-labeled cells were incubated for 4 days at 37°C and 5% CO₂ with medium only or pooled HIV-1 peptides (5 µM). After 4 days of incubation, cells were restimulated in the presence of 2 µg/mL anti-CD28 (BD Biosciences), pooled HIV-1 peptides and Brefeldin A- GolgiPlugTM (BD Biosciences) for the last 12 hours. After the incubation period, cells were surface and intracellular stained as described [16]. Samples were acquired on a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences) and then analyzed using FlowJo software (version 10, Tree Star). For each flow cytometry experiment performed, unstained and all single-color controls were processed to allow proper compensation.

Data analysis

Statistical significance (p-values) was calculated by using One-way ANOVA and Tukey's honestly significantly different (HSD). Statistical analysis and graphical representation of data was performed using GraphPad Prism version 5.0 software.

Results

Bupivacaine enhances the magnitude of T cell responses

To analyze whether immunization in the presence of bupivacaine could enhance vaccine-specific T cell responses, mice were immunized with the DNA vaccine HIVBr18 in the presence or absence of the anesthetic. Control mice were immunized with the empty vector pVAX and bupivacaine. Fifteen days after the last dose, splenocytes from immunized mice were incubated with pooled HIV-1 peptides, and specific IFN γ and IL-2 secretion were measured by ELISPOT assay. We observed a significantly higher number of peptide-specific IFN γ secreting cells in spleens from mice immunized in the presence of bupivacaine (figure 1A), and the same pattern was observed for IL-2 (figure 1B). In contrast,

splenocytes from pVAX1 immunized mice presented negligible numbers of cytokine secreting cells to the same HIV-1 peptides.

To discriminate between the effect of bupivacaine in vaccine-specific CD4⁺ and CD8⁺ specific T cell responses we performed a CFSE-based proliferation assay. Taking into account multiple experiments, we observed that addition of bupivacaine was able to increase CD4⁺ T cell proliferation and to a lesser extent proliferation of CD8⁺ T cells (figures 2A and B, respectively).

In order to analyze the vaccine induced cytokine secretion profile, splenocytes from immunized mice were cultured with pooled HIV peptides and the assessment of Th1 and Th2 cytokines determined by flow cytometry using cytometric bead array (CBA). After culture, we detected secretion of TNF α , IFN- γ and IL-2 and negligible levels of IL-5 and IL-4 in splenocytes from mice immunized with HIVBr18 in the presence or absence of bupivacaine (figure 3). Interestingly, we observed a higher production of these cytokines in culture of splenocytes from mice immunized with bupivacaine. In contrast, splenocytes from pVAX1 immunized mice failed to secrete the same cytokines upon restimulation with the same peptides.

Using multiparameter flow cytometry, we sought to characterize antigen-specific T cells (CD4⁺ and CD8⁺) based on their ability to proliferate (CFSE dilution assay) and produce the cytokines IFN- γ , TNF α and IL-2 at a single cell level. Using boolean analysis, that allows the identification of proliferating cells that produce any cytokine in any combination, we found that bupivacaine acts as an adjuvant increasing the numbers of proliferating CD4⁺ and CD8⁺ T cells that produce the effector cytokines (figures 4A and B, respectively). In fact, we detected as many as 8.5% and 14% of proliferating (CFSE^{low})-cytokine producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells, respectively.

Splenocytes from pVAX1 immunized mice presented negligible levels of proliferation and cytokine secreting cells to the same pooled HIV-1 peptides. Taken together these results suggest that bupivacaine enhances the overall magnitude of the Th1 vaccine induced immune responses.

Bupivacaine does not alter breadth of T cell responses

Given that immunization with bupivacaine resulted in increase in the overall magnitude of specific cellular immune responses, we asked whether such an effect would have consequences that affect the breadth of the response. For this purpose, we determined the number of IFN- γ and IL-2 secreting cells against each vaccine-encoded peptide individually. Noteworthy, immunization with HIVBr18 induced responses against the same 8 out of 18 vaccine encoded peptides that were previously described by our group [16]. Peptides p17 (73-89), p6 (32-46), pol (63-77), gp160 (188-201), rev(11-27), vpr (65-82), vif (144-158) and nef (180-194) were able to induce both IFN- γ and IL-2 secreting cells and we observed no significant impact on the breadth of specific immune response irrespective the use of bupivacaine as an adjuvant (figure 5A and B). The use of bupivacaine had an impact on the magnitude of IFN- γ and IL-2 responses for the peptides p17 (73-89), p6 (32-46), pol (63-77), gp160 (188-201), rev (11-27) and vpr (65-82). These results demonstrate that bupivacaine plays a role in the magnitude but not in the breadth of the vaccine-specific immune response.

Long-lived T cell responses after immunization with bupivacaine

A critical feature of an effective vaccine adjuvant is its ability to promote long-term immunological memory. To address whether bupivacaine could improve memory induction in immunized mice, we measured vaccine-induced cytokine production and T cell proliferation 90 days after the last dose. In fact, we observed that mice immunized with HIVBr18 plus bupivacaine presented significantly higher numbers of IFN- γ secreting cells when compared to mice immunized with HIVBr18 only. Interestingly, we found that 12% of CD4⁺ and 17% of CD8⁺ T cells from mice immunized in the presence of bupivacaine retained proliferative capacity against HIV-1 peptides (figure 6). In contrast, 4.8% of CD4⁺ and 12% of CD8⁺ T cells from mice immunized with HIVBr18 only proliferated against HIV peptides. Thus, these results demonstrate that bupivacaine also facilitates the development of vaccine induced memory responses.

Discussion

In the present study we sought to evaluate the concomitant use of bupivacaine to improve the immunopotency of our DNA vaccine. The DNA vaccine used in this work, HIVBr18, encodes 18 CD4⁺ T cell promiscuous HIV-1 epitopes that were previously described by our group to be frequently recognized by PBMC from HIV-1 infected individuals [15]. We also demonstrated that this vaccine induced polyfunctional, long-lasting and broad immune responses in several strains of mice, including transgenic to human HLA class II molecules [16] [18].

To our knowledge this study is the first to characterize the effect of the concomitant use of Bupivacaine with a DNA vaccine encoding several epitopes on vaccine-specific cellular immune responses. Bupivacaine is usually administered several days before immunization with the vaccine [36], but such delay in conjunction with the fact that the injection must be at the same site poses a major concern when large-scale vaccination is needed. Recently, bupivacaine mixed with DNA generated a similar immune response when compared to separated administration [41].

We demonstrated that immunization of mice with the DNA vaccine in the presence of bupivacaine was able to increase the magnitude of vaccine-specific cellular immune responses. The production of type 1 cytokines, proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and induction of polyfunctional T cells was higher in the group co-immunized with HIVBr18 and bupivacaine. Bupivacaine has been used before as an adjuvant for a DNA vaccine encoding the envelope protein of HIV to enhance antibody titers and neutralization ability [38].

The development of a vaccine against HIV that induces cellular mediated immune responses by specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in order to confer long-term protective immunity is supported by several studies [4, 5]. It is believed that this type of vaccine would reduce viral load and transmission and postpone the development of the onset of the disease-related symptoms [42]. Strong specific CD4⁺ T cell response is associated with control of viral replication and long-term nonprogression to AIDS [43,44] [11,45]. Furthermore, CD4⁺ T cells from HIV-infected patients have been shown to express large amounts of cytolytic effector

molecules and HIV-specific CD4⁺ T cell clones and cell lines can readily mediate target cell lysis and viral inhibition *in vitro* [12,13,46], even in the absence of genetic and immunological environment that favors the generation of protective HIV-specific responses [47]. Polyfunctional HIV-1-specific CD4⁺ T cells are normally present among HIV-1 infected individuals with nonprogressive disease [48,49]. Moreover, HIV elite controllers present strong polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses in blood and rectal mucosa [50,51].

Memory T cells may be critical to generate long-term immunity and to effectively induce vaccine viral control. For example, immunization with the effective vaccinia virus is able to generate specific long-lived memory CD4⁺ T cells that survive for more than 30 years [52]. Notably, we previously demonstrated that HIVBr18 immunization induced a long-lived memory cell pool [53]. We hereby demonstrated that co-immunization with bupivacaine also induced long-lasting memory responses against vaccine encoded HIV-1 peptides with higher magnitude.

We believe that the data provided here may contribute for the development of a future HIV DNA-based vaccine.

Acknowledgments

We thank Mr. Luis Roberto Mundel and Mr. Geová Pereira Santos for assistance at the animal facility.

References

1. Flynn MN, Forthal DN, Harro CD, Judson FN, Mayer KH, et al. (2005) Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *Journal of Infectious Diseases* 191: 654-665.
2. Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, Heyward W, Martin M, et al. (2006) Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *Journal of Infectious Diseases* 194: 1661-1671.
3. McMichael AJ (2006) HIV vaccines. *Annu Rev Immunol* 24: 227-255.
4. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF (2010) The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Reviews Immunology* 10: 11-23.
5. Watkins DI (2008) The hope for an HIV vaccine based on induction of CD8(+) T lymphocytes - A review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 119-129.

6. O'Connell RJ, Kim JH, Corey L, Michael NL (2012) Human immunodeficiency virus vaccine trials. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a007351.
7. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, et al. (2009) Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *New England Journal of Medicine* 361: 2209-2220.
8. Rerks-Ngarm S, Paris RM, Chunsuttiwat S, Prensri N, Namwat C, et al. (2013) Extended evaluation of the virologic, immunologic, and clinical course of volunteers who acquired HIV-1 infection in a phase III vaccine trial of ALVAC-HIV and AIDSVAX B/E. *J Infect Dis* 207: 1195-1205.
9. de Souza MS, Ratto-Kim S, Chuenarom W, Schuetz A, Chantakulkij S, et al. (2012) The Thai phase III trial (RV144) vaccine regimen induces T cell responses that preferentially target epitopes within the V2 region of HIV-1 envelope. *J Immunol* 188: 5166-5176.
10. Walton S, Mandaric S, Oxenius A (2013) CD4 T cell responses in latent and chronic viral infections. *Front Immunol* 4: 105.
11. Klatt NR, Silvestri G (2012) CD4+ T cells and HIV: A paradoxical Pas de Deux. *Sci Transl Med* 4: 123ps124.
12. Sacha JB, Giraldo-Vela JP, Buechler MB, Martins MA, Maness NJ, et al. (2009) Gag- and Nef-specific CD4(+) T cells recognize and inhibit SIV replication in infected macrophages early after infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 9791-9796.
13. Soghoian DZ, Jessen H, Flanders M, Sierra-Davidson K, Cutler S, et al. (2012) HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Sci Transl Med* 4: 123ra125.
14. Virgin HW, Walker BD (2010) Immunology and the elusive AIDS vaccine. *Nature* 464: 224-231.
15. Fonseca SG, Coutinho-Silva A, Fonseca LA, Segurado AC, Moraes SL, et al. (2006) Identification of novel consensus CD4 T-cell epitopes from clade B HIV-1 whole genome that are frequently recognized by HIV-1 infected patients. *AIDS* 20: 2263-2273.
16. Rosa DS, Ribeiro SP, Almeida RR, Mairena EC, Postol E, et al. (2011) A DNA Vaccine Encoding Multiple HIV CD4 Epitopes Elicits Vigorous Polyfunctional, Long-Lived CD4(+) and CD8(+) T Cell Responses. *Plos One* 6.
17. Rosa DS, Ribeiro SP, Almeida RR, Mairena EC, Kalil J, et al. (2011) A Recombinant Adenovirus Encoding Multiple HIV-1 Epitopes Induces Stronger CD4 T cell Responses than a DNA Vaccine in Mice. *J Vaccines Vaccin* 2.
18. Ribeiro SP, Rosa DS, Fonseca SG, Mairena EC, Postol E, et al. (2010) A Vaccine Encoding Conserved Promiscuous HIV CD4 Epitopes Induces Broad T Cell Responses in Mice Transgenic to Multiple Common HLA Class II Molecules. *Plos One* 5.
19. Ledgerwood JE, Graham BS (2009) DNA vaccines: a safe and efficient platform technology for responding to emerging infectious diseases. *Hum Vaccin* 5: 623-626.
20. Apostolopoulos V, Weiner DB (2009) Development of more efficient and effective DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines* 8: 1133-1134.
21. Abdulhaqq SA, Weiner DB (2008) DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunol Res* 42: 219-232.
22. Halperin SA, Ward B, Cooper C, Predy G, Diaz-Mitoma F, et al. (2012) Comparison of safety and immunogenicity of two doses of investigational hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate

- oligodeoxyribonucleotide and three doses of a licensed hepatitis B vaccine in healthy adults 18-55 years of age. *Vaccine* 30: 2556-2563.
23. Galli G, Hancock K, Hoschler K, DeVos J, Praus M, et al. (2009) Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-lived human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted prepandemic vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7962-7967.
 24. Banzhoff A, Gasparini R, Laghi-Pasini F, Staniscia T, Durando P, et al. (2009) MF59-adjuvanted H5N1 vaccine induces immunologic memory and heterotypic antibody responses in non-elderly and elderly adults. *PLoS One* 4: e4384.
 25. McElhaney JE, Beran J, Devaster JM, Esen M, Launay O, et al. (2013) AS03-adjuvanted versus non-adjuvanted inactivated trivalent influenza vaccine against seasonal influenza in elderly people: a phase 3 randomised trial. *Lancet Infect Dis* 13: 485-496.
 26. Podda A (2001) The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine* 19: 2673-2680.
 27. Nimal S, McCormick AL, Thomas MS, Heath AW (2005) An interferon gamma-gp120 fusion delivered as a DNA vaccine induces enhanced priming. *Vaccine* 23: 3984-3990.
 28. Nimal S, Heath AW, Thomas MS (2006) Enhancement of immune responses to an HIV gp120 DNA vaccine by fusion to TNF alpha cDNA. *Vaccine* 24: 3298-3308.
 29. Morrow MP, Weiner DB (2008) Cytokines as adjuvants for improving anti-HIV responses. *AIDS* 22: 333-338.
 30. Kraynyak KA, Kutzler MA, Cisper NJ, Laddy DJ, Morrow MP, et al. (2009) Plasmid-encoded interleukin-15 receptor alpha enhances specific immune responses induced by a DNA vaccine in vivo. *Hum Gene Ther* 20: 1143-1156.
 31. Kwissa M, Amara RR, Robinson HL, Moss B, Alkan S, et al. (2007) Adjuvanting a DNA vaccine with a TLR9 ligand plus Flt3 ligand results in enhanced cellular immunity against the simian immunodeficiency virus. *J Exp Med* 204: 2733-2746.
 32. Wille-Reece U, Flynn BJ, Lore K, Koup RA, Miles AP, et al. (2006) Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. *J Exp Med* 203: 1249-1258.
 33. Jin H, Li Y, Ma Z, Zhang F, Xie Q, et al. (2004) Effect of chemical adjuvants on DNA vaccination. *Vaccine* 22: 2925-2935.
 34. Vitadello M, Schiaffino MV, Picard A, Scarpa M, Schiaffino S (1994) Gene transfer in regenerating muscle. *Hum Gene Ther* 5: 11-18.
 35. Danko I, Fritz JD, Jiao S, Hogan K, Latendresse JS, et al. (1994) Pharmacological enhancement of in vivo foreign gene expression in muscle. *Gene Ther* 1: 114-121.
 36. Wang B, Ugen KE, Srikantan V, Agadjanyan MG, Dang K, et al. (1993) Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4156-4160.
 37. Pachuk CJ, Ciccarelli RB, Samuel M, Bayer ME, Troutman RD, et al. (2000) Characterization of a new class of DNA delivery complexes formed by the local anesthetic bupivacaine. *Biochim Biophys Acta* 1468: 20-30.
 38. Wang B, Dang K, Agadjanyan MG, Srikantan V, Li F, et al. (1997) Mucosal immunization with a DNA vaccine induces immune responses against HIV-1 at a mucosal site. *Vaccine* 15: 821-825.
 39. Liu GX, Xu QA, Jin J, Li YH, Jia R, et al. (2009) Mucosal and systemic immunization with targeted fusion anti-carries DNA plasmid in young rats. *Vaccine* 27: 2940-2947.

40. Quah BJ, Warren HS, Parish CR (2007) Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc* 2: 2049-2056.
41. Sin JI, Kim J, Pachuk C, Weiner DB (2000) Interleukin 7 can enhance antigen-specific cytotoxic-T-lymphocyte and/or Th2-type immune responses in vivo. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 751-758.
42. Streeck H, D'Souza MP, Littman DR, Crotty S (2013) Harnessing CD4(+) T cell responses in HIV vaccine development. *Nat Med* 19: 143-149.
43. Gandhi RT, Walker BD (2002) Immunologic control of HIV-1. *Annu Rev Med* 53: 149-172.
44. Martinez V, Costagliola D, Bonduelle O, N'go N, Schnuriger A, et al. (2005) Combination of HIV-1-specific CD4 Th1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term nonprogression. *J Infect Dis* 191: 2053-2063.
45. Pancre V, Delhem N, Yazdanpanah Y, Delanoye A, Delacre M, et al. (2007) Presence of HIV-1 Nef specific CD4 T cell response is associated with non-progression in HIV-1 infection. *Vaccine* 25: 5927-5937.
46. Norris PJ, Moffett HF, Yang OO, Kaufmann DE, Clark MJ, et al. (2004) Beyond help: Direct effector functions of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4(+) T cells. *Journal of Virology* 78: 8844-8851.
47. International HIVCS, Pereyra F, Jia X, McLaren PJ, Telenti A, et al. (2010) The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* 330: 1551-1557.
48. Kannanganat S, Kapogiannis BG, Ibegbu C, Chennareddi L, Goepfert P, et al. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines. *J Virol* 81: 12071-12076.
49. Harari A, Petitpierre S, Vallerian F, Pantaleo G (2004) Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood* 103: 966-972.
50. Ferre AL, Hunt PW, Critchfield JW, Young DH, Morris MM, et al. (2009) Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood* 113: 3978-3989.
51. Ferre AL, Hunt PW, McConnell DH, Morris MM, Garcia JC, et al. (2010) HIV controllers with HLA-DRB1*13 and HLA-DQB1*06 alleles have strong, polyfunctional mucosal CD4+ T-cell responses. *J Virol* 84: 11020-11029.
52. Wang M, Tang ST, Lund O, Dziegiel MH, Buus S, et al. (2009) High-affinity human leucocyte antigen class I binding variola-derived peptides induce CD4+ T cell responses more than 30 years post-vaccinia virus vaccination. *Clin Exp Immunol* 155: 441-446.
53. Rosa DS, Ribeiro SP, Almeida RR, Mairena EC, Postol E, et al. (2011) A DNA vaccine encoding multiple HIV CD4 epitopes elicits vigorous polyfunctional, long-lived CD4+ and CD8+ T cell responses. *PLoS One* 6: e16921.

Figure legends

Figure 1: Immunization with HIVBr18 and bupivacaine induces higher number of IFN- γ and IL-2 secreting cells against HIV peptides. Two weeks

after the last immunization with HIVBr18 in the presence or absence of bupivacaine, spleen cells from 6 BALB/c mice were cultured in the presence of pooled HIV-1 peptides (5 μ M) or medium only. Frequencies of HIV peptide-specific IFN- γ (A) and IL-2 (B) secreting cells were measured by ELISPOT assay. These data are representative of four independent experiments with similar results; SFU: spot forming units; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 2: Coadministration of HIVBr18 and bupivacaine enhances specific T cell proliferation. Proliferative T cell responses were assessed by CFSE dilution assay. Splenocytes from immunized mice were labeled with CFSE and cultured for 5 days in the presence of pooled HIV-1 peptides or medium only. After staining with fluorochrome-labeled anti-CD3, -CD4 and -CD8 monoclonal antibodies, cells were analyzed by flow cytometry. CFSE dilution on gated CD3⁺CD4⁺ (A) or CD3⁺CD8⁺ (B) cells was used as a readout for antigen-specific proliferation. Five hundred thousand events were acquired in a live lymphocyte gate. The percent of proliferating CD4⁺ and CD8⁺ CFSE^{low} cells was determined in the CD3⁺ cell population. The percentage of proliferating T cells was calculated subtracting the values of peptide-stimulated from non-stimulated cultures. Data are representative of five independent immunization experiments; ** $p < 0.01$, NS, non-significant

Figure 3: Immunization with HIVBr18 together with bupivacaine induces proliferating T cells with a polyfunctional type 1 cytokine profile. Two weeks after the last immunization spleen cells were collected, labeled with CFSE and cultured for 4 days in the presence of pooled HIV-1 peptides or medium only. On day 4, cells were pulsed for 12 hours with pooled peptides in the presence of costimulatory antibody and Brefeldin A. Cells were then surface stained with antibodies to CD4 and CD8, permeabilized and stained for intracellular cytokines (IFN- γ , TNF α and IL-2) and CD3. Total frequencies of proliferating (CFSE^{low}) and cytokine-producing CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T cells were determined by Boolean analysis. Background responses detected in negative control tubes were subtracted from those detected in stimulated samples for every specific functional combination. Negative control tubes include cells stimulated with medium and cells from pVAX1 immunized mice stimulated with pooled peptides. For each sample, 10⁶ events were collected in the live lymphocyte gate; * $p < 0.05$.

Figure 4: Immunization with HIVBr18 together with bupivacaine induces higher Th1 type cytokine production. Splenocytes from immunized mice were cultured in the presence of pooled HIV-1 peptides. After 120 hours, levels of IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-4 and IL-5 in culture supernatants were measured using the mouse Th1/Th2 cytokine cytometric bead array (CBA) by flow cytometry, and analyzed using FCAP array software. Values of cytokine production by peptide-stimulated splenocytes from pVAX1 immunized group were always below the detection limit.

Figure 5: Immunization with HIVBr18 and bupivacaine induces IFN- γ and IL-2 secretion and proliferation against multiple HIV-1 epitopes. Two weeks after the last immunization with HIVBr18 or the empty pVAX1 vector, spleen cells from BALB/c mice were cultured in the presence of individual HIV-1 peptides or medium only. Frequencies of HIV peptide-specific IFN- γ (A) and IL-2 (B) secreting cells were measured by ELISPOT assay; SFU: spot forming units; [21]Data are representative of five independent immunization experiments.

Figure 6: Coadministration of HIVBr18 and bupivacaine enhances longevity of antigen specific cellular immune responses. BALB/c mice immunized with HIVBr18 were euthanized 90 days after the last immunization. Splenocytes were cultured in the presence of pooled HIV-1 peptides. (A) Frequencies of IFN γ secreting cells as measured by ELISPOT assay. (B) Percentage of proliferating CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ T cells, *p<0.05.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)