SUSAN PEREIRA RIBEIRO

Análise da imunogenicidade de uma vacina de DNA
codificando epitopos CD4 promíscuos e conservados do
HIV-1 em camundongos BALB/c e transgênicos para
moléculas de HLA classe II

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de: Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha-Neto

**São Paulo
2010**

SUSAN PEREIRA RIBEIRO

Análise da imunogenicidade de uma vacina de DNA
codificando epitopos CD4 promíscuos e conservados do
HIV-1 em camundongos BALB/c e transgênicos para
moléculas de HLA classe II

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de: Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha-Neto

**São Paulo
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ribeiro, Susan Pereira

Análise da imunogenicidade de uma vacina de DNA codificando epitopos CD4 promíscuos e conservados do HIV-1 em camundongos BALB/c e transgênicos para moléculas de HLA classe II / Susan Pereira Ribeiro. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha-Neto.

Descritores: 1.Vacinas contra HIV 2.Epitopos de linfócito T 3.Linfócitos T CD4-positivos 4.Camundongos transgênicos 5.Diversidade genética 6.Cobertura vacinal 7.Antígenos HLA 8.Vacinas de DNA 9.HIV 10.AIDS

USP/FM/DBD-314/10

**Eu gostaria de dedicar esta tese aos meus pais, Cláudio e
Rosana, aos meus irmãos Daniel, Vivian, Guilherme e Sarah,
à minha filha Helena e à minha sobrinha Carolina, pela
presença efetiva em cada passo de minha jornada e pela
torcida incansável e incessante.**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer

Ao Bo pela paciência, carinho e incentivo em cada etapa.

À minha querida filha Helena, companheira de todas as horas, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo imenso amor.

Ao meu orientador Dr Edecio, pelos momentos de discussão científica e por acreditar em mim e em meu trabalho.

À minha co-orientadora e grande amiga Dra Daniela, por me acompanhar durante todo esse trajeto, vibrando a cada conquista, pelos puxões de orelha e também pelos momentos de descontração.

Ao Dr Jorge Kalil, pelas enriquecedoras reuniões das quintas-feiras.

Ao Rafael, nossa nova aquisição laboratorial, que tem acrescentado muito ao grupo como cientista e como amigo.

À equipe da UGQ: Candida, Fernanda, Sergio, Issler, Ruth e Neus, pelo enriquecimento que me trouxeram nessa caminhada. Em especial a Candida e a Fernanda pela grande amizade.

Aos amigos e colegas de laboratório (LIM60 e LIM19) que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, proporcionando momentos de discussão científica e também momentos de grande descontração e diversão.

À DEUS, minha força maior.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências:

Adaptado de *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Carneiro da Cunha, A. *et al.* 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos:

List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas	i
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Figuras Anexas.....	x
Lista de Tabelas Anexas.....	xi
Lista de Publicações.....	xii
Resumo.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Epidemiologia.....	3
1.2. Ciclo de vida.....	4
1.3. Origem do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).....	5
1.3.1. Filogenia do HIV-1.....	9
1.4. Tratamento.....	9
1.5. Patogênese da infecção pelo HIV-1.....	14

1.6. Mecanismos imunológicos de defesa contra o HIV-1.....	20
1.6.1. Resposta imune inata.....	20
1.6.2. Resposta imune adaptativa.....	23
1.7. Vacinas contra o HIV-1.....	25
1.8. Requisitos essenciais a serem induzidos por uma vacina que vise indução de resposta imune celular.....	28
1.8.1. Importância de um componente indutor de respostas de linfócitos T CD4 ⁺	29
1.8.2. Vacinas baseadas em epitopos.....	30
1.8.3. Indução de células polifuncionais.....	35
1.8.4. Indução de memória imunológica.....	36
2. Objetivos	38
2.1. Objetivo geral.....	39
2.2. Objetivos específicos.....	39
3. Métodos.....	40
3.1. Síntese automática de peptídeos em fase sólida.....	41
3.2. Subclonagem do gene multiepitópico artificial codificando	

epitopos promíscuos e conservados do HIV-1.....	42
3.3. Transformação de bactérias DH5 α por choque térmico.....	43
3.4. Extração e purificação dos DNAs plasmidiais.....	44
3.5. Quantificação e avaliação da qualidade dos plasmídeos purificados.....	46
3.6. Animais.....	47
3.6.1. Camundongos BALB/c convencionais.....	47
3.6.2. Camundongos transgênicos para moléculas de HLA classe II.....	47
3.7. Imunizações experimentais.....	49
3.7.1. Imunização para avaliação da expressão de RNA.....	50
3.7.2. Imunização para estabelecimento do protocolo vacinal.....	50
3.7.3. Imunização para avaliação da toxicidade da vacina.....	51
3.7.4. Imunização para avaliação da imunogenicidade.....	51
3.8. Extração de RNA.....	52
3.8.1. Quantificação de RNA.....	53
3.8.2. Tratamento do RNA total com DNase I.....	54

3.8.3. Transcrição reversa.....	54
3.8.4. PCR para GAPDH e PCR para HIVBr18.....	55
3.9. Suspensão celular.....	57
3.10. Ensaio de proliferação celular.....	57
3.11. Avaliação fenotípica e funcional de linfócitos T.....	61
3.11.1. Marcação de superfície.....	63
3.11.2. Marcação intracelular.....	63
3.12. Preparo das <i>beads</i> para ajuste das voltagens.....	65
3.13. ELISPOT para IFN- γ e IL-2.....	65
3.14. Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura através de CBA (Cytometric Bead Array)	66
3.15. ELISA para detecção de Ig Total Ildi e IgG.....	69
4. Resultados.....	71
4.1. Construção da vacina.....	72
4.2. Estabelecimento do protocolo vacinal.....	75
4.3. Toxicidade da vacina.....	78
4.4. Avaliação da imunogenicidade da vacina multiepitópica,	

HIVBr18 em camundongos BALB/c.....	79
4.4.1. Avaliação da resposta imune humoral.....	90
4.5. Avaliação da longevidade da resposta vacinal.....	92
4.6. Avaliação da amplitude das respostas induzidas.....	98
4.7. Avaliação da indução de respostas imunes em camundongos transgênicos para moléculas HLA de classe II.....	102
5. Discussão.....	114
6. Conclusões.....	126
7. Anexos.....	128
Anexo A - Figuras.....	129
Anexo B - Tabelas.....	136
Anexo C - Laudo histopatológico.....	141
8. Referências.....	151
9. Publicações.....	174
10. Aprovação da CAPPesq	212

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	porcentagem
2-ME	2- β -mercaptoetanol
	Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity
ADCC	(citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos)
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
APC	Allophycocyanin (aloficocianina)
ART	Antiretroviral therapy (Terapia antirretroviral)
BD	Benton Dicson
BFA	Brefeldina
CA	Califórnia
CAPPEsq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CBA	Cytometric Bead Array
CCR5	C-C chemokine receptor type 5 (receptor de quimiocina C-C do tipo 5)
CD	Cluster of Differentiation (designação de grupos)
CDC	Centers for disease control and Prevention (Centro de Controle de infecções e Prevenção)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico complementar)
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester (carboxifluoresceína succinimidil éster)
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CO ₂	Dióxido de carbono
ConA	Concanavalina A
CTL	Cytotoxic T lymphocytes (linfócitos T citotóxicos)

CXCR4	CXC chemokine Receptor type 4 (receptor de quimiocina CXC do tipo 4)
DO	Densidade óptica
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
DP	Desvio padrão
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido tetracético etilenodiamínico)
ELISA	Enzyme-linked Immuno sensitive assay (Ensaio imuno sensitivo)
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot assay (
et al.	e outros
EUA	Estados Unidos da América
F	Foward
FITC	Isoticianato de fluoresceína
Fmoc	N-9-fluorenilmetoxycarbonil
FRCs	Formas recombinantes circulantes
FSC	Forward Scatter
g	Gramas
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gliceraldeído 3-fosfato)
H/E	Eosina/hematoxicilina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HAART	Higly active antiretroviral therapy (Terapia antirretroviral altamente ativa)
HIV-1	Human immunodeficiency vírus type 1 (Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1)

HIV-2	Human immunodeficiency vírus type 2 (Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 2)
HLA	Human leukocyte antigen (Antígeno leucocitário humano)
HLA-DQ6	Human leukocyte antigen – allele –DQ6 (Antígeno leucocitário humano - alelo -DQ6)
HLA-DQ8	Human leukocyte antigen – allele –DQ8 (Antígeno leucocitário humano - alelo -DQ8)
HLA-DR2	Human leukocyte antigen – allele –DR2 (Antígeno leucocitário humano - alelo -DR2)
HLA-DR4	Human leukocyte antigen – allele –DR4 (Antígeno leucocitário humano - alelo -DR4)
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
HSV-2	Herpes Simplex Virus 2
I.E.	Índice de estimulação
IFN- γ	Interferon gama
IFN- α	Interferon alfa
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina da classe G
IL-17	Interleucina 17
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IM	Intramuscular
IMT	Instituto de Medicina Tropical
InCor	Instituto do Coração
iNKRs	Receptor inibitório de NK
kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
KHCO ₃	Bicarbonato de potássio
L T	Linfócitos T

LB	Lúria Bertani
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LPS	Lipopolissacarídeo
LTNP	Long term non progressors (Não progressores por longo tempo)
M	Major (principal)
MB	Macs Buffer
mDCs	Mieloid dendritic cells (células dendríticas mielóides)
MFI	Median fluorescence intensity (mediana de intensidade de fluorescência)
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	Major histocompatibility complex (Complexo principal de histocompatibilidade)
MIP-1 β	Macrophage Inflammatory Protein betha (proteína alfa inflamatória de macrófagos)
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein alpha ((proteína beta inflamatória de macrófagos)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm ³	milímetros cúbicos
MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (ácido propanossulfônico 3-(N morfolino)
mRNA	messenger ribonucleic acid (Ácido ribonucleico mensageiro)
N	Non major e Non outlier
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCR	Natural cytotoxicity receptors (Receptores de citotoxicidade naturais)
ng	Nanogramas
NH ₄ Cl	Cloreto de amonio

NK	Células natural killer
nm	Nanômetro
O	Outlier
°C	Grau centígrado
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	o-phenylenediamine dihydrochloride (diicloridro o-fenilediamina)
p	p-value (valor de p)
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline (tampão salina-fosfato)
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação de polimerase em cadeia)
pDCs	Plasmocitoid dendritic cells (células dendríticas plasmocitóides)
PE	Phycoerythrin (ficoeritrina)
PercP	Peridinin chlorophyll protein (proteína clorofil peridina)
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PN-DST/AIDS	Programa Nacional – Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS
PRED ^{BALB/c}	Algoritmo de predição para moléculas H2 de camundongos BALB/c
qsp	Quantidade suficiente para
R	Reverse (reverso)
R10	Meio RPMI suplementado com 10% de SFB
RANTES	Chemokine (C-C motif) ligand 5 (Ligante de quimiocina 5 (motivo C-C))
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleic)
rpm	Rotações por minuto
RPM	Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR	Reverse transcriptase - polymerase chain reaction (transcriptase reversa – reação de polimerase em cadeia)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)
SFB	Soro Fetal Bovino
SHIV	Vírus quimérico da imunodeficiência símia
SIV	Simian Immunodeficiency Virus (vírus da imunodeficiência símia)
SPF	Specific pathogen free (livre de patógenos específicos)
SSC	Side Scatter
TAE	Tampão Tris-acetato/EDTA
Taq	Termus aquaticus
TBE	Tris/Borato/EDTA
TCM	Células T de memória central
TEM	Células T de memória efetora
TEPITOPE	Algoritmo de predição de epitopos restritos para moléculas de HLA classe II
TLR	Toll like receptor
TLR-4	Toll like receptor 4
TLR-7	Toll like receptor 7
TNF- α	Tumour-necrosis factor alpha (fator de necrose tumoral alfa)
ToF	Time of flight (tempo de voo)
U	Unidades
UFS	Unidades formadoras de spots
V	Volts
vol	Volume
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do HIV-1.....	7
Figura 2: Distribuição global dos subtipos e formas recombinantes circulantes do HIV-1.....	11
Figura 3: Curso da infecção pelo HIV-1.....	19
Figura 4: Construção da vacina HIVBr18.....	72
Figura 5: Avaliação da expressão da vacina HIVBr18.....	74
Figura 6: Cinética do número de doses para estabelecimento do protocolo vacinal.....	76
Figura 7: Avaliação da proliferação celular utilizando ensaio de CFSE.	80
Figura 8: Avaliação da secreção de citocinas através de ensaio de ELISPOT para IFN- γ e IL-2.....	81
Figura 9: Avaliação do perfil funcional celular induzido após imunização com HIVBr18.....	83
Figura 10: Avaliação da secreção de citocinas no sobrenadante de cultura.....	86
Figura 11: Avaliação fenotípica das células que proliferaram após imunização com HIVBr18.....	88
Figura 12: Avaliação do perfil funcional das células de memória induzidas após imunização com HIVBr18.....	89
Figura 13: Avaliação da resposta imune humoral após imunização com HIVBr18.....	91
Figura 14: Avaliação da longevidade da resposta imune antígeno-específica induzida pela imunização com HIVBr18 por ensaio de CFSE.....	94
Figura 15: Avaliação do perfil fenotípico e funcional das células induzidas após imunização com HIVBr18 ao longo do tempo.....	95
Figura 16: Avaliação da secreção de citocinas após imunização com HIVBr18 em diferentes períodos de tempo após última imunização.....	97

Figura 17: Avaliação da secreção de citocinas no sobrenadante de cultura ao longo do tempo.....	98
Figura 18: Avaliação da indução de respostas multiepitópicas através de ensaio de CFSE.....	99
Figura 19: Avaliação da indução de respostas multiepitópicas através de ensaio de ELISPOT.....	101
Figura 20: Ensaio de CFSE nas diferentes linhagens de camundongos transgênicos para moléculas de HLA classe II.....	103
Figura 21: Ensaio de ELISPOT para IFN- γ nas diferentes linhagens de camundongos transgênicos para moléculas de HLA classe II.....	105
Figura 22: Avaliação da indução de respostas multiepitópicas através de ensaio de ELISPOT para IFN- γ nas linhagens de camundongos transgênicos para moléculas de HLA classe II.....	108
Figura 23: Resumo dos epitopos reconhecidos por cada linhagem de camundongo testada.....	113

.

.

.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Seqüências e ciclo de amplificação dos <i>primers</i> empregados nas reações de RT-PCR para GAPDH.....	56
Tabela 2: Seqüências e ciclo de amplificação dos <i>primers</i> empregados nas reações de RT-PCR para HIVBr18.....	56
Tabela 3: Painéis de Citometria de Fluxo Multiparamétrica.....	62
Tabela 4: Cinética de doses.	77
Tabela 5: Avaliação da amplitude de resposta induzida nas linhagens transgênicas para moléculas de HLA classe II utilizando ensaio de CFSE.....	106
Table 6: Reconhecimento dos epitopos presentes na construção vacinal pelas moléculas de HLA classe II HLA-DR2 (A) e –DR4 (B) de camundongos transgênicos para essas moléculas e pacientes infectados pelo HIV-1 portadores de tais alelos.....	111

LISTA DE FIGURAS ANEXAS

Figura 1: Análise da integridade do DNA plasmidial após purificação e corrida em gel de agarose 1%	130
Figura 2: Avaliação da integridade das amostras de RNA por gel de agarose.....	131
Figura 3: Estratégia de análise adotada para avaliação da proliferação celular através de ensaio com CFSE.....	132
Figura 4: Estratégia de análise adotada para avaliação da produção de citocinas intracelulares através de citometria de fluxo multiparamétrica e estratégia booleana para avaliação da polifuncionalidade celular.....	133
Figura 5: Estratégia de análise adotada para avaliação do fenótipo de memória das células que proliferaram após imunização com HIVBr18.....	134
Figura 6: Estratégia de análise adotada para avaliação do perfil funcional das células de memória induzidas pela imunização com HIVBr18.....	135

LISTA DE TABELAS ANEXAS

Tabela 1: Sequência de aminoácidos dos epitopos identificados por Fonseca et al (2006). Epitopos CTL/CD8 descritos no banco de dados de Los Alamos contidos nos epitopos para linfócitos T CD4 ⁺ identificados por nosso grupo.....	137
Tabela 2: Predição de ligação à moléculas de MHC classe I e II de camundongos BALB/c com utilização do algoritmo PRED ^{BALB/c}	138
Tabela 3: Avaliação da consistência das respostas induzidas após imunização com HIVBr18 e estímulo <i>in vitro</i> com os peptídeos sintéticos individuais.....	139

LISTA DE PUBLICAÇÕES

1. **Ribeiro SP**, Rosa DS, Fonseca SG, Mairena EC, Postól E, Costa Oliveira S, Guilherme L, Kalil J, Cunha-Neto E. A vaccine encoding conserved promiscuous HIV CD4 epitopes induces broad T cell responses in mice transgenic to multiple common HLA class II molecules. PLoS One. 2010 Jun 11;5(6):e11072.
2. Rosa DS, **Ribeiro SP**, Cunha-Neto E. CD4⁺ T cell epitope discovery and rational vaccine design. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2010 Apr;58(2):121-30. Epub 2010 Feb 14. Review.
3. Rosa DS, **Ribeiro SP**, Cunha-Neto E. PERSPECTIVAS E ESTRATÉGIAS NO DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA ANTI- HIV (*PERSPECTIVES AND STRATEGIES IN THE DEVELOPMENT OF AN ANTI-HIV VACCINE*) Tendências em HIV • AIDS 2008. V3 - N 3 - 10-20).
4. Bilate AM, Teixeira PC, **Ribeiro SP**, Brito T, Silva AM, Russo M, Kalil J, Cunha-Neto E. Distinct outcomes of Trypanosoma cruzi infection in hamsters are related to myocardial parasitism, cytokine/chemokine gene expression, and protein expression profile. J Infect Dis. 2008 Aug 15;198(4):614-23.

RESUMO

Ribeiro, SP. Análise da imunogenicidade de uma vacina de DNA codificando epitopos CD4 promíscuos e conservados do HIV-1 em camundongos BALB/c e transgênicos para moléculas de HLA classe II I. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 173p.

Abordagens atuais no desenho de vacinas contra o HIV-1 estão focadas em imunógenos que codificam proteínas inteiras do HIV-1 e visam induzir respostas citotóxicas específicas. É concebível que vacinas bem-sucedidas devem induzir respostas contra múltiplos epitopos do HIV-1, coincidindo com seqüências das cepas circulantes do vírus, conhecido por sua grande variabilidade genética. Sabe-se que células T CD4⁺ são necessárias para indução de respostas efetivas de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. Neste trabalho, nós avaliamos a imunogenicidade de uma vacina de DNA codificando 18 epitopos para linfócitos T CD4⁺, conservados e ligadores de múltiplas moléculas HLA-DR em camundongos BALB/c e em quatro linhagens de camundongos transgênicos para moléculas de HLA classe II. Os camundongos imunizados apresentaram respostas de amplitude e magnitude significativas com proliferação e secreção de citocinas por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Onze dos 18 epitopos para linfócitos T CD4⁺ presentes na vacina foram reconhecidos pelas linhagens de camundongos transgênicos para moléculas de HLA classe II. Em suma, 17 dos 18 epitopos codificados pela vacina foram reconhecidos. As células induzidas pela vacina apresentaram um perfil polifuncional com tipo 1 de citocinas, incluindo produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2. A vacina também induziu células T CD4⁺ de memória central de longa duração, capazes de fornecer auxílio contínuo para células T CD8⁺. Pela capacidade da vacina HIVBr18 de induzir respostas contra múltiplos epitopos de linfócitos T CD4⁺ conservados que podem ser reconhecidos no contexto de múltiplas moléculas de HLA classe II, esse conceito vacinal pode solucionar o problema da variabilidade genética viral assim como aumentar a cobertura populacional. Portanto, essa vacina, pode ser útil se utilizada isoladamente ou como fonte de auxílio

cognato para células T CD8⁺ HIV-específicas induzidas por outros imunógenos gerando resposta em uma grande proporção dos vacinados.

Descritores: 1.Vacinas contra HIV 2.Epitopos de linfócito T 3.Linfócitos T CD4-positivos 4.Camundongos transgênicos 5.Diversidade genética 6.Cobertura vacinal 7.Antígenos HLA 8.Vacinas de DNA 9.HIV 10.AIDS

Ribeiro, SP. Immunogenicity analysis of a DNA vaccine encoding promiscuous and conserved HIV-1 CD4 epitopes in BALB/c and HLA class II transgenic mice [thesis]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 2010. 173p.

Current HIV vaccine approaches are focused on immunogens encoding whole HIV antigenic proteins that elicit cytotoxic CD8⁺ responses. It is conceivable that successful vaccines have to elicit responses to multiple epitopes, to match circulating strains of HIV, a virus known for its high genetic variability. It is known that CD4⁺ T cell responses are necessary for effective CD8⁺ antiviral responses. Here we assessed the immunogenicity of a DNA vaccine encoding 18 conserved, multiple HLA-DR-binding HIV CD4 epitopes in BALB/c and four strains of HLA class II-transgenic mice. Immunized mice displayed CD4⁺ and CD8⁺ proliferative and cytokine T cell responses of significant breadth and magnitude. Eleven out of the 18 encoded epitopes were recognized by CD4⁺ T cells from HLA class II-transgenic strain. Overall, 17 out of the 18 encoded peptides were recognized. The induced T cell response had a polyfunctional type 1 cytokine profile, including IFN- γ , TNF- α and IL-2. The vaccine also induced long-lived central memory CD4⁺ T cells, which might provide sustained help for CD8⁺ T cells. By virtue of inducing broad responses against conserved CD4⁺ T cell epitopes that can be recognized in the context of widely diverse, common HLA class II alleles, this vaccine concept may cope both with HIV genetic variability and increased population coverage. The vaccine may thus be useful either as a standalone approach or as a source of cognate help for HIV-specific CD8⁺ T cells elicited by conventional immunogens, eliciting responses in a wide proportion of vaccinees.

Descriptors: 1.HIV vaccines 2.Epitopes, T-lymphocyte 3.CD4-positive T-lymphocytes 4. Mice, transgenic 5.Genetic Diversity 6.Immunization coverage 7.HLA antigens 8.Vaccines, DNA 9.HIV 10.AIDS

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença causada pelo vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), um vírus citopático que infecta células que expressam em sua superfície a molécula CD4 e o receptor de quimiocina CCR5 ou CXCR4. O vírus pode ser adquirido pela rota sexual ou pelo contato com sangue e hemoderivados, quer seja através de transfusão sanguínea ou pelo compartilhamento de seringas contaminadas por usuários de drogas intravenosas. A transmissão vertical (mãe- recém-nascido) também é observada (Marcello, 2006).

A AIDS é uma doença caracterizada por um longo período de latência, durante o qual ocorre a depleção progressiva das células CD4⁺ culminando em um estado de profunda imunodeficiência seguido de morte (Marcello, 2006).

Existem dois tipos de HIV, o HIV-1 e o HIV-2, sendo o primeiro, o grande responsável pela pandemia. O HIV-1 é um retrovírus da família *lentiviridae* e seu genoma, com cerca de 9800 pares de bases, é constituído de duas moléculas de RNA (ácido ribonucléico) (revisado por Burger e Poles, 2003) codificadoras das proteínas: Gag, Env, Pol (estruturais); Vif, Vpr, Vpu (acessórias) e Rev, Nef e Tat (reguladoras) (revisado por Potter *et al.*, 2004; Burger e Poles, 2003).

A despeito dos avanços no conhecimento da patogenia causada pelo vírus e da resposta imune à infecção, até o momento não existe uma vacina eficaz contra o HIV. A seguir revisaremos aspectos importantes sobre a

pandemia, biologia e origem do vírus, tratamento, patogenia, resposta imune e ensaios vacinais contra a infecção pelo HIV-1.

1.1. Epidemiologia

A infecção pelo HIV-1 atinge hoje cerca de 33,4 milhões de pessoas, com 2,7 milhões de novos casos e 2,0 milhões de mortes somente no ano de 2008 (Unaid, 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 600 novas infecções pelo HIV-1 ocorrem por hora no mundo com maior prevalência em países em desenvolvimento (OMS, 2008).

Aproximadamente dois terços dos adultos e das crianças infectadas pelo HIV-1 vivem na África subsaariana e no sudeste asiático. No Brasil, foram notificados 544 846 casos de infecção pelo HIV-1 e 183 mil óbitos como consequência da AIDS até junho de 2009 (UNAIDS, 2009). Somente no primeiro semestre do mesmo ano, foram notificados 13 661 novos casos de infecção (PN-DST/AIDS, 2009). O HIV-1 afeta principalmente jovens entre 15 a 24 anos de idade, correspondendo a cerca de 40% das novas infecções (CDC, 2007).

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 tratamento em muitos países (Kates e Levi, 2007).

1.2. Ciclo de vida

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).

Como todo retrovírus, o HIV utiliza a maquinaria celular para a sua replicação. O complexo trimérico do envelope viral, composto do heterodímero das proteínas gp120 e gp41, é essencial para a entrada do vírus nas células-alvo. Após a ligação da proteína gp120 com a molécula CD4, o envelope viral sofre uma alteração estrutural, expondo um domínio específico da gp120 que é capaz de se ligar a receptores de quimiocinas na membrana celular, como o CCR5 ou CXCR4. O CXCR4 é expresso em muitas células, incluindo linfócitos T, enquanto que a molécula CCR5 está presente em monócitos/macrófagos, células dendríticas e linfócitos T ativados. 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 aproximando ambas as membranas, levando então a fusão das mesmas (Figura 1) (Berger *et al.*, 1999; Fanales-Belasio *et al.*, 2010). Após a fusão do vírus com a célula do hospedeiro, ocorre a liberação do conteúdo viral no citoplasma celular. A conversão do RNA viral em DNA (ácido desoxirribonucléico) proviral ocorre devido à ação da transcriptase reversa no citoplasma celular (Fanales-Belasio *et al.*, 2010). Mutações, incluindo mutações pontuais, deleções e inserções, podem ser introduzidas

no genoma durante esta etapa de síntese do DNA viral, pela ausência da atividade de revisão da transcriptase reversa (Bebenek *et al.*, 1989; Boyer *et al.*, 1992). Esses são alguns dos fatores que explicam a grande diversidade genética do vírus. Em seguida, o DNA dupla fita recém-sintetizado é incorporado ao genoma da célula do hospedeiro com auxílio da integrase (Smith e Daniel, 2006), dando origem ao provírus. Monócitos/macrófagos, células da microglia e células CD4⁺ quiescentes que contêm o DNA proviral integrado ao seu genoma, constituem importantes reservatórios virais de longa vida (Chun *et al.*, 1997). Quando a célula infectada é ativada, ocorre a transcrição do DNA proviral. O mRNA (ácido ribonucléico mensageiro) viral, que codifica para fragmentos longos, migra para o citoplasma, onde as proteínas estruturais dos novos virions serão sintetizadas. As proteínas codificadas pelos genes gag e pol formam o núcleo da nova partícula do HIV; os produtos gênicos codificados pelo gene env formam as glicoproteínas do envelope viral. A proteína precursora gp160 é clivada pela protease do HIV-1 originando as proteínas gp120 e gp41. As proteínas Gag e Pol também são proteínas precursoras que são clivadas originando os produtos finais de Gag e Pol. A clivagem de tais partículas pela protease viral é necessária para a geração das partículas virais infecciosas (Fanales-Belasio *et al.*, 2010). A formação de novas partículas virais ocorre passo a passo da seguinte maneira: dois filamentos de RNA viral se associam com as enzimas de replicação, enquanto que as proteínas do cerne viral formam o capsídeo do vírus. Esta partícula imatura migra para a superfície da célula. Os precursores das grandes moléculas são então clivados pela protease do

HIV-1, resultando em novas partículas virais infecciosas, que brotam da membrana da célula hospedeira, adquirindo assim um novo envelope. Durante o processo de brotamento, a membrana lipídica do vírus incorpora várias proteínas da célula hospedeira e fica enriquecida com fosfolipídios e colesterol de tal célula. Diferentemente dos linfócitos T, onde o brotamento ocorre na superfície da célula e os virions são liberados no espaço extracelular, o brotamento em monócitos e macrófagos resulta na acumulação de partículas virais nos vacúolos intracelulares, que são posteriormente liberados (Fanales-Belasio *et al.*, 2010; Smith e Daniel, 2006; Zheng *et al.*, 2005).

Uma única célula infectada pode produzir até 10^{10} vírus por dia (Coffin, 1995), e a replicação viral pode resultar na morte das células T CD4⁺ (Klimas *et al.*, 2008). As novas partículas maduras do HIV infectam novas células CD4⁺, e recomeçam o processo de replicação viral. As células T CD4⁺ têm um papel central na resposta imune, sinalizando para o funcionamento de outras células, como células T CD8⁺ citotóxicas e linfócitos B (Fahey *et al.*, 1990). A destruição desse subtipo celular na infecção pelo HIV-1 propicia o aparecimento de doenças oportunistas e cânceres que caracterizam a AIDS, o estágio final da infecção pelo HIV-1.

Figura 1: Ciclo de vida do HIV-1. 1- fixação do vírus na superfície celular pela ligação das glicoproteínas da superfície viral (gp120) à molécula CD4⁺ e ao correceptor de quimiocina CCR5; 2- liberação do conteúdo viral no citoplasma celular; 3- transcrição reversa do RNA viral pela transcriptase reversa; 4- formação do DNA viral; 5- integração do DNA viral ao DNA da célula infectada, originando o provírus; 6- tradução do mRNA viral originado as poliproteínas virais; 7- brotamento dos novos vírions da superfície da célula infectada. Adaptado da ilustração de Dominic Doyle (<http://www.mc.vanderbilt.edu/lens/article/?id=202>).

1.3. Origem do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

A AIDS é uma infecção de origem zoonótica que tem como agente etiológico o HIV, um retrovírus derivado do Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) (Salemi *et al.*, 2001). Acredita-se que a rota de transmissão do SIV de primatas não humanos para humanos foi devido ao contato direto com o sangue desses animais através da caça (Chitnis *et al.*, 2000; Peeters *et al.*, 2002).

Existem dois tipos de HIV, o HIV-1 e o HIV-2. Na ausência de evidências epidemiológicas diretas, estudos moleculares dos lentivírus de primatas forneceram informações definitivas sobre a origem desses dois tipos virais. Os chimpanzés, em particular aqueles da região equatorial ocidental da África, são uma espécie naturalmente infectada por um vírus similar ao HIV-1, conhecido como SIV_{cpz}. Essa região coincide com os altos índices de infecção pelo HIV-1 e é considerada como o coração da epidemia na África. Esse mesmo tipo de HIV está associado com os casos de infecção nos Estados Unidos, Europa e na maioria dos outros países do mundo (Tebit *et al.*, 2007). Vírus similares ao HIV-2 foram isolados de macacos mangabeus fuligentos (SIV_{sm}) na África ocidental, região endêmica para esse tipo viral (Peeters *et al.*, 1991). O aparecimento dos dois tipos virais, HIV-1 e HIV-2, foi decorrente de várias transmissões independentes de primatas não humanos para humanos (Gao *et al.*, 1999).

Modelos evolucionários de estudo mostraram que menos de um século foi necessário para que uma extraordinária diversidade de populações virais se desenvolvesse. Seqüências do HIV-1 foram encontradas em Manchester (EUA) em amostras que datam de 1959, o que certamente implica numa introdução do vírus em seres humanos em datas anteriores (Zhu *et al.*, 1998). Tentativas de estimar o período de origem do HIV-1 utilizando análises filogenéticas indicaram que o ancestral comum desse vírus deve ter sido introduzido na população humana na década de 30 (Korber *et al.*, 2000; Salem *et al.*, 2001; Yusim *et al.*, 2001). Entretanto, o HIV só foi efetivamente descrito em 1983 por Luc Montagnier e Robert Gallo (Barre-Sinoussi *et al.*,

1983; Gallo et al., 1983) a partir de amostras de plasma de pacientes com ocorrência atípica de pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* (Fauci, 2006).

1.3.1. Filogenia do HIV-1

Como citado anteriormente, o HIV-1 se originou de um vírus símio, SIV_{cpz}, que infectou muitas comunidades de chimpanzés geograficamente isoladas no sul de Camarões. Especula-se que o vírus então se espalhou entre os seres humanos ao longo do rio Congo até Kinshasa, capital da República Democrática do Congo (revisado por Woodman e Williamson, 2009).

Análises filogenéticas do HIV-1 sugerem três transmissões independentes no início do século XX, gerando os 3 grupos do 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 dividido 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 seqüenciamento genômico do HIV-1 levaram à identificação dessas formas recombinantes circulantes (FRCs). Mais de 20

FRCs foram definidas apenas no tipo M (Kantor *et al.*, 2005). A variação genética do HIV é uma de suas principais características, e pode influenciar na patogenicidade das diferentes cepas (Sharp *et al.*, 1999). Variações na seqüência 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 mundo inteiro, 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 freqüente 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 em diferentes posições (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 (Figura 2).

Figure 2: Distribuição global dos subtipos e formas recombinantes circulantes do HIV-1. Adaptado de Taylor *et al.*, 2008.

1.4. Tratamento

Mesmo após 27 anos da descoberta do HIV, o acesso universal ao tratamento continua a ser um sonho para milhões de pessoas (Granich *et al.*, 2010). Atualmente existem aproximadamente 20 drogas antirretrovirais aprovadas para uso no tratamento da infecção em humanos (ART Guidelines, 2008). Existem seis classes de drogas utilizadas: 1- inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos/nucleotídeos; 2- inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos; 3- inibidores de protease; 4- inibidores de fusão; 5- antagonistas de CCR5; 6- inibidores de integrase (ART Guidelines, 2008). Cada uma dessas classes de drogas afeta o vírus HIV em diferentes estágios de seu ciclo de vida. Os tratamentos atuais consistem na combinação de pelo menos duas drogas pertencentes a

duas classes distintas de agentes antirretrovirais. Essa forma de tratamento é conhecida como terapia antirretroviral combinada (ART: antiretroviral therapy) ou HAART (highly active antiretroviral therapy)

Até o final do ano de 2008, quatro milhões de pessoas estavam em tratamento com HAART e a cobertura do tratamento atingiu aproximadamente 42% em países de baixa e média renda (OMS, 2008).

A terapia antirretroviral combinada é capaz de tornar a viremia indetectável e numerosos estudos observacionais têm demonstrado o seu potencial para a prevenção da transmissão do HIV (Bunnell *et al.*, 2006; Castilla *et al.*, 2005). Além disso, a terapia antirretroviral pode levar a um aumento na contagem dos linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico. Dessa maneira o tratamento diminui substancialmente a morbidade e a mortalidade entre os indivíduos infectados pelo HIV-1. Estudos observacionais sugerem que o tratamento reduz em vários anos a taxa de progressão para AIDS, tanto em pacientes já imunodeficientes como em pacientes com altas contagens de linfócitos T CD4⁺ (Sterne *et al.*, 2009).

A decisão de quando iniciar a terapia com antirretrovirais deve ser feita para cada indivíduo isoladamente. Para indivíduos em que as contagens de células T CD4⁺ assim como a avaliação clínica de saúde não indicam risco elevado para progressão da doença, o tratamento pode ser mais danoso do que benéfico, uma vez que o mesmo tem efeitos tóxicos e colaterais. Efeitos colaterais incluem febre, dores abdominais, exacerbação de processos inflamatórios, lipodistrofia entre outros (Stankov e Behrens, 2007). De acordo com o Guia de Painéis de Drogas Antirretrovirais para Adultos e

Adolescentes do Departamento de Serviços Humanos e de Saúde, pacientes devem ser tratados se apresentarem os sintomas definidores de AIDS, ou se a contagem de células T CD4⁺ for menor que 350 células/mm³ (Klimas *et al.*, 2008). A queda no número de células T CD4⁺ para valores abaixo de 200 células/mm³ leva a uma vulnerabilidade no sistema imune do paciente, propiciando o aparecimento de infecções oportunistas e cânceres.

A aderência sub-ótima, comum entre os pacientes tratados (Torres-Madriz *et al.*, 2010) está associada com falha terapêutica e emergência de cepas virais resistentes (Bangsberg *et al.*, 2000; Mcpherson-Baker *et al.*, 2005; Roge *et al.*, 2004).

Em países onde o acesso ao tratamento antirretroviral é limitado, somente uma vacina eficaz poderia controlar o alastramento da epidemia. 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. A OMS estima que, na ausência de uma vacina eficaz, surgirão cerca de 100 milhões de novos casos de infecção pelo HIV-1 nas próximas décadas (OMS, 2008). Sendo assim, o desenvolvimento de uma vacina contra o HIV-1 é uma prioridade de saúde pública global.

1.5. Patogênese da infecção pelo HIV-1

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 num quadro de imunodeficiência ou de sobrevivência por longo período (Fanales-Belasio *et al.*, 2010).

A replicação viral é elevada nos primeiros estágios da infecção (Embretson *et al.*, 1993; Pantaleo *et al.*, 1993) e existem poucas variantes virais (Haase, 2005). As células infectadas podem ser lisadas ou estabelecem uma infecção latente, particularmente em macrófagos e células T CD4⁺ quiescentes, que se tornam reservatórios permanentes (Alexaki *et al.*, 2008). Este fato representa um grande obstáculo para a completa erradicação da infecção, uma vez que permite a persistência do vírus, mesmo na presença de tratamento com drogas antirretrovirais. Uma redução pronunciada do número de células T CD4⁺ de memória ou ativadas, localizadas nos tecidos linfóides do intestino, tem sido observada precocemente após a infecção (Mehandru *et al.*, 2004), permanecendo mesmo após o tratamento com drogas antirretrovirais. A destruição gradual de células T CD4⁺ de memória e *naïve* é um marco na infecção pelo HIV-1, tendo a AIDS como estágio final (Douek *et al.*, 2003).

Diferentes mecanismos de depleção celular têm sido propostos, vários deles favorecendo ativação imune como uma causa constante da depleção de células T CD4⁺. A ativação imune na infecção pelo HIV-1 se dá pelo aumento da translocação bacteriana através da mucosa intestinal danificada.

Esse fato ocorre devido à depleção de células T CD4⁺ secretoras de IL-17 importantes na defesa contra bactérias e fungos, particularmente nas superfícies de mucosa como o trato gastrointestinal (Brenchley *et al.*, 2008; Cecchinato *et al.*, 2008). Estudos recentes mostraram que indivíduos infectados cronicamente pelo HIV-1 apresentam níveis plasmáticos de LPS significativamente mais elevados do que indivíduos não infectados (Brenchley *et al.*, 2006). Nos indivíduos controladores de elite que passam a progredir, os níveis de depleção das células T CD4⁺ estão estritamente associados com os níveis de ativação de células T, os quais por sua vez, estão associados com o aumento dos níveis plasmáticos de LPS (revisado por Douek *et al.*, 2009).

Entre 10-12 dias após a infecção pelo HIV-1, o RNA viral pode ser detectado no sangue (Fiebig *et al.*, 2003). Rapidamente a viremia atinge um pico acima de 100 milhões de cópias/mm³ e coincide com a fase de soro-conversão (presença de anticorpos HIV-específicos) (Fiebig *et al.*, 2003; Lindback *et al.*, 2000; Little *et al.*, 1999) (Figura 3). A elevada viremia permanece por curtos períodos, uma vez que o hospedeiro desenvolve uma resposta imune humoral e celular específicas contra o HIV-1, que controlam parcialmente a replicação viral. Nas semanas seguintes, a viremia decai de 10 a 100 vezes até atingir o *set point* viral (Kahn e Walker, 1998), que marca o início da fase crônica da doença. Muitos fatores associados a resposta imune inata e adquirida podem influenciar a replicação viral e o estabelecimento do *set point*. Entretanto, a presença de células T CD8⁺ específicas parece ser central no controle inicial da viremia antes do

aparecimento dos anticorpos neutralizantes HIV-específicos (Allen *et al.*, 2000; Bangham, 2009; Borrow *et al.*, 1994; Koup, 1994; Price *et al.*, 1997).

A soro-conversão pode ser observada de três a cinco semanas após o contato com o vírus HIV (Butto *et al.*, 2010). O período no qual a infecção está presente, mas os anticorpos ainda não são detectáveis, é conhecido como o período de janela imunológica (Weber, 2006). Do período de poucos dias até poucas semanas após a exposição ao HIV, a maioria dos indivíduos infectados apresentam sintomas gripais e erupções cutâneas (Kahn e Walker, 1998). A fase sintomática da infecção pelo HIV pode permanecer de um período de sete a dez dias, raramente se estendendo a períodos superiores a 14 dias. Durante a fase aguda, o número de células T CD4⁺ decai dramaticamente (Gupta, 1993). Quando as respostas imunes específicas são induzidas, a viremia decai e as contagens de células T CD4⁺ sobem novamente, embora em níveis mais baixos do que os presentes antes da infecção, sugerindo a persistência dos efeitos patogênicos associados ao vírus. Além disso, um dano na qualidade funcional das respostas imunes contra o HIV, assim como a outros antígenos podem ser detectados (Douek, 2003; Lange *et al.*, 2003; Lichterfeld *et al.*, 2004; Rosenberg *et al.*, 1998), indicando que nos estágios iniciais de infecção, o vírus pode induzir uma disfunção das células T CD4⁺ assim como de outras células do sistema imune.

Poucas semanas após o início da fase aguda, a maioria dos indivíduos infectados, entra numa fase assintomática, geralmente associada com a queda da viremia do HIV e ausência de sintomas (Figura 3). Esses eventos

refletem a ação antiviral exercida tanto pela imunidade inata como adaptativa (Ford *et al.*, 2009). Em particular, os anticorpos se ligam a antígenos do HIV, culminando na prevenção da infecção celular (Stamatatos *et al.*, 2009) ou favorecendo a eliminação das células infectadas por um mecanismo conhecido como citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), mediada por linfócitos T e células natural killer (NK) (Chung *et al.*, 2008). Além disso, linfócitos T HIV-específicos reconhecem antígenos virais na superfície das células infectadas e promovem a eliminação das mesmas por mecanismos citotóxicos antígenos-específicos (Bangham, 2009). Adicionalmente, durante a fase assintomática da doença, o HIV se replica continuamente, induzindo um estado sistêmico de inflamação crônica. Apesar de a população viral ser homogênea nos primeiros estágios após a transmissão, com o passar do tempo, surgem variantes virais resistentes aos anticorpos neutralizantes, às células T CD8⁺ citotóxicas ou às drogas antirretrovirais. Tais variantes são armazenadas nas células de longa vida, como linfócitos T CD4⁺ de memória, na forma de provírus integrados ao DNA do hospedeiro (reservatórios virais) (Klimas *et al.*, 2008).

Em alguns indivíduos infectados, a viremia do HIV não é detectada por muitos anos, indicando a ocorrência de um controle eficiente da infecção. Indivíduos que apresentam essa condição são chamados de controladores de elite (Baker *et al.*, 2009; Saxena *et al.*, 2007) e são intensamente estudados com objetivo de se entender os mecanismos envolvidos no controle da infecção pelo HIV-1.

Durante a fase assintomática da infecção, efeitos patogênicos associados ao HIV persistem e induzem uma lenta, porém progressiva depleção de células T CD4⁺, assim como danos ao sistema imune (Ford *et al.*, 2009). A progressão da doença é caracterizada 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 tecidos linfóides de todo o corpo (Fanales-Belasio *et al.*, 2010).

Na ausência do controle da replicação viral, a destruição do sistema linfóide continua e a diminuição das contagens de células T CD4⁺ continua a decair, o que propicia o aparecimento de infecções oportunistas, como consequência do grave comprometimento do sistema imune (Brooks *et al.*, 2009). Esta fase é geralmente caracterizada pelo inchaço difuso dos linfonodos, redução de peso, febre e doenças respiratórias, e sintomas gastro-intestinais. Uma progressiva encefalopatia, induzida pelo HIV e outras infecções oportunistas, também é associada com a invalidação severa e os níveis aumentados de mortalidade. Durante a AIDS, as contagens de células T CD4⁺ continuam a decair, e anemia e linfopenia são freqüentemente detectáveis (Fanales-Belasio *et al.*, 2010).

Figure 3: Curso da infecção pelo HIV-1. Viremia no plasma (superior), e dinâmica de alterações no compartimento de linfócitos T CD4⁺ (inferior). A infecção primária é caracterizada por uma elevada viremia plasmática (linha vermelha- superior), queda de células CD4⁺ (linha verde – inferior), e ausência de anticorpos específicos (linha alaranjada – inferior). A viremia decai com o aparecimento de células CD8⁺ citotóxicas (CTL) (linha azul – inferior) e o “set point” viral é atingido durante a infecção crônica. O “set point” viral difere grandemente entre os indivíduos (ex. linha vermelha tracejada – superior) e prediz a progressão da doença (círculos preenchidos – superior). 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).**

1.6. Mecanismos imunológicos de defesa contra o HIV-1

1.6.1. Resposta imune inata

A resposta imune inata é crítica na defesa do organismo contra infecções virais. As células NK, células dendríticas plasmocitóides (pDCs) e mielóides (mDCs), e células NK T restritas a molécula CD1d, medeiam as funções efetoras e reguladoras da resposta imune inicial (Gonzalez *et al.*, 2010). IFNs do tipo I (IFN α/β) são moléculas antivirais potentes que tem um importante papel na defesa contra várias infecções virais. As células dendríticas plasmocitóides são a principal fonte de IFNs desse tipo (Gonzalez *et al.*, 2010). O IFN do tipo I secretado pelas células dendríticas plasmocitóides promove o recrutamento e ativação de células NK para os locais de infecção assim como para os linfonodos (Gerosa *et al.*, 2002); (Megjugorac *et al.*, 2004).

O papel do IFN- α na infecção pelo HIV-1 é complexo. Achados da literatura sugerem tanto um papel protetor como patogênico. O efeito protetor do IFN- α na infecção primária é apoiado por dados *in vitro* (Bednarik *et al.*, 1989; Gendelman *et al.*, 1990; Shirazi e Pitha, 1992) e *in vivo* (Lapenta *et al.*, 1999; Vieillard *et al.*, 1999), apoiados por uma correlação negativa entre os números de pDCs e a viremia (Donaghy *et al.*, 2001; Soumelis *et al.*, 2001). Na infecção crônica, entretanto, o IFN- α pode contribuir para a imunopatogênese e progressão da doença. Células dendríticas plasmocitóides podem ser infectadas pelo HIV-1 (Patterson e Knight, 1987;

Patterson *et al.*, 2001) e podem transmitir o vírus para células T CD4⁺ (Groot *et al.*, 2006; Lore *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2004).

O estímulo da resposta imune inata pode impedir a infecção ou limitar o estágio inicial de replicação viral e a sua disseminação. A ativação da imunidade inata através de TLRs reduz a replicação viral em modelos animais de infecção com herpes simplex 2 (HSV-2), hepatite C e infecções pelo vírus da influenza (Wu *et al.*, 2007; Gill *et al.*, 2008; Horsmans *et al.*, 2005). A habilidade dos ligantes de TLRs de induzir IFNs do tipo I pode fornecer uma via indutora de respostas antivirais, uma vez que IFNs do tipo I têm um papel fundamental na ativação de células do sistema imune inato como a células NK (Alter e Altfeld, 2006) e podem então aumentar a expressão de proteínas antivirais que previnem a replicação do HIV-1.

As células NK são um componente crítico para a resposta do sistema imune inato contra uma variedade de viroses, fungos, parasitas e bactérias (Lanier, 2001; Trinchieri, 1989). Após ativação, as células NK secretam citocinas e quimiocinas que induzem respostas inflamatórias, moduladoras da hematopoiese, controle de crescimento e da função de monócitos e granulócitos, e influenciam no tipo da resposta imune adaptativa subsequente. As células NK têm tanto uma atividade antiviral assim como antitumoral, e a habilidade das mesmas de lisar os alvos não depende de sensibilização prévia e nem de interações restritas com moléculas de MHC (Barao e Ascensao, 1998). A viremia na infecção pelo HIV-1 afeta a habilidade das células NK em produzir β -quimiocinas e dessa maneira a habilidade das mesmas em suprimir a replicação do HIV-1 *ex vivo* Além

disso, ensaios de citotoxicidade mediados por células NK demonstraram que células NK provenientes de pacientes com viremia não são capazes de lisar células alvo *in vitro*, como uma consequência da expressão aumentada de iNKRs (receptor inibitório de NK) e da diminuição da expressão dos receptores de citotoxicidade (NCR) dessas células. Os mecanismos pelos quais a viremia do HIV-1 influencia a expressão dos receptores das células NK e sua função secretora e citotóxica não está completamente elucidado (Kottlil et al., 2003; Kottlil et al., 2007; Mavilio et al., 2003). Alguns achados sugerem que o RNA viral estimula diretamente as células dendríticas plasmocitóides a produzirem IFN- α através da interação com TLR-7 (Beignon et al., 2005), o qual já foi demonstrado *in vitro* ativar células NK (Alter et al., 2007). Kottlil et al. (2006) demonstraram que a replicação contínua do HIV-1 resulta em respostas anormais das células NK, salientando a susceptibilidade das mesmas à morte celular, e essa anormalidade provavelmente é atribuída a ativação imune induzida pela infecção.

Apesar de benefícios da ativação da resposta imune inata no controle da replicação viral, seu estímulo crônico pode ser danoso. A ativação aumentada de células dendríticas plasmocitóides e a secreção de IFNs (Mandl et al., 2008; Beignon et al., 2005) desregulam o sistema imune, como observado na infecção crônica pelo HIV-1. A ativação crônica do sistema imune está correlacionada a níveis plasmáticos aumentados de LPS. Este aumento decorre devido à translocação bacteriana no trato gastrointestinal (revisado por Brenchley e Douek, 2008). Estes achados implicam a

translocação microbiana como uma causa da ativação imune em indivíduos cronicamente infectados pelo HIV-1 fornecendo uma ligação direta entre os danos nos tecidos gastrointestinais durante a fase aguda da infecção e a progressão para a imunodeficiência.

1.6.2. Resposta imune adaptativa

Diversas linhas de evidência indicam que anticorpos neutralizantes, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ desempenham um importante papel na defesa contra o HIV-1 (revisto por Gandhi e Walker, 2002). Embora existam várias evidências que sugerem que os anticorpos neutralizantes são capazes de prevenir a infecção pelo HIV-1, o seu aparecimento tardio não tem influência sobre o estabelecimento da infecção e a formação de reservatórios virais, sendo que as novas progêneses virais escapam da atividade neutralizante de tais anticorpos devido à mutações (revisto por Letvin, 2006).

Os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) têm um papel reconhecido no controle viral através da lise celular direta de células infectadas e da secreção de citocinas e quimiocinas que aumentam a imunidade antiviral e suprimem a replicação do vírus (Walker *et al.*, 1987; Plata *et al.*, 1987; Borrow *et al.*, 1994; Cocchi *et al.*, 1995). 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. Dessa maneira, a resposta de CTLs elimina células infectadas antes que a progênie de vírions seja liberada, demonstrando a potencial atividade antiviral dessas células.

Os linfócitos T CD8⁺ podem agir também inibindo a replicação do HIV-1 pela secreção de quimiocinas β , como MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES, as quais possuem a capacidade de se ligar aos co-receptores do HIV-1 nas células T CD4⁺ bloqueando então a entrada do vírus nas mesmas (revisto por Gandhi e Walker, 2002). O papel das células T CD8⁺ específicas para o HIV-1 no controle da doença foi diretamente demonstrado em modelos de infecção por SHIV (Vírus Quimérico da Imundeficiência Símia) em macacos (Koup *et al.*, 1994). A depleção desse tipo celular com anticorpos monoclonais anti-CD8⁺ e posterior infecção com SIV, levou a uma da replicação viral descontrolada e mortalidade acelerada (Schmitz *et al.*, 1999). Durante a infecção aguda pelo HIV-1, a ativação e expansão dos linfócitos T CD8⁺ HIV-1 específicos está relacionada com o declínio da viremia (Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994; Greenough *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1998).

A importância de células T CD4⁺ vírus-específicas e sua associação com a resposta imune antiviral foi demonstrada em camundongos (Novy *et al.*, 2007). Os linfócitos T CD4⁺ HIV-1 específicos têm papel fundamental na atividade dos linfócitos T CD8⁺, através de auxílio na indução e/ou manutenção das respostas dessas células, além de também influenciar nas respostas de linfócitos B (produtores de anticorpos) e macrófagos pela mediação direta de suas funções efetoras antivirais tais como produção de citocinas e, eventualmente efeito citotóxico (Hogan e Hammer, 2001). O controle da replicação do HIV-1 e conseqüente diminuição da viremia foram associados a uma resposta linfoproliferativa de linfócitos T CD4⁺ específicas vigorosa em pacientes cronicamente infectados e não tratados (Rosenberg

et al., 1997; revisto por Gandhi e Walker, 2002). A imunização capaz de preservar as células T CD4⁺ de memória (Mattapallil *et al.*, 2006) levou a uma sobrevida aumentada após desafio de primatas com SIV (Letvin *et al.*, 2006). Células T CD4⁺ específicas também já foram descritas como capazes de controlar a replicação viral em macrófagos infectados pelo SIV (Sacha *et al.*, 2009). Respostas de células T CD4⁺ antígeno específicas precoces também podem ser utilizadas como um fator de bom prognóstico na infecção pelo HIV-1 (Pancre *et al.*, 2007).

1.7. Vacinas contra o HIV-1

Dentre as possíveis estratégias para o desenvolvimento de vacinas, vacinas contra o HIV-1 poderiam induzir uma resposta imune estéril ou uma resposta imune parcial. No primeiro caso, a indução de anticorpos neutralizantes de amplo espectro contra proteínas do envelope viral poderiam impedir a infecção contra diferentes cepas do HIV-1. Já as vacinas direcionadas para indução de uma resposta imune parcial, visam induzir respostas imunes celulares e não seriam capazes de bloquear a infecção pelo HIV-1, mas existem indícios de que as mesmas poderiam levar a um controle da progressão para AIDS assim como da transmissão do HIV-1 (Wawer *et al.*, 2005).

Anticorpos monoclonais dirigidos a determinados epítopos do envelope viral são capazes de neutralizar um grande número de isolados do HIV-1 e são chamados de anticorpos neutralizantes de amplo espectro. A indução deste tipo de anticorpo pode bloquear a infecção pelo HIV-1 gerando uma

imunidade estéril. O desenvolvimento de uma vacina esterilizante contra o HIV-1 capaz de induzir elevados títulos desses anticorpos neutralizantes permanece um grande desafio. Ensaios clínicos iniciais envolvendo a forma monomérica da proteína do envelope, gp120, mostraram que os anticorpos induzidos pela vacinação não foram capazes de neutralizar isolados primários do HIV-1 e não exerceram nenhuma pressão imunológica seletiva sobre os vírus infectantes (Connor *et al.*, 1998). Dois estudos de eficácia de fase III, utilizando a vacina conhecida como AIDSVAX, foram conduzidos nos Estados Unidos e Tailândia para avaliar a eficácia protetora de tal vacina. Os resultados mostraram que a vacina não foi eficaz na proteção contra a infecção pelo HIV-1 (Flynn *et al.*, 2005; Pitisuttithum *et al.*, 2006), confirmando a necessidade do desenvolvimento de novos imunógenos. Houve portanto, uma intensificação dos interesses em desenvolver imunógenos visando à indução de respostas imunes celulares, incluindo o uso de vacinas de DNA e vetores virais recombinantes (Barouch e Korber, 2010). Embora essas vacinas não sejam capazes de bloquear a replicação viral, a expectativa é de que as mesmas sejam capazes de reduzir a viremia e prevenir a destruição maciça e precoce de células T CD4⁺ de memória, que auxiliam no controle da infecção e prolongam a sobrevida livre da doença (Barouch e Korber, 2010).

Uma viremia reduzida (menos de 2 000 cópias/mL) está associada à progressão mais lenta para AIDS (Gray *et al.*, 2003; Gray *et al.*, 2001; Quinn *et al.*, 2000) assim como com menores taxas de transmissão (Garcia *et al.*, 2008; Wawer *et al.*, 2005). Portanto, acredita-se que vacinas indutoras de

uma imunidade celular possam reduzir a transmissão, tendo efeito direto na pandemia (Johnston e Fauci, 2007) assim como prolongar o tempo de progressão para AIDS nos indivíduos vacinados (Barouch e Korber, 2010).

Recentemente foi encerrado um ensaio clínico de fase IIb conduzido pela indústria farmacêutica Merck (estudo STEP), que visava a indução de uma resposta imune celular (Buchbinder *et al.*, 2008). A vacina era baseada em uma mistura de adenovírus recombinantes codificando 3 proteínas inteiras do HIV-1: gag, pol e nef. Essa vacina não foi capaz de proteger e nem de reduzir a viremia nos indivíduos vacinados que se infectaram (Appay, 2009). A falta de eficácia do estudo de fase IIb conduzido pela Merck, pode ter sido relacionado a pequena amplitude das respostas de células T induzidas. Em média, apenas um epitopo foi reconhecido por produto gênico do HIV-1 em cada paciente (Corey *et al.*, 2009). Além disso, as respostas de células T CD8⁺ induzidas não eram polifuncionais, um perfil associado ao controle da replicação do HIV-1 e progressão da doença (Betts *et al.*, 2006; Emu *et al.*, 2008; Harari *et al.*, 2004). Além disso, 30% e 60% dos vacinados no ensaio STEP não apresentaram respostas de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ aos antígenos vacinais (Mcelrath *et al.*, 2008). e apenas 25% apresentaram simultaneamente respostas de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (Corey *et al.*, 2009).

Outro ensaio clínico, conduzido na Tailândia, concluído recentemente foi (ensaio RV144) (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009). Consistia em um ensaio de fase III que visava induzir tanto imunidade celular quanto imunidade humoral. O esquema de imunização consistiu em 4 doses iniciais com

Canarypox recombinante codificando a proteína gp120, Gag e protease, seguido de 2 doses auxiliares com a proteína gp120 (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009). Os resultados revelaram uma redução das taxas de infecção em aproximadamente 30% dos indivíduos vacinados, mas não houve efeito sobre a carga viral (Bansal *et al.*, 2010). Em relação a esse ensaio vacinal, não foram observadas respostas de células T CD8⁺ entre os vacinados e 66% deles não apresentaram respostas de célula T CD4⁺ (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009).

1.8. Requisitos essenciais a serem induzidos por uma vacina que vise indução de resposta imune celular

Os ensaios vacinais contra o HIV-1 testados até o momento demonstraram que as vacinas não foram capazes de induzir respostas de amplitude elevada de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. A indução de respostas imunes amplas e funcionalmente relevantes, contra epítomos conservados, na maioria dos indivíduos, pode ser um pré-requisito essencial para novos candidatos a vacina (Sekaly, 2008; Watkins, 2008). Especula-se que vacinas que sejam capazes de induzir respostas de linfócitos T CD4⁺ poderiam fornecer auxílio para linfócitos T CD8⁺ efetores e dessa maneira ter maior eficácia no controle da replicação viral nos indivíduos vacinados que venham a se infectar. Além disso, essa vacina deveria induzir linfócitos T polifuncionais e de memória central e efetora, de longa duração, que podem ser prontamente ativadas no caso de reencontro com o antígeno.

1.8.1. Importância de um componente indutor de respostas de linfócitos T CD4⁺

Como já citado anteriormente, células T CD4⁺ são de extrema relevância para o funcionamento do sistema imune, além de também estarem correlacionadas com melhor prognóstico na infecção pelo HIV-1 (Rosenberg *et al.*, 1997). Os mecanismos em que essas células podem estar envolvidas incluem auxílio cognato para células CD8⁺ (Lichterfeld *et al.*, 2004; Shedlock e Shen, 2003), mobilização de células CD8⁺ efetoras para os locais periféricos de infecção (Nakanishi *et al.*, 2009), e mesmo atividade citolítica direta, atuando no controle da replicação viral em macrófagos infectados (Sacha *et al.*, 2009). Além disso, células T CD4⁺ vírus-específicas podem ser capazes de tolerar maior diversidade de sequência nos epitopos alvo do que células T CD8⁺ sendo portanto, mais resistentes a mutações de escape (Wilson *et al.*, 2004). A falta da indução de respostas de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ pelas vacinas do ensaio STEP da Merk (Buchbinder *et al.*, 2008) e RV144 (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009), pode estar associada à falta de eficácia das mesmas. Portanto, a inclusão deliberada de epitopos para células T CD4⁺ do HIV-1 em imunógenos, a fim de fornecer auxílio cognato e impulsionar respostas de células T CD8⁺, pode ser uma estratégia desejável para vacinas contra o HIV-1 que visem induzir respostas celulares.

1.8.2. Vacinas baseadas em epitopos

Vacinas que codificam genes ou proteínas inteiras do HIV-1 mantêm mecanismos de escape molecular desenvolvidos pelo HIV-1 nativo ao longo da evolução do hospedeiro, em resposta às pressões imunes e outras, o que pode ser responsável pela baixa proteção conferida por tais vacinas (Mcelrath *et al.*, 2008; Rerks-Ngarm *et al.*, 2009).

Vacinas baseadas em epitopos podem combinar múltiplos epitopos de células T alinhados, e focar a resposta imune no grupo de epitopos selecionados, como por exemplo, epitopos conservados e altamente antigênicos, gerando insertos de tamanhos menores. Nessa estratégia vacinal, cada epitopo isoladamente pode ser imunogênico, além de já haverem relatos de vacinas baseadas em epitopos serem capazes de gerar respostas mais amplas e potentes (Fuller *et al.*, 2007; Tenzer *et al.*, 2009; Suhrbier, 2002; Ishioka *et al.*, 1999; Restifo *et al.*, 1995). Além disso, vacinas baseadas em epitopos, apresentados fora do contexto das seqüências flanqueadoras das proteínas nativas, poderiam abolir os mecanismos de escape de processamento, apresentação e reconhecimento imunológicos (Allen *et al.*, 2004), levando à indução de respostas imunes celulares amplificadas. Outro aspecto essencial é que os epitopos contidos em um candidato vacinal devem gerar respostas imunes amplas e ser reconhecidos pela totalidade ou a grande maioria dos indivíduos, de forma a cobrir uma proporção significativa da população exposta.

Dado o papel fundamental das células T CD4⁺ na manutenção da resposta imune, a identificação e caracterização de epitopos para essas células é crucial para o desenvolvimento de vacinas (Rosa *et al.*, 2010).

Uma estratégia convencional na identificação de epitopos para células T é a de sintetizar peptídeos sobrepostos (geralmente 15 mers) cobrindo toda a proteína alvo, e testar a imunogenicidade de tais peptídeos em ensaios celulares. Entretanto, esse método consome muito tempo, é caro, e pode não permitir a identificação de todos os epitopos potenciais para células T CD4⁺. Em contrapartida, ferramentas de bioinformática, podem prever quais peptídeos são mais prováveis de conter epitopos para células T, reduzindo de maneira grandiosa a quantidade das seqüências candidatas (Gowthaman e Agrewala, 2008).

A predição de epitopos para células T data de 1980, quando o primeiro algoritmo foi desenvolvido baseado na identificação de regiões helicoidais anfipáticas de antígenos proteicos (Berzofsky *et al.*, 1987). Desde então, novos métodos baseados inicialmente em motivos de ligação MHC-peptídeo e, mais recentemente, sobre as propriedades de ligação a moléculas de MHC, com base na pontuação calculada a partir de ensaios de ligação *in vitro* com peptídeos, têm sido desenvolvidos. Métodos de predição de epitopos para moléculas de MHC classe II são mais complexos do que métodos de predição de epitopos para moléculas de MHC classe I (Yang e Yu, 2009). Vários dos algoritmos de bioinformática foram desenvolvidos para prever epitopos para molécula de MHC classe II (Guan *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2008; Rammensee *et al.*, 1999; Reche *et al.*, 2002; Sturniolo *et al.*,

1999; Zhang *et al.*, 2009). Muitos estudos têm comparado as performances desses algoritmos de predição para moléculas de MHC classe II (Gowthaman e Agrewala, 2008; Lin *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008) e confirmaram que a performance do algoritmo TEPITOPE (Sturniolo *et al.*, 1999) é similar a de muitos outros algoritmos mais recentes, indicando que apesar das diferenças nos bancos de dados utilizados, os métodos contemporâneos têm mostrado pequena melhora (Lin *et al.*, 2008).

O algoritmo de predição de ligação a moléculas HLA-DR, TEPITOPE (Sturniolo *et al.*, 1999), é um algoritmo de previsão *in silico* de ligação ao MHC virtual e incorpora em sua matriz os resultados de milhares de ensaios de ligação peptídeo-HLA-DR, permitindo prever peptídeos que se liguem a múltiplas moléculas de HLA-DR e identificar epitopos potenciais de células T CD4⁺ (Sturniolo *et al.*, 1999; Bian e Hammer, 2004). Esse algoritmo utiliza o conceito de que cada *pocket* HLA-DR pode ser caracterizado por um determinado perfil, considerando a interação natural de todos os resíduos de aminoácidos com determinado *pocket* (Hammer *et al.*, 1994). Um pequeno banco de dados de perfis de *pockets* foi suficiente para gerar um grande número de matrizes HLA-DR virtuais, representando uma significativa proporção de especificidades de peptídeos ligadores a essas moléculas. Tais matrizes foram incorporadas no software do TEPITOPE. Para cada especificidade de HLA-DR, o algoritmo TEPITOPE gera uma pontuação de ligação correspondente à soma algébrica da força de interação entre cada resíduo e o *pocket*, o que se correlaciona com a afinidade de ligação. A pontuação dos epitopos de uma dada proteína são normalizados para cada

molécula HLA-DR de acordo com os melhores peptídeos ligadores. Considerando que o software apresenta um número significativo de especificidades de moléculas HLA-DR, também é possível prever a promiscuidade dos epitopos identificados, ou seja, epitopos que são capazes de se ligar a múltiplas das especificidades de moléculas HLA-DR utilizadas pelo algoritmo (Panigada *et al.*, 2002; De Lalla *et al.*, 1999; Benmohamed *et al.*, 2003; Iwai *et al.*, 2003). O modelo de predição TEPITOPE tem sido aplicado com sucesso na identificação de epítomos de células T no contexto de várias doenças humanas (Bian e Hammer, 2004).

Recentemente, nosso grupo, com ajuda do algoritmo de previsão de ligação de peptídeos em moléculas HLA-DR, TEPITOPE, identificou 18 epitopos conservados para linfócitos T CD4⁺ provenientes do HIV-1 subtipo B (Los Alamos Sequence Database) previstos se ligarem a pelo menos 66% das múltiplas moléculas HLA-DR descritas pelo algoritmo. Desses epitopos 11 são novos, não tendo sido previamente descritos pela literatura (Fonseca *et al.*, 2006).

A promiscuidade dos epitopos do HIV-1 descritos foi confirmada através de ensaios de ligação *in vitro* as moléculas de HLA-DR altamente prevalentes na população mundial (Fonseca *et al.*, 2006). A maioria dos peptídeos se ligou a pelo menos 50% das moléculas de HLA-DR classe II testadas. Além disso, cada molécula HLA-DR se ligou a múltiplos peptídeos, a maioria se ligando a 10 ou mais, indicando que um indivíduo portador de tais moléculas HLA-DR pode desenvolver respostas de linfócitos T CD4⁺ amplas contra os epitopos descritos. Adicionalmente, células do sangue

periférico de pacientes infectados pelo HIV-1 foram capazes de secretar IFN- γ quando re-estimuladas *in vitro* com os peptídeos sintéticos individualmente. 91% dos pacientes reconheceram pelo menos um epitopo descrito, sendo que 44% deles reconheceram 5 ou mais epitopos, incluindo reconhecimento por células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Fonseca *et al.*, 2006), corroborando a promiscuidade observada nos testes de ligação *in vitro*. Essas respostas não foram restritas à alelos específicos de HLA-DR. Sequências idênticas à muitos dos peptídeos descritos também aparecem em frequência superior à 50% entre isolados de HIV-1 dos subtipos A, C, D e F depositados no Los Alamos Sequence database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/maps.html>). Este fato reitera que os epitopos selecionados, ou seqüências altamente semelhantes a eles, estão amplamente representados entre os diferentes subtipos do HIV-1, levantando a possibilidade de que pacientes infectados com outros subtipos do HIV-1, que não seja o subtipo B, também possam reconhecer tais epitopos originalmente identificados na seqüência consenso do HIV-1 subtipo B.

Considerando as características acima descritas, a combinação desses epitopos promíscuos e conservados para linfócitos T CD4⁺ poderia gerar uma vacina candidata contra o HIV-1. Hipoteticamente, tal vacina permitiria a imunização da população geneticamente heterogênea, pela habilidade dos múltiplos epitopos se ligarem a múltiplas moléculas HLA-DR, proporcionando dessa maneira uma elevada amplitude de reconhecimento de epitopos conservados do HIV-1 em cada indivíduo portador de diferentes moléculas

HLA-DR, gerando respostas imunes eficazes contra diversos isolados do HIV-1. Recentemente, com o desenvolvimento de várias linhagens de camundongos transgênicos para moléculas de HLA de classe II (Call *et al.*, 2009; Dasilva *et al.*, 2002; Gregory *et al.*, 2009), modelos animais para testar tais conceitos tornaram-se disponíveis. Esses camundongos transgênicos não expressam sua molécula de MHC classe II endógena e são capazes de desenvolver respostas de células T CD4⁺ para os mesmos epitopos reconhecidos por seres humanos, portadores do mesmo alelo de HLA classe II para o qual o camundongo é transgênico (Geluk *et al.*, 1998b; Kawamura *et al.*, 2000). A importância da utilização desses camundongos consiste na avaliação da imunogenicidade da vacina no contexto de moléculas HLA classe II altamente prevalentes na população mundial, em nível pré-clínico, permitindo a avaliação da amplitude de reconhecimento dos epitopos conservados em indivíduos portadores de múltiplas moléculas HLA de classe II.

1.8.3. Indução de células polifuncionais

Vem se tornando cada vez mais evidente que além da magnitude, a qualidade das respostas imunes geradas é um fator crucial na definição de uma resposta imune protetora (Seder *et al.*, 2008). Células polifuncionais são células capazes de secretar duas ou mais citocinas simultaneamente. Células T CD4⁺ polifuncionais (IFN- γ ⁺IL-2⁺TNF- α ⁺) induzidas em camundongos por imunização foram capazes de fornecer proteção contra desafios com *Leishmania major* (Darrah *et al.*, 2007) e *M. tuberculosis*

(Lindenstrom *et al.*, 2009). Células T CD4⁺ polifuncionais HIV-1 específicas estão presentes em indivíduos infectados pelo HIV-1 não progressores (Emu *et al.*, 2008; Harari *et al.*, 2004) e correlacionam-se inversamente com a viremia (Kannanganat *et al.*, 2007a). Além disso, indivíduos infectados pelo HIV-2, que apresentam um maior tempo para a progressão para AIDS do que indivíduos infectados pelo HIV-1, apresentam maior quantidade de células T CD4⁺ polifuncionais (Duvall *et al.*, 2008). Dessa maneira, acredita-se que a indução de células polifuncionais possa ser um correlato de proteção putativo.

1.8.4. Indução de memória imunológica

Além da indução de células T polifuncionais, a indução de células de memória central também vem sendo associadas com proteção e melhor prognóstico em várias infecções. Células de memória podem ser prontamente ativadas no caso de reencontro com o antígeno e são responsáveis pela manutenção por longo tempo da resposta imune antiviral, devido a sua longa meia vida e capacidade de renovação (Lanzavecchia e Sallusto, 2005). A imunização com o vírus da *vaccínia* foi capaz de gerar células T CD4⁺ específicas de memória por mais de 30 anos (Wang *et al.*, 2009). Entre pacientes infectados pelo HIV-1 e não progressores por longo tempo, existe uma preservação do compartimento de células T CD4⁺ de memória central e sinais de ativação funcional potente no compartimento de células T CD4⁺ de memória efetora (Potter *et al.*, 2007). A observação de que a vacinação que preserva células T CD4⁺ de memória em primatas

desafiados com SIV (Mattapallil *et al.*, 2006) levou a uma sobrevivência aumentada (Letvin *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009) reforçou a importância das células T CD4⁺ de memória na proteção contra a progressão para a AIDS. Além disso, foi mostrado que imunizações que induzem células T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória efetora específicas contra o SIV foram capazes de causar redução significativa da viremia na fase aguda e crônica (Wilson *et al.*, 2009), além de diminuir a incidência de infecção pelo SIV após repetidos desafios com uma cepa patogênica (Hansen *et al.*, 2009). Portanto, a indução desses subtipos de linfócitos T polifuncionais e com fenótipo de memória pode ser considerada provável indicador de sucesso vacinal.

Dessa maneira, a hipótese desse trabalho é que um imunógeno contendo o conjunto de epitopos para linfócitos T CD4⁺ do HIV-1, altamente conservados e promíscuos, provenientes de 8 diferentes proteínas do HIV-1 será capaz de induzir respostas de células T amplas em indivíduos portando diversas moléculas de HLA classe II, com características funcionais e de memória descritas como protetoras.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a imunogenicidade de uma vacina de DNA codificando epitopos conservados e promíscuos do HIV-1 do subtipo B em camundongos BALB/c e transgênicos para moléculas de HLA classe II.

2.2. Objetivos específicos

- 1- Construir uma vacina de DNA multiepitópica codificando os 18 epitopos promíscuos e conservados do HIV-1 identificados em estudo prévio;
- 2- Avaliar a expressão e a toxicidade da vacina;
- 3- Estabelecer o protocolo de imunização;
- 4- Avaliar as respostas proliferativas e de citocinas de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ induzidas pela vacina em relação à magnitude e amplitude;
- 5- Avaliar o perfil de memória e polifuncional das células induzidas pelo protocolo vacinal;
- 6- Avaliar a longevidade das respostas geradas;
- 7- Avaliar a habilidade da vacina em induzir respostas de linfócitos T CD4⁺ no contexto de múltiplas moléculas de HLA de classe II.

3. MÉTODOS

3.1. Síntese automática de peptídeos em fase sólida

Para a realização deste trabalho foram utilizados peptídeos sintéticos produzidos pelo setor de síntese de nosso laboratório (InCor – LIM19). A síntese foi realizada em fase sólida automaticamente utilizando-se química N-9-fluorenilmetoxycarbonil (estratégia Fmoc).

O controle de qualidade após a síntese foi realizado através de cromatografia líquida em fase reversa em HPLC (LC-10AT_{vp} - Shimadzu) e por espectrometria de massas em um espectrômetro do tipo Ettan Maldi ToF/Pro (Amersham Biosciences). A pureza de todos os peptídeos utilizados estava acima de 70%. Após síntese e avaliação da pureza dos peptídeos, os mesmos foram diluídos em DMSO, para uma solução estoque na concentração de 25mM. Essa solução foi armazenada à -20°C até o momento do uso. Nos ensaios para avaliação da resposta imune antígeno-específica a solução estoque acima, foi diluída em R10 para a concentração final de uso de 5uM. O pool de peptídeos contendo todos os 18 peptídeos sintéticos foi preparado com quantidades iguais de cada peptídeo.

3.2. Subclonagem do gene multiepitópico artificial codificando epitopos promíscuos e conservados do HIV-1

Em trabalho prévio nosso grupo descreveu 18 epitopos promíscuos para linfócitos T CD4⁺ provenientes de regiões conservadas do consenso B do HIV-1 (Fonseca *et al.*, 2006). A sequência de cada epitopo está representada na Tabela 1 anexa. Cada epitopo teve sua sequência nucleotídica otimizada para expressão em células de mamíferos. Essa otimização foi realizada com o auxílio de um banco de dados de *códon usage* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Após otimização dos códons, os epitopos foram colocados em sequência, obedecendo a ordem em que aparecem no genoma do HIV-1. Entre cada epitopo foi inserido um espaçador de sequência GP GPG a fim de evitar a criação de epitopos juncionais (Livingston *et al.*, 2002). Os aminoácidos que compõe o espaçador não são comuns nos sítios de ligação às moléculas de HLA classe II, facilitando dessa maneira o processamento e apresentação corretos de cada epitopo. Posteriormente, um gene sintético, codificando os 18 epitopos *in tandem* assim como as sequências espaçadoras, foi produzido a partir de um sintetizador pela empresa EZBiolab (EUA <http://www.ezbiolab.com>). O gene sintético foi então subclonado dentro do vetor pVAX 1, um vetor liberado para uso em humanos (Nemunaitis *et al.*, 2006) dando origem ao plasmídeo vacinal HIVBr18. O inserto contendo os múltiplos epitopos foi subclonado no vetor pVAX 1 nos sítios de restrição das enzimas HindIII e XhoI.

Com a intenção de facilitar a tradução da proteína artificial pelas células de mamíferos, foi inserida uma seqüência de Kosak. Também foi inserido um códon de parada anteriormente ao sítio da enzima Xho I.

3.3. Transformação de bactérias DH5 α por choque térmico

A obtenção dos plasmídeos em grandes quantidades para os protocolos de imunização foi realizado com a transformação de bactérias DH5 α competentes. As mesmas foram transformadas tanto com o vetor pVAX 1 (sem o inserto) assim como com o vetor contendo o inserto codificando os 18 epitopos selecionados, HIVBr18.

Aproximadamente 200 ng de cada DNA plasmidial, pVAX 1 ou HIVBr18, foram adicionados em tubos de microcentrífuga contendo alíquotas de 100 μ L de bactérias DH5 α competentes. Após incubação em gelo por 30 minutos, os tubos foram colocados à 42 °C por exatamente 2 minutos e recolocados em gelo por mais 5 minutos. Em seguida, foram acrescentados 400 μ L de meio SOC e os tubos foram incubados à 37 °C por 1 hora sob agitação (250 rpm). O volume total da mistura foi semeado em placas de LB sólido contendo 50 μ g/mL de canamicina (Sigma) e incubado à 37 °C por 16 horas para seleção dos clones resistentes ao antibiótico. Os clones resistentes foram então semeados em meio LB líquido (50 μ g/mL de canamicina (Sigma)) para extração e purificação dos DNAs plasmidiais para posterior utilização nos protocolos de imunização.

3.4. Extração e purificação dos DNAs plasmidiais

Os plasmídeos pVAX 1 (vetor) ou HIVBr18 foram purificados por lise alcalina, utilizando-se o "*kit*" comercial Qiagen Giga Plasmid Purification (Qiagen, Alemanha).

Inicialmente, as bactérias DH5 α transformadas com cada plasmídeo individualmente foram semeadas em placas de LB sólido contendo 50 μ g/mL de canamicina (Sigma) como citado anteriormente. Um clone resistente proveniente de cada transformação (pVAX 1 ou HIVBr18) foi inoculado em 5 mL de meio LB líquido (Invitrogen) contendo canamicina (50 μ g/mL) e incubado durante 8 horas à 37 °C sob agitação (250 rpm) (Orbital Shaker Hepa Filter – Thermo Forma). A seguir, essa cultura foi diluída na proporção de 1/500 em 2,5 litros de LB líquido, contendo canamicina (50 μ g/mL), e incubada novamente à 37 °C sob agitação (250 rpm) por 16 horas. Após esse período, toda a cultura foi centrifugada à 3700 rpm por 15 minutos à 4°C (SORVALL RC5C Instrument). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de bactérias foi ressuspenso em 125 mL do tampão P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM e RNase) fornecido pelo *kit*. Posteriormente, foram adicionados 125 mL do tampão P2 (NaOH 200 mM; SDS 1 %), também fornecido pelo *kit*, e a solução foi homogeneizada levemente. A mesma foi deixada a temperatura ambiente por 5 minutos para a completa lise da parede bacteriana. Em seguida, adicionou-se 125 mL do tampão P3 (acetato de potássio 3,0 M pH 5,5, fornecido pelo *kit*) para neutralização da reação de lise.

O material proveniente da lise bacteriana foi transferido para um filtro cedido pelo *kit*, o qual ficou em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente, para que a massa composta de parede e genoma bacterianos se separasse da parte aquosa, que contém o material de interesse. O filtro foi previamente anexado a uma garrafa de volume de 1 litro. Após esse período, o líquido foi filtrado à vácuo, lavado com 50 mL do tampão FWB2 (acetato de potássio 1M, pH 5,0). Foram então adicionados 30mL do tampão para remoção de endotoxinas e toda a solução foi mantida no gelo por 30 minutos. Em seguida, o filtrado foi aplicado em uma coluna de cefarose (Qiagen) previamente equilibrada com 75 mL do tampão QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15% e Triton X-100 - 0,15 %). Todo o volume passou pela coluna por ação da gravidade. Após a passagem de todo o filtrado pela coluna, a resina foi lavada com 600 mL do tampão QC (NaCl 1,0 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %). Finalmente, o DNA plasmidial foi eluído com a adição de 100 mL do tampão QN (NaCl 0,25 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %) à coluna. O DNA eluído foi precipitado com isopropanol (70% do volume inicial), centrifugado à 11200 rpm por 30 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foram adicionados 10 mL de etanol 70% (em água livre de endotoxinas). Após mais uma etapa de centrifugação à 11200 rpm por 10 minutos à 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ficou a temperatura ambiente até toda a evaporação do etanol. Após essa etapa, o *pellet* foi ressuspenso em 2,0 mL de água estéril livre de endotoxinas e os DNAs plasmidiais obtidos passaram por uma análise de restrição seguida por eletroforese em gel de agarose, e enfim

foram utilizados nos protocolos de imunização.

3.5.Quantificação e avaliação da qualidade dos plasmídeos purificados

Após a purificação dos plasmídeos como descrito acima, foi realizada a quantificação e a avaliação da qualidade dos produtos purificados.

A quantificação dos plasmídeos foi realizada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 a 280nm, utilizando-se o aparelho Nanodrop Spectrophotometer ND-1000. Para a quantificação, os plasmídeos foram diluídos 10 vezes na mesma água em que foram ressuspensos anteriormente. A mesma também foi utilizada para “zerar” a leitura do aparelho.

A avaliação da qualidade dos plasmídeos foi feita utilizando-se a enzima de restrição Hind III para pVAX 1 e Hind III e Xho I (Invitrogen) para o HIVBr18. Em síntese, aproximadamente 400 ng dos plasmídeos foram incubados à 37 °C de 2 à 4 horas com as respectivas enzimas (1 U/ μ g) e seus respectivos tampões (React III) na concentração de 1 vez.

Em seguida, os produtos da digestão de cada amostra, assim como os plasmídeos linearizados (uso de apenas 1 enzima no caso do HIVBr18) ou circulares (não digeridos), foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo (0,5 ug/mL). As amostras foram ressuspensas em tampão de eletroforese para concentração final de 1x

(0,25% azul de bromofenol; 40% de sacarose em água) e o material foi submetido à eletroforese em tampão TAE (Tris-acetato 40mM; EDTA 1 mM pH 8) à 140 V por aproximadamente 40 minutos. O padrão Ready load 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen) foi utilizado como marcador de peso molecular. O gel corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídio (Invitrogen) e teve suas bandas visualizadas com luz ultravioleta no aparelho Multimage™ Light Cabinet Filter Positions (Software Alpha Imager).

3.6. Animais

3.6.1. Camundongos BALB/c convencionais

Camundongos isogênicos fêmeas de 6 a 8 semanas de idade da linhagem convencional BALB/c (H-2^d) foram utilizados nesse projeto para os experimentos de imunização. Os animais foram mantidos e manipulados em condições SPF no biotério do Laboratório de Imunologia do InCor, situado no Instituto de Medicina Tropical (IMT). Esse projeto de pesquisa teve aprovação da CAPESq 686/06.

3.6.2. Camundongos transgênicos para moléculas de HLA class II

Camundongos transgênicos para diversas moléculas de HLA classe II humanas (-DR2, -DR4, -DQ6 e -DQ8) também foram utilizados nesse projeto para os experimentos de imunização, e ficaram sob as mesmas condições

de manutenção e manipulação que os camundongos convencionais. Esses camundongos transgênicos não expressam sua molécula MHC classe II endógena (AE⁰) e sim moléculas de HLA classe II humanas como -DR2, -DR4, -DQ6 ou -DQ8.

Os camundongos HLA-DR2 tiveram o gene DRB1*1502 inserido em camundongos B10.RQB3 (Aa^qAb^qEb^qEa^k) que expressam a molécula H2A^q. A região Eb^q está mutada nesta linhagem, não sendo funcional. Os animais que receberam o gene foram entrecruzados por 10 gerações. A região Ea^k é homóloga a DRα, pareando com DRB1*1502. Esses animais têm a prevalência do “background” de MHC classe I H2^q (Gonzalez-Gay *et al.*, 1996). Já os camundongos HLA-DR4 partiram de um cruzamento entre SWR (q2) e B10 (H2^b). O gene DR4β foi inserido em óvulos provenientes desse cruzamento. Os animais positivos para DR4β foram entrecruzados e a progênie foi cruzada com B10.RFB3 (H2^f). Esses animais, têm portanto, um “background” genético H2^{q2}, H2^b, H2^f sendo principalmente H2^f (Pan *et al.*, 1998). Os camundongos HLA-DQ6 tiveram os genes DQA1*0103 e DQB1*0601 inseridos em embriões provenientes da F2 do cruzamento CBA/j e B10.M, gerando os animais B10.M-DQ6 (H-2A^{ff}). Os animais B10.M-DQ6 foram cruzados com a linhagem H-2Ab⁰ (H-2Ab^{0/0}), gerando camundongos HLA-DQ6⁺-H2Ab⁰. Portanto esses animais são H2^k, H2^f cruzados com Hb⁰, 129 (H2^b) (Bradley *et al.*, 1997). Para geração dos camundongos transgênicos HLA-DQ8 foram inseridos os genes DQA1*0301 e DQB1*0302 em embriões provenientes da F2 do cruzamento CBA/j e B10.M, gerando os animais B10.M-DQ8 (H-2A^{ff}). Os animais B10.M-DQ8 foram cruzados com a

linhagem H-2Ab⁰ (H-2Ab^{0/0}), gerando os HLA-DQ8⁺-H2Ab⁰. Portanto esses animais são predominantemente H2^k, H2^f cruzados com Hb⁰, 129 (H2^b) (Nabozny *et al.*, 1996).

3.7. Imunizações experimentais

A imunização básica consistiu de uma injeção prévia de 7 µg de cardiotoxina (Sigma) em volume final de 100 µL de solução salina estéril (NaCl 0,9%, Baxter), pela via intramuscular, sendo administrados 50 µL em cada músculo *tibialis anterioris*, direito e esquerdo, seguindo procedimentos de anti-sepsia. Após 5 dias, os animais receberam o número de doses necessárias para realização de cada protocolo (descritos especificamente abaixo) pela via intramuscular (IM). Cada dose consistiu de 100 µg do respectivo DNA plasmidial (pVAX 1 ou HIVBr18) em volume final de 100 µL de solução salina estéril (NaCl 0,9%, Baxter), administradas 50 µL em cada músculo *tibialis anterioris*, direito e esquerdo, também seguindo procedimentos de anti-sepsia. O intervalo entre as doses consistiu em um período de 15 dias. Após o tempo determinado para cada protocolo vacinal específico (descritos abaixo), os animais foram sacrificados em câmara de fluxo laminar por deslocamento cervical ou câmara de CO₂ e os baços foram coletados.

3.7.1. Imunização para avaliação da expressão de RNA

Grupos de 3 camundongos isogênicos fêmeas de 6 a 8 semanas de idade da linhagem convencional BALB/c (H-2^d) receberam uma injeção prévia de cardiotoxina como descrito acima. Nesse protocolo os animais receberam apenas 1 dose pela via IM de 100 µg do respectivo DNA plasmidial (pVAX 1 ou HIVBr18). Os animais foram sacrificados 7 dias após dose única e foram coletados baço e os músculos *tibialis anterioris*, direito e esquerdo, de cada animal, para extração de RNA e posterior avaliação da expressão da vacina.

3.7.2. Imunização para estabelecimento do protocolo vacinal

A fim de verificar o número de imunizações que seria capaz de induzir a maior magnitude e amplitude de resposta nós realizamos uma cinética do número de doses. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina como descrito acima e, posteriormente receberam 2, 3 ou 4 doses de 100 µg de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via IM e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose.

3.7.3. Imunização para avaliação da toxicidade da vacina

A fim de verificar se a vacinação com HIVBr18 induziria dano tecidual, grupos de 3 camundongos isogênicos fêmeas de 6 a 8 semanas de idade das linhagens convencionais BALB/c (H-2^d) receberam uma injeção prévia de cardiotoxina como citado anteriormente e após 5 dias, os animais receberam 3 doses pela via IM de 100 µg de pVAX 1, HIVBr18 ou 100 µL de salina (NaCl 0,9%, Baxter). Duas semanas após a última dose os camundongos foram sacrificados. Músculos *tibiais anteriores*, articulação dos joelhos, baço, rim, fígado, coração e cérebro foram coletados e fixados em formol tamponado 10%. As análises histopatológicas foram realizadas pela empresa Cyallix - Laboratórios & Consultorias, utilizando coloração H/E (eosina/hematoxilina).

3.7.4. Imunização para avaliação da imunogenicidade

Grupos de camundongos convencionais BALB/c e transgênicos para diferentes moléculas de HLA classe II humanas (-DR2, -DR4, -DQ6 e -DQ8) que não expressam as moléculas MHC classe II endógenas, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina como descrito previamente e após 5 dias, os animais receberam 3 doses pela via IM de 100 µg do respectivo DNA plasmidial (pVAX 1 ou HIVBr18). Duas semanas após a última dose, os animais foram sacrificados para coleta dos baços para realização dos ensaios de avaliação da resposta imune celular *in vitro*. Para os camundongos BALB/c fizemos um *pool* com os baços dos animais do

mesmo grupo para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica. Já para os camundongos transgênicos, os baços foram utilizados individualmente para avaliação da resposta específica, e os resultados apresentados são referentes às respostas positivas de um animal representativo de cada grupo.

Para os camundongos BALB/c, no momento do sacrifício foi realizada punção retro-orbital, para coleta de soro para posterior avaliação da resposta imune humoral.

3.8.Extração de RNA

O RNA total foi extraído do baço e dos músculos *tibialis anterioris* pelo método de Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). Trizol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que rompe a célula mantendo a integridade do RNA. Este método consistiu inicialmente da homogeneização de amostras de tecido de aproximadamente 20-40 mg em solução de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) utilizando homogeneizador de tecido (Power Gen 1000, Fisher Scientific, Atlanta, EUA). Após a incubação das amostras por 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir completa dissociação de complexos de nucleoproteínas, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio para cada mL de trizol, seguido de agitação vigorosa por aproximadamente 15 segundos. O material foi posteriormente incubado por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugado por 15 minutos a 1120 g à 4 °C. Após esta centrifugação ocorre a separação da solução em três

fases (aquosa, interface e orgânica). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 0,5 mL de álcool isopropílico para cada mL de trizol, para a precipitação do RNA. Este tubo foi homogeneizado por inversão, seguido de incubação por 10 minutos à temperatura ambiente e então centrifugado novamente a 1120 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* de RNA lavado com etanol 75 % diluído em água DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) seguido de centrifugação a 640 g por 10 minutos à 4°C. O RNA assim obtido foi deixado secar por 5 minutos para evaporação do etanol e então ressuspenso em 10 µL de água DEPC. Este material foi mantido a – 80°C até o momento de uso.

3.8.1. Quantificação do RNA

Após extração, o RNA obtido foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro (Beckman, DU530, Fullerton, CA, EUA) no comprimento de onda de 260 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da análise da relação entre 260 e 280 nm. Foi considerada uma boa pureza aquela que apresentou valores entre 1,6 a 1,8. Para o cálculo da concentração da amostra considerou-se que a absorbância igual a 1 corresponde a 40 µg de RNA/mL no comprimento de onda de 260 nm. Além disso, uma alíquota de RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% corado com 0,5ug/uL brometo de etídeo para visualização da integridade das amostras e também possíveis contaminações com DNA. 1 uL do RNA

de cada amostra foi aplicado no gel e submetido a corrida eletroforética a 100 V durante 40 minutos. A visualização da integridade dos RNAs foi realizada observando-se as duas subunidades do RNA ribossômico, 18S e 28S. O marcador de peso molecular de 100pb (Ladder 100bp, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

3.8.2. Tratamento do RNA total com DNase I

Para evitar possíveis contaminações com DNA, o RNA foi tratado com rDNase (DNase recombinante bovina Usb, EUA), de acordo com a recomendação do fabricante. Adicionou-se para cada 1 ug de RNA total, 1 unidade de rDNase I, 1 uL do tampão 10x rDNase e água DEPC q.s.p. para 9 uL. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Após o tempo de incubação foi adicionado 1uL da solução de inativação da enzima para cada 1 ug de RNA total e incubou-se por 10 minutos à 65 °C

Para avaliar a qualidade do RNA após o tratamento com DNase I , cerca de 1 µL de RNA tratado foi submetido a eletroforese em um gel de agarose 1% corado com 0,5 ug/mL de brometo de etídeo em tampão TBE. As amostras foram consideradas adequadas quando as bandas de 28S e 18S se mostraram íntegras. O marcador de peso molecular de 100pb (Ladder 100bp, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

3.8.3. Transcrição reversa

Após constatação da qualidade e pureza do RNA extraído das amostras, a transcrição reversa do RNA para cDNA foi feita com 2 ug de

RNA total utilizando a enzima transcriptase reversa (Super-script II™ Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para este protocolo foi adicionado ao RNA, 1 µL de oligo dT (500 µg/ml), 1 µL de dNTP (10 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e água DEPC q.s.p. 12 µL. Esta mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos em termociclador (MJ research, Inc., watertown, MA, EUA). Em seguida foi adicionado ao tubo da reação 4 µL de tampão de transcrição 5x (Tris-HCl 250mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de inibidor de RNase (40 U/µL) (RNase OUT™, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As amostras foram então colocadas em termociclador a 42°C por 2 minutos. Por último foi adicionado 1 µL da enzima transcriptase reversa (200 U/µL) e a solução foi colocada novamente em termociclador a 42 °C por 50 minutos seguidos de 70 °C por 15 minutos. Ao final da transcrição o cDNA foi mantido à -20 °C.

3.8.4. PCR para GAPDH e PCR para HIVBr18

Para análise da qualidade do cDNA obtido, foram feitos RT-PCR para GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Para a amplificação de GAPDH, utilizamos “*primers*” específicos, resultando na amplificação de um fragmento de 93 pb. Para cada reação de PCR foram utilizados 1 µL de cada um dos “*primers*”, 1U de “Taq DNA-polimerase” (Gibco-BRL), MgCl₂ 1,5 mM, 0,25 mM da mistura de dNTPs (2,5 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Gibco-BRL) e o tampão de reação de PCR 10x concentrado (Gibco-BRL). Foram adicionados 10% do transcrito de cDNA. As seqüências

utilizadas dos *primers*, bem como o ciclo de amplificação, encontram-se na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Seqüências e ciclo de amplificação dos *primers* empregados nas reações de RT-PCR para GAPDH.

	Seqüência dos primers	Ciclos de amplificação
GAPDH-(F)	5'-GGTCGGTGTGAACGGATTTG -3'	40x (95 °C/1',60 °/1',72°C/1')e 72°C/8'
GAPDH-(R)	5'-GGGTCGTTGATGGCAACAAT-3'	

Para a amplificação do HIVBr18, utilizamos *primers* específicos, resultando na amplificação de um fragmento de 96 pb. As seqüências utilizadas dos *primers*, bem como o ciclo de amplificação, encontram-se na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Seqüências e ciclo de amplificação dos *primers* empregados nas reações de RT-PCR para HIVBr18

	Seqüência dos primers	Ciclos de amplificação
HIVBr18-(F)	5'- CCGAGGTGATCCCCATGTT -3'	40x (95°C/1',60°/1',72°C/1') e 72°C/8'
HIVBr18-(R)	5'TGTACATTCTCACGATCTTGTTTCAG3'	

Os produtos de PCR foram identificados por eletroforese em gel de agarose 1 ou 1,5%, corado com brometo de etídio (0,5ug/mL). O padrão Ready load 100pb (Gibco-BRL)) foi utilizado como marcador de peso molecular.

3.9. Suspensão celular

Após o tempo determinado para cada protocolo vacinal específico, os animais foram sacrificados em câmara de fluxo laminar por deslocamento cervical ou câmara de CO₂ e os baços foram coletados. As células foram obtidas após maceração gentil do órgão e lavadas por centrifugação (1700 rpm a 4 °C, por 6 minutos) com 10 mL de meio RPMI (Gibco) (suplementado com L-glutamina 2 mM (Sigma), solução de aminoácidos não essenciais (1%vol/vol) (Gibco), piruvato de sódio 1mM, 2-ME 5x10⁻⁵M (Sigma) e os antibióticos Gentamicina (40µg/mL) e Peflacin (20 µg/mL) e vitaminas (1%vol/vol)). Em seguida, as células foram tratadas com tampão hemolítico ACK (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 1 mM, Na₂EDTA 0,1 mM) para lise das hemáceas e em seguida lavadas duas vezes com 10 mL meio RPMI. Ao final das lavagens, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio R10 (meio RPMI suplementado, contendo 10% vol/vol de soro fetal bovino (Gibco)).

3.10. Ensaio de proliferação celular

Para realização dos ensaios de proliferação celular os esplenócitos recém isolados (concentração de 50x10⁶ células/mL) foram ressuspensos em PBS pré-aquecido (37°C) e marcados com 1,25 µM de CFSE durante 10 minutos à 37 °C. Em seguida, o material foi centrifugado a 1700 rpm por 6 minutos e a reação interrompida pela adição de meio R10. Após 3 lavagens com 5 mL de R10, as células foram ressuspensas em meio R10 na concentração de 1,5x10⁶/mL. As células foram cultivadas em placas de 96

poços de fundo U (Nunc) na concentração de 3×10^5 células por 200 μ L na presença ou ausência dos peptídeos sintéticos individuais ou com o pool composto por esses peptídeos do HIV-1, na concentração final de 5 μ M. Utilizamos também ConA na concentração de 2,5 μ g/mL como controle positivo, ou nenhum estímulo como controle negativo. Os peptídeos sintéticos selecionados correspondem aos epitopos para linfócitos T CD4⁺ utilizados na construção vacinal. Todas as culturas foram feitas em triplicatas.

Após 5 dias de cultura à 37 °C, sob atmosfera contendo 5 % de CO₂, as células coletadas foram lavadas com Macs Buffer (MB) (PBS 1x/ 2uM EDTA/ 0,5% BSA) e marcadas com os anticorpos anti CD3-PE (1:50), anti-CD4-PerCP (1:200) e anti-CD8-APC (1:200) (BD Bioscience) por 45 minutos à 4 °C no escuro. Após esse período foram lavadas 2 vezes com tampão MB e ressuspensas em um volume final de 200uL de MB. As amostras foram adquiridas em um citômetro FACS Canto utilizando o software DIVA (Tree Star, Inc.). Para ajuste das voltagens foram utilizadas beads marcadas com os fluorocromos individualmente: FITC, PE, PercP e APC. Cinquenta mil eventos foram adquiridos no “*gate*” de linfócitos. A resposta proliferativa peptídeo-específica foi avaliada utilizando-se o software Flow Jo, seguindo a estratégia de análise mostrada na Figura 3 anexa. Em síntese foi feito um “*gate*” inicial em linfócitos baseado no tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) das células. Este “*gate*” abrangeu células de tamanho aumentado, uma vez que células em divisão celular aumentam seu tamanho transitoriamente. Posteriormente foi feito um “*gate*” nas células CD3⁺, que se

referem às populações de linfócitos T. Subseqüentemente os linfócitos T foram subdivididos em duas populações majoritárias, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Posteriormente, avaliamos a proliferação antígeno-específica com base na diluição do fluorocromo CFSE (células CFSE^{low}), fazendo um *gate* abrangendo as populações com menor fluorescência. Durante a divisão celular o CFSE sofre ação de estereases celulares e emite uma fluorescência no comprimento de onda de 488nm detectado pelo citômetro no canal FITC. As células que estão marcadas com esse fluorocromo ao se dividirem distribuem esse marcador para as células filhas, portanto, células que passaram por diversos ciclos de divisão celular perdem sua fluorescência progressivamente, fato que pode ser observado por citometria de fluxo.

Para análise do fenótipo de memória induzido, após marcação das células com 1,25 uM CFSE, as mesmas foram ressuspensas em meio R10 na concentração de $1,5 \times 10^6$ /mL, cultivadas em placas de 96 poços de fundo U (Nunc) na concentração de 3×10^5 células por 200 µL na presença ou ausência do pool de peptídeos derivados do HIV-1, na concentração final de 5 uM em triplicatas. Após 5 dias de cultura à 37 °C, sob atmosfera contendo 5 % de CO₂, as células coletadas foram lavadas com Macs Buffer e marcadas com os anticorpos anti CD3-APCCY7 (1:50), CD44PE (1:400), CD62L APC (1:1600), CD4 PercP (1:200) e CD8 PECY7 (1:200) (BD Biosciences) seguindo o mesmo protocolo descrito acima. Em camundongos, as populações de memória podem ser diferenciadas das

populações de células *naïve* pela expressão diferencial dos marcadores CD44 e CD62L. O CD44 é uma glicoproteína de superfície celular envolvida nas interações célula-célula, nos processos de adesão e migração celular. O marcador CD62L também é uma molécula de superfície celular que está envolvida na migração de células T para os linfonodos. O CD62L é clivado proteoliticamente de maneira contínua tendo esta clivagem acelerada após ativação antigênica das células T. As amostras foram adquiridas em um citômetro FACS Canto utilizando o software DIVA (Tree Star, Inc.). Para ajuste das voltagens foram utilizadas beads marcadas com os fluorocromos individualmente: FITC, PE, PercP, APC, APCCY7 e PECY7. Cem mil eventos foram adquiridos no *gate* de linfócitos. A resposta proliferativa foi avaliada utilizando-se o software Flow Jo, seguindo-se a seguinte estratégia de “gates” mostrada na Figura 5 anexa. Em síntese foi feito um “*gate*” inicial em linfócitos baseado no tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) das células. Este “*gate*” abrangeu células de tamanho aumentado, uma vez que células em divisão celular aumentam seu tamanho transitoriamente. Posteriormente foi feito um “*gate*” nas células CD3⁺, que se referem às populações de linfócitos T. Subseqüentemente os linfócitos T foram subdivididos em duas populações majoritárias, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Posteriormente, avaliamos a proliferação antígeno-específica com base na diluição do fluorocromo CFSE (células CFSE^{low}), fazendo um *gate* abrangendo as populações com menor fluorescência. Dentro dessa população de células que proliferaram verificamos o perfil fenotípico das mesmas. Os subtipos celulares foram definidos como: células

CD44^{hi}CD62L^{low}, definidas como células de memória efetora (TEM); células CD44^{hi}CD62L^{hi}, definidas como células de memória central (TCM); células CD44^{low}CD62L^{hi}, definidas como células *naïve*; e finalmente células CD44^{low}CD62L^{low}, definidas como outros subtipos celulares.

Para ambas as análises, proliferação isoladamente ou proliferação de subpopulações de memória, os resultados foram expressos como porcentagem de células CFSE “low” e consideradas positivas quando apresentaram índice de estimulação (I.E.) superior a 2 (proliferação específica/proliferação espontânea) ou porcentagem de proliferação (%proliferação específica - % proliferação células sem estímulo) específica acima de um “*cutoff*” estabelecido. O Cálculo do “*cutoff*” foi realizado baseado na média de proliferação das células provenientes do grupo imunizado com pVAX 1 contra os peptídeos individuais, adicionados a 3 vezes o valor do desvio padrão.

3.11. Avaliação fenotípica e funcional de linfócitos T

A fim de avaliar o perfil fenotípico e funcional dos esplenócitos provenientes de camundongos imunizados, utilizamos citometria de fluxo multiparamétrica.

As células foram cultivadas em triplicatas em placas de 96 poços de fundo U (Nunc) na concentração de 1×10^6 células por 200 μ L de R10 com adição de anti-CD28 (BD) na concentração de 2 μ g/mL.

As triplicatas foram estimuladas com meio (como controle negativo), anti-CD3 (como controle positivo) 1 μ g/mL (BD) e com o pool dos 18 peptídeos sintéticos na concentração final de 5 μ M. Após adição dos estímulos, a placa foi

colocada em estufa à 37 °C em atmosfera de 5 % CO₂ por 1 hora. Após este período, foi adicionado aos poços dos painéis 1, 2 e 3 (Tabela 3 abaixo) 0,2 uL/poço de Brefeldina (BD kit Cytotfix/Cytoperm). A placa foi então incubada em estufa à 37 °C em atmosfera de 5 % CO₂ durante 12 horas.

Abaixo se encontra a Tabela 3 com os diferentes painéis utilizados.

Tabela 3: Painéis de Citometria de Fluxo Multiparamétrica

Painéis	Fluorocromos utilizados	Diluição	Tipo de marcação
Painel 1	IL-2 FITC	1:100	intracelular
	TNF- α PE	1:100	intracelular
	IFN- γ APC	1:100	intracelular
	CD3 APCCY7	1:50	intracelular
	CD8 PercP	1:200	superfície
	CD4 PECY7	1:200	superfície
Painel 2	IL-2 FITC	1:100	intracelular
	IFN- γ APC	1:100	intracelular
	CD3 APCCY7	1:50	intracelular
	CD44 PE	1:400	superfície
	CD62L PECY5	1:1600	superfície
	CD4PECY7	1:200	superfície
Painel3	IL-2 FITC	1:100	intracelular
	IFN- γ APC	1:100	intracelular
	CD3 APCCY7	1:50	intracelular
	CD44 PE	1:400	superfície
	CD62L PECY5	1:1600	superfície
	CD8PECY7	1:200	superfície

3.11.1. Marcação de superfície

Após incubação, as triplicatas foram unidas em placa de fundo “V” e lavadas com MB para a marcação inicial com os anticorpos de superfície. A marcação foi realizada em volume final de 50 uL de MB com os anticorpos de superfície na diluição indicada na Tabela 3 acima. A placa foi incubada no escuro à 4 °C por 30 minutos. Subseqüentemente à incubação, os poços foram lavados 2 vezes com 150 uL de MB. Posteriormente à esta etapa, seguiu-se com o protocolo de marcação intracelular.

3.11.2. Marcação intracelular

Após 2 lavagens com 150 uL de MB como citado acima, foram adicionados 100 uL/poço de *Cytofix/Cytoperm* (BD), que fixa a marcação de superfície já feita, além de permeabilizar a membrana celular para a posterior marcação intracelular. A placa foi então incubada à 4 °C durante 15 minutos no escuro. Em seguida, os poços foram lavados com 150 uL da solução de lavagem comercial (contém soro fetal bovino e saponina) diluído para 1x em água destilada. Os anticorpos para marcação intracelular foram diluídos no mesmo tampão, nas diluições indicadas na Tabela 3. Foram adicionados 50 uL da diluição dos anticorpos nos poços dos respectivos painéis. A placa foi incubada à 4 °C no escuro por 30 minutos. Finalmente após incubação, os poços foram lavados 2 vezes com a solução de lavagem e ressuspensos em 200 uL de MB para posterior aquisição no citômetro.

As amostras foram adquiridas em um citômetro FACS Canto utilizando o software DIVA (Tree Star, Inc.). Para ajuste das voltagens foram utilizadas beads marcadas com os fluorocromos individualmente: FITC, PE, PercP, APC, PECY7 e APCCY7. Um milhão de eventos foi adquirido no *gate* de linfócitos. A resposta imune específica foi avaliada utilizando-se o software Flow Jo. A estratégia de análise utilizadas para o Painel 1 está ilustrada na Figura 4 anexa. . 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⁺, que se referem às populações de linfócitos T. Subseqüentemente os linfócitos T foram subdivididos em duas populações majoritárias, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Em cada subpopulação de linfócitos T, as células que secretam IFN- γ ou TNF- α ou IL-2 isoladamente foram definidas. A polifuncionalidade das células induzidas após protocolo vacinal foi avaliada utilizando-se a estratégia de “*Boolean gate*”, que se baseia na combinação *booleana*, onde a intersecção entre as células que são capazes de produzir cada citocina ou a combinação entre as mesmas após re-estímulo *in vitro* é avaliada.

A estratégia de análise para os painéis 2 e 3 são semelhantes e encontram-se na Figura 6 anexa. Brevemente, fizemos um “*gate*” em linfócitos baseados em tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células, seguido por um “*gate*” em células CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺ CD8⁺ (linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺, respectivamente). Após definidas as subpopulações de linfócitos, foi feito um “*gate*” nas células CD44^{hi} para definição das células de memória. Logo em seguida foram feitos “*gates*” baseados na expressão do marcador CD62L para

definição das duas subpopulações de memória: TCM (CD62L hi) ou TEM (CD62L low). Em cada subpopulação de memória foram definidas células secretoras de IFN- γ e IL-2 isoladamente, ou de ambas as citocinas simultaneamente.

3.12. Preparo das *beads* para ajuste das voltagens

Para ajuste das voltagens do citômetro de fluxo nós utilizamos *beads* de Compensação (BD) comerciais. As mesmas foram marcadas com os fluorocromos utilizados em cada painel individualmente. As *beads* foram preparadas proporcionalmente com a adição de 1 gota da *beads* negativa e 1 gota das *beads* positivas à 600 μ L de MB. Em seguida, 100 μ L dessa suspensão de *beads* foram distribuídos em diferentes tubos de citometria referentes a cada fluorocromo contido no painel. A cada tubo contendo as *beads*, foi adicionado 20 μ L do respectivo fluorocromo já na diluição de uso indicada na Tabela 3. As mesmas foram incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente e em seguida adquiridas no citômetro (FACS CANTO) para ajuste das voltagens individuais.

3.13. ELISPOT para IFN- γ e IL-2

Os ensaios de ELISPOT foram realizados utilizando-se os sets anti-*mouse* IFN- γ e anti-*mouse* IL-2 (BD). O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Em síntese, o anticorpo de captura (*purified anti mouse*

IFN- γ ou IL-2) foi adicionado à placa na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ em volume final de 100 μL por poço, e estocado durante a noite à 4 °C. Em seguida os poços foram lavados com 200 μL de R10 e o bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com meio R10 noo volume de 200 μL /poço por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, às placas de ELISPOT IFN- γ foram adicionados os estímulos: meio, como controle negativo, Con A (2,5 $\mu\text{g/mL}$) como controle positivo e os peptídeos individuais ou em pool (5 μM) em um volume final de 100 μL . E em seguida foram adicionadas as suspensões celulares na concentração de 3×10^5 células/poço também em volume final de 100 μL . Todos os estímulos e suspensões celulares foram preparados em R10 adicionados de 30 U/mL de IL-2 recombinante humana no ensaio de ELISPOT para IFN- γ . Para o ensaio de ELISPOT de IL-2 não foi adicionada IL-2 recombinante ao meio R10.

Após adição dos estímulos e suspensões celulares, a placa foi novamente incubada à 37 °C em estufa à 5 % de CO₂ durante a noite (aproximadamente 20 horas). Posteriormente, as placas foram lavadas 2x com água deionizada e 3x com PBS-0.05%Tween 20. O anticorpo de detecção (anti IFN- γ ou IL-2 biotinizado) foi diluído em PBS-10% SFB e adicionado aos poços (volume 100 μL /poço) na concentração final de 2 $\mu\text{g/mL}$ e incubado novamente durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem dos poços 3x com PBS-0.05%Tween 20, o conjugado enzimático (streptavidin-HRP) foi diluído em PBS-10% SFB para concentração final de 1x e adicionado aos poços (100 μL /poço), seguido de mais uma etapa de incubação de 1 hora à temperatura ambiente.

Para revelação, os poços foram lavados 4x com PBS-0.05%Tween 20 e posteriormente 2x com PBS. Foram adicionados então 100 μL da solução final

de substrato/poço AEC (3-amino-9-ethylcarbazole - BD) e a formação de *spots* foi monitorada de 5 – 60 minutos, levando em consideração o aumento do *background* nos poços que eram controle negativo. Passado esse período, o corante foi desprezado e a reação foi interrompida com 5 lavagens 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 número de *spots* por 10^6 células (UFS/ 10^6 células). Foram considerados positivos os estímulos cujo número de UFS/ 10^6 células foi superior ao *cutoff* do experimento em questão. O *cutoff* estabelecido foi calculado baseado na média de resposta obtida em esplenócitos provenientes de camundongos BALB/c imunizados com pVAX 1, estimulados com os peptídeos individualmente, adicionados a 3 vezes o valor do desvio padrão (*Cutoff*= média *spots* (subtraídos do valor do meio) pVAX 1 +3* DP).

Como o grupo imunizado com pVAX 1 não apresentou a formação de *spots* frente à re-estímulo *in vitro* contra nenhum dos peptídeos, nós estabelecemos um *cutoff* fixo igual à 15 UFS/ 10^6 células, para camundongos BALB/c e 10 UFS/ 10^6 células para as linhagens transgênicas.

3.14. Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura através de CBA (Cytometric Bead Array)

Esplenócitos provenientes de camundongos imunizados foram cultivados em triplicata na concentração final $1 \times 10^6/200 \mu\text{L}$ na temperatura de 37°C , sob atmosfera contendo 5 % de CO_2 . Além de poços contendo células sem estímulo (produção espontânea de citocinas), as células foram estimuladas com o pool de peptídeos do HIV-1 ($5 \mu\text{M}$), e como controle positivo, Con A (Sigma) na concentração de $2,5 \mu\text{g/mL}$.

Após 48 ou 120 horas de cultura, $150 \mu\text{L}$ dos sobrenadantes foram recolhidos e estocados a -20°C até o momento do uso para a dosagem de citocinas. A detecção das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, $\text{IFN-}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$ foi realizada por Cytometric Bead Array (CBA) utilizando-se o Kit Th1xTh2 (BD) de acordo com instruções do fabricante. A detecção de todas as citocinas foi feita simultaneamente através de citometria de fluxo.

Em suma, os padrões de citocinas liofilizados foram reconstituídos e diluídos serialmente em $200 \mu\text{L}$ de “*assay diluent*” fornecido pelo *kit* antes de serem misturados com as *beads* de captura e o reagente de detecção. Cinquenta microlitros de cada sobrenadante foi adicionado à mistura de $50 \mu\text{L}$ de cada pool de *beads* de captura e $50 \mu\text{L}$ do respectivo conjugado de detecção. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 2 horas, no escuro. Após a incubação, as amostras foram lavadas e logo em seguida ressuspensas em $300 \mu\text{L}$ de tampão de lavagem antes da aquisição no citômetro FACSCanto. Os dados foram analisados usando o software

CBA (BD PharMingen). As curvas padrão foram geradas para cada citocina utilizando a mistura de citocinas padrão fornecida pelo kit. A concentração das citocinas em cada sobrenadante foi determinada por interpolação a partir da curva padrão correspondente. A gama de detecção foi 20-5000 pg/mL para cada citocina.

3.15. ELISA para detecção de Ig Total (G, A, M) e IgG

Após a coleta do soro no momento do sacrifício dos camundongos BALB/c imunizados, placas de 96 poços de alta ligação (Maxisorp, Nunc) foram sensibilizadas com 1 ug/poço de cada peptídeo do envelope ((gp41(261-276); gp160(19-31); gp160(174-185); gp160(188-201); gp160(481-498)) presentes na construção vacinal HIVBr18, em volume final de 50 uL de tampão carbonato/bicarbonato e incubadas durante a noite à 4° C. Após esse período as placas foram bloqueadas com 200 uL PBS Tween 0,05% gelatina 0,25%, 1 hora à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi descartada e os soros, na diluição de 1:100 em PBS Tween gelatina foram aplicados nos poços em volume de 50 uL/poço. A placa foi incubada 2 horas à 37 °C. Após o período de incubação a placa foi lavada 3 vezes com PBS Tween 0,05%. Para a detecção de Ig Total, 50 uL do conjugado anti-Ig total (anti-mouse polyvalent Immunoglobulin (G, A, M)) foram adicionados à placa, na diluição de 1:4000 em PBS Tween-gelatina e a placa foi incubada 1 hora à 37 °C. Para a detecção de IgG total, 50 uL do conjugado anti-IgG (*γ chain specific*) foram adicionados à placa, na diluição de 1:4000 em PBS Tween-gelatina e a placa foi incubada 1 hora à 37 °C.

Posteriormente, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-Tween. A revelação foi realizada com a adição de 50 uL/poço do substrato OPD 0,4 mg/mL em tampão citrato fosfato com 0,03% de H_2O_2 . Após incubação no escuro durante 10 minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de 50 uL de H_2SO_4 (2 M). A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro de placas, à 492 nm. Os resultados foram representados de acordo com a densidade óptica (D.O.) utilizando-se a média e desvio padrão dos soros de camundongos do mesmo grupo.

4. RESULTADOS

4.1. Construção da vacina

Com o objetivo de avaliar a imunogenicidade dos 18 epítopos para linfócitos T CD4⁺ do HIV-1 previamente descritos pelo nosso grupo (FONSECA *et al.*, 2006), um gene sintético foi desenhado com otimização de códon para expressão em células de mamíferos codificando “*in tandem*” tais epítopos. O esquema representativo dos 18 epítopos está ilustrado na Figura 4 A. A Figura 4 B mostra a sequência nucleotídica códon otimizada do gene sintético o qual foi denominado HIVBr18 (Figura 4C). A Tabela 1 anexa contém a sequência de aminoácidos de cada epítopo selecionado.

A)

B)

Sequência com codon usage para mamífero
CLONAGEM NO PVAX1

```

AAG CTT ACC ATG GAG GAG CTG AGA AGC CTG TAC AAC ACC GTG GCC
ACC CTG TAC TGC GTG CAC GGC CCC GGC CCC GGC AGC CCC GAG GTG
ATC CCC ATG TTC AGC GCC CTG AGC GAG GGC CCC GGC CCC GGC AAG
AGA TGG ATC ATC CTG GGC CTG AAC AAG ATC GTG AGA ATG TAC AGC
CCC ACC AGC ATC GGC CCC GGC CCC GGC GAC AAG GAG CTG TAC CCC
CTG GCC AGC CTG AGA AGC CTG TTC GGC GGC CCC GGC CCC GGC CAG
AGA CCC CTG GTG ACC ATC AAG ATC GGC GGC CAG CTG AAG GAG GGC
GGC GGC CCC GGC ACC CCC GTG AAC ATC ATC GGC AGA AAC CTG CTG
ACC CAG ATC GGC GGC CCC GGC CCC GGC GGC AAG ATC ATC CTG GTG
GCC CTG CAC CTG GCC AGC GGC TAC ATG GGC CCC GGC CCC GGC AGA
GAC CTG CTG ATC GTG ACC AGA ATC GTG GAG CTG CTG GGC AGA
GGC CCC GGC CCC GGC ACC ATG CTG CTG GGC ATG CTG ATG ATC TGC
AGC GCC GCC GGC CCC GGC CCC GGC GCC CTG TTC TAC AAG CTG GAC
GTG GTG CCC ATC GAC GGC CCC GGC CCC GGC AAC ACC AGC TAC AGA
CTG ATC AGC TGC AAC ACC AGC GTG ATC GGC CCC GGC CCC GGC AGC
GAG CTG TAC CTG TAC AAG GTG GTG AAG ATC GAG CCC CTG GGC GTG
GCC CCC GGC CCC GGC CCC GGC GAG CTG CTG AAG ACC GTG AGA CTG
ATC AAG TTC CTG TAC CAG AGC AAC CCC GGC CCC GGC CCC GGC GAG
GCC ATC ATC AGA ATC CTG CAG CAG CTG CTG TTC ATC CAC TTC GGC
CCC GGC CCC GGC CAG CAG CTG CTG TTC ATC CAC TTC AGA ATC GGC
TGC AGA CAC AGC AGA ATC GGC GGC CCC GGC CCC GGC AGC CTG CAG
TAC CTG GCC CTG GTG GCC CTG GTG GCC CCC AAG AAG GGC CCC GGC
CCC GGC GTG CTG GCC ATC GTG GCC CTG GTG GGC ACC ATC ATC
GCC ATC GGC CCC GGC CCC GGC GGC GTG GAG TGG AGA TTC GAC AGC
AGA CTG GCC TTC CAC CAC GTG TAG CTG GAG
  
```

AAG CTT – sítio de Hind III
 ACC ATG – sequência de Kozak
 TAG – stop Códon
 CTC GAG – Xho I
 GGC CCC GGC CCC GGC GGC espaçadores (GPGPG)

C)

Figura 4: Construção da vacina HIVBr18. A) Esquema do gene multiepitópico contendo os 18 epitopos previamente selecionados pelo nosso grupo e seqüências espaçadoras GPGPG. Em cinza estão representados os 11 epitopos que não haviam sido descritos anteriormente na literatura; B) Seqüência nucleotídica codificando cada um dos epitopos com otimização de códons para expressão em células de mamíferos. Em azul está representado o sítio da enzima de restrição Hind III; em cinza está representada a sequência de Kosak; em rosa está representado o sítio da enzima de restrição Xho I; e em amarelo estão representadas as seqüências espaçadoras; C) mapa do vetor pVAX 1, utilizado para subclonagem do inserto.

A integridade do DNA plasmidial foi analisada através de análise de restrição (Figura 1 anexa).

Antes de iniciarmos os testes de imunogenicidade da vacina em camundongos BALB/c, foram realizados testes *in silico* com o algoritmo PRED^{BALB/c}, a fim de prever a capacidade de ligação dos 18 epitopos presentes na vacina, às moléculas de MHC classe I e II desses camundongos. O sistema de predição utiliza matrizes quantitativas, que foram validadas utilizando dados experimentais de grande número de testes de ligação às moléculas MHC H2^d. As predições incluem o conjunto completo de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (H2^d) de classe I (H2-K^d, H2-L^d e H2-D^d) e de classe II (I-E^d e -A^d) (Zhang et al., 2005). O “*cutoff*” de positividade de ligação sugerido pelo algoritmo é de 8,0. Como podemos observar na Tabela 1 anexa, todos os epitopos são preditos a se ligarem às moléculas de MHC classe II, enquanto 17 dos 18 epitopos são preditos de se ligarem às moléculas de MHC classe I (exceção foi o peptídeo nef (180-194)). Esta predição nos sugeriu que camundongos BALB/c poderiam ser adequados para a avaliação da imunogenicidade da vacina de DNA multiepitópica contra o HIV-1.

Com o objetivo de avaliar a expressão do gene multiepitópico no local da injeção com o DNA plasmidial (HIVBr18) assim como no local onde é realizada a avaliação da resposta imune celular (baço), camundongos BALB/c foram injetados com cardiotoxina e receberam 1 dose do DNA HIVBr18 ou pVAX 1. Uma semana após a imunização, os animais foram sacrificados e os músculos *tibialis anterioris* assim como o baço foram

retirados para extração de RNA total. A integridade do RNA total assim como a qualidade do cDNA gerado foram analisados em gel de agarose (Figura 2 anexa). Após transcrição reversa dos RNAs dos músculos *T. anterioris* e baços provenientes dos animais imunizados, realizamos uma PCR para verificar a expressão do gene multiepitópico, HIVBr18. Podemos observar uma intensa banda de 96pb amplificada dos RNAs provenientes dos músculos *T. anterioris*, local da imunização, e uma banda menos intensa amplificada dos RNAs provenientes dos baços dos camundongos imunizados (Figura 5). Nos animais imunizados com o vetor vazio, pVAX 1, não foi observada amplificação de nenhuma banda.

Figura 5: Avaliação da expressão da vacina HIVBr18. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5ug/mL) e submetido a corrida eletroforética a 100V durante 40 minutos. Pool de músculos *T. anterioris* e de baços dos animais imunizados com o HIVBr18. Banda de 96pb obtida a partir de reações de PCR utilizando cDNA de músculo e de baço ou o DNA plasmidial HIVBr18. Nenhum produto de amplificação foi observado quando a reação de PCR foi feita na presença dos “*primers*” e da água somente ou com amostras provenientes dos animais imunizados com pVAX 1. 1: cDNA de pool de músculos (grupo imunizado com HIVBr18), 2: cDNA pool de baços (grupo imunizado com HIVBr18), 3: controle negativo sem DNA; 4: controle positivo utilizando o DNA plasmidial HIVBr18 purificado.

4.2. Estabelecimento do protocolo vacinal

Com o intuito de estabelecer o número de imunizações que geraria as melhores respostas em relação à secreção de IFN- γ , realizamos uma cinética de doses como descrito na metodologia.

Os resultados de ELISPOT para IFN- γ mostraram que 5 dos 18 peptídeos inclusos no DNA multiepitópico foram capazes de induzir a secreção de IFN- γ *in vitro* (Figura 6) por esplenócitos dos grupos que receberam diferentes número de doses HIVBr18. Dentre eles estão: p6(32-46), gp160(188-201), vpr(65-82), vif(144-158) e nef(180-194), além do pool composto pelos 18 peptídeos sintéticos. Os esplenócitos de animais que receberam maior número de doses, 3 ou 4, apresentaram respostas contra 2 peptídeos adicionais. No protocolo de 3 doses entretanto, nós observamos o maior número de unidades formadoras de spots por milhão de células para 5 dos peptídeos. Tabela 4. Além disso, nesse protocolo vacinal, quando considerada a somatória das respostas induzidas pelos peptídeos positivos, observamos a maior magnitude de spots por milhão de células mesmo quando comparado com o protocolo de imunização com 4 doses (Tabela 1).

Figura 6: Cinética do número de doses para estabelecimento do protocolo vacinal. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 2, 3 ou 4 doses de 100 μ g de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Pools de baços dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica através de ensaio de ELISPOT para IFN- γ contra estímulo *in vitro* com os 18 peptídeos individualmente (concentração de 5 μ M). A secreção de IFN- γ pelos esplenócitos provenientes de camundongos BALB/c imunizados com HIVBr18 está mostrada. A secreção de IFN- γ pelos esplenócitos provenientes de camundongos BALB/c imunizados pVAX 1 foi negligenciável. *Cutoff*: 15 spots/10⁶ células. n= 6 camundongos por grupo.

Tabela 4: Cinética de doses.

estímulo	2 doses	3 doses	4 doses
p17(73-89)	*	*	27
p6 (32-46)	25	37	16
pol (785-799)	*	21	*
gp160(188-201)	33	92	57
rev (11-27)	*	32	22
vpr (65-82)	85	61	74
vif (144-158)	68	56	61
nef (180-194)	38	54	44
Número de peptídeos indutores de resposta	5	7	7
Somatória dos spots	249	353	301

Estímulos que induziram respostas positivas após imunização de camundongos BALB/c com HIVBr18.

Cutoff =15.

* Valores abaixo do *cutoff*.

Considerando os dados acima, o protocolo de 3 doses foi estabelecido, uma vez que se mostrou suficiente para induzir respostas imune antígeno-específicas semelhantes ou superiores ao protocolo de 2 e 4 doses.

4.3.Toxicidade da vacina

Com o objetivo de avaliar a toxicidade da vacina HIVBr18 em diferentes tecidos, 3 grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com o protocolo vacinal estabelecido, recebendo 3 doses de HIVBr18, pVAX 1 ou apenas salina pela via intramuscular. Os animais foram analisados clinicamente e foram sacrificados duas semanas após a última dose para coleta de diferentes tecidos para realização de análises microscópicas.

Clinicamente, todos os animais imunizados de acordo com o protocolo descrito, permaneceram em condições saudáveis, não apresentando perda de peso, com 100% de sobrevida até o dia do sacrifício para análise microscópica.

Os diferentes tecidos submetidos à análise pela coloração de H/E (músculos *tibialis anterioris*, articulação dos joelhos, baço, rim, fígado, coração e cérebro) não apresentaram alterações microscópicas relevantes como mostrado no laudo em anexo (ANEXO C). Os baços de camundongos de todos os grupos apresentaram hemossiderose discreta, caracterizada pelo depósito de hemossiderina no tecido. A hemossiderina é considerada normal em um número moderado de macrófagos velhos em camundongos. O aumento da hemossiderina está associado com algumas formas de anemia, hemólise e com aumento na destruição de eritrócitos, entretanto,

por ser encontrada nos três grupos analisados não está relacionada com a imunização com a vacina HIVBr18. A análise do fígado do camundongo 2 do grupo que recebeu salina, assim como do camundongo 1, do grupo que foi imunizado com HIVBr18, apresentaram focos discretos de infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e linfócitos compatível com hepatite aguda multifocal leve. Novamente, a presença de tais infiltrados inflamatórios não foi restrita a nenhum grupo específico. Portanto, esses resultados preliminares de avaliação de segurança vacinal demonstraram que a imunização com HIVBr18 foi bem tolerada e não induziu sintomas sistêmicos relacionados à vacinação e nem danos teciduais restritos ao imunógeno, indicando a ausência toxicidade da vacina e a segurança do protocolo vacinal.

4.4.Avaliação da imunogenicidade da vacina multiepitópica, HIVBr18 em camundongos BALB/c

Depois de estabelecido o melhor esquema de imunização e avaliada a toxicidade da vacina, camundongos BALB/c foram imunizados com 3 doses dos imunógenos HIVBr18 ou pVAX 1, e a resposta imune antígeno-específica contra o pool dos 18 peptídeos foi avaliada.

Inicialmente avaliamos se a imunização seria capaz de induzir proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ contra os peptídeos sintéticos codificados na vacina em esplenócitos provenientes de camundongos imunizados com a vacina HIVBr18. A estratégia de “*gates*” utilizada para avaliação da resposta proliferativa está mostrada na Figura 3 anexa. Após

re-estímulo *in vitro* com o pool contendo os 18 peptídeos sintéticos, observamos que aproximadamente 10% de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (Figura 7) provenientes de camundongos BALB/c imunizados com HIVBr18 proliferaram especificamente.

Figura 7: Avaliação da proliferação celular utilizando ensaio de CFSE.

Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100µg de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Pools de baços dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica através de ensaio de CFSE contra estímulo *in vitro* com o pool dos 18 peptídeos sintéticos (concentração de 5uM). As células foram marcadas com a concentração de 1,25uM de CFSE e incubadas por 5 dias com os estímulos. *** p<0,001. n= 6 camundongos por grupo.

Em seguida avaliamos a secreção de IFN-γ e IL-2 através de ensaio de ELISPOT. Quando esplenócitos provenientes de camundongos imunizados com HIVBr18 foram estimulados com o pool de peptídeos sintéticos observamos uma secreção significativa dessas citocinas (Figura 8).

Figura 8: Avaliação da secreção de citocinas através de ensaio de ELISPOT para IFN- γ e IL-2. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100 μ g de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Pools de baços dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica através de ensaio de ELISPOT para IFN- γ e IL-2 contra estímulo *in vitro* com o pool dos 18 peptídeos sintéticos (concentração de 5 μ M). *** $p < 0,001$. Cutoff: 15 spots/10⁶ células. n= 6 camundongos por grupo.

Conjuntamente, esses resultados nos indicam que vacina de DNA, HIVBr18, foi imunogênica em camundongos BALB/c, gerou respostas específicas potentes contra o pool de peptídeos sintéticos do HIV-1 induzindo proliferação de linfócitos T CD4⁺ assim como T CD8⁺ e secreção das citocinas IFN- γ e IL-2.

Posteriormente, avaliamos se a imunização seria capaz de induzir células polifuncionais, ou seja, células capazes de secretar duas ou mais citocinas simultaneamente. O método utilizado para tal avaliação foi a marcação de citocinas intracelulares e avaliação com a técnica de citometria de fluxo multiparamétrica. As células foram caracterizadas fenotipicamente

com os marcadores CD3, CD4 e CD8, como descrito em materiais e métodos e posteriormente foram analisadas funcionalmente com os marcadores para as citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α . A estratégia de “gate” utilizada está mostrada na Figura 4 anexa.

Com esta análise, observamos a produção simultânea das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-2 por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ provenientes de camundongos imunizados com HIVBr18 (Figura 9). Aproximadamente 50% dos linfócitos T específicos induzidos são polifuncionais. Também observamos uma grande proporção de linfócitos T CD4⁺ bifuncionais secretores de IL-2/ TNF- α (Figura 9 A) e linfócitos T CD8⁺ bifuncionais secretores de IFN- γ / TNF- α (Figura 9 C) quando comparados com os linfócitos provenientes de camundongos BALB/c imunizados com pVAX 1. Para avaliar a magnitude de cada citocina produzida nas células com diferentes perfis funcionais, descritas pela estratégia booleana, comparamos as medianas de intensidade de fluorescência (MFI) para cada uma das citocinas em células monofuncionais e polifuncionais. Observamos que as células polifuncionais apresentaram uma mediana de intensidade de fluorescência maior para as citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-2 do que as células monofuncionais (Figura 9 B e D). Portanto, as populações celulares polifuncionais induzidas pela imunização com HIVBr18 produzem mais de cada citocina por célula do que as células monofuncionais.

A)

B)

C)

D)

Figura 9: Avaliação do perfil funcional celular induzido após imunização com HIVBr18. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100 μ g de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Pools de baços dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica contra estímulo *in vitro* com o pool dos 18 peptídeos sintéticos (concentração de 5uM) através de citometria de fluxo multiparamétrica. As células ficaram em cultura por 12 horas com os estímulos na presença de BFA e em seguida foram marcadas como descrito em materiais e métodos com os marcadores CD3, CD4, CD8, IFN- γ , IL-2 e TNF- α . (A) e (C) Polifuncionalidade de linfócitos T CD4 $^{+}$ e T CD8 $^{+}$ respectivamente; (B) e (D) MFI para linfócitos T CD4 $^{+}$ e T CD8 $^{+}$ respectivamente. n= 6 camundongos por grupo.

A secreção de citocinas também foi avaliada no sobrenadante das culturas de esplenócitos estimulados com o pool dos 18 peptídeos sintéticos por 48 ou 120 horas. As citocinas presentes no sobrenadante das culturas celulares foram quantificadas com o *kit* de *Cytometric Bead Array* (CBA) perfil Th1/Th2 como descrito em materiais e métodos. Verificamos que após 48 horas de cultura, os esplenócitos provenientes de camundongos BALB/c imunizados com HIVBr18 secretaram altos níveis de citocinas de perfil T1 de citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF- α e níveis negligenciáveis das citocinas IL-4 e IL-5 (perfil T2 de citocinas) (Figura 10). Após 120 horas de cultura, os níveis de IFN- γ e TNF- α aumentaram substancialmente, porém o nível de secreção de IL-2 diminuiu. Essa diminuição provavelmente ocorreu devido ao consumo dessa citocina para a proliferação celular. Estes resultados mostram que a imunização com HIVBr18 induziu uma resposta polifuncional de perfil T1 de citocinas. Em contrapartida, a quantidade de citocinas secretadas por esplenócitos provenientes de camundongos BALB/c imunizados com pVAX 1 foram negligenciáveis.

Figura 10: Avaliação da secreção de citocinas no sobrenadante de cultura. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100 μ g de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Pools de baços dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica contra estímulo *in vitro* com o pool dos 18 peptídeos sintéticos (concentração de 5 μ M) através de citometria de fluxo multiparamétrica. A secreção de citocinas de perfil Th1/Th2 foi avaliada com o kit CBA (Cytometric Bead Array). As células ficaram em cultura por 48 ou 120 horas com os estímulos, em seguida os sobrenadantes foram coletados para análise. As respostas observadas nos animais imunizados com pVAX 1 foram negligenciáveis. n= 6 camundongos por grupo.

Os resultados acima mostram que a vacina HIVBr18 é imunogênica em camundongos BALB/c induzindo células polifuncionais com perfil T1 de citocinas após re-estímulo *in vitro* com o pool dos 18 peptídeos sintéticos do HIV-1 presentes na construção vacinal.

A fim de avaliar os fenótipos celulares induzidos após a imunização com a vacina de DNA multiepitópica, verificamos a expressão de marcadores de memória como CD44 e CD62L. Portanto, considerando a importância da geração de células T de memória para uma resposta protetora após qualquer protocolo vacinal, avaliamos se a imunização com

HIVBr18 seria capaz de gerar células com esses fenótipos. Além do perfil fenotípico de tais células também avaliamos sua capacidade proliferativa. A estratégia de “*gate*” utilizada está mostrada na Figura 5 anexa.

Como mostrado na Figura 11, a vacina HIVBr18 induziu níveis mais elevados de proliferação de células TEM quando comparados às células TCM. Entre as células T CD4⁺ que proliferaram, aproximadamente 70% apresentaram fenótipo de memória efetora e aproximadamente 24% apresentaram fenótipo de memória central. Semelhantemente, entre as células T CD8⁺ que proliferaram, 57% das células apresentaram fenótipo de memória efetora e aproximadamente 39% apresentaram fenótipo de memória central.

Figura 11: Avaliação fenotípica das células que proliferaram após imunização com HIVBr18. TCM (CD44^{hi}CD62L^{hi}); TEM (CD44^{hi}CD62L^{low}); *naïve* (CD44^{low}CD62L^{hi}). Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100µg de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Pools de baços dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica através de ensaio de CFSE contra estímulo *in vitro* com o pool dos 18 peptídeos sintéticos (concentração de 5µM). As células foram marcadas com a concentração de 1,25µM de CFSE e incubadas por 5 dias com os estímulos. Gráfico representativo da porcentagem de cada subtipo de memória que foi capaz de proliferar dentre linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ provenientes de camundongos imunizados com HIVBr18, após re-estímulo *in vitro* com o pool de peptídeos sintéticos. As respostas observadas nos animais imunizados com pVAX 1 foram sempre abaixo do *cutoff*. n=6 camundongos.

A fim de caracterizar o perfil de citocinas das células de memória induzidos após a vacinação com HIVBr18, utilizamos o método de detecção de citocinas intracelulares. A estratégia de análise utilizada está representada na Figura 6 anexa.

Baseados nessa estratégia de análise, observamos que a frequência de células T CD4⁺ de memória efetora secretora de IFN-γ e/ou IL-2 foi quatro vezes maior do que as células T CD8⁺ de memória efetora (Figura 12 A). Para ambas as populações de memória efetora (linfócitos T CD4⁺ ou T

CD8⁺), houve uma prevalência das células produtoras de IFN- γ /IL-2 simultaneamente. As células T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória central produziram de maneira predominante IL-2 isoladamente (Figura 12 B).

Esses resultados nos mostram que a vacina HIVBr18 foi capaz de induzir células de memória, tanto central quanto efetora, capazes de proliferar intensamente, tendo uma prevalência na proliferação de células de memória efetora. Além disso, ambos os subtipos de células de memória T CD4⁺ e T CD8⁺ se apresentaram funcionalmente ativas sendo capazes de secretar IFN- γ e IL-2 revelando também um perfil T1 de citocinas.

A)

B)

Figura 12: Avaliação do perfil funcional das células de memória induzidas após imunização com HIVBr18. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100 μ g de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Pools de baços dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica através de citometria de fluxo multiparamétrica contra estímulo *in vitro* com o pool dos 18 peptídeos sintéticos (concentração de 5 μ M). As células foram cultivadas 12 horas na presença do estímulo e BFA. Em seguida foram marcadas para avaliação fenotípica e funcional. O gráfico mostra as respostas obtidas para animais imunizados com HIVBr18. Os resultados obtidos para animais imunizados com pVAX 1 foram negligenciáveis. (A) Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória efetora. (B) Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória central. n= 6 camundongos.

4.4.1. Avaliação da resposta imune humoral

Além das respostas de linfócitos T, avaliamos se a imunização com HIVBr18 seria capaz de induzir uma resposta humoral contra os peptídeos do envelope (gp41(261-276); gp160(19-31); gp160(174-185); gp160(188-201); gp160(481-498)). Para tal, realizamos ensaios de ELISA com o soro dos animais imunizados coletado no dia do sacrifício dos mesmos. Foram avaliadas Ig total assim como IgG total. Como mostrado na Figura 13 A e B,

não observamos a presença de Ig total (G,A,M) e nem de IgG contra nenhum dos epítopos do envelope testados no soro proveniente dos animais imunizados com HIVBr18. As repostas foram sempre muito baixas e indistinguíveis das encontradas no soro dos animais imunizados com pVAX 1.

A)

B)

Figura 13: Avaliação da resposta imune humoral após imunização com HIVBr18. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100µg de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. A punção retro-orbital para coleta de soro para realização de ensaios de ELISA contra os 5 peptídeos do envelope do HIV-1 presentes na vacina foi feita no momento do sacrifício. (A) ELISA Ig TOTAL (G, A, M). (B) ELISA IgG. n= 6 camundongos por grupo.

4.5. Avaliação da longevidade da resposta vacinal

Camundongos BALB/c foram imunizados como previamente estabelecido e foram sacrificados 2 semanas, 1 mês, 3 e 6 meses após a última dose. Como podemos verificar na Figura 14, 2 semanas e 1 mês após a última dose, uma proporção semelhante de linfócitos T CD4⁺ (11-12%) provenientes de camundongos imunizados com HIVBr18 proliferaram quando re-estimulados *in vitro* com o pool de peptídeos do HIV-1. Três meses após a última dose, houve um declínio significativo na magnitude de proliferação observada para os linfócitos T CD4⁺ (de 11,62% para 4,76%, $p < 0,01$). Esta magnitude continuou a decair até o sexto mês após a última

dose, atingindo 1% de proliferação específica. Já para os linfócitos T CD8⁺ específicos, somente 6 meses após a última dose observamos um declínio significativo na magnitude de proliferação quando comparado com o primeiro ponto de avaliação (2 semanas após a última dose). Apesar desse decaimento tanto na proliferação de linfócitos T CD4⁺ como T CD8⁺, seis meses após a última dose, os níveis de proliferação ainda se encontraram superiores às observadas nos esplenócitos provenientes dos animais imunizados com o pVAX 1. Todas as respostas obtidas para os esplenócitos provenientes de camundongos BALB/c imunizados com pVAX 1 e re-estimulados *in vitro* com o pool dos 18 peptídeos sintéticos provenientes do HIV-1 apresentaram níveis negligenciáveis de proliferação, tanto para linfócitos T CD4⁺ como T CD8⁺.

Figura 14: Avaliação da longevidade da resposta imune antígeno-específica induzida pela imunização com HIVBr18 por ensaio de CFSE. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100µg de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas, 1 mês, 3 ou 6 meses após a última dose. Pools de baços de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica contra o pool de peptídeos sintéticos do HIV-1. As células foram marcadas com CFSE 1,25uM e cultivadas por 5 dias na presença do estímulo. No gráfico estão representadas a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que proliferaram nos respectivos períodos após a última imunização de animais imunizados com HIVBr18. Valores de proliferação de linfócitos T CD4⁺ assim como T CD8⁺ provenientes de camundongos BALB/c imunizados com pVAX 1 em todos os períodos avaliados foram sempre negligenciáveis. NS: não diferiu estatisticamente. n=6 camundongos por grupo.

Em seguida, caracterizamos as respostas de células T CD4⁺ e T CD8⁺ fenotípica e funcionalmente. O perfil de memória das células T CD4⁺ e T CD8⁺ que proliferaram se manteve com o tempo, sendo composto principalmente por células com fenótipo de memória efetora (aproximadamente 70%), seguido por células de memória central (aproximadamente 30%). A frequência de células T CD4⁺ de memória

efetora secretoras de citocinas diminuiu com o passar do tempo (de 2,5% no tempo de 2 semanas *versus* 0,65% no tempo de 6 meses, IFN- γ e/ou IL2⁺ (Figura 15 A). Em contrapartida, as células T CD4⁺ de memória central, especialmente as secretoras de IL-2, tiveram sua porcentagem aumentada com o passar do tempo (0,8% no período de 2 semanas *versus* 1,52% após 6 meses, IFN- γ e/ou IL2⁺). Em relação à cinética das células T CD8⁺ de memória, as células de memória central específicas se mostraram mais abundantes que as células de memória efetora nos 2 períodos avaliados: 2 semanas e 6 meses após a última dose (Figura 15 B).

A)

B)

Figura 15: Avaliação do perfil fenotípico e funcional das células induzidas após imunização com HIVBr18 ao longo do tempo. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100 μ g de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas ou 6 meses após a última dose. Pools de baços de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica contra o pool de peptídeos sintéticos do HIV-1. As células foram cultivadas por 12 horas na presença do estímulo e BFA. No gráfico estão representadas a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ secretores de citocinas nos respectivos períodos após a última imunização de animais imunizados com HIVBr18. (A) Avaliação simultânea da produção de citocinas e do fenótipo de memória em linfócitos T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B) duas semanas e seis meses após a última imunização. As respostas observadas nos animais imunizados com pVAX 1 foram sempre abaixo do *cutoff*. n=6 camundongos por grupo.

A capacidade dos esplenócitos dos camundongos imunizados com HIVBr18 de secretar IFN- γ e IL-2 também foi avaliada em diferentes períodos de tempo através de ensaio de ELISPOT (Figura 16). A secreção de IFN- γ e IL-2 diminuíram significativamente ($p < 0,01$) 3 meses após a última dose e foram mantidas até o período de 6 meses.

Figura 16: Avaliação da secreção de citocinas após imunização com HIVBr18 em diferentes períodos de tempo após última imunização. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100 μ g de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas, 3 ou 6 meses após a última dose. Pools de baços de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica contra o pool de peptídeos sintéticos do HIV-1. Secreção de citocinas foi avaliada através de ELISPOT para IFN- γ e IL-2. Os gráficos representam as respostas induzidas em esplenócitos provenientes de animais imunizados com HIVBr18. As respostas obtidas em esplenócitos provenientes de camundongos imunizados com pVAX 1 foram sempre abaixo do *cutoff*. *Cutoff*: 15 UFC/10⁶ células – representado pela linha pontilhada. n=6 camundongos por grupo.

Quando avaliamos o perfil de citocinas no sobrenadante de cultura dos esplenócitos estimulados *in vitro* com o pool de peptídeos do HIV-1 durante 48 horas, observamos que o perfil T1 de citocinas foi mantido nos diferentes períodos de tempo avaliados. Além disso, a secreção de citocinas decaiu com o tempo, mas ainda se encontrou detectável 6 meses após a última dose (Figura 17).

Figura 17: Avaliação da secreção de citocinas no sobrenadante de cultura ao longo do tempo. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100 μ g de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas, 3 ou 6 meses após receberem a última dose. Pools de baços dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica contra estímulo *in vitro* com o pool dos 18 peptídeos sintéticos (concentração de 5 μ M) através de citometria de fluxo multiparamétrica. A secreção de citocinas de perfil Th1/Th2 foi avaliada com o kit CBA (Cytometric Bead Array). As células ficaram em cultura por 48 horas com os estímulos, em seguida os sobrenadantes foram coletados para análise. As respostas observadas nos animais imunizados com pVAX 1 foram negligenciáveis. n= 6 camundongos por grupo.

Esses dados nos indicam que a vacina, HIVBr18, foi capaz de induzir respostas específicas proliferativas e de secreção de citocinas duradouras por células de memória por até 6 meses após a última dose.

4.6. Avaliação da amplitude das respostas induzidas

A fim de avaliar a amplitude das respostas induzidas pela vacina HIVBr18, camundongos BALB/c foram imunizados de acordo com o

protocolo vacinal estabelecido e, a resposta imune antígeno-específica, foi avaliada para cada peptídeo individualmente.

Todos os ensaios realizados, tanto de proliferação quanto de ELISPOT, foram repetidos várias vezes. Portanto, consideramos epítopos positivos aqueles que foram capazes de induzir respostas acima do “*cutoff*” em mais de 50% dos experimentos realizados. Esses peptídeos são descritos como indutores de respostas consistentes nos resultados abaixo.

Em relação aos ensaios de proliferação utilizando ensaio de CFSE, foram observadas respostas proliferativas positivas de linfócitos T CD4⁺ consistentes para 5 peptídeos (p6 (32-46), pol (785-799), gp160 (188-201), vif (144-158) e nef (180-194)) (Figura 18 A) e de linfócitos T CD8⁺ contra gp160 (188-201) e nef (180-194) (Figura 18 B).

A)

B)

Figura 18: Avaliação da indução de respostas multiepitópicas através de ensaio de CFSE. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100µg de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Pools de baços dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica através de ensaio de CFSE contra estímulo *in vitro* com os 18 peptídeos sintéticos do HIV-1 individualmente (concentração de 5µM). As células foram marcadas com a concentração de 1,25µM de CFSE e incubadas por 5 dias com os estímulos. (A) Porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e (B) T CD8⁺ CFSE low. Valores de proliferação de linfócitos T CD4⁺ assim como T CD8⁺ provenientes de camundongos BALB/c imunizados com pVAX 1 foram sempre negligenciáveis. *Cutoff*: CD4⁺ = 2,72% e CD8⁺ 3,80% células – representado pela linha tracejada. Os gráficos acima são representativos de 1 experimento entre os 12 experimentos realizados. n= 6 camundongos por grupo.

Em seguida avaliamos a secreção das citocinas IFN-γ e IL-2 através de ensaios de ELISPOT contra os peptídeos individuais. Observamos que 8 peptídeos induziram consistentemente células secretoras de IFN-γ (Figura 19 A) e de IL-2 (Figura 19 B). Os peptídeos p17 (73-89), p6 (32-46), pol (785-799), gp160 (188-201), rev (11027), vpr (58-65), vif (144-158) e nef

(180-194) induziram tais respostas consistentes (Tabela 2 A e B X anexa).

Em relação aos esplenócitos provenientes dos animais imunizados com pVAX 1 a secreção das citocinas avaliadas sempre abaixo do valor do *cutoff*.

A)

B)

Figura 19: Avaliação da indução de respostas multiepitópicas através de ensaio de ELISPOT. BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100µg de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Pools de baços dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica através de ensaio de ELISPOT para IFN- γ (A) e IL-2 (B) contra estímulo *in vitro* com os 18 peptídeos sintéticos do HIV-1 individualmente (concentração de 5uM). secreção de ambas as citocinas avaliadas nos esplenócitos provenientes de animais imunizados com pVAX 1 foram sempre abaixo do *cutoff*. *Cutoff*: 15UFS/10⁶ células – representado pela linha tracejada. Os gráficos acima são representativos de 1 experimento entre todos os realizados. n= 6 camundongos por grupo.

Interessantemente, todos os peptídeos que induziram proliferação de linfócitos T CD4⁺ e/ou T CD8⁺ também induziram a secreção de IFN- γ e/ou IL-2. Portanto, considerando todas as respostas induzidas, a vacinação de camundongos BALB/c com a vacina HIVBr18, foi capaz de induzir respostas proliferativas assim como secreção de citocinas contra 8 dos 18 epitopos presentes na construção vacinal (p17 (73-89), p6 (32-46), pol (785-799), gp160 (188-201), rev (11027), vpr (58-65), vif (144-158) e nef (180-194)).

4.7. Avaliação da indução de respostas imunes em camundongos transgênicos para moléculas de HLA classe II

A fim de avaliar se a vacina HIVBr18 poderia induzir respostas de linfócitos T CD4⁺ restritas à diferentes moléculas de HLA classe II humanas, utilizamos 4 linhagens de camundongos transgênicas para essas moléculas, que não expressam sua molécula de classe II endógena. As respostas celulares específicas foram avaliadas por ensaio de proliferação e secreção de citocinas frente estímulo *in vitro* com o pool dos peptídeos sintéticos ou com os peptídeos individuais presentes na construção vacinal. Os camundongos transgênicos foram imunizados de acordo com o protocolo estabelecido em camundongos BALB/c.

Em relação às respostas proliferativas contra o pool dos peptídeos sintéticos do HIV-1, em todas as linhagens transgênicas testadas, observamos proliferação de linfócitos T CD4⁺ (Figura 20 A) assim como de linfócitos T CD8⁺ (Figura 20 B). Linfócitos T CD4⁺ proliferaram significativamente em todas as linhagens testadas enquanto que a

proliferação de linfócitos T CD8⁺ foi predominantemente observada em esplenócitos provenientes das linhagens HLA-DR2 e -DR4.

A)

B)

Figura 20: Ensaio de CFSE nas diferentes linhagens de camundongos transgênicos para moléculas de HLA classe II. Camundongos transgênicos para as moléculas de HLA classe II (HLA-DR2, -DR4, -DQ6 e -DQ8) receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100µg de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Baços individuais dos animais de cada grupo foram obtidos para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica através de ensaio de CFSE contra estímulo *in vitro* com o pool dos 18 peptídeos sintéticos (concentração de 5uM). As células foram marcadas com a concentração de 1,25uM de CFSE e incubadas por 5 dias com os estímulos. Estão representados os Índices de Estimulação (proliferação específica/proliferação espontânea) para linfócitos T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B) para cada linhagem. Respostas positivas: I.E. > 2,0 – está representado com uma linha tracejada. A resposta representativa de um camundongo está mostrada. n= 6 camundongos por grupo.

A habilidade de secretar IFN- γ após estímulo *in vitro* com o pool dos peptídeos sintéticos do HIV-1 foi avaliada por ensaios de ELISPOT. Esplenócitos provenientes de todas as linhagens de camundongos transgênicos imunizados foram capazes de secretar IFN- γ (Figura 21). As linhagens transgênicas HLA-DR2 e -DR4 apresentaram as maiores respostas contra os pools de peptídeos contidos na vacina. Os esplenócitos

provenientes de camundongos imunizados com pVAX 1 apresentaram respostas sempre inferiores ao *cutoff*.

Figura 21: Ensaio de ELISPOT para IFN- γ nas diferentes linhagens de camundongos transgênicos para moléculas de HLA classe II. Camundongos transgênicos para as moléculas de HLA classe II (HLA-DR2, -DR4, -DQ6 e -DQ8) receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100 μ g de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Baços individuais dos animais de cada grupo foram obtidos para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica através de ensaio de ELISPOT para IFN- γ contra estímulo *in vitro* com o pool dos 18 peptídeos sintéticos (concentração de 5 μ M). *Cutoff*: 10UFS/10⁶ células – representado pela linha tracejada. A resposta representativa de um camundongo está mostrada. n= 6 camundongos por grupo.

Esses resultados demonstram que a vacina HIVBr18 foi capaz de induzir respostas no contexto de múltiplas moléculas de HLA classe II.

A capacidade de indução de respostas amplas nas diferentes linhagens transgênicas testadas também foi avaliada. Quando avaliamos a proliferação específica de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ contra os peptídeos individuais em todas as linhagens transgênicas, verificamos que 11 epitopos induziram proliferação de linfócitos T CD4⁺, sendo essas respostas restritas ao HLA de

classe II transgênico (Tabela 5 A) e 6 epitopos induziram proliferação de linfócitos T CD8⁺ (Tabela 5 B), sendo essas respostas restritas ao MHC de classe I murino.

Tabela 5 – Avaliação da amplitude de resposta induzida nas linhagens transgênicas para moléculas de HLA classe II utilizando ensaio de CFSE

A)

LT CD4+ CFSE low				
Estímulo	DR2	DR4	DQ6	DQ8
p17(73-89)	--	0.86	1.72	--
p24(33-45)	--	--	--	--
p24 (131-150)	--	--	--	--
p6(32-46)	--	--	1.57	--
pol (63-77)	--	0.4	1.64	--
pol (136-150)	--	0.13	3.27	--
pol (785-799)	--	--	2.54	--
gp41(261-276)	--	--	--	--
gp160(19-31)	--	0.35	1.42	--
gp160(174-185)	--	--	1.35	--
gp160(188-201)	--	0.31	4.33	--
gp160(481-498)	--	--	--	--
rev (11-27)	--	--	1.42	--
vpr (58-72)	--	--	--	--
vpr (65-82)	--	--	--	--
vif (144-158)	--	--	3.24	--
vpu (6-20)	--	--	--	--
nef (180-194)	14.17	2	1.46	--
cut off	6.89	0.1	1.21	2.40
Respostas positivas	1	6	11	0

B)

LT CD8+ CFSE low				
Estímulo	DR2	DR4	DQ6	DQ8
p17(73-89)	--	--	--	--
p24(33-45)	--	--	--	0.87
p24 (131-150)	--	--	--	--
p6(32-46)	--	--	--	--
pol (63-77)	--	--	--	--
pol (136-150)	7.94	6.94	--	--
pol (785-799)	8.82	--	--	--
gp41(261-276)	--	2.4	--	--
gp160(19-31)	8.33	--	--	--
gp160(174-185)	12.42	--	--	--
gp160(188-201)	--	--	--	--
gp160(481-498)	--	--	--	--
rev (11-27)	--	--	--	--
vpr (58-72)	--	--	--	--
vpr (65-82)	--	--	--	--
vif (144-158)	--	--	--	--
vpu (6-20)	--	--	--	--
nef (180-194)	--	--	--	--
cut off	7.29	0.01	12.60	0.59
Respostas positivas	4	2	0	1

Camundongos transgênicos para as moléculas de HLA classe II (HLA-DR2, -DR4, -DQ6 e -DQ8) receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100µg de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Baços individuais dos animais de cada grupo foram obtidos para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica através de ensaio de CFSE contra estímulo *in vitro* com os 18 peptídeos sintéticos presentes na construção vacinal (concentração de 5µM). Proliferação de linfócitos T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B) provenientes das diferentes linhagens transgênicas. Os números representam a porcentagem de células CFSE low que estão acima do *cutoff*, representado no rodapé das tabelas. Os traços representam valores abaixo do *cutoff*. A resposta representativa de um camundongo está mostrada. As respostas observadas nos animais imunizados com pVAX 1 foram sempre abaixo do *cutoff*. n= 6 camundongos por grupo.

Os ensaios de ELISPOT para IFN-γ revelaram que diferentes epitopos foram capazes de induzir a secreção dessa citocina nas linhagens transgênicas testadas. Como mostrado na Figura 22 abaixo, nós encontramos respostas positivas nos esplenócitos de camundongos HLA-

DR2 para 5 epitopos (p17(73-89)> vif (144-158)> gp160(481-498)> pol (136-150)> p24(33-45)); HLA-DR4 contra 4 epitopos (gp160(188-201)> vif (144-158)> p17(73-89)> pol (63-77)); HLA-DQ6 contra 10 epitopos (p17(73-89)> p24(33-45)> gp41(261-276)> vpu (6-20)> nef (180-194)> gp160(188-201)> gp160(19-31)> pol (136-150)> vif (144-158)> vpr (58-72)) e na linhagem HLA-DQ8 contra 1 epitopo (p17(73-89)). O epitopo p17(73-89) induziu secreção de IFN- γ nos esplenócitos provenientes de todas as linhagens transgênicas para moléculas de HLA classe II testadas.

A)

B)

C)

D)

Figura 22: Avaliação da indução de respostas multiepitópicas através de ensaio de ELISPOT para IFN- γ nas linhagens de camundongos transgênicos para moléculas de HLA classe II. Camundongos transgênicos para as moléculas de HLA classe II: (A) HLA-DR2, (B) -DR4, (C) -DQ6 e (D) -DQ8, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100 μ g de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Baços individuais dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica através de ensaio de ELISPOT para IFN- γ contra estímulo *in vitro* com os 18 peptídeos sintéticos presentes na construção vacinal (concentração de 5 μ M). Os gráficos mostram as respostas induzidas nos esplênócitos dos animais imunizados com HIVBr18. As respostas observadas nos animais imunizados com pVAX 1 foram sempre abaixo do *cutoff*. *Cutoff*: 10 UFS/10⁶ células – representado pela linha tracejada. A resposta representativa de um camundongo está mostrada. n=6camundongos por grupo

Em suma, a imunização das diferentes linhagens transgênicas para moléculas de HLA classe II com a vacina de DNA HIVBr18, foi capaz de induzir proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ou secreção de IFN- γ contra 16 dos 18 epitopos presentes na construção vacinal. Significativamente, 11 epitopos induziram proliferação de linfócitos T CD4⁺, alguns deles sendo reconhecidos por várias linhagens de camundongos transgênicos.

Corroborando o reconhecimento dos epitopos por moléculas HLA de classe II em camundongos transgênicos, estão os dados de reconhecimento dos mesmos epitopos por CMSP de pacientes infectados pelo HIV-1 que compartilham o mesmo alelo HLA de classe II. Em camundongos transgênicos para as moléculas HLA-DR2 (DRB1* 1501) seis epitopos induziram proliferação de linfócitos T CD4⁺ ou secreção de citocinas e tais epitopos também foram reconhecidos por pelo menos um dos 5 pacientes infectados pelo HIV-1 testados e que compartilham esse mesmo alelo (HLA-DR15) (Fonseca *et al.*, 2006) (Tabela 6 A). No caso dos camundongos transgênicos para a molécula de HLA-DR4, 7 epitopos induziram proliferação de linfócitos T CD4⁺ ou secreção de IFN- γ nessa linhagem transgênica, mas apenas 3 dos 7 epitopos foram reconhecidos pelo único indivíduo infectado pelo HIV-1 que compartilha o mesmo alelo (Tabela 6 B). Este fato é provavelmente devido ao número restrito de indivíduos testados portadores desse alelo em estudo prévio (Fonseca *et al.*, 2006). Esses achados nos sugerem que essas linhagens são representativas das respostas encontradas em humanos.

Table 6- Reconhecimento dos epítopos presentes na construção vacinal pelas moléculas de HLA classe II HLA-DR2 (A) e –DR4 (B) de camundongos transgênicos para essas moléculas e pacientes infectados pelo HIV-1 portadores de tais alelos

A)

epítopos	Camundongos transgênicos para HLA-DR2 (DRB1* 1501)		Pacientes infectados pelo HIV-1 portadores da molécula HLA-DR15– resposta de ELISPOT para IFN- γ (UFS/10 ⁶ células)*				
	ELISPOT para IFN γ (UFS/10 ⁶ células)	Proliferação de L T CD4 ⁺	paciente 1	paciente 2	paciente 3	paciente 4	paciente 5
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)				+		+	+
nef(180-194)		+	+	+			+
Epítopos reconhecidos	5	1	5	18	3	1	10

* resultados provenientes da referência (Fonseca *et al.*, 2006).

+: respostas acima do *cutoff*.

B)

	Camundongos transgênicos para HLA-DR4 (DRB1*0401)		Paciente infectado pelo HIV-1 portador da molécula HLA-DR4 ⁺ – resposta de ELISPOT para IFN- γ (UFS/10 ⁶ células)*
epitopos	ELISPOT para IFN γ (UFS/10 ⁶ células)	Proliferação de L T CD4 ⁺	paciente 6
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)			+
nef(180-194)		+	+
Epitopos reconhecidos	4	6	8

* resultados provenientes da referência (Fonseca *et al.*, 2006).

+: respostas acima do *cutoff*.

Comparação entre os epitopos que induziram respostas positivas em ensaios de proliferação de linfócitos T CD4⁺ ou secreção de IFN- γ nas linhagens de camundongos transgênicos HLA-DR2 (A) ou –DR4 (B) com as respostas observadas em ensaios de ELISPOT para IFN- γ em pacientes portadores dos mesmos alelos testados em estudos prévios (Fonseca *et al.*, 2006).

A Figura 23 mostra o número de epitopos reconhecidos por cada linhagem transgênica testada assim como pelos camundongos BALB/c imunizados com HIVBr18 nos diferentes ensaios realizados. Verificamos que

17 dos 18 epitopos presentes na vacina induziram alguma resposta nas 5 linhagens testadas. Onze dessas respostas foram observadas em relação a proliferação de linfócitos T CD4⁺ (p17(73-89), p6 (32-46), pol (63-77), pol (136-150), pol (785-799), gp160 (19-31), gp160 (174-185), gp160 (188-201), rev (11-27), vif (144-158) e nef (180-194)).

Figura 23: Resumo dos epitopos reconhecidos por cada linhagem de camundongo testada. Cada barra representa um tipo de ensaio. Os valores numéricos em cima das barras cinza claras representam as respostas restritas aos HLAs de classe II, no caso das linhagens transgênicas, ou restritas ao MHC de classe II, no caso dos camundongos BALB/c.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliamos o potencial imunogênico da vacina de DNA HIVBr18, que codifica 18 epitopos para linfócitos T CD4⁺ promíscuos e conservados do HIV-1 previamente identificados por nosso grupo (Fonseca *et al.*, 2006). A capacidade de induzir respostas amplas no contexto de múltiplas moléculas de HLA classe II sugere que a vacina HIVBr18 pode auxiliar a contornar a variabilidade genética viral e aumentar a cobertura vacinal. A vacina apresentou-se imunogênica em camundongos BALB/c induzindo respostas de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ restritas às moléculas de MHC murino. O perfil das respostas celulares induzidas se caracterizou por respostas de longa duração e polifuncionais com citocinas de perfil do tipo 1. Oito dos 18 epitopos presentes na vacina induziram respostas específicas nessa linhagem de camundongos. A imunização de camundongos transgênicos para moléculas de HLA classe II induziu respostas celulares amplas e restritas a essas moléculas, assim como respostas de linfócitos T CD8⁺, restritas ao reconhecimento pelo MHC classe I murino. Dezesesseis dos 18 epitopos codificados pela vacina foram reconhecidos quando consideradas todas as linhagens transgênicas testadas. Em conjunto com os resultados provenientes de camundongos BALB/c, 17 dos 18 epitopos presentes na construção vacinal induziram respostas celulares específicas, sugerindo que os epitopos da vacina HIVBr18 foram adequadamente processados e apresentados.

Estudos clínicos de vacinas baseadas na indução de respostas de células T anti-HIV-1 sugerem fortemente que a indução de respostas imunes amplas e funcionalmente relevantes contra epitopos conservados na maioria dos indivíduos, pode ser um pré-requisito essencial para novos candidatos à vacina (Mcelrath *et al.*, 2008; Sekaly, 2008; Watkins, 2008). Além disso, respostas imunes celulares contra múltiplos epitopos podem evitar escape imunológico e aumentar a cobertura das respostas induzidas (Geluk *et al.*, 1998a; Kawamura *et al.*, 2000). A vacinação com o vírus atenuado SIVmac239 Δ Nef (Gauduin *et al.*, 2006) ou com um adenovírus 5 codificando 8 proteínas do SIV (Wilson *et al.*, 2009) induziram respostas de células T CD4⁺ e T CD8⁺ amplas e de alta frequência levando a proteção dos animais vacinados contra desafio com uma cepa patogênica do SIV ou resultou numa significativa redução da carga viral, tanto no pico de viremia da fase aguda assim como no “*set point*” viral nos animais que se infectaram (Wilson *et al.*, 2009). Estas respostas de linfócitos T se correlacionam com contagens elevadas de linfócitos T CD4⁺ após o desafio (Martins *et al.*, 2010).

Uma vacina de células T eficaz deve também ter uma cobertura populacional significativa, devido ao extenso polimorfismo HLA observado nas diferentes populações. Em uma vacina baseada em epitopos, uma forma de assegurar a cobertura máxima é incluir múltiplos epitopos, onde cada um pode se ligar a múltiplas moléculas de HLA. O algoritmo de predição TEPITOPE tem sido aplicado com sucesso na identificação de vários epitopos promíscuos de células T no contexto de várias doenças

infeciosas, alérgicas e auto-imunes (Rosa *et al.*, 2006; Bian e Hammer, 2004; Garcia *et al.*, 2008; Iwai *et al.*, 2003). Uma correlação significativa foi observada entre a promiscuidade prevista pelo TEPITOPE e a observada em ensaios de ligação *in vitro* utilizando múltiplas moléculas HLA-DR (Rosa *et al.*, 2010). No conjunto de peptídeos identificados por nosso grupo e codificados na vacina HIVBr18, cada peptídeo se ligou a aproximadamente 50% das 9 moléculas de HLA-DR comuns testadas (Fonseca *et al.*, 2006). A maioria das moléculas HLA-DR se ligou a pelo menos 10 dos epitopos, indicando que um indivíduo tendo pelo menos uma das moléculas HLA-DR poderia apresentar respostas de linfócitos T CD4⁺ amplas contra esse grupo de epitopos do HIV-1 presentes na vacina (Fonseca *et al.*, 2006). A promiscuidade dos epitopos para moléculas de HLA classe II identificados pelo algoritmo TEPITOPE deve se estender além do número limitado de moléculas preditas na matriz do algoritmo. Este fato pode explicar porque tais indivíduos infectados pelo HIV-1, assim como camundongos transgênicos para as moléculas HLA-DQ6 e -DQ8, alelos de classe II cuja ligação não é prevista pelo TEPITOPE, também apresentaram respostas celulares amplas contra o conjunto de epitopos selecionados.

A imunização de camundongos transgênicos para distintas moléculas de HLA classe II induziu respostas de linfócitos T CD4⁺ contra 11 dos epitopos presentes na vacina, indicando o potencial da vacina HIVBr18 de induzir respostas multiepitópicas em um contexto de múltiplas moléculas de HLA classe II. O fato de cada linhagem transgênica reconhecer um conjunto distinto de peptídeos após a imunização com HIVBr18 está de acordo com o

reconhecimento restrito por diferentes MHCs de classe II e é corroborado pelos diferentes padrões de reconhecimento também observado em CMSP dos pacientes infectados pelo HIV-1 testados (Tabela 6 A e B). Os achados nas linhagens transgênicas sugerem que a imunização com HIVBr18 pode fornecer uma cobertura significativa da população humana geneticamente heterogênea, induzindo respostas de linfócitos T CD4⁺ amplas. Considerando que cada linhagem de camundongos transgênicos expressa uma, ao invés de 3-8 formas alélicas de moléculas de classe II HLA-DP, -DQ e -DR distintas presentes em humanos, e a ineficiente ligação das moléculas de HLA classe II com a molécula CD4 murina (Khanolkar *et al.*, 2007), a amplitude e a magnitude das respostas de células T CD4⁺ potencialmente induzidas pela vacina HIVBr18 em humanos poderia ser ainda maior. Observamos que aproximadamente 80% dos camundongos das linhagens transgênicas HLA-DR2, -DR4 e -DQ6 responderam ao regime de imunização, enquanto apenas 30% dos camundongos transgênicos HLA-DQ8 apresentaram alguma resposta. Isto pode ser devido a níveis qualitativamente diferentes da expressão da molécula de HLA classe II (Wong e Wen, 2004). Considerando os resultados obtidos na linhagem transgênica para a molécula HLA-DR2 (DRB1 * 1501), os seis peptídeos que induziram a secreção de IFN- γ ou a proliferação de linfócitos T CD4⁺ nessa linhagem, também foram reconhecidos por um ou mais dos 5 indivíduos infectados pelo HIV-1, portadores do mesmo HLA, que foram testados (Fonseca *et al.*, 2006) (Tabela 6 A). O reconhecimento de epitopos adicionais por alguns pacientes pode ser explicado pela expressão de outras

moléculas de classe II (HLA-DR, -DQ e -DP) nestes indivíduos, diferentemente dos camundongos transgênicos que expressam apenas um único alelo de HLA classe II. No caso dos camundongos transgênicos para a molécula HLA-DR4, relativamente baixo compartilhamento de respostas entre os camundongos transgênicos e o reconhecimento humano foi provavelmente devido ao fato do número restrito de indivíduos HIV-1⁺ testados (Fonseca *et al.*, 2006) (Tabela 6 B). Esse é o primeiro trabalho usando múltiplas linhagens de camundongos transgênicos como modelo de teste de imunogenicidade e avaliação de respostas restritas a moléculas de HLA classe II. Os achados nos sugerem que os resultados obtidos nessas linhagens podem traduzir as respostas que podem ser induzidas em humanos em um ensaio vacinal.

Os padrões de reconhecimento distintos dos epitopos por linfócitos TCD8⁺, restritos ao MHC classe I murino observados nessas linhagens transgênicas para moléculas de HLA classe II, deve-se às diferentes origens das mesmas, onde cada linhagem foi originária de vários retro-cruzamentos entre camundongos portadores de diferentes moléculas H-2 de classe I (Chapoval *et al.*, 1998; Gonzalez-Gay *et al.*, 1996; Pan *et al.*, 1998). A indução de respostas de linfócitos T CD8⁺ não é inesperada, uma vez que 78% dos pacientes infectados pelo HIV-1 testados em estudo prévio (Fonseca *et al.*, 2006) exibiram respostas de linfócitos T CD8⁺ contra o pool de peptídeos do HIV-1, geralmente coexistindo com respostas de linfócitos T CD4⁺. Além disso, 9 dos 18 peptídeos contém epitopos para moléculas de classe I humanas e murinas conhecidos (Tabela 1 anexa).

Apesar de sabermos que as células T CD8⁺ citotóxicas (CTLs) são os efetores primários anti-HIV-1 (Watkins *et al.*, 2008), vasta literatura apóia o papel protetor de células T CD4⁺ específicas na infecção pelo HIV-1, assim como em outras infecções. Respostas precoces de células T CD4⁺ foram associadas com a baixa progressão para AIDS na infecção pelo HIV-1 (Martinez *et al.*, 2005; Pancre *et al.*, 2007). Além disso, macacos resos infectados pelo SIV, controladores de elite, apresentam respostas de linfócitos T CD4⁺ SIV-específicas amplas, e que certos alelos de classe II estão associados com a significativa queda da viremia (Giraldo-Vela *et al.*, 2008). A depleção de células T CD4⁺ em macacos resos reduziu o efeito protetor induzido por vacinação após desafio com SIV (Vaccari *et al.*, 2008). O desenvolvimento de um anticorpo de fusão anti-DEC-205-HIV-1 expressando a proteína Gag do HIV-1 foi capaz de induzir uma forte resposta das células T CD4⁺ capazes de conferir proteção de mucosa contra desafio com o vírus da vaccínia recombinante expressando a mesma proteína (Trumpfheller *et al.*, 2006). Células T CD4⁺ induzidas pela vacinação contribuem para a proteção em primatas desafiados pelo SIV (Letvin *et al.*, 2006, Vaccari *et al.*, 2008). Os mecanismos protetores relacionados a esse subtipo celular incluem auxílio cognato para células T CD8⁺ funcionais de memória (Lichterfeld *et al.*, 2004; Shedlock e Shen, 2003), mobilização de células T CD8⁺ efetoras para os sítios periféricos de infecção (Nakanishi *et al.*, 2009), e inibição da replicação do SIV em macrófagos infectados (Sacha *et al.*, 2009). Letvin *et al.* (2006) relataram que estratégias de vacinação que preservam células T CD4⁺ em primatas

desafiados com SIV levaram a um aumento da sobrevivência. Em modelos murinos, vem sendo demonstrado que o auxílio cognato por linfócitos T CD4⁺ tem um papel crucial na geração e na manutenção das respostas de células T CD8⁺ de memória funcionais e proliferativas (Lichterfeld *et al.*, 2004; Shedlock e Shen, 2003). Novy *et al.* (2007) mostraram em modelo de infecção pelo vírus da vaccínia, que as células T CD4⁺ são de fundamental importância para a manutenção da expansão clonal e funcionalidade das células T CD8⁺ geradas. Além disso, em modelo de infecção pelo HSV-2 foi mostrado que as células T CD4⁺ influenciam na migração de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos específicos para sítios de mucosa, local da infecção por esse vírus (Nakanishi *et al.*, 2009). Em trabalho recente, foi mostrado que a indução de células T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória efetora, após imunização com vírus CMV recombinante, expressando várias proteínas do SIV, foi capaz de reduzir a viremia depois de repetidos desafios de mucosa, sendo que as células CD4⁺CCR5⁺ geradas no local do desafio não aceleraram e nem aumentaram os níveis de infecção viral (Hansen *et al.*, 2009). Jin *et al.* (2009) em um estudo de fase I, com 84 indivíduos saudáveis, mostraram que uma vacina contendo múltiplos epítomos para linfócitos T CD4⁺, induziu respostas de linfócitos T CD4⁺ polifuncionais em 68% dos indivíduos após 2 imunizações. Os autores sugeriram que a mesma pode ser uma fonte de auxílio na geração de anticorpos neutralizantes assim como de respostas de linfócitos T CD8⁺. Portanto, novas estratégias de imunização devem também induzir respostas potentes de células T CD4⁺ assim como T CD8⁺, a fim de conferir uma imunidade protetora. Esses achados sugerem que a falta de

eficácia das estratégias de vacinação que visaram induzir exclusivamente células T CD8⁺ pode ser devido a ausência do auxílio fornecido pelas células T CD4⁺ e o conseqüente prejuízo na manutenção das respostas das células T CD8⁺ funcionais por longo prazo (Khanolkar *et al.*, 2007).

Entre as respostas induzidas e observadas em camundongos BALB/c, 5 dos 8 epitopos que induziram alguma resposta imune celular antígeno-específica, induziram proliferação de linfócitos T CD4⁺. A capacidade de apresentação dos epitopos promíscuos, selecionados pelo algoritmo TEPITOPE, pelo MHC classe II de camundongos BALB/c, pode ter ocorrido devido a similaridade entre os motivos de ligação das moléculas murinas e humanas (Fraser *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 2010; Sturniolo *et al.*, 1999).

O reconhecimento inter-espécies dos epitopos do HIV selecionados pelo TEPITOPE para ligação ao MHC humano correlaciona-se com achados prévios, onde epitopos provenientes de vários patógenos, como *P. vivax*, *S. manoni*, selecionados por tal algoritmo apresentaram-se imunogênicos, antigênicos e induziram proteção a desafio infeccioso em linhagens de camundongos que possuem haplótipos H-2 distintos, incluindo C57BL/6 (H-2^b), BALB/c (H-2^d) e C3H/HeJ (H-2^k) (Benmohamed *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2006). Adicionalmente, o algoritmo PRED^{BALB/c} mostrou que vários dos peptídeos foram previstos para se ligarem às moléculas H2d de camundongos BALB/c como mostrado na tabela 2 anexa (Zhang *et al.*, 2005). Epitopos de SIV selecionados pelo mesmo algoritmo também foram reconhecidos por CMSP de macacos resos infectados pelo SIV, controladores de elite (dados não publicados).

A qualidade das respostas imunes é um fator crucial na definição de respostas protetoras (Seder *et al.*, 2008). A capacidade da vacina HIVBr18 de induzir IFN- γ , TNF- α e IL-2, com pouca ou nenhuma produção de IL-4 ou IL-5, indica uma resposta de citocinas do tipo 1. A observação de que aproximadamente 50% das células T CD4⁺ específicas geradas eram polifuncionais, expressando simultaneamente as três citocinas (IFN- γ , IL-2 e TNF- α) e que tais células polifuncionais produziram maiores quantidades de cada citocina do que as células monofuncionais. Este perfil está de acordo com achados recentes em células polifuncionais de camundongos (Darrah *et al.*, 2007) e humanos (Kannanganat *et al.*, 2007a, Kannanganat *et al.*, 2007b). Dados recentes de estudos de imunização utilizando as vacinas da varíola assim como da febre amarela mostraram que a indução de células T CD4⁺ e T CD8⁺ polifuncionais devem desempenhar um papel na imunidade protetora (Gaucher *et al.*, 2008; Precopio *et al.*, 2007). Além disso, células T CD4⁺ polifuncionais (IFN- γ ⁺IL-2⁺TNF- α ⁺) mostraram-se capazes de fornecer proteção contra desafios com *Leishmania major* (Darrah *et al.*, 2007) e *M. tuberculosis* (Lindenstrom *et al.*, 2009). Células T CD4⁺ polifuncionais HIV-1 específicas estão presentes em indivíduos infectados pelo HIV-1 LTNP (não progressores por longo tempo) (Harari *et al.*, 2004) e os níveis dessas células apresentam uma correlação inversa com a viremia (Kannanganat *et al.*, 2007b). Indivíduos infectados pelo HIV-1 LTNP apresentam números mais elevados de células T CD8⁺ polifuncionais do que indivíduos progressores (Betts *et al.*, 2006). Indivíduos infectados pelo HIV-2, que apresentam um maior tempo para a progressão para AIDS do que indivíduos

infectados pelo HIV-1, apresentam maior quantidade de células T CD4⁺ polifuncionais (Duvall *et al.*, 2008). Nossos resultados sugerem que a vacina HIVBr18, como outras vacinas eficazes validadas, como da febre amarela e da varíola (Gaucher *et al.*, 2008; Precopio *et al.*, 2007), pode induzir células polifuncionais, um correlato de proteção putativo.

Células T de memória induzidas pela vacina podem ser decisivas na geração de imunidade de longa duração e ter efeito na destruição viral. Nós verificamos que após a imunização com HIVBr18, as células T CD4⁺ e T CD8⁺ que proliferaram especificamente apresentaram um fenótipo de memória efetora (TEM) com produção simultânea de IFN- γ e IL-2, enquanto que as células de memória central induzidas eram produtoras principalmente da citocina IL-2 isoladamente. As respostas proliferativas, a produção de citocinas intracelular assim como a secreção de citocinas avaliadas por ensaios de ELISPOT apresentaram um pico entre 2 e 4 semanas após a última dose de imunização e então, contraíram, estabelecendo um pool de células de memória central de longa duração, fundamentais para uma imunidade protetora (Shedlock e Shen, 2003), detectáveis até 24 semanas após a última imunização. Nós observamos que as células T CD4⁺ de memória efetora eram abundantes 2 semanas após a última dose mas decaíram com o passar do tempo, enquanto que as células T CD4⁺ de memória central aumentaram, indicando que as células de memória central induzidas pela imunização com HIVBr18 tem duração longa e podem ser capazes de prover um auxílio sustentado para as células T CD8⁺. Em conjunto, nossos resultados demonstram que a imunização com HIVBr18

induz células T CD4⁺ e T CD8⁺ de longa duração com um componente de células de memória central significativo. Células de memória central são capazes de manter respostas antivirais devido a sua meia vida longa e sua capacidade de auto-renovação (Lanzavecchia e Sallusto, 2005), e podem ser prontamente ativadas no caso de reencontro com o antígeno. A imunização com o vírus da vaccínia é capaz de gerar células T CD4⁺ de longa duração por mais de 30 anos (Wang *et al.*, 2009). Dentre indivíduos LTNP, existe um compartimento preservado de células T CD4⁺ de memória central e sinais de potente ativação funcional no compartimento de células T CD4⁺ de memória efetora (Potter *et al.*, 2007). Em modelos de primatas vacinados e desafiados com SIV, a preservação de células T CD4⁺ de memória (Mattapallil *et al.*, 2006) levou a um aumento da sobrevivência (Letvin *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009) e reforçou a importância dessas células T CD4⁺ na proteção contra a progressão para AIDS. Além disso, a imunização que induz células T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória efetora SIV-específicas é capaz de diminuir a viremia do SIV após desafios repetidos (Hansen *et al.*, 2009).

6. CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que a imunização com a vacina de DNA HIVBr18, codificando uma seqüência de epitopos para linfócitos T CD4⁺ conservados e promíscuos do HIV-1, induziu respostas de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ amplas em um contexto de múltiplas moléculas de HLA classe II. As respostas imunes induzidas foram polifuncionais, com perfil do tipo 1 de citocinas, induzindo respostas com células de longa duração com componentes de memória central e efetora. Estes resultados nos indicam que indivíduos portadores de tais moléculas HLA poderiam potencialmente desenvolver respostas imunes amplas após a vacinação com HIVBr18. Portanto, acreditamos que este conceito vacinal pode contornar o problema da variabilidade genética do HIV-1 assim como do aumento de cobertura imunológica da população geneticamente heterogênea, e pode ser útil se aplicada isoladamente ou como fonte de auxílio cognato em outras estratégias vacinais contra o HIV-1.

ANEXO A - FIGURAS

Figura 1: Análise da integridade do DNA plasmidial após purificação e corrida em gel de agarose 1%. (A) 1- peso molecular (Ready-load 1kb plus DNA ladder), 2- pVAX 1 circular, 3- pVAX 1 linearizado com a enzima Hind III; (B) 1- peso molecular (Ready-load 1kb plus DNA ladder), 2- HIVBr18 1circular, 3- HIVBr18 linearizado com a enzima Hind III, 4- HIVBr18 digerido com as enzimas Hind III e Xho I. A presença de diversas bandas observadas no DNA não digerido (Figura 1 A e B – canaletas 2) é característica de DNA super-enovelado, fato não observado nos DNAs linearizados (Figura 1 A e B – canaletas 3) com apenas a enzima Hind III. A digestão do vetor pVAX 1 com a enzima Hind III revelou uma banda com tamanho de 3 Kb (Figura 1 A – canaleta 3), enquanto que a digestão do plasmídeo HIVBr18 (Figura 1 B – canaleta 4) com as enzimas Hind III e Xho I revelou uma banda de 3 Kb referente ao vetor pVAX 1 e outra de 1kb referente ao inserto multiepitópico.

Figura 2: Avaliação da integridade das amostras de RNA por gel de agarose. Tecidos extraídos após protocolo de imunização com HIVBr18 ou pVAX 1. Músculos e baço de camundongos BALB/c imunizados com pVAX 1 ou HIVBr18 e sacrificados 7 dias após imunização. Integridade do RNA após extração e tratamento com DNase e corrida em gel de agarose 1%. 1ug de RNA de cada amostra foi carregado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5ug/mL) e submetido a corrida eletroforética a 100V durante 40 minutos. PM: Peso molecular 100pb ladder 100bp, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1-6: RNA extraído de músculos (1-3 grupo imunizado com pVAX 1; 4-6 grupo imunizado com HIVBr18); e 7-12: RNA extraído de baços (7-9 grupo imunizado com pVAX 1; 10-12 grupo imunizado com HIVBr18). As duas bandas observadas correspondem às porções 18S e 28S do RNA.

Figura 3: Estratégia de análise adotada para avaliação da proliferação celular através de ensaio com CFSE. “*Dot Plot*” representativo de ensaio de proliferação celular utilizando ensaio de CFSE. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100 μ g de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Pools de baços dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica através de ensaio de CFSE contra estímulo *in vitro* com o pool dos 18 peptídeos sintéticos (concentração de 5 μ M). A proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ 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

Figura 4: Estratégia de análise adotada para avaliação da produção de citocinas intracelulares através de citometria de fluxo multiparamétrica e estratégia booleana para avaliação da polifuncionalidade celular. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100µg de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Pools de baços dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica contra estímulo *in vitro* com o pool dos 18 peptídeos sintéticos (concentração de 5uM). A secreção de citocinas foi avaliada como mostra a estratégia de análise acima. Em síntese, foi feito um *gate* inicial em linfócitos baseados em tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), seguido por um *gate* em células CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺. 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 ou TNF- α ou IL-2 isoladamente. A polifuncionalidade das células induzidas após protocolo vacinal foi avaliada utilizando-se a estratégia de “*Boolean gate*”, que se baseia na combinação *booleana*, onde é feita a intersecção entre as células que são capazes de produzir cada citocina ou a combinação entre as mesmas após re-estímulo *in vitro*. Os dados mostrados são referentes à re-estímulo *in vitro* com anti-CD3.

Figura 5: Estratégia de análise adotada para avaliação do fenótipo de memória das células que proliferaram após imunização com HIVBr18. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100µg de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Pools de baços dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica contra estímulo *in vitro* com o pool dos 18 peptídeos sintéticos (concentração de 5µM). As células foram marcadas com 1,25µM de CFSE e mantidas em cultura com o estímulo por 5 dias. Posteriormente foram marcadas como descrito em materiais e métodos. O fenótipo das células que proliferaram foi avaliado como mostrado na estratégia acima. Em suma, foi feito um *gate* em linfócitos (FSC x SSC), posteriormente um *gate* em células CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺ (linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺ respectivamente) e subseqüentemente um *gate* na população que proliferou (CFSE low). Dentro dessa população de células verificamos o perfil fenotípico das mesmas. Os subtipos celulares foram definidos como: células CD44^{hi}CD62L^{low}, definidas como células de memória efetora (TEM); células CD44^{hi}CD62L^{hi}, definidas como células de memória central (TCM); células CD44^{low}CD62L^{hi}, definidas como células *naïve*; e finalmente células CD44^{low}CD62L^{low}, definidas como outros subtipos celulares.

Figura 6: Estratégia de análise adotada para avaliação do perfil funcional das células de memória induzidas pela imunização com HIVBr18. Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, receberam uma injeção prévia de cardiotoxina e posteriormente receberam 3 doses de 100µg de pVAX 1 ou HIVBr18 pela via intramuscular, em intervalos de 15 dias, e foram sacrificados 2 semanas após receberem a última dose. Pools de baços dos animais de cada grupo foram preparados para avaliação da resposta imune celular antígeno-específica contra estímulo *in vitro* com o pool dos 18 peptídeos sintéticos (concentração de 5µM) por 12 horas de cultura na presença de BFA. Após cultura as células foram marcadas e avaliadas como mostrado na estratégia acima. Brevemente, fizemos um *gate* em linfócitos baseados em tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), seguido por um *gate* em linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺. Após definidas as subpopulações de linfócitos, foi feito um *gate* nas células CD44^{hi} para definição das células de memória. Logo em seguida foram feitos *gates* baseados na expressão do marcador CD62L para definição das duas subpopulações de memória: TCM (CD62L hi) ou TEM (CD62L low). Em cada subpopulação de memória, definimos células secretoras de IFN- γ e IL-2 isoladamente ou de ambas as citocinas simultaneamente. Esquema representativo de esplenócitos estimulados *in vitro* com anti-CD3.

ANEXO B – TABELAS

Tabela 1: Sequência de aminoácidos dos epitopos identificados por Fonseca et al (2006). Epitopos CTL/CD8 descritos no banco de dados de Los Alamos contidos nos epitopos para linfócitos T CD4⁺ identificados por nosso grupo.

epitopo MHC classe II	Seqüência	HXB2 CTL/CD8
p17(73-89)	EELRSLYNTVATLYCVH	ELRSLYNTV
p24(33-45)	SPEVIPMFSALE	EVIPMFSA
p24(131-150)	KRWIILGLNKIVRMYSPTSI	KRWIILGLNK
p6(32-46)	DKELYPLASLRSFLG	sequencia discrepante
pol(63-77)	QRPLVTIKIGGQLKE	sequencia discrepante
pol(136-150)	TPVNIIGRNLLTQIG	ND
pol(785-799)	GKIILVAVHVASGYI	ND
gp41(261-276)	RDLLIVTRIVELLGR	ND
gp160(19-31)	TMLLGMLMCSAA	ND
gp160(174-185)	ALFYKLDVVPID	ND
gp160(188-201)	NTSYRLISCNTSVI	RLISCNTSV
gp160(481-498)	SELYLYKVVVKEPLGVAP	YKVVVKEPL
rev(11-27)	ELLKTVRLIKFLYQSNP	EELLKTVRL
vpr(58-72)	EAIIRILQQLFIHF	AIIRILQQL
vpr(65-82)	QQLFIHFRIGCRHSRIG	ND
vif(144-158)	SLQYLALVALVAPKK	ND
nef(180-194)	VLEWRFD SRLAFHHV	LMWKFD SRL
vpu(6-20)	VLAIVALVVAITIAI	LAIVALVVA

ND: não descrito

Destacadas em vermelho estão as seqüências de aminoácidos pertencentes aos epitopos de linfócitos T CD4⁺ identificados pelo nosso grupo e que constituem os epitopos CTL já descritos na base de dados de Los Alamos. Em verde estão representados os aminoácidos que constituem o epitopo CTL descrito na base de dados, mas que não são coincidentes com os epitopos para linfócitos T CD4⁺ identificados.

Tabela 2: Predição de ligação à moléculas de MHC classe I e II de camundongos BALB/c com utilização do algoritmo PRED^{BALB/c}.

Peptídeo	MHC classe II		MHC classe I		
	Predição I-A ^d	Predição I-E ^d	Predição H2-D ^d	Predição H2-K ^d	Predição H2-L ^d
p17(73-89)	9.5	9.64	9.66	9.4	7,4
p24 (33-45)	9.1	4,96	8.82	6,1	5,1
p24 (131-150)	9.5	9.7	8.96	8.9	3,92
p6 (32-46)	9.1	8.82	9.4	6,1	7,5
pol (63-77)	10	9.9	9.44	6,1	6,54
pol (136-150)	8.3	8.14	9.6	6,1	4,7
pol (785-799)	9.7	9.76	9.2	8.98	5,04
gp41(261-276)	9.5	9.5	8.66	7,78	4,7
gp160 (19-31)	9.6	7,14	7,34	8	2,5
gp160 (174-185)	9.6	9.5	9.7	7,7	4
gp160(188-201)	9.48	8.7	7,3	8.3	5,58
gp160 (481-498)	9.5	9.8	9.78	8.42	5,3
rev (11-27)	9.1	9.7	8.58	7,8	4,7
vpr (58-72)	8.9	8.28	8.18	7,74	7,6
vpr (65-82)	9.2	9.9	9.2	7	6,2
vif (144-158)	9.7	9.5	9.4	8.58	7,66
vpu (6-20)	9.6	9.4	8.96	7,84	2,18
nef (180-194)	9.1	9.6	7,9	5,7	6,2

Peptídeos previstos a se ligar à moléculas H2^d pelo algoritmo PRED^{BALB/c} estão em negrito. *Cutoff* positividade: 8,0.

Tabela 3: Avaliação da consistência das respostas induzidas após imunização com HIVBr18 e estímulo *in vitro* com os peptídeos sintéticos individuais.

A)

peptídeo	Número do experimento												% respostas positivas (consistentes)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
p17(73-89)	--	--	27	--	17	46	--	17	46	--	17	--	50 *
p24 (33-45)	--	--	--	--	22	--	--	--	--	--	--	--	8
p24 (131-150)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
p6 (32-46)	38	15	67	35	10	23	16	64	22	16	64	--	83 *
pol (63-77)	--	--	--	--	--	--	--	114	--	--	114	41	25
pol (136-150)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
pol (785-799)	21	--	27	34	25	--	16	17	--	16	17	--	67 *
gp41 (261-276)	--	--	--	60	--	--	--	--	--	--	--	--	8
gp160 (19-31)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
gp160 (174-185)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
gp160 (188-201)	92	40	221	96	72	192	103	115	192	103	115	59	100 *
gp160 (481-498)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
rev (11-27)	33	--	25	48	--	--	19	16	--	19	16	17	67 *
vpr (58-72)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
vpr (65-82)	61	46	193	92	117	81	45	134	81	44	134	74	100 *
vif (144-158)	56	88	286	189	64	157	47	104	157	47	104	73	100 *
vpu (6-20)	--	--	--	18	--	--	--	--	--	--	--	--	8
nef (180-194)	54	23	75	94	25	107	35	107	107	34	107	47	100 *
pool	153	129	345	328	224	322	136	296	322	136	296	191	100 *

B)

peptídeo	Número do experimento											% respostas positivas (consistentes)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
p17(73-89)	15	15	--	30	33	16	17	17	16	17	--	82 *
p24 (33-45)	--	--	--	--	--	--	25	--	--	25	--	18
p24 (131-150)	--	--	--	--	44	--	17	--	--	17	--	27
p6 (32-46)	23	23	15	--	21	--	47	--	--	47	--	55 *
pol (63-77)	--	--	--	--	--	--	65	--	--	65	32	27
pol (136-150)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
pol (785-799)	40	30	--	20	19	--	18	16	--	18	8	64 *
gp41 (261-276)	--	33	--	--	--	--	--	--	--	--	--	9
gp160 (19-31)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
gp160 (174-185)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
gp160 (188-201)	77	43	82	63	38	43	100	76	43	100	27	100 *
gp160 (481-498)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2	0
rev (11-27)	23	19	20	22	--	--	--	21	--	--	16	55 *
vpr (58-72)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
vpr (65-82)	112	43	55	43	84	36	68	36	36	68	57	100 *
vif (144-158)	103	78	33	25	61	34	67	36	34	67	28	100 *
vpu (6-20)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0
nef (180-194)	28	51	25	21	33	20	47	32	20	47	21	100 *
pool	165	191	128	125	223	111	192	223	111	192	111	100 *

Foram considerados epitopos consistentemente reconhecidos àqueles que induziram respostas positivas em mais de 50% das repetições realizadas. As tabelas representam o número de células secretoras de IFN- γ (A) e IL-2 (B) avaliadas por ensaio de ELISPOT em esplenócitos provenientes de camundongos imunizados com HIVBr18. Resultados de 12 ou 11 experimentos individuais estão representados, respectivamente. Os valores na tabela indicam o número de unidades formadoras de spots para cada peptídeo em cada repetição. Os traços representam valores abaixo do *cutoff*. A coluna da direita, representa a porcentagem em que cada peptídeo induziu respostas acima do *cutoff* em cada experimento individualmente. * peptídeos reconhecidos em >50% dos experimentos de imunização.

ANEXO C – LAUDO HISTOPATOLÓGICO

Ciallyx

Laboratórios & Consultoria

São Paulo, 02 de abril de 2008

CIALLYX Laboratórios & Consultoria

Laboratório de Histopatologia - HISTOLAB

Material recebido pelo Laboratório de Histopatologia da CIALLYX:

- Tecidos fixados em formol tamponado 10%, desde novembro de 2007.
- Material entregue em tubos tipo Falcom[®] de 50ml.
- Material proveniente de 8 camundongos / Linhagem não definida.

Amostras denominadas como:

Salina:

camundongo 1

camundongo 2

pVAX 1:

camundongo 1

camundongo 2

camundongo 3

HIVBr18:

camundongo 1

camundongo 2

camundongo 3

Estruturas anatômicas presentes nas amostras enviadas:

Músculos tibiais anteriores, articulação dos joelhos, baço, rim, fígado, coração e cérebro (em algumas amostras).

Laudos histopatológicos:

Os resultados das análises histopatológicas são apresentados segundo as denominações utilizadas nas amostras enviadas. Onde houveram achados histopatológicos significativos foram realizadas consultas prévias ao livro *“Handbook of toxicology. Derelanko; M.J. & Hollinger; M.A. CRC Press. 2nd ed. 2002, Chapter: Animal Histopathology; pág 650 a 740”* e havendo descrição de lesões semelhantes em camundongos (mesmo que de outras linhagens), apresentamos uma breve descrição estatística destas lesões nestes camundongos (normais e não tratados com nenhum tipo de substância química e/ou biológica).

Salina:

Camundongo 1:

Músculos tibiais anteriores: Ausência de alterações microscópicas.

Articulação do joelho: Ausência de alterações microscópicas.

Baço: Hemossiderose discreta ^(A).

(A) Pigmentação. Hemossiderina. Hemossiderina é considerada normal em um número moderado de macrófagos velhos em camundongos. O aumento de hemossiderina está associado com algumas formas de anemia, hemólise e com aumento na destruição de eritrócitos. Handbook of toxicology.

Derelanko; M.J. & Hollinger; M.A. CRC Press. 2nd ed. 2002, Chapter: Animal Histopathology; pag. 683.

Rim: Ausência de alterações microscópicas.

Fígado: Ausência de alterações microscópicas.

Coração: Ausência de alterações microscópicas.

Cérebro: Ausência de alterações microscópicas.

Camundongo 2:

Músculos tibiais anteriores: Ausência de alterações microscópicas.

Articulação do joelho: Ausência de alterações microscópicas.

Baço: Hemossiderose discreta ^(A).

(A) Pigmentação. Hemossiderina. Hemossiderina é considerada normal em um número moderado de macrófagos velhos em camundongos. O aumento de hemossiderina está associado com algumas formas de anemia, hemólise

e com aumento na destruição de eritrócitos. *Handbook of toxicology. Derelanko; M.J. & Hollinger; M.A. CRC Press. 2nd ed. 2002, Chapter: Animal Histopathology. Peckham; J.; pág. 683.*

Rim: Ausência de alterações microscópicas.

Fígado: Presença de focos discretos de infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e linfócito compatível com hepatite aguda multifocal leve ^(B).

(B) Inflamação. Hepatite. Achado muito comum (camundongos CD-1: 2000 machos - 19,3%; 2000 fêmeas – 9,3%); mais de 50% de camundongos CD-1 têm pequenos focos tanto de processos inflamatórios agudos como crônicos com células inflamatórias espalhadas pelo tecido hepático; pequenos agregados de linfócitos são comuns; foram observados 20% destes casos em 274 camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas; focos inflamatórios grandes estão associados com necrose coagulativa a qual pode estar relacionada com *Bacillus piliformis* (doença de Tyzzer) ou com hepatite viral dos camundongos que ocorre em cerca de 5% dos camundongos CD-1 de alguns laboratórios; hepatite aguda, crônica ou necrótica pode estar relacionada também à infecção por *Helicobacter hepaticus*. . *Handbook of toxicology. Derelanko; M.J. & Hollinger; M.A. CRC Press. 2nd ed. 2002, Chapter: Animal Histopathology. Peckham; J.; pág. 673.*

Coração: Ausência de alterações microscópicas.

Cérebro: Ausência de alterações microscópicas.

pVAX 1:

Camundongo 1:

Músculos tibiais anteriores: Ausência de alterações microscópicas.

Articulação do joelho: Ausência de alterações microscópicas.

Baço: Hemossiderose discreta ^(A).

(A) Pigmentação. Hemossiderina. Hemossiderina é considerada normal em um número moderado de macrófagos velhos em camundongos. O aumento de hemossiderina está associado com algumas formas de anemia, hemólise e com aumento na destruição de eritrócitos. Handbook of toxicology. Derelanko; M.J. & Hollinger; M.A. CRC Press. 2nd ed. 2002, Chapter: Animal Histopathology. Peckham; J.; pág. 683.

Rim: Ausência de alterações microscópicas.

Fígado: Ausência de alterações microscópicas.

Coração: Ausência de alterações microscópicas.

Cérebro: Não apresenta fragmento do órgão.

Camundongo 2:

Músculos tibiais anteriores: Ausência de alterações microscópicas.

Articulação do joelho: Ausência de alterações microscópicas.

Baço: Hemossiderose discreta ^(A).

(A) Pigmentação. Hemossiderina. Hemossiderina é considerada normal em um número moderado de macrófagos velhos em camundongos. O aumento de hemossiderina está associado com algumas formas de anemia, hemólise e com aumento na destruição de eritrócitos. Handbook of toxicology. Derelanko; M.J. & Hollinger; M.A. CRC Press. 2nd ed. 2002, Chapter: Animal Histopathology. Peckham; J.; pág. 683.

Rim: Focos discretos de hemorragia intertubular

Fígado: Ausência de alterações microscópicas.

Coração: Ausência de alterações microscópicas.

Cérebro: Ausência de alterações microscópicas.

Camundongo 3:

Músculos tibiais anteriores: Um dos fragmentos apresenta foco de infiltrado inflamatório linfocítico moderado entre as fibras musculares compatível com miosite linfocítica focal. Nota-se ainda foco de calcificação das fibras musculares ^(C).

(C) Inflamação. Crônica (miosite). Em camundongos CD-1 normais (não tratados) há relatos esporádicos de miosite linfocítica focal. . Handbook of toxicology. Derelanko; M.J. & Hollinger; M.A. CRC Press.2nd ed. 2002, Chapter: Animal Histopathology. Peckham;J.; pág. 681.

Articulação dos joelhos: Ausência de alterações microscópicas.

Baço: Hemossiderose discreta ^(A).

(A) Pigmentação. Hemossiderina. Hemossiderina é considerada normal em um número moderado de macrófagos velhos em camundongos. O aumento de hemossiderina está associado com algumas formas de anemia, hemólise e com aumento na destruição de eritrócitos. Handbook of toxicology. Derelanko; M.J. & Hollinger; M.A. CRC Press.2nd ed. 2002, Chapter: Animal Histopathology. Peckham;J.; pág. 683.

Rim: Ausência de alterações microscópicas.

Fígado: Ausência de alterações microscópicas.

Coração: Ausência de alterações microscópicas.

Cérebro: Ausência de alterações microscópicas.

HIVBr18:

Camundongo 1:

Músculos tibiais anteriores: Ausência de alterações microscópicas.

Articulação dos joelhos: Ausência de alterações microscópicas.

Baço: Hemossiderose discreta ^(A).

(A) Pigmentação. Hemossiderina. Hemossiderina é considerada normal em um número moderado de macrófagos velhos em camundongos. O aumento de hemossiderina está associado com algumas formas de anemia, hemólise e com aumento na destruição de eritrócitos. Handbook of toxicology. Derelanko; M.J. & Hollinger; M.A. CRC Press. 2nd ed. 2002, Chapter: Animal Histopathology. Peckham; J.; pág. 683.

Rim: Ausência de alterações microscópicas.

Fígado: Presença de focos discretos de infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e linfócitos compatíveis com hepatite aguda multifocal leve ^(B).

(B) Inflamação. Hepatite. Achado muito comum (camundongos CD-1: 2000 machos - 19,3%; 2000 fêmeas – 9,3%); mais de 50% de camundongos CD-1 têm pequenos focos tanto de processos inflamatórios agudos como crônicos com células inflamatórias espalhadas pelo tecido hepático; pequenos agregados de linfócitos são comuns; foram observados 20% destes casos em 274 camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas; focos inflamatórios grandes estão associados com necrose coagulativa a qual pode estar relacionada com Bacillus piliformis (doença de Tyzzer) ou com hepatite viral dos camundongos que ocorre em cerca de 5% dos camundongos CD-1 de alguns laboratórios; hepatite aguda, crônica ou

necrótica pode estar relacionada também à infecção por *Helicobacter hepaticus*. . *Handbook of toxicology*. Derelanko; M.J. & Hollinger; M.A. CRC Press.2nd ed. 2002, Chapter: *Animal Histopathology*. Peckham;J.; pág. 673.

Coração: Ausência de alterações microscópicas.

Cérebro: Ausência de alterações microscópicas.

Camundongo 2:

Músculos tibiais anteriores: Ausência de alterações microscópicas.

Articulação do joelho: Ausência de alterações microscópicas.

Baço: Hemossiderose discreta ^(A).

(A) Pigmentação. Hemossiderina. Hemossiderina é considerada normal em um número moderado de macrófagos velhos em camundongos. O aumento de hemossiderina está associado com algumas formas de anemia, hemólise e com aumento na destruição de eritrócitos. Handbook of toxicology. Derelanko; M.J. & Hollinger; M.A. CRC Press.2nd ed. 2002, Chapter: Animal Histopathology. Peckham;J.; pág. 683.

Rim: Ausência de alterações microscópicas.

Fígado: Ausência de alterações microscópicas.

Coração: Ausência de alterações microscópicas.

Cérebro: Ausência de alterações microscópicas.

Camundongo 3:

Músculos tibiais anteriores: Ausência de alterações microscópicas.

Articulação do joelho: Ausência de alterações microscópicas.

Baço: Hemossiderose discreta ^(A).

(A) Pigmentação. Hemossiderina. Hemossiderina é considerada normal em um número moderado de macrófagos velhos em camundongos. O aumento de hemossiderina está associado com algumas formas de anemia, hemólise e com aumento na destruição de eritrócitos. Handbook of toxicology. Derelanko; M.J. & Hollinger; M.A. CRC Press. 2nd ed. 2002, Chapter: Animal Histopathology. Peckham; J.; pág. 683.

Rim: Ausência de alterações microscópicas.

Fígado: Ausência de alterações microscópicas.

Coração: Ausência de alterações microscópicas.

Cérebro: Ausência de alterações microscópicas.

8. REFERÊNCIAS

- Alexaki A, Liu Y, Wigdahl B. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr HIV Res.*2008 Sep;6(5):388-400.
- Allen TM, Altfeld M, Yu XG, O'Sullivan KM, Lichterfeld M, Le Gall S, et al. Selection, transmission, and reversion of an antigen-processing cytotoxic T-lymphocyte escape mutation in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.*2004 Jul;78(13):7069-78.
- Allen TM, O'Connor DH, Jing P, Dzuris JL, Mothe BR, Vogel TU, et al. Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature.*2000 Sep 21;407(6802):386-90.
- Alter G, Altfeld M. NK cell function in HIV-1 infection. *Curr Mol Med*2006 Sep;6(6):621-9.
- Alter G, Suscovich TJ, Teigen N, Meier A, Streeck H, Brander C, et al. Single-stranded RNA derived from HIV-1 serves as a potent activator of NK cells. *J Immunol.*2007 Jun 15;178(12):7658-66.
- Appay V. 25 years of HIV research! ... and what about a vaccine? *Eur J Immunol.*2009 Aug;39(8):1999-2003.
- Baker BM, Block BL, Rothchild AC, Walker BD. Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. *Expert Opin Biol Ther.*2009 Jan;9(1):55-69.
- Bangham CR. CTL quality and the control of human retroviral infections. *Eur J Immunol.*2009 Jul;39(7):1700-12.
- Bangsberg DR, Hecht FM, Charlebois ED, Zolopa AR, Holodniy M, Sheiner L, et al. Adherence to protease inhibitors, HIV-1 viral load, and development of drug resistance in an indigent population. *AIDS.*2000 Mar 10;14(4):357-66.
- Bansal GP, Malaspina A, Flores J. Future paths for HIV vaccine research: Exploiting results from recent clinical trials and current scientific advances. *Curr Opin Mol. Ther* Feb;12(1):39-46.

- Barao I, Ascensao JL. Human natural killer cells. Arch Immunol Ther Exp (Warsz).1998;46(4):213-29.
- Barouch DH, Korber B. HIV-1 vaccine development after STEP. Annu Rev Med.2010;61:153-67.
- Bebenek K, Abbotts J, Roberts JD, Wilson SH, Kunkel TA. Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. J Biol Chem.1989 Oct 5;264(28):16948-56.
- Bednarik DP, Mosca JD, Raj NB, Pitha PM. Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) replication by HIV-trans-activated alpha 2-interferon. Proc Natl Acad Sci U S A.1989 Jul;86(13):4958-62.
- Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. J Clin Invest.2005 Nov;115(11):3265-75.
- BenMohamed L, Bertrand G, McNamara CD, Gras-Masse H, Hammer J, Wechsler SL, et al. Identification of novel immunodominant CD4+ Th1-type T-cell peptide epitopes from herpes simplex virus glycoprotein D that confer protective immunity. J Virol.2003 Sep;77(17):9463-73.
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. Annu Rev Immunol.1999;17:657-700.
- Berzofsky JA, Cease KB, Cornette JL, Spouge JL, Margalit H, Berkower IJ, et al. Protein antigenic structures recognized by T cells: potential applications to vaccine design. Immunol Ver.1987 Aug;98:9-52.
- Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. Blood.2006 Jun 15;107(12):4781-9.
- Bian H, Hammer J. Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T cell epitopes with TEPITOPE. Methods.2004 Dec;34(4):468-75.
- Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in

- primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*.1994 Sep;68(9):6103-10.
- Boyer PL, Ferris AL, Hughes SH. Cassette mutagenesis of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*.1992 Feb;66(2):1031-9.
- Bradley DS, Nabozny GH, Cheng S, Zhou P, Griffiths MM, Luthra HS, et al. HLA-DQB1 polymorphism determines incidence, onset, and severity of collagen-induced arthritis in transgenic mice. Implications in human rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*.1997 Nov 1;100(9):2227-34.
- Brenchley JM, Douek DC. HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunol*.2008 Jan;1(1):23-30.
- Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, Asher AI, Cervasi B, Asher TE, et al. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood*.2008 Oct 1;112(7):2826-35.
- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*.2006 Dec;12(12):1365-71.
- Brooks JT, Kaplan JE, Holmes KK, Benson C, Pau A, Masur H. HIV-associated opportunistic infections--going, going, but not gone: the continued need for prevention and treatment guidelines. *Clin Infect Dis*.2009 Mar 1;48(5):609-11.
- Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, Fitzgerald DW, Mogg R, Li D, et al. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet*.2008 Nov 29;372(9653):1881-93.
- Bunnell R, Ekwaru JP, Solberg P, Wamai N, Bikaako-Kajura W, Were W, et al. Changes in sexual behavior and risk of HIV transmission after antiretroviral therapy and prevention interventions in rural Uganda. *AIDS*.2006 Jan 2;20(1):85-92.
- Burger S, Poles MA. Natural history and pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Semin Liver Dis*.2003 May;23(2):115-24.

- Butto S, Raimondo M, Fanales-Belasio E, Suligoi B. Suggested strategies for the laboratory diagnosis of HIV infection in Italy. *Ann Ist Super Sanita* 2010.;46(1):34-41.
- Call MJ, Xing X, Cuny GD, Seth NP, Altmann DM, Fugger L, et al. In vivo enhancement of peptide display by MHC class II molecules with small molecule catalysts of peptide exchange. *J Immunol*. 2009 May 15;182(10):6342-52.
- Castilla J, Del Romero J, Hernando V, Marincovich B, Garcia S, Rodriguez C. Effectiveness of highly active antiretroviral therapy in reducing heterosexual transmission of HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 Sep 1;40(1):96-101.
- Cecchinato V, Trindade CJ, Laurence A, Heraud JM, Brenchley JM, Ferrari MG, et al. Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Mucosal Immunol*. 2008 Jul;1(4):279-88.
- Chapoval SP, Neeno T, Krco CJ, Marietta EV, Harders J, David CS. HLA-DQ6 and HLA-DQ8 transgenic mice respond to ragweed allergens and recognize a distinct set of epitopes on short and giant ragweed group 5 antigens. *J Immunol*. 1998 Aug 15;161(4):2032-7.
- Chitnis A, Rawls D, Moore J. Origin of HIV type 1 in colonial French Equatorial Africa? *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000 Jan 1;16(1):5-8.
- Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997 May 8;387(6629):183-8.
- Chung A, Rollman E, Johansson S, Kent SJ, Stratov I. The utility of ADCC responses in HIV infection. *Curr HIV Res*. 2008 Nov;6(6):515-9.
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*. 1995 Dec 15;270(5243):1811-5.
- Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*. 1995 Jan 27;267(5197):483-9.

- Connor RI, Korber BT, Graham BS, Hahn BH, Ho DD, Walker BD, et al. Immunological and virological analyses of persons infected by human immunodeficiency virus type 1 while participating in trials of recombinant gp120 subunit vaccines. *J Virol.*1998 Feb;72(2):1552-76.
- Corey L, McElrath MJ, Kublin JG. Post-step modifications for research on HIV vaccines. *AIDS.*2009 Jan 2;23(1):3-8.
- Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med.*2007 Jul;13(7):843-50.
- DaSilva L, Welcher BC, Ulrich RG, Aman MJ, David CS, Bavari S. Humanlike immune response of human leukocyte antigen-DR3 transgenic mice to staphylococcal enterotoxins: a novel model for superantigen vaccines. *J Infect Dis.*2002 Jun 15;185(12):1754-60.
- De Lalla C, Sturniolo T, Abbruzzese L, Hammer J, Sidoli A, Sinigaglia F, et al. Cutting edge: identification of novel T cell epitopes in Lol p5a by computational prediction. *J Immunol.*1999 Aug 15;163(4):1725-9.
- Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, Qazi N, Gilmour J, Gotch F, et al. Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood.*2001 Oct 15;98(8):2574-6.
- Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol.*2003;21:265-304.
- Douek DC, Roederer M, Koup RA. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med*2009;60:471-84.
- Douek DC. Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease. *AIDS Ver.*2003 Jul-Sep;5(3):172-7.
- Duvall MG, Precopio ML, Ambrozak DA, Jaye A, McMichael AJ, Whittle HC, et al. Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *Eur J Immunol.*2008 Feb;38(2):350-63.
- Emu B, Sinclair E, Hatano H, Ferre A, Shacklett B, Martin JN, et al. HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not

- always necessary for long-term virus control. *J Virol.*2008 Jun;82(11):5398-407.
- Fahey JL, Taylor JM, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P, et al. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med.*1990 Jan 18;322(3):166-72.
- Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Butto S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita.*2010. 46(1):5-14.
- Fauci AS. Twenty-five years of HIV/AIDS. *Science.*2006 Jul 28;313(5786):409.
- Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS.*2003 Sep 5;17(13):1871-9.
- Flynn NM, Forthal DN, Harro CD, Judson FN, Mayer KH, Para MF. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis.*2005 Mar 1;191(5):654-65.
- Fonseca SG, Coutinho-Silva A, Fonseca LA, Segurado AC, Moraes SL, Rodrigues H, et al. 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.*2006 Nov 28;20(18):2263-73.
- Ford ES, Puroh CE, Sereti I. Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm. *Curr Opin HIV AIDS.*2009 May;4(3):206-14.
- Fraser DG, Mealey RH, McGuire TC. Selecting peptides to optimize Th1 responses to an equine lentivirus using HLA-DR binding motifs and defined HIV-1 Th peptides. *Immunogenetics.*2003 Oct;55(7):508-14.
- Fuller DH, Shipley T, Allen TM, Fuller JT, Wu MS, Horton H, et al. Immunogenicity of hybrid DNA vaccines expressing hepatitis B core

- particles carrying human and simian immunodeficiency virus epitopes in mice and rhesus macaques. *Virology*.2007 Aug 1;364(2):245-55.
- Gandhi RT, Walker BD. Immunologic control of HIV-1. *Annu Rev Med*.2002;53:149-72.
- Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*.1999 Feb 4;397(6718):436-41.
- Garcia TC, Fonseca CT, Pacifico LG, Duraes Fdo V, Marinho FA, Penido ML, et al. Peptides containing T cell epitopes, derived from Sm14, but not from paramyosin, induce a Th1 type of immune response, reduction in liver pathology and partial protection against *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Acta Trop*.2008 Jun;106(3):162-7.
- Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med*.2008 Dec 22;205(13):3119-31.
- Gauduin MC, Yu Y, Barabasz A, Carville A, Piatak M, Lifson JD, et al. Induction of a virus-specific effector-memory CD4+ T cell response by attenuated SIV infection. *J Exp Med*.2006 Nov 27;203(12):2661-72.
- Geluk A, Taneja V, van Meijgaarden KE, de Vries RR, David CS, Ottenhoff TH. 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*.1998;10(3):191-6.
- Geluk A, Taneja V, van Meijgaarden KE, Zanelli E, Abou-Zeid C, Thole JE, et al. Identification of HLA class II-restricted determinants of *Mycobacterium tuberculosis*-derived proteins by using HLA-transgenic, class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1998 Sep 1;95(18):10797-802.
- Gendelman HE, Baca LM, Turpin J, Kalter DC, Hansen B, Orenstein JM, et al. Regulation of HIV replication in infected monocytes by IFN-alpha. Mechanisms for viral restriction. *J Immunol*.1990 Oct 15;145(8):2669-76.

- Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med*.2002 Feb 4;195(3):327-33.
- Gill N, Davies EJ, Ashkar AA. The role of toll-like receptor ligands/agonists in protection against genital HSV-2 infection. *Am J Reprod Immunol*.2008 Jan;59(1):35-43.
- Giraldo-Vela JP, Rudersdorf R, Chung C, Qi Y, Wallace LT, Bimber B, et al. 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*.2008 Jan;82(2):859-70.
- Gonzalez VD, Landay AL, Sandberg JK. Innate immunity and chronic immune activation in HCV/HIV-1 co-infection. *Clin Immunol*. 2010. Apr;135(1):12-25.
- Gonzalez-Gay MA, Zanelli E, Khare SD, Krco CJ, Zhou P, Inoko H, et al. Human leukocyte antigen-DRB1*1502 (DR2Dw12) transgene reduces incidence and severity of arthritis in mice. *Hum Immunol*.1996 Sep 15;50(1):54-60.
- Gowthaman U, Agrewala JN. In silico tools for predicting peptides binding to HLA-class II molecules: more confusion than conclusion. *J Proteome Res*.2008 Jan;7(1):154-63.
- Granich R, Crowley S, Vitoria M, Smyth C, Kahn JG, Bennett R, et al. Highly active antiretroviral treatment as prevention of HIV transmission: review of scientific evidence and update. *Curr Opin HIV AIDS*.2010. Jul;5(4):298-304.
- Gray RH, Li X, Wawer MJ, Gange SJ, Serwadda D, Sewankambo NK, et al. Stochastic simulation of the impact of antiretroviral therapy and HIV vaccines on HIV transmission; Rakai, Uganda. *AIDS*.2003 Sep 5;17(13):1941-51.
- Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, Sewankambo NK, Serwadda D, Wabwire-Mangen F, et al. Probability of HIV-1 transmission per coital

- act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet*.2001 Apr 14;357(9263):1149-53.
- Greenough TC, Brettler DB, Somasundaran M, Panicali DL, Sullivan JL. Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL), virus load, and CD4 T cell loss: evidence supporting a protective role for CTL in vivo. *J Infect Dis*.1997 Jul;176(1):118-25.
- Gregory SH, Mott S, Phung J, Lee J, Moise L, McMurry JA, et al. Epitope-based vaccination against pneumonic tularemia. *Vaccine*.2009 Aug 27;27(39):5299-306.
- Groot F, van Capel TM, Kapsenberg ML, Berkhout B, de Jong EC. Opposing roles of blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 infection of T cells: transmission facilitation versus replication inhibition. *Blood*.2006 Sep 15;108(6):1957-64.
- Guan P, Doytchinova IA, Zygouri C, Flower DR. MHCpred: bringing a quantitative dimension to the online prediction of MHC binding. *Appl Bioinformatics*.2003;2(1):63-6.
- Guimaraes ML, dos Santos Moreira A, Loureiro R, Galvao-Castro B, Morgado MG. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses*.2002 Nov 20;18(17):1261-9.
- Gupta KK. Acute immunosuppression with HIV seroconversion. *N Engl J Med*.1993 Jan 28;328(4):288-9.
- Haase AT. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nat Rev Immunol*.2005 Oct;5(10):783-92.
- Hammer J, Belunis C, Bolin D, Papadopoulos J, Walsky R, Higelin J, et al. High-affinity binding of short peptides to major histocompatibility complex class II molecules by anchor combinations. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1994 May 10;91(10):4456-60.
- Hansen SG, Vieville C, Whizin N, Coyne-Johnson L, Siess DC, Drummond DD, et al. Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nat Med*.2009 Mar;15(3):293-9.

- Harari A, Petitpierre S, Vallelian F, Pantaleo G. 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*.2004 Feb 1;103(3):966-72.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS*.2006 Oct 24;20(16):W13-23.
- Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann Intern Med*.2001 May 15;134(10):978-96.
- Horsmans Y, Berg T, Desager JP, Mueller T, Schott E, Fletcher SP, et al. Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection. *Hepatology*.2005 Sep;42(3):724-31.
- http://www.who.int/hiv/data/2009_global_summary.gif
- Ishioka GY, Fikes J, Hermanson G, Livingston B, Crimi C, Qin M, et al. Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes. *J Immunol*.1999 Apr 1;162(7):3915-25.
- Iwai LK, Yoshida M, Sidney J, Shikanai-Yasuda MA, Goldberg AC, Juliano MA, et al. In silico prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* frequently recognized in primary peripheral blood mononuclear cell responses from sensitized individuals. *Mol Med*.2003 Sep-Dec;9(9-12):209-19.
- Jin X, Newman MJ, De-Rosa S, Cooper C, Thomas E, Keefer M, et al. 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*.2009 Nov 23;27(50):7080-6.
- Johnston MI, Fauci AS. An HIV vaccine--evolving concepts. *N Engl J Med*.2007 May 17;356(20):2073-81.
- Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*.1998 Jul 2;339(1):33-9.

- Kannanganat S, Ibegbu C, Chennareddi L, Robinson HL, Amara RR. Multiple-cytokine-producing antiviral CD4 T cells are functionally superior to single-cytokine-producing cells. *J Virol.*2007 Aug;81(16):8468-76.
- Kannanganat S, Kapogiannis BG, Ibegbu C, Chennareddi L, Goepfert P, Robinson HL, et al. Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines. *J Virol.*2007 Nov;81(21):12071-6.
- Kantor R, Shafer RW, Katzenstein D. 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.*2005;7(1):71.
- Kates J, Levi J. 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.* 2007 Dec 15;45 Suppl 4:S255-60.
- Kawamura K, Yamamura T, Yokoyama K, Chui DH, Fukui Y, Sasazuki T, et al. Hla-DR2-restricted responses to proteolipid protein 95-116 peptide cause autoimmune encephalitis in transgenic mice. *J Clin Invest.*2000 Apr;105(7):977-84.
- Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science.*2006 Jul 28;313(5786):523-6.
- Khanolkar A, Badovinac VP, Harty JT. CD8 T cell memory development: CD4 T cell help is appreciated. *Immunol Res*2007;39(1-3):94-104.
- Klimas N, Koneru AO, Fletcher MA. Overview of HIV. *Psychosom Med.*2008 Jun;70(5):523-30.
- Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science.*2000 Jun 9;288(5472):1789-96.

- Kottlilil S, Chun TW, Moir S, Liu S, McLaughlin M, Hallahan CW, et al. Innate immunity in human immunodeficiency virus infection: effect of viremia on natural killer cell function. *J Infect Dis.*2003 Apr 1;187(7):1038-45.
- Kottlilil S, Jackson JO, Reitano KN, O'Shea MA, Roby G, Lloyd M, et al. Innate immunity in HIV infection: enhanced susceptibility to CD95-mediated natural killer cell death and turnover induced by HIV viremia. *J Acquir Immune Defic Syndr.*2007 Oct 1;46(2):151-9.
- Kottlilil S, Shin K, Jackson JO, Reitano KN, O'Shea MA, Yang J, et al. Innate immune dysfunction in HIV infection: effect of HIV envelope-NK cell interactions. *J Immunol.*2006 Jan 15;176(2):1107-14.
- Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.*1994 Jul;68(7):4650-5.
- Koup RA. Virus escape from CTL recognition. *J Exp Med.*1994 Sep 1;180(3):779-82.
- Lange CG, Lederman MM, Medvik K, Asaad R, Wild M, Kalayjian R, et al. Nadir CD4+ T-cell count and numbers of CD28+ CD4+ T-cells predict functional responses to immunizations in chronic HIV-1 infection. *AIDS.*2003 Sep 26;17(14):2015-23.
- Lanier LL. On guard--activating NK cell receptors. *Nat Immunol.*2001 Jan;2(1):23-7.
- Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol.*2005 Jun;17(3):326-32.
- Lapenta C, Santini SM, Proietti E, Rizza P, Logozzi M, Spada M, et al. Type I interferon is a powerful inhibitor of in vivo HIV-1 infection and preserves human CD4(+) T cells from virus-induced depletion in SCID mice transplanted with human cells. *Virology.*1999 Oct 10;263(1):78-88.
- Letvin NL, Mascola JR, Sun Y, Gorgone DA, Buzby AP, Xu L, et al. Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. *Science.*2006 Jun 9;312(5779):1530-3.

- Letvin NL. Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat Rev Immunol*.2006 Dec;6(12):930-9.
- Lichterfeld M, Kaufmann DE, Yu XG, Mui SK, Addo MM, Johnston MN, et al. Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells. *J Exp Med*.2004 Sep 20;200(6):701-12.
- Lin HH, Ray S, Tongchusak S, Reinherz EL, Brusic V. Evaluation of MHC class I peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. *BMC Immunol*.2008;9:8.
- Lindback S, Thorstensson R, Karlsson AC, von Sydow M, Flamholz L, Blaxhult A, et al. Diagnosis of primary HIV-1 infection and duration of follow-up after HIV exposure. Karolinska Institute Primary HIV Infection Study Group. *AIDS*.2000 Oct 20;14(15):2333-9.
- Lindenstrom T, Agger EM, Korsholm KS, Darrah PA, Aagaard C, Seder RA, et al. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells. *J Immunol*.2009 Jun 15;182(12):8047-55.
- Little SJ, McLean AR, Spina CA, Richman DD, Havlir DV. Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *J Exp Med*.1999 Sep 20;190(6):841-50.
- Liu J, O'Brien KL, Lynch DM, Simmons NL, La Porte A, Riggs AM, et al. Immune control of an SIV challenge by a T-cell-based vaccine in rhesus monkeys. *Nature*.2009 Jan 1;457(7225):87-91.
- Livingston B, Crimi C, Newman M, Higashimoto Y, Appella E, Sidney J, et al. A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *J Immunol*.2002 Jun 1;168(11):5499-506.
- Lore K, Smed-Sorensen A, Vasudevan J, Mascola JR, Koup RA. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells. *J Exp Med*.2005 Jun 20;201(12):2023-33.
- Mandl JN, Barry AP, Vanderford TH, Kozyr N, Chavan R, Klucking S, et al. Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production

- distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nat Med.*2008 Oct;14(10):1077-87.
- Marcello A. Latency: the hidden HIV-1 challenge. *Retrovirology*2006;3:7.
- Martinez V, Costagliola D, Bonduelle O, N'go N, Schnuriger A, Theodorou I, et al. 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.*2005 Jun 15;191(12):2053-63.
- Martins MA, Wilson NA, Reed JS, Ahn CD, Klimentidis YC, Allison DB, et al. T-cell correlates of vaccine efficacy after a heterologous SIV challenge. *J Virol.*2010 Feb 17.
- Mattapallil JJ, Douek DC, Buckler-White A, Montefiori D, Letvin NL, Nabel GJ, et al. Vaccination preserves CD4 memory T cells during acute simian immunodeficiency virus challenge. *J Exp Med.*2006 Jun 12;203(6):1533-41.
- Mavilio D, Benjamin J, Daucher M, Lombardo G, Kottlil S, Planta MA, et al. Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2003 Dec 9;100(25):15011-6.
- McCutchan FE, Viputtigul K, de Souza MS, Carr JK, Markowitz LE, Buapunth P, et al. Diversity of envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 of recent seroconverters in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses.*2000 May 20;16(8):801-5.
- McElrath MJ, De Rosa SC, Moodie Z, Dubey S, Kierstead L, Janes H, et al. HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet.*2008 Nov 29;372(9653):1894-905.
- McPherson-Baker S, Jones D, Duran RE, Klimas N, Schneiderman N. Development and implementation of a medication adherence training instrument for persons living with HIV: the MATI. *Behav Modif.*2005 Mar;29(2):286-317.
- Megjugorac NJ, Young HA, Amrute SB, Olshalsky SL, Fitzgerald-Bocarsly P. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and

- induce migration of T and NK cells. *J Leukoc Biol.*2004 Mar;75(3):504-14.
- Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.*2004 Sep 20;200(6):761-70.
- Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes MD, et al. 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.*1994 May;10(5):569-76.
- Nabozny GH, Baisch JM, Cheng S, Cosgrove D, Griffiths MM, Luthra HS, et al. HLA-DQ8 transgenic mice are highly susceptible to collagen-induced arthritis: a novel model for human polyarthritis. *J Exp Med.*1996 Jan 1;183(1):27-37.
- Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A. CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature.*2009 Nov 26;462(7272):510-3.
- Nemunaitis J, Meyers T, Senzer N, Cunningham C, West H, Vallieres E, et al. Phase I Trial of sequential administration of recombinant DNA and adenovirus expressing L523S protein in early stage non-small-cell lung cancer. *Mol Ther.*2006 Jun;13(6):1185-91.
- Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T, Peters B, Sette A, Justesen S, et al. Quantitative predictions of peptide binding to any HLA-DR molecule of known sequence: NetMHCIIpan. *PLoS Comput Biol.*2008;4(7):e1000107.
- Novy P, Quigley M, Huang X, Yang Y. CD4 T cells are required for CD8 T cell survival during both primary and memory recall responses. *J Immunol.*2007 Dec 15;179(12):8243-51.
- Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science.*1998 Mar 27;279(5359):2103-6.

- Pan S, Trejo T, Hansen J, Smart M, David CS. HLA-DR4 (DRB1*0401) transgenic mice expressing an altered CD4-binding site: specificity and magnitude of DR4-restricted T cell response. *J Immunol.*1998 Sep 15;161(6):2925-9.
- Pancre V, Delhem N, Yazdanpanah Y, Delanoye A, Delacre M, Depil S, et al. Presence of HIV-1 Nef specific CD4 T cell response is associated with non-progression in HIV-1 infection. *Vaccine.*2007 Aug 1;25(31):5927-37.
- Panel on Antiretroviral Guidelines for Adult and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services, January 29, 2008, pp 1–128.
- Panigada M, Sturniolo T, Besozzi G, Bocchieri MG, Sinigaglia F, Grassi GG, et al. Identification of a promiscuous T-cell epitope in *Mycobacterium tuberculosis* Mce proteins. *Infect Immun.*2002 Jan;70(1):79-85.
- Patterson S, Knight SC. Susceptibility of human peripheral blood dendritic cells to infection by human immunodeficiency virus. *J Gen Virol.*1987 Apr;68 (Pt 4):1177-81.
- Patterson S, Rae A, Hockey N, Gilmour J, Gotch F. Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J Virol.*2001 Jul;75(14):6710-3.
- Peeters M, Cournaud V, Abela B, Auzel P, Pourrut X, Bibollet-Ruche F, et al. Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat. *Emerg Infect Dis.*2002 May;8(5):451-7.
- Peeters M, Piot P, van der Groen G. Variability among HIV and SIV strains of African origin. *AIDS.*1991;5 Suppl 1:S29-36.
- Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, Heyward W, Martin M, van Griensven F, et al. 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.*2006 Dec 15;194(12):1661-71.

- Plata F, Autran B, Martins LP, Wain-Hobson S, Raphael M, Mayaud C, et al. AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. *Nature*.1987 Jul 23-29;328(6128):348-51.
- PN-DST/AIDS. Boletim Epidemiológico - Aids e DST. 2009.
- Potter SJ, Lacabartz C, Lambotte O, Perez-Patrigion S, Vingert B, Sinet M, et al. Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *J Virol*.2007 Dec;81(24):13904-15.
- Potts KE, Kalish ML, Bandea CI, Orloff GM, St Louis M, Brown C, et al. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 strains in Kinshasa, Zaire. *AIDS Res Hum Retroviruses*.1993 Jul;9(7):613-8.
- Precopio ML, Betts MR, Parrino J, Price DA, Gostick E, Ambrozak DR, et al. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med*.2007 Jun 11;204(6):1405-16.
- Price DA, Goulder PJ, Klenerman P, Sewell AK, Easterbrook PJ, Troop M, et al. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1997 Mar 4;94(5):1890-5.
- Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F, et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med*.2000 Mar 30;342(13):921-9.
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*.1999 Nov;50(3-4):213-9.
- Reche PA, Glutting JP, Reinherz EL. Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs. *Hum Immunol*.2002 Sep;63(9):701-9.
- Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med*.2009 Dec 3;361(23):2209-20.

- Restifo NP, Bacik I, Irvine KR, Yewdell JW, McCabe BJ, Anderson RW, et al. Antigen processing in vivo and the elicitation of primary CTL responses. *J Immunol*.1995 May 1;154(9):4414-22.
- Roge BT, Barfod TS, Kirk O, Katzenstein TL, Obel N, Nielsen H, et al. Resistance profiles and adherence at primary virological failure in three different highly active antiretroviral therapy regimens: analysis of failure rates in a randomized study. *HIV Med*.2004 Sep;5(5):344-51.
- Rosa DS, Iwai LK, Tzelepis F, Bargieri DY, Medeiros MA, Soares IS, et al. Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). *Microbes Infect*.2006 Jul;8(8):2130-7.
- Rosa DS, Ribeiro SP, Cunha-Neto E. CD4+ T cell epitope discovery and rational vaccine design. *Arch Immunol Ther Exp*.2010;In press.
- Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, et al. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*.1997 Nov 21;278(5342):1447-50.
- Rosenberg YJ, Anderson AO, Pabst R. HIV-induced decline in blood CD4/CD8 ratios: viral killing or altered lymphocyte trafficking? *Immunol Today*.1998 Jan;19(1):10-7.
- Sacha JB, Giraldo-Vela JP, Buechler MB, Martins MA, Maness NJ, Chung C, et al. 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*.2009 Jun 16;106(24):9791-6.
- Saksena NK, Rodes B, Wang B, Soriano V. Elite HIV controllers: myth or reality? *AIDS Rev*2007 Oct-Dec;9(4):195-207.
- Salemi M, Strimmer K, Hall WW, Duffy M, Delaporte E, Mboup S, et al. 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*.2001 Feb;15(2):276-8.
- Schmidt B, Scott I, Whitmore RG, Foster H, Fujimura S, Schmitz J, et al. Low-level HIV infection of plasmacytoid dendritic cells: onset of

- cytopathic effects and cell death after PDC maturation. *Virology*.2004 Nov 24;329(2):280-8.
- Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science*.1999 Feb 5;283(5403):857-60.
- Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*.2008 Apr;8(4):247-58.
- Sekaly RP. The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med*.2008 Jan 21;205(1):7-12.
- Sharp PM, Bailes E, Robertson DL, Gao F, Hahn BH. Origins and evolution of AIDS viruses. *Biol Bull*.1999 Jun;196(3):338-42.
- Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science*.2003 Apr 11;300(5617):337-9.
- Shirazi Y, Pitha PM. Alpha interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type 1 replication cycle. *J Virol*.1992 Mar;66(3):1321-8.
- Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet*.2006 Aug 5;368(9534):489-504.
- Smith JA, Daniel R. Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses. *ACS Chem Biol*.2006 May 23;1(4):217-26.
- Soumelis V, Scott I, Gheyas F, Bouhour D, Cozon G, Cotte L, et al. Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood*.2001 Aug 15;98(4):906-12.
- Stamatatos L, Morris L, Burton DR, Mascola JR. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat Med*.2009 Aug;15(8):866-70.
- Stankov MV, Behrens GM. HIV-therapy associated lipodystrophy: experimental and clinical evidence for the pathogenesis and treatment. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*.2007 Dec;7(4):237-49.

- Sterne JA, May M, Costagliola D, de Wolf F, Phillips AN, Harris R, et al. Timing of initiation of antiretroviral therapy in AIDS-free HIV-1-infected patients: a collaborative analysis of 18 HIV cohort studies. *Lancet*.2009 Apr 18;373(9672):1352-63.
- Sturniolo T, Bono E, Ding J, Radrizzani L, Tuereci O, Sahin U, et al. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol*.1999 Jun;17(6):555-61.
- Suhrbier A. Polytope vaccines for the codelivery of multiple CD8 T-cell epitopes. *Expert Rev Vaccines*.2002 Aug;1(2):207-13.
- Tebit DM, Nankya I, Arts EJ, Gao Y. HIV diversity, recombination and disease progression: how does fitness "fit" into the puzzle? *AIDS Rev*.2007 Apr-Jun;9(2):75-87.
- Tenzer S, Wee E, Burgevin A, Stewart-Jones G, Friis L, Lamberth K, et al. Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance. *Nat Immunol*.2009 Jun;10(6):636-46.
- Torres-Madriz G, Lerner D, Ruthazer R, Rogers WH, Wilson IB. Work-related Barriers and Facilitators to Antiretroviral Therapy Adherence in Persons Living with HIV Infection. *AIDS*. 2010. Behav Jan 21.
- Torres-Madriz G, Lerner D, Ruthazer R, Rogers WH, Wilson IB. Work-related Barriers and Facilitators to Antiretroviral Therapy Adherence in Persons Living with HIV Infection. *AIDS Behav*.2010.
- Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*.1989;47:187-376.
- Trumpfheller C, Finke JS, Lopez CB, Moran TM, Moltedo B, Soares H, et al. Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med*.2006 Mar 20;203(3):607-17.
- UNAIDS. AIDS Epidemic update: November 2009.
- Vaccari M, Boasso A, Ma ZM, Cecchinato V, Venzon D, Doster MN, et al. CD4+ T-cell loss and delayed expression of modulators of immune responses at mucosal sites of vaccinated macaques following SIV(mac251) infection. *Mucosal Immunol*.2008 Nov;1(6):497-507.

- Vaccari M, Mattapallil J, Song K, Tsai WP, Hryniewicz A, Venzon D, et al. Reduced protection from simian immunodeficiency virus SIVmac251 infection afforded by memory CD8⁺ T cells induced by vaccination during CD4⁺ T-cell deficiency. *J Virol*.2008 Oct;82(19):9629-38.
- Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, et al. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature*.2006. Nov 9;444(7116):164.
- Vieillard V, Jouvesshomme S, Leflour N, Jean-Pierre E, Debre P, De Maeyer E, et al. Transfer of human CD4(+) T lymphocytes producing beta interferon in Hu-PBL-SCID mice controls human immunodeficiency virus infection. *J Virol*.1999 Dec;73(12):10281-8.
- Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, Paradis TJ, Flynn T, Durno AG, et al. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature*.1987 Jul 23-29;328(6128):345-8.
- Wang M, Tang ST, Lund O, Dziegiel MH, Buus S, Claesson MH. 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*.2009 Mar;155(3):441-6.
- Wang P, Sidney J, Dow C, Mothe B, Sette A, Peters B. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput Biol*.2008 Apr;4(4):e1000048.
- Watkins DI, Burton DR, Kallas EG, Moore JP, Koff WC. Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat Med*.2008 Jun;14(6):617-21.
- Watkins DI. The hope for an HIV vaccine based on induction of CD8⁺ T lymphocytes--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.2008 Mar;103(2):119-29.
- Wawer MJ, Gray RH, Sewankambo NK, Serwadda D, Li X, Laeyendecker O, et al. Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. *J Infect Dis*.2005 May 1;191(9):1403-9.
- Weber B. Screening of HIV infection: role of molecular and immunological assays. *Expert Rev Mol Diagn*.2006 May;6(3):399-411.

- WHO. World Health Organization. Towards universal access: scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector; 2008. http://www.who.int/hiv/pub/towards_universal_access_report_2008.pdf. Yearly WHO report that describes global progress toward Universal Access.
- Wilson DB, Wilson DH, Schroder K, Pinilla C, Blondelle S, Houghten RA, et al. Specificity and degeneracy of T cells. *Mol Immunol*.2004 Feb;40(14-15):1047-55.
- Wilson NA, Keele BF, Reed JS, Piaskowski SM, MacNair CE, Bett AJ, et al. Vaccine-induced cellular responses control simian immunodeficiency virus replication after heterologous challenge. *J Virol*.2009 Jul;83(13):6508-21.
- Wong FS, Wen L. What can the HLA transgenic mouse tell us about autoimmune diabetes? *Diabetologia*.2004 Sep;47(9):1476-87.
- Woodman Z, Williamson C. HIV molecular epidemiology: transmission and adaptation to human populations. *Curr Opin HIV AIDS*.2009 Jul;4(4):247-52.
- Wu CC, Hayashi T, Takabayashi K, Sabet M, Smee DF, Guiney DD, et al. Immunotherapeutic activity of a conjugate of a Toll-like receptor 7 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*.2007 Mar 6;104(10):3990-5.
- Yang X, Yu X. An introduction to epitope prediction methods and software. *Rev Med Virol*.2009 Mar;19(2):77-96.
- Yusim K, Peeters M, Pybus OG, Bhattacharya T, Delaporte E, Mulanga C, et al. Using human immunodeficiency virus type 1 sequences to infer historical features of the acquired immune deficiency syndrome epidemic and human immunodeficiency virus evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*.2001 Jun 29;356(1410):855-66.
- Zhang GL, Srinivasan KN, Veeramani A, August JT, Brusic V. PRED-BALB/c: a system for the prediction of peptide binding to H2d molecules, a haplotype of the BALB/c mouse. *Nucleic Acids Res*.2005 Jul 1;33(Web Server issue):W180-3.
- Zhang S, Zhang H, Zhao J. The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochem Biophys Res Commun*.2009 Jul 10;384(4):405-8.

- Zheng YH, Lovsin N, Peterlin BM. Newly identified host factors modulate HIV replication. *Immunol Lett* 2005 Mar 15;97(2):225-34.
- Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, Ho DD. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*. 1998 Feb 5;391(6667):594-7.

9. PUBLICAÇÕES

A Vaccine Encoding Conserved Promiscuous HIV CD4 Epitopes Induces Broad T Cell Responses in Mice Transgenic to Multiple Common HLA Class II Molecules

Susan Pereira Ribeiro^{1,3*}, Daniela Santoro Rosa^{1,3*}, Simone Gonçalves Fonseca^{1,2}, Eliane Conti Mairena^{2,3}, Edilberto Postól^{2,3}, Sergio Costa Oliveira⁴, Luiza Guilherme^{2,3}, Jorge Kalil^{1,2,3}, Edecio Cunha-Neto^{1,2,3*}

1 Laboratory of Clinical Immunology and Allergy-LIM60, Division of Clinical Immunology and Allergy, Department of Medicine, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil, **2** Heart Institute (InCor), University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil, **3** Institute for Investigation in Immunology-INCT, São Paulo, Brazil, **4** Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Abstract

Current HIV vaccine approaches are focused on immunogens encoding whole HIV antigenic proteins that mainly elicit cytotoxic CD8+ responses. Mounting evidence points toward a critical role for CD4+ T cells in the control of immunodeficiency virus replication, probably due to cognate help. Vaccine-induced CD4+ T cell responses might, therefore, have a protective effect in HIV replication. In addition, successful vaccines may have to elicit responses to multiple epitopes in a high proportion of vaccinees, to match the highly variable circulating strains of HIV. Using rational vaccine design, we developed a DNA vaccine encoding 18 algorithm-selected conserved, “promiscuous” (multiple HLA-DR-binding) B-subtype HIV CD4 epitopes - previously found to be frequently recognized by HIV-infected patients. We assessed the ability of the vaccine to induce broad T cell responses in the context of multiple HLA class II molecules using different strains of HLA class II-transgenic mice (-DR2, -DR4, -DQ6 and -DQ8). Mice displayed CD4+ and CD8+ T cell responses of significant breadth and magnitude, and 16 out of the 18 encoded epitopes were recognized. By virtue of inducing broad responses against conserved CD4+ T cell epitopes that can be recognized in the context of widely diverse, common HLA class II alleles, this vaccine concept may cope both with HIV genetic variability and increased population coverage. The vaccine may thus be a source of cognate help for HIV-specific CD8+ T cells elicited by conventional immunogens, in a wide proportion of vaccinees.

Citation: Ribeiro SP, Rosa DS, Fonseca SG, Mairena EC, Postól 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(6): e11072. doi:10.1371/journal.pone.0011072

Editor: Mario A. Ostrowski, University of Toronto, Canada

Received: March 18, 2010; **Accepted:** May 19, 2010; **Published:** June 11, 2010

Copyright: © 2010 Ribeiro et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq), São Paulo State Research Funding Agency (FAPESP), International Centre of Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) and from the Brazilian Ministry of Health (Brazil). S. P. Ribeiro and D. S. Rosa are recipients of a São Paulo State Research Funding Agency (FAPESP) fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist. The International Centre of Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) is a non-profit organization related to the UNESCO which funds basic research in developing and middle-income countries. There are no links (employment, consultancy, patents, products in development or marketed products) between the authors and the ICGEB that may alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials. The use of the peptide combination for vaccination purposes, among others, has been patented (international application number PCT/BR2006/000175).

* E-mail: edecunha@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Given the proportions of the AIDS pandemic, development of an effective vaccine against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) remains one of the most important biomedical research priorities. Only three vaccine concepts have completed clinical efficacy studies so far, with two negative results (Env gp 120 vaccine -AIDSVAX; recombinant Adenovirus 5 HIV-1 gag/pol/nef trivalent vaccine -STEP trial [1]), and one showing borderline efficacy, with no effect on HIV-1 viral load (recombinant canarypox ALVAC (gp120/Gag/Protease) prime - gp120 protein boost - ALVAC-AIDSVAX) [2].

Vaccination regimens that induced cell-mediated immunity were shown to significantly reduce simian immunodeficiency virus

(SIV) replication in non-human primates [3], [4], [5]. Therefore, most of the HIV-1 vaccine field is currently focused on development of vaccines that elicit potent cytotoxic CD8+ responses. The lack of efficacy of the recently studied STEP trial of the Adenovirus 5 HIV-1 gag/pol/nef trivalent vaccine [6] may have been related to the narrowness of the induced T cell response – on average, only one epitope was recognized per HIV-1 gene product in each vaccinee [7]. Recent evidence from the SIV infected macaque model show that heterozygote animals, which carry more MHC molecules and present a broader T cell response, display better control of viral load than their homozygote counterparts [8]. It has thus been argued that the development of novel vaccine strategies that elicit a greater epitope breadth, matching T cell responses to circulating HIV strains, is a

critical step to improve effectiveness of a vaccine against the highly variable HIV-1 [7]. In addition, 30% and 60% of vaccinees in the STEP trial failed to display CD8+ and CD4+ T cell responses to HIV epitopes, respectively [9]. Regarding the ALVAC-AIDSVAX trial, no CD8+ T cell responses were detected among the vaccinees, and 66% of them failed to display CD4+ T cell responses to gp120 [2]. Thus, vaccines tested in recent efficacy trials failed to induce CD8+ and especially CD4+ T cell responses in a significant proportion of vaccinees. The lack of population coverage may thus have been another cause of the insufficient results of the trials. Thus, innovative vaccine antigen design and immunogen formulation is needed in order to develop a vaccine able to induce broad immune responses in the majority of vaccinees. One possible way to increase the breadth of the response would be to include most or all of the HIV-1 proteome into a viral vector [5]. However, most viral vectors pose constraints on insert size, and developing such a vaccine for large-scale use could be technically challenging or impractical. On the other hand, epitope-based vaccines combine multiple T cell epitopes assembled in tandem, and can focus the immune response on any chosen group of epitopes (e. g. conserved and highly antigenic), generating much smaller insert sizes. Every single epitope can be immunogenic in multiple epitope-based vaccines; in addition, they have been reported to generate broad and potent immune responses [10], [11], [12], [13], [14]. By eliminating epitope flanking regions, epitope vaccines are also devoid of mutations that impair antigen processing and presentation, which may have accumulated in the flanking regions along viral evolution [15].

In spite of the abundant evidence that cytotoxic CD8+ T lymphocytes are the primary anti-HIV-1 effectors [16], several studies have shown that a strong specific CD4+ T-cell response is associated with control of viral replication and long-term nonprogression to AIDS [17], [18], [19], [20]. It has been shown that specific CD4+ T cells play a major role in the generation of a CD8+ cytotoxic T cell response and neutralizing antibodies, able to control viral replication [21], [22], [23]. Furthermore, CD4+ T cells contribute to T cell vaccine-induced protection in SIV-infected primates [24], [25]. Protective mechanisms include cognate help for functional CD8+ T cell memory [26], [27], mobilization of effector CD8+ T cells to peripheral sites of infection [28], and inhibition of SIV replication in infected macrophages [29]. In addition, virus-specific CD4+ T cells may be able to tolerate more sequence diversity in their target epitopes than CD8+ T cells, therefore being more resistant to mutational escape [30]. It follows that deliberate inclusion of HIV-1 CD4+ T cell epitopes in HIV-1 immunogens, to provide cognate help and boost CD8+ T cell responses, might be a desirable approach for prophylactic T cell vaccines.

With the aid of the TEPITOPE algorithm [31], our group has previously identified a set of 18 conserved CD4+ T-cell epitopes, derived from HIV-1 subtype B consensus whole proteome, capable of binding to multiple HLA-DR molecules [32]. The 18 peptides were recognized, and PBMC (peripheral blood mononuclear cells) from over 90% of HIV-1-infected patients displayed IFN- γ ELISPOT responses to the peptides; each patient recognized on average 5 peptides, including both CD4+ and CD8+ T cell responses [32]. A vaccine encoding multiple conserved epitopes may increase crossreactivity between different HIV strains, possibly circumventing HIV-1 genetic variability [1]. Furthermore, one would expect that a vaccine built with multiple “promiscuous” peptides, capable to bind to several HLA class II molecules could lead to an increased coverage of the genetically heterozygous human population. Since essentially all HLA class II molecules tested were shown to bind to multiple promiscuous

HIV-1 epitopes [32], it is expected that most individuals could develop broad T cell responses. We thus hypothesized that an immunogen containing such a set of 18 conserved, highly promiscuous, immunodominant epitopes from 8 different HIV-1 proteins could potentially elicit a broad T cell response in a high proportion of individuals bearing distinct HLA class II molecules. In order to test our hypothesis, we designed a DNA vaccine encoding the 18 described HIV-1 epitopes. To assess its immunogenicity, we used four mouse strains transgenic to common HLA class II molecules (HLA-DR2, -DR4, -DQ6, -DQ8 present in 35–50% of the population), as a preclinical rodent model of the HLA class II diversity found in humans [33], [34], [35]. It has been reported that HLA class II-transgenic mice are able to develop CD4+ T cell responses to the same HLA-restricted epitopes recognized by humans carrying the same HLA class II molecule [36], [37]. Broad T cell responses were observed in all strains, covering 16 out of the 18 epitopes encoded by the DNA vaccine. We observed multiple CD4+ T cell responses restricted by several HLA-DR and -HLA-DQ molecules, as well as CD8+ T cell responses restricted to murine class I MHC. We believe this vaccine design may be potentially useful as a source of cognate T cell help to CD8+ T cell responses in novel HIV-1 vaccine candidates.

Results

The HIVBr18 vaccine is immunogenic and induces significant HIV-specific cytokine and proliferative T cell responses in HLA class II transgenic strains of mice

To assess the magnitude and coverage of the peptide-specific response induced by the HIVBr18 vaccine in mouse strains transgenic to HLA-DR2, -DR4, -DQ6 and -DQ8, we analyzed T cell proliferation and cytokine production against pooled HIV-1 peptides. Using the CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, Molecular Probes) - based proliferation assay, we observed significant peptide-specific proliferation of both CD4+ and CD8+ splenic T cells derived from HIVBr18-immunized mice. Figure 1 depicts a representative experiment, using the DR4-transgenic strain. All four HLA class II-transgenic strains of mice presented positive proliferative responses against pooled HIV-1 peptides in splenic CD4+ T cells (Figure 2A), while strong specific CD8+ T cell responses were essentially detected only in -DR2- and DR4-Tg mice (Figure 2B). Mice from all four HLA class II-transgenic strains were able to secrete IFN- γ against pooled HIV-1 peptides as measured by ELISPOT (Figure 2C). In contrast, splenocytes from mice immunized with pVAX1 presented negligible numbers of IFN- γ secreting cells.

Broad specific CD4+ and CD8+ T cell responses following immunization HIVBr18 in HLA class II transgenic mice

To determine whether this vaccine concept would be able to induce a broad specific immune response, splenocytes from immunized mice were incubated with each of the 18 individual HIV-1 peptides encoded by the DNA vaccine (Table S1). Immunization with HIVBr18 elicited significant numbers of IFN- γ secreting cells directed to different vaccine-encoded epitopes in HLA-DR2, -DR4, -DQ6 and -DQ8 transgenic mice, which recognized 5, 4, 10 and 1 peptides, respectively (Figures 3 A, B, C and D, respectively). Of note, the epitope p17 (73–89) induced IFN- γ secretion by spleen cells from all transgenic strains. We also evaluated the proliferative T cell responses of immunized HLA class II transgenic mice against the 18 individual peptides. Splenocytes from immunized HLA-DR2, -DR4, -DQ6 and -DQ8 transgenic mice also displayed CD4+ T cell responses to different

Figure 1. Immunization with HIVBr18 induces significant CD4+ and CD8+ T cell proliferation against pooled HIV peptides. Two weeks after the last immunization with HIVBr18, spleen cells from a HLA-DR4 mouse were labeled with CFSE (1.25 μ M) and cultured for 5 days in the presence of 5 μ M of 18 pooled HIV-1 peptides. Cells were analyzed by flow cytometry and CFSE^{low} cells on gated CD3+CD4+ or CD3+CD8+ was used as a readout for antigen-specific proliferation. Representative dot plots of CD4+ (left) and CD8+ (right) T cell proliferation (%CFSE^{low} cells) of splenocytes stimulated with medium or pooled peptides from HIVBr18 immunized mice.
doi:10.1371/journal.pone.0011072.g001

vaccine-encoded epitopes (1, 6, 11 and 0 peptides were recognized, respectively) (Table 1). Several such responses were shared between different HLA class II-transgenic mouse strains. CD8+ T cell responses, on the other hand, were less frequent among immunized HLA-DR2, -DR4, -DQ6 and DQ8 transgenic mice (4, 2, 0 and 1 peptides, respectively) (Table 2). Taken together, HLA class II transgenic mice displayed CD4+ and CD8+ T cell responses to 11 and 6 epitopes, respectively.

In summary, immunization with HIVBr18 was able to induce multiple T cell responses in all 4 HLA class II-transgenic mouse strains tested, against 16 out of the 18 epitopes encoded by the vaccine (Figure 4). Significantly, 11 peptides were recognized by proliferating CD4+ T cells, some of them being recognized by several HLA class II transgenic strains of mice.

Discussion

In this report, we have developed a DNA vaccine encoding 18 conserved, multiple HLA-DR-binding HIV-1 CD4+ T cell

epitopes frequently recognized by HIV-1-infected patients. The HIVBr18 vaccine was immunogenic in four mouse strains transgenic to the common HLA class II molecules HLA-DR2, -DR4, -DQ6 and -DQ8. Moreover, vaccination with HIVBr18 induced broad MHC class II-restricted T cell responses in the HLA class II-transgenic strains of mice, and 16 out of the 18 encoded epitopes could be recognized. Indeed, recent clinical trials of T cell-based HIV vaccines [9] strongly suggested that induction of broad immune responses towards conserved epitopes, in the majority of the genetically heterogeneous vaccinees, may be an essential pre-requisite for novel vaccine candidates [38], [39]. Vaccination of non-human primates with an Adenovirus 5 vaccine encoding 8 SIV proteins and devoid of Env caused a significant reduction in viral load after heterologous challenge [5], and induced broad CD4+ and CD8+ T cell responses. The breadth of pre-challenge SIV-specific T-cell responses correlated with lower viral loads and higher CD4+ lymphocyte counts [40].

An effective T cell vaccine should also have significant population coverage, given the extensive HLA polymorphism

Figure 2. Immunization with HIVBr18 induces responses in human HLA- class II transgenic mice. Splenocytes derived from -DR2, -DR4, -DQ6 and -DQ8 transgenic mice immunized with HIVBr18 or the pVAX1 vector alone were cultured with pooled HIV-1 peptides. Proliferation of CFSE- labeled CD3⁺CD4⁺ (A) and CD3⁺CD8⁺ (B) T cells from transgenic mice. The stimulation index was calculated by the fold increase between stimulated versus unstimulated cell cultures. (C) IFN- γ production by T cells from HIVBr18- (black bars) or pVAX1- (white bars) immunized mice. HLA class II-transgenic mouse strains are indicated in X axis.

doi:10.1371/journal.pone.0011072.g002

observed in human populations. In an epitope-based vaccine, one way to ensure maximum coverage is to include multiple epitopes where each one could bind to multiple HLA molecules. The TEPITOPE prediction algorithm has been successfully applied to the identification of multiple HLA-DR-binding, “promiscuous” T

cell epitopes in the context of several human infectious, allergic and autoimmune diseases [41], [42], [43], [44]. A significant correlation was observed between the TEPITOPE-predicted promiscuity (ie the number of HLA-DR molecules predicted to bind to a certain peptide) and the number of HLA-DR molecules that could actually bind the peptide in biochemical assays [45]. In the conserved HIV-1 peptide set identified by our group and encoded by the HIVBr18 vaccine, each peptide could bind on average to 50% of the 9 common HLA-DR specificities tested. Conversely, most HLA-DR molecules bound to at least 10 of the peptides, indicating that an individual bearing at least one such HLA-DR molecule could develop broad CD4⁺ T cell responses against the HIV-1 peptide set [32]. Concerning the 6 peptides that elicited IFN- γ secretion or CD4⁺ T cell proliferative responses in HLA-DR2 (DRB1*1501) transgenic mice, we observed that all of them were also recognized by one or more of the 5 HLA-matched HIV-1-infected individuals tested; all 6 peptides presented binding capacity to the HLA DRB1*1501 molecule (data not shown [32]) (Table S2). Regarding the 7 peptides that elicited IFN- γ secretion or CD4⁺ T cell proliferative responses in HLA-DR4 transgenic mice, we observed that 3 were also recognized by the single HLA-DR4 HIV-1-infected individual tested [32] (Table S3).

The promiscuity of HLA class II binding of TEPITOPE-selected peptides may extend beyond the limited number of molecules in the prediction matrix. This is suggested by the cross-species recognition of TEPITOPE-selected peptides [45], indicating that the algorithm may select for peptides that share MHC class II binding motifs similar to many other human and non-human MHC class II molecules [31]. This may explain why so many HIV-1 infected patients and, in the present case, mice transgenic to HLA-DQ6 and -DQ8, HLA class II alleles whose binding is not predicted by the TEPITOPE algorithm, also displayed broad T cell responses to the selected HIV-1 peptide set. In addition, all TEPITOPE-selected HIV-1 peptides were predicted to bind to H-2^d class II molecules, and immunization of BALB/c (H-2^d) mice with HIVBr18 also induced broad specific T cell responses to predicted peptides (unpublished observations).

The fact that each HLA class II transgenic strain recognized a different set of CD4 epitopes after immunization with HIVBr18 is in line with MHC class II-restricted recognition. Further in support of this, the fact that all peptides recognized by HLA-DR2(DRB1*1501)-transgenic mice were also recognized by at least one of the 5 tested HLA-DR15 HIV-1 infected patients [32] indicates that findings in HLA class II-transgenic mice accurately translates human responses (Table S2). The recognition of additional epitopes by some patients could possibly be explained by the expression of other HLA-DR, -DQ and -DP molecules in these individuals, contrasting to transgenic mice that carry only one HLA class II allele. In the case of HLA-DR4-transgenic mice, the fact that only 3 out of 7 recognized epitopes matched human responses is probably due to the fact that only a single HLA-DR4 HIV-1 infected patient was tested [32] (Table S3). Our finding that HLA class II transgenic strains could recognize up to 11 CD4⁺ T cell epitopes further indicates the ability of HIVBr18 to induce broad responses in the context of multiple HLA class II molecules. Considering that each HLA class II-transgenic strain only expresses one, rather than the 3–8 distinct class II specificities found in different HLA-DR, -DQ and -DP haplotypes carried by humans; and the inefficient binding of HLA class II molecules with the murine CD4 molecule [46], our results indicate that the breadth and magnitude of the CD4⁺ T cell response to the HIVBr18 immunogen may be even higher in humans. We observed that approximately 80% of mice from HLA-DR2, -DR4 and -DQ6 transgenic strains responded to the vaccination regimen, while

A **B** **C** **D**

Figure 3. Immunization with HIVBr18 induces IFN- γ secretion against multiple epitopes in human HLA class II transgenic mice. Two weeks after the last immunization with HIVBr18 or the empty pVAX1 vector, splenocytes derived from individual HLA-DR2 (A), -DR4 (B), -DQ6 (C) and -DQ8 (D) transgenic mice (6 per group) were cultured with individual HIV-1 peptides overnight. IFN- γ production was measured by ELISPOT assay. HIV peptide-specific cellular immune responses from human HLA class II- transgenic mice that responded to the immunization are displayed. SFU, spot-forming units. Cutoff = 10 SFU/10⁶ cells and is represented by the dotted line. (SFU from pVAX1-immunized group were always below 5 SFU/10⁶ cells). doi:10.1371/journal.pone.0011072.g003

only 30% of vaccinated HLA-DQ8 transgenic mice presented any response (data not shown). This may be due to qualitatively different levels of HLA class II expression. Regarding CD8+ T cell recognition of murine MHC class I-restricted peptides, it should be noticed that each HLA class II transgenic strain was backcrossed to mouse strains with distinct H-2 class I backgrounds [47], [48], [49]. Our data confirmed the ability of the HIVBr18 immunization strategy in inducing broad HIV-1-specific proliferative and cytokine T cell responses in all HLA-DR and -DQ transgenic strains of mice tested. We observed T cell recognition of 16 out of the 18 epitopes encoded by the vaccine, thus showing that nearly all epitopes in HIVBr18 were adequately processed and presented. This implies that, on average, each strain of mice recognized epitopes corresponding to ca. 50% of the length of the insert encoded by HIVBr18. This is higher than the epitope coverage from conventional whole gene/protein HIV-1 vaccines. Although we used a CD4+ epitope-based DNA vaccine, we could also detect CD8+ T cell responses. This is not unexpected, since

78% of HIV-1 infected patients displayed CD8+ T cell responses to the pooled HIV-1 peptides, usually coexisting with CD4+ T cell responses [32]. Furthermore, 9 out of the 18 peptides contain known human or murine MHC class I-restricted CD8 epitopes [50]. To our knowledge, this is the first report of using multiple HLA class II transgenic strains of mice as a model to probe immunogenicity and HLA class II-restricted T cell responses elicited by a vaccine against an infectious disease. Data suggest that immunization with HIVBr18 might provide significant coverage of the genetically heterogeneous human population.

The significant HIV-1- specific proliferative CD4+ T cell responses in immunized mice was indicative of the magnitude of the T helper activity elicited by HIVBr18. In spite of the abundant evidence that cytotoxic CD8+ T lymphocytes (CTL) are the primary anti-HIV-1 effectors [16], a significant amount of information supports a protective role of specific CD4+ responses in HIV-1/SIV and other viral infections. Early HIV-1 specific CD4+ T cell responses were associated with slower progression in HIV-1 infection [19], [20]. Elite controller SIV-infected macaques mount broad CD4+-specific T cell responses, and certain macaque

Table 1. Immunization with HIVBr18 induces CD4+ T cell proliferation in human HLA- class II transgenic mice.

Stimulus	DR2	DR4	DQ6	DQ8
p17(73–89)		0.86	1.72	
p24(33–45)				
p24 (131–150)				
p6(32–46)			1.57	
pol (63–77)	0.40		1.64	
pol (136–150)	0.13		3.27	
pol (785–799)			2.54	
gp41(261–276)				
gp160(19–31)	0.35		1.42	
gp160(174–185)			1.35	
gp160(188–201)	0.31		4.33	
gp160(481–498)				
rev (11–27)			1.42	
vpr (58–72)				
vpr (65–82)				
vif (144–158)			3.24	
vpu (6–20)				
nef (180–194)	14.17	2.00	1.46	
cutoff	6.89	0.10	1.21	2.40
recognized peptides	1	6	11	0

Quantitative analysis of proliferating CD4⁺ T cells (gated on CD3⁺CD4⁺ CFSE^{low} cells) from HIVBr18 immunized transgenic mice. Proliferative responses measured 15 days after immunization. Only proliferative (%CFSE^{low}) responses above cutoff are shown. Cutoff values for each transgenic strain are shown in the table. % CFSE^{low} cell values were calculated after subtraction of % CFSE^{low} cells in unstimulated cultures. Since we observed different background values in the CFSE assay among each mouse strain, individual cutoffs were established to distinguish the random noise from the true proliferation values. The nonspecific proliferative response was found to be from 0.10% to 6.89%. doi:10.1371/journal.pone.0011072.t001

Table 2. Immunization with HIVBr18 induces CD8+ T cell proliferation in human HLA- class II transgenic mice.

Stimulus	DR2	DR4	DQ6	DQ8
p17(73–89)				
p24(33–45)				0.87
p24 (131–150)				
p6(32–46)				
pol (63–77)				
pol (136–150)	7.94	6.94		
pol (785–799)	8.82			
gp41(261–276)		2.4		
gp160(19–31)	8.33			
gp160(174–185)	12.42			
gp160(188–201)				
gp160(481–498)				
rev (11–27)				
vpr (58–72)				
vpr (65–82)				
vif (144–158)				
vpu (6–20)				
nef (180–194)				
cutoff	7.29	0.01	12.60	0.59
recognized peptides	4	2	0	1

Quantitative analysis of proliferating CD8⁺ T cells (gated on CD3⁺CD8⁺ CFSE^{low} cells) from HIVBr18 immunized transgenic mice. Proliferative responses measured 15 days after immunization. Only proliferative (%CFSE^{low}) responses above cutoff are shown. Cutoff values for each transgenic strain are shown in the table. For cutoff value calculation, see Table 1. The nonspecific proliferative response was found to be from 0.01% to 12.60%. doi:10.1371/journal.pone.0011072.t002

Figure 4. Number of recognized epitopes by spleen cells from HIVBr18 immunized HLA-DR2, -DR4, -DQ6 and -DQ8 transgenic mice. Overall peptide-specific responses observed with IFN- γ ELISPOT, CD4+ and CD8+ T cell proliferation assays in each HLA-transgenic mouse strain are depicted.
doi:10.1371/journal.pone.0011072.g004

class II alleles are associated with significantly decreased viral loads [51]. Vaccination with the attenuated virus SIVmac239 Δ Nef [52] or an 8-valent SIV Adenovirus 5 vaccine [5] both induce broad, high frequency CD4+ T cell responses and protect against pathogenic SIV challenge. Significantly, CD4+ T cell depletion in Rhesus macaques reduced the vaccine-induced protective effect against SIV challenge [53]. Some vaccine approaches have been especially designed to induce HIV-specific CD4+ T cells. An anti-DEC205-HIV-1 gag fusion mAb induced a CD4+ T cell response which conferred protection against challenge with recombinant vaccinia-HIV-1 gag [54]. It follows that novel immunization strategies should also aim to elicit strong CD4+ as well as CD8+ T cell responses, in order to confer long-term protective immunity [55].

We hereby demonstrate that immunization with HIVBr18, a DNA plasmid encoding a string of conserved multiple HLA class II-binding HIV-1 CD4+ T cell epitopes, can induce IFN- γ secretion, CD4+ and even some CD8+ T cell proliferation against multiple epitopes. Moreover, this T cell response was multiallelic, being able to elicit responses restricted to several distinct HLA class II molecules. Previous data from our group has shown that common HLA-DR molecules bind to multiple peptides encoded in the vaccine [32]. This indicates that T cells from individuals bearing such HLA molecules could potentially develop broad immune responses to vaccination with the conserved epitopes of HIVBr18. Thus, this vaccine concept may cope with HIV genetic variability by increasing breadth, as well as providing increased population coverage. We believe this insert design may be useful as a source of cognate T cell help in novel HIV-1 vaccine candidates.

Materials and Methods

Construction of DNA plasmid encoding multiple HIV-1 epitopes

We designed a multi-epitopic construct containing the nucleotide sequence encoding the 18 HIV-1 epitopes described by Fonseca et al. (2006): [32] p17(73–89), p24 (33–45), p24 (131–150), p6 (32–46), protease (7–21), protease (80–94), integrase (70–84), 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), nef (180–194). Epitope sequences, assembled *in tandem* in the above mentioned order, had GPGPG spacers at C and N termini, to avoid the creation of junctional epitopes and interference with processing and presentation [56]. The sequences of such epitopes are available in Supplementary Table S1. The nucleotide sequence was codon-optimized and a Kozak sequence was included at the 5' end to improve mammalian expression. The synthetic gene was built (EZBiolab, USA, <http://www.ezbiolab.com>) and subcloned using *HindIII* and *XhoI* sites of the expression vector pVAX-1 (Invitrogen) for production of the recombinant DNA plasmid HIVBr18. The presence and correct orientation of the gene encoding the selected epitopes was confirmed by direct sequencing using the T7 oligonucleotide. Large-scale preparations of plasmid DNA's HIVBr18 and the empty vector pVAX1 were prepared with the Endofree[®] Giga Plasmid Purification Kit from Qiagen according to manufacturer's instructions. The yield and quality of purified DNA was determined by spectrophotometry at 260 nm and confirmed by agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining.

Mice and Immunizations

Six to eight week-old female HLA-class II transgenic mice. DRB1*1502 (DR2), DRB1*0401 (DR4), DQB1*0601 (DQ6) and DQB1*0302 (DQ8) were used in this study [47], [48], [49]. All transgenic mice were kindly provided by Dr. Chella S. David (Department of Immunology, Mayo Clinic, Rochester). Mice used for transgene expression were made genetically deficient for the endogenous class II genes (I-A⁰, E⁰) by homologous recombination. The expression of human HLA class II molecules on antigen-presenting cells in the thymus and periphery of these transgenic mice has a similar distribution to that of endogenous mouse MHC class II molecules [46]. Mice were kept and manipulated in SPF conditions in the animal care facilities of the Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo (IMT/FMUSP). Experiments were performed in accordance to the guidelines of the Ethical committee of University of São Paulo. Six mice per group were injected with 10 mM cardiotoxin (Sigma) five days before vaccination. At weeks 0, 2 and 4, DNA plasmid HIVBr18 or empty vector pVAX1 was administered intramuscularly. Each quadriceps was injected with 50 μ l of DNA at a concentration of

1 µg/µl in saline such that each animal received a total of 100 µg of plasmid DNA. Two weeks after the last DNA injection, mice were euthanized with CO₂.

Peptides

The eighteen multiple HLA-DR binding, frequently recognized peptides, derived from the conserved regions of HIV-1 B-subtype consensus and selected from the whole proteome [32] (sequences in Supplementary Table S1) were synthesized in house by solid phase technology. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy, with the C-terminal carboxyl group in amide form, was used for synthesis [57]. Peptide purity and quality were assessed by reverse-phase high performance liquid chromatography and mass spectrometry and was routinely above 90%.

Spleen cell isolation for immune assays

Two weeks after the last immunization, mice were euthanized and spleens were 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% vol/vol non-essential amino acid solution, 40 µg/ml of Gentamicin, 20 µg/ml of Penicillin and 5 × 10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol (SIGMA). The viability of the 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 Neubauer chamber and adjusted in cell culture medium.

IFN γ ELISPOT assays

Splenocytes from HIVBr18 or pVAX1 immunized mice were assayed for their ability to secrete IFN- γ after *in vitro* stimulation with 5 µM of individual or pooled HIV-1 peptides using an ELISPOT assay. The ELISPOT assay was performed using Becton Dickinson murine IFN- γ ELISPOT kit according to manufacturer's instructions. Spots were counted using an automated stereomicroscope (KS ELISPOT, Zeiss, Oberkochen, Germany). The number of antigen specific T cells, expressed as IFN- γ spot-forming units (SFU)/10⁶ splenocytes was calculated after subtracting negative control values (wells with cells in the absence of peptide). The positivity cutoff was calculated as the mean $\pm$ 3 SD of splenocytes from pVAX1 immunized mice, stimulated with all peptides. The cutoff for IFN- γ was 10 SFU/10⁶ splenocytes.

CFSE-based proliferation assay

Splenocytes from HIVBr18 or pVAX1-immunized mice were assayed for their ability to proliferate *in vitro* after stimulation with HIV-1 peptides using the CFSE dilution based proliferation assay [58]. Freshly isolated splenocytes from immunized mice were resuspended (50 × 10⁶/ml) in PBS, labeled with 1.25 µM of CFSE at 37°C for 10 minutes. The reaction was quenched with RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and cells were washed before resuspending in RPMI 1640 at a density of 1.5 × 10⁶/ml. Cells were cultured in 96-well-round-bottomed plates (3 × 10⁵/well in triplicate) for 5 days at 37°C and 5%CO₂ with medium alone or 5 µM of HIV peptides. Positive controls were stimulated with 2.5 µg/mL of Concanavalin A (Sigma). Cells were then harvested,

washed with 100 µL of FACS buffer (PBS with 0.5% BSA and 2 mM EDTA) and stained with anti-mouse CD3 phycoerythrin (PE), anti-mouse CD4 peridinin chlorophyll protein (PerCP) and anti-mouse CD8 allophycocyanin (APC) (BD Pharmingen, San Jose, CA) for 45 minutes at 4°C. Cells were then washed twice with FACS buffer, fixed with 4% paraformaldehyde, and resuspended in FACS buffer. Samples were acquired on a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences) and then analyzed using FlowJo software (version 8.7.1, Tree Star, San Carlo, CA). Fifty thousand events (proliferation evaluation) were acquired in a live lymphocyte gate. The percent of proliferating CD4 + and CD8 + T cells, i.e., CFSE-low cells, was determined in the CD3 + cell population. The criteria for scoring as positive the proliferating cell cultures included CFSE-low cells > cut off. The cutoff of unspecific proliferative response was determined based on the median percentage of proliferating cells (% of CD3+CD4+ or CD3+CD8+ CFSE low cells) on splenocytes from pVAX-immunized groups after stimulating with individual peptides +3 standard deviations; or stimulation index >2: the stimulation index was calculated by the following equation: %CFSE^{low} cells after stimulus/%CFSE^{low} unstimulated cell cultures.

Data Analysis

Statistical significance (p-values) was calculated by using a Student's T test or One-way ANOVA and Tukey's honestly significantly different (HSD). Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 4.0 software.

Supporting Information

Table S1 Peptide sequences derived from conserved regions of B-subtype HIV-1 consensus selected for multiple HLA-DR binding by the TEPITOPE algorithm and recognition by PBMC from HIV-1-infected patients.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0011072.s001 (0.04 MB DOC)

Table S2 Epitope recognition by HLA-DR2 transgenic mice and HIV-1-infected patients bearing the same haplotype.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0011072.s002 (0.06 MB DOC)

Table S3 Epitope recognition by HLA-DR4 transgenic mice and HIV-1-infected patient bearing the same haplotype.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0011072.s003 (0.04 MB DOC)

Acknowledgments

We thank Dr. Claudio Puschel and Mr. Washington Robert da Silva for peptide synthesis; Mr. Luis Roberto Mundel for assistance at the animal facility; and Dr. Silvia Boscardin for critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SPR DSR SGF SCO LG JK ECN. Performed the experiments: SPR DSR ECM EP. Analyzed the data: SPR DSR SGF ECN. Contributed reagents/materials/analysis tools: SPR DSR JK ECN. Wrote the paper: SPR DSR ECN.

References

- Barouch DH, Korber B (2010) HIV-1 vaccine development after STEP. *Annu Rev Med* 61: 153–167.
- 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. *N Engl J Med* 361: 2209–2220.
- Hansen SG, Vieville C, Whizin N, Coyne-Johnson L, Siess DC, et al. (2009) Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nat Med* 15: 293–299.
- Liu J, O'Brien KL, Lynch DM, Simmons NL, La Porte A, et al. (2009) Immune control of an SIV challenge by a T-cell-based vaccine in rhesus monkeys. *Nature* 457: 87–91.

5. Wilson NA, Keele BF, Reed JS, Piaskowski SM, MacNair CE, et al. (2009) Vaccine-induced cellular responses control simian immunodeficiency virus replication after heterologous challenge. *J Virol* 83: 6508–6521.
6. Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, Fitzgerald DW, Mogg R, et al. (2008) Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* 372: 1881–1893.
7. Corey L, McElrath MJ, Kublin JG (2009) Post-step modifications for research on HIV vaccines. *AIDS* 23: 3–8.
8. O'Connor SL, Lhost JJ, Becker EA, Detmer AM, Johnson RC, et al. MHC heterozygote advantage in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *Sci Transl Med* 2: 22ra18.
9. McElrath MJ, De Rosa SC, Moodie Z, Dubey S, Kierstead L, et al. (2008) HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet* 372: 1894–1905.
10. Fuller DH, Shipley T, Allen TM, Fuller JT, Wu MS, et al. (2007) Immunogenicity of hybrid DNA vaccines expressing hepatitis B core particles carrying human and simian immunodeficiency virus epitopes in mice and rhesus macaques. *Virology* 364: 245–255.
11. Tenzer S, Wee E, Burgevin A, Stewart-Jones G, Friis L, et al. (2009) Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance. *Nat Immunol* 10: 636–646.
12. Subriar A (2002) Polytope vaccines for the codelivery of multiple CD8 T-cell epitopes. *Expert Rev Vaccines* 1: 207–213.
13. Ishioka GY, Fikes J, Hermanson G, Livingston B, Crimi C, et al. (1999) Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigenic DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes. *J Immunol* 162: 3915–3925.
14. Restifo NP, Bacik I, Irvine KR, Yewdell JW, McCabe BJ, et al. (1995) Antigen processing in vivo and the elicitation of primary CTL responses. *J Immunol* 154: 4414–4422.
15. Allen TM, Altfeld M, Yu XG, O'Sullivan KM, Lichterfeld M, et al. (2004) Selection, transmission, and reversion of an antigen-processing cytotoxic T-lymphocyte escape mutation in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 78: 7069–7078.
16. Watkins DI, Burton DR, Kallas EG, Moore JP, Koff WC (2008) Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat Med* 14: 617–621.
17. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, et al. (1997) Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 278: 1447–1450.
18. Gandhi RT, Walker BD (2002) Immunologic control of HIV-1. *Annu Rev Med* 53: 149–172.
19. 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.
20. 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.
21. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R (1994) CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 68: 8056–8063.
22. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, et al. (1998) Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 188: 2205–2213.
23. Bevan MJ (2004) Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol* 4: 595–602.
24. Vaccari M, Boasso A, Ma ZM, Cecchinato V, Venzon D, et al. (2008) CD4+ T-cell loss and delayed expression of modulators of immune responses at mucosal sites of vaccinated macaques following SIV(mac251) infection. *Mucosal Immunol* 1: 497–507.
25. Letvin NL (2006) Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat Rev Immunol* 6: 930–939.
26. Shedlock DJ, Shen H (2003) Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300: 337–339.
27. Lichterfeld M, Kaufmann DE, Yu XG, Mui SK, Addo MM, et al. (2004) Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells. *J Exp Med* 200: 701–712.
28. Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A (2009) CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature* 462: 510–513.
29. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 9791–9796.
30. Wilson DB, Wilson DH, Schroder K, Pinilla C, Blondelle S, et al. (2004) Specificity and degeneracy of T cells. *Mol Immunol* 40: 1047–1055.
31. Sturmli T, Bono E, Ding J, Radrizzani L, Tuereci O, et al. (1999) Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol* 17: 555–561.
32. 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.
33. Call MJ, Xing X, Cuny GD, Seth NP, Altmann DM, et al. (2009) In vivo enhancement of peptide display by MHC class II molecules with small molecule catalysts of peptide exchange. *J Immunol* 182: 6342–6352.
34. DaSilva L, Welcher BC, Ulrich RG, Aman MJ, David CS, et al. (2002) Humanlike immune response of human leukocyte antigen-DR3 transgenic mice to staphylococcal enterotoxins: a novel model for superantigen vaccines. *J Infect Dis* 185: 1754–1760.
35. Gregory SH, Mott S, Phung J, Lee J, Moise L, et al. (2009) Epitope-based vaccination against pneumonic tularemia. *Vaccine* 27: 5299–5306.
36. Geluk A, Taneja V, van Meijgaarden KE, Zanelli E, Abou-Zeid C, et al. (1998) Identification of HLA class II-restricted determinants of *Mycobacterium tuberculosis*-derived proteins by using HLA-transgenic, class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10797–10802.
37. Kawamura K, Yamamura T, Yokoyama K, Chui DH, Fukui Y, et al. (2000) Hla-DR2-restricted responses to proteolipid protein 95-116 peptide cause autoimmune encephalitis in transgenic mice. *J Clin Invest* 105: 977–984.
38. Sekaly RP (2008) The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med* 205: 7–12.
39. Watkins DI (2008) The hope for an HIV vaccine based on induction of CD8+ T lymphocytes—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 119–129.
40. Martins MA, Wilson NA, Reed JS, Ahn CD, Klimentidis YC, et al. (2010) T-cell correlates of vaccine efficacy after a heterologous simian immunodeficiency virus challenge. *J Virol* 84: 4352–4365.
41. Rosa DS, Iwai LK, Tzelepis F, Bargieri DY, Medeiros MA, et al. (2006) Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). *Microbes Infect* 8: 2130–2137.
42. Garcia TC, Fonseca CT, Pacifico LG, Duraes Fdo V, Marinho FA, et al. (2008) Peptides containing T cell epitopes, derived from Sm14, but not from paramyosin, induce a Th1 type of immune response, reduction in liver pathology and partial protection against *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Acta Trop* 106: 162–167.
43. Iwai LK, Yoshida M, Sidney J, Shikanai-Yasuda MA, Goldberg AC, et al. (2003) In silico prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* frequently recognized in primary peripheral blood mononuclear cell responses from sensitized individuals. *Mol Med* 9: 209–219.
44. Bian H, Hammer J (2004) Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T cell epitopes with TEPITOPE. *Methods* 34: 468–475.
45. Rosa DS, Ribeiro SP, Cunha-Neto E (2010) CD4+ T cell epitope discovery and rational vaccine design. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58: 121–130.
46. Wong FS, Wen L (2004) What can the HLA transgenic mouse tell us about autoimmune diabetes? *Diabetologia* 47: 1476–1487.
47. Gonzalez-Gay MA, Zanelli E, Khare SD, Krcio CJ, Zhou P, et al. (1996) Human leukocyte antigen-DRB1*1502 (DR2Dw12) transgene reduces incidence and severity of arthritis in mice. *Hum Immunol* 50: 54–60.
48. Pan S, Trejo T, Hansen J, Smart M, David CS (1998) HLA-DR4 (DRB1*0401) transgenic mice expressing an altered CD4-binding site: specificity and magnitude of DR4-restricted T cell response. *J Immunol* 161: 2925–2929.
49. Chapoval SP, Neebo T, Krcio CJ, Marietta EV, Harders J, et al. (1998) HLA-DQ6 and HLA-DQ8 transgenic mice respond to ragweed allergens and recognize a distinct set of epitopes on short and giant ragweed group 5 antigens. *J Immunol* 161: 2032–2037.
50. Korber BTM, Brander C, Haynes BF, Koup R, Moore JP, et al. (2006) In: HIV Molecular Immunology Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics.
51. Giraldo-Vela JP, Rudersdorf R, Chung C, Qi Y, Wallace LT, et al. (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: 859–870.
52. Gauduin MC, Yu Y, Barabasz A, Carville A, Piatak M, et al. (2006) Induction of a virus-specific effector-memory CD4+ T cell response by attenuated SIV infection. *J Exp Med* 203: 2661–2672.
53. Vaccari M, Mattapallil J, Song K, Tsai WP, Hryniewicz A, et al. (2008) Reduced protection from simian immunodeficiency virus SIVmac251 infection afforded by memory CD8+ T cells induced by vaccination during CD4+ T-cell deficiency. *J Virol* 82: 9629–9638.
54. Trumpfheller C, Finke JS, Lopez CB, Moran TM, Moltedo B, et al. (2006) Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med* 203: 607–617.
55. Khanolkar A, Badovinac VP, Harty JT (2007) CD8 T cell memory development: CD4 T cell help is appreciated. *Immunol Res* 39: 94–104.
56. Livingston B, Crimi C, Newman M, Higashimoto Y, Appella E, et al. (2002) A rational strategy to design multipotential immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *J Immunol* 168: 5499–5506.
57. Atherton ND (1989) HPLC measurement of phenylalanine by direct injection of plasma onto an internal-surface reversed-phase silica support. *Clin Chem* 35: 975–978.
58. 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.

CD4⁺ T Cell Epitope Discovery and Rational Vaccine Design

Daniela Santoro Rosa · Susan Pereira Ribeiro ·
Edécio Cunha-Neto

Received: 16 June 2009 / Accepted: 8 August 2009 / Published online: 14 February 2010
© L. Hirschfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Wrocław, Poland 2010

Abstract T cell epitope-driven vaccine design employs bioinformatic algorithms to identify potential targets of vaccines against infectious diseases or cancer. Potential epitopes can be identified with major histocompatibility complex (MHC)-binding algorithms, and the ability to bind to MHC class I or class II indicates a predominantly CD4⁺ or CD8⁺ T cell response. Furthermore, an epitope-based vaccine can circumvent evolutionary events favoring immune escape present in native proteins from pathogens. It can also focus on only the most relevant epitopes (i.e. conserved and promiscuous) recognized by the majority of the target population. Mounting evidence points to the critical role of CD4⁺ T cells in natural antigen encounter and active immunization. In this paper the need for CD4⁺ T cell help in vaccine development, the selection of CD4⁺

T cell epitopes for an epitope-based vaccine, and how the approach can be used to induce a protective effect are reviewed.

Keywords Vaccine design · CD4⁺ T cells · T cell help · Epitope prediction · Epitope-based vaccines

Introduction

High-throughput genome sequencing of pathogens and tumor antigens and advances in bioinformatics have disclosed a massive number of potential protein targets of immune responses. The use of this new knowledge for the development of novel vaccines is termed “reverse vaccinology” (Rappuoli 2000). The use of major histocompatibility complex (MHC)-binding algorithms has allowed the identification of novel T cell epitopes that could be used in vaccine design against infectious diseases and cancer, the so-called epitope-driven vaccine design. Epitope-based vaccines have the ability to focus the immune response on highly antigenic epitopes, free from the original protein scaffold, which can be selected to be conserved and amply recognized by the target population while increasing safety. Given the fundamental role played by CD4⁺ T cells in determining the functional status of both innate and adaptive immune responses, the inclusion of appropriate CD4⁺ T cell epitopes may be essential for vaccine efficacy. Here we describe the background underlying the need for CD4⁺ T cell help in vaccine development and how to select CD4⁺ T cell epitopes for an epitope-based vaccine. We also provide examples of how the approach can be used to successfully overcome barriers observed in whole protein-based vaccines.

D. S. Rosa · S. P. Ribeiro · E. Cunha-Neto
Division of Clinical Immunology and Allergy,
Department of Internal Medicine,
University of São Paulo School of Medicine,
São Paulo, SP, Brazil

E. Cunha-Neto
Heart Institute (InCor),
University of São Paulo School of Medicine,
São Paulo, SP, Brazil

D. S. Rosa · S. P. Ribeiro · E. Cunha-Neto
Institute for Investigation in Immunology-INCT,
São Paulo, SP, Brazil

E. Cunha-Neto (✉)
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo,
LIM60, Avenida Dr. Arnaldo, 455, sala 3209, Cerqueira César,
São Paulo, SP 01246-903, Brazil
e-mail: edecunha@gmail.com

Antigen Presentation and T Cell Recognition

T cells recognize antigen via the binding of T cell receptors (TCRs) to self or foreign proteins (Braga-Neto and Marques 2006). This phenomenon is dependent on the previous binding of the antigenic peptides to cell-surface glycoproteins, the MHC proteins. The human MHC locus (HLA—human leukocyte antigens) encodes three HLA class I molecules (HLA-A, -B, -C) and three HLA class II molecules (HLA-DR, -DQ, -DP). The structures of the MHC class I and class II molecules complexed with different peptides were solved by X-ray crystallographic studies. CD8⁺ T cell epitopes bound by MHC class I range from 8 to 11 residues, while CD4⁺ T cell epitopes bound to HLA class II range from 11 to more than 20 residues in length. Bound peptides are buried in the antigen-binding groove formed between the helices of the MHC molecule, leaving only a few of their side chains available for direct TCR contact (Bjorkman et al. 1987; Stern et al. 1994). Only nine residues from a given peptide bind to MHC class II within the antigen-binding groove, while flanking residues may also interact with the TCR (Carson et al. 1997). Specific binding of certain peptides to a MHC molecule comes from the interaction of peptide side chains with the irregular surface of the floor and sides of the groove, the “pockets” and ridges formed by the protrusion of MHC residues. The major pockets in the floor of the groove of HLA-DR molecules are occupied by the side chains of residues 1, 4, 6, and 9 of the bound peptide (Stern et al. 1994).

HLA molecules are highly polymorphic. To date, more than 2,215 HLA class I and 986 HLA class II allelic sequences have been identified (Robinson et al. 2009). This polymorphism is concentrated in the region encoding the peptide-binding groove, yielding very diverse amino-acid sequences in this region among different HLA alleles. Thus each pocket in the peptide-binding groove of each HLA molecule is shaped by clusters of polymorphic residues. It follows that each allelic HLA molecule only binds peptides with amino-acid sequences that are capable of interacting with its antigen-binding groove. This implies that T cells from different individuals may be able to recognize distinct epitopes from a given protein.

Escape from Presentation and Recognition by “Molecular Evolution”

For millions of years, pathogens have evolved molecular mechanisms to escape effective presentation and recognition by the immune system. Tumor cells and pathogens evolve accumulating mutations in protein antigens, either flanking or inside an epitope, to escape immune pressure by one of several mechanisms: (1) abrogation of epitope

binding to host MHC or TCR (De Groot et al. 2008), (2) loss of sites for sequence-specific processing proteases (Moudgil et al. 1996), and (3) antagonism or partial agonism of TCR signaling (Franco et al. 1995). Thus the immune response, or lack thereof, against pathogen protein antigens may reflect the evolutionary success of the parasite. Immunization with substituted synthetic peptides or DNA/proteins can present neoepitopes or alter the hierarchy of dominant/cryptic T cell epitopes, bypassing escape mechanisms (Cunha-Neto 1999).

Immunodominance

The hallmarks of the adaptive immune response are specificity and memory, for which T cells are indispensable. Protein antigens typically contain multiple epitopes capable of binding MHC class II molecules, but T cell responses are limited to only a small number of these determinants in each individual. The ability of the immune system to regulate and focus T cell responses to a select number of epitopes is termed immunodominance (Berzofsky 1988). As the immune response is always mounted against immunodominant epitopes of an antigen, exposure to these regions will result in efficient priming of the immune system, which can generate protection on subsequent challenge. In other words, immunodominant epitopes, or collections of them, can be potential vaccine candidates. Such epitope-based vaccines exploit small but useful antigenic regions of a protein and ignore portions that are poorly immunogenic or can cause a harmful response (Gowthaman and Agrewala 2008).

A number of mutually nonexclusive hypotheses have been put forth to explain this very restricted specificity of T cells, including: (1) endosomal antigen processing may restrict the array of peptides available to recruit CD4⁺ T cells, (2) MHC molecules may be able to bind only a limited subset of antigenic peptides that are released during antigen processing, the so-called determinant selection and (3) the TCR repertoire may be limited and only able to detect some MHC:peptide combinations (holes in the repertoire) (Sant et al. 2005). Processing reactions within an antigen-presenting cell may also influence immunodominance since gross changes in antigen structure may modulate the efficiency of an epitope's presentation (Li et al. 2009).

While dominant peptides efficiently elicit recall responses in animals primed with whole antigens, non-dominant or cryptic peptides are only immunogenic when directly administered in vivo. Epitope immunodominance is an MHC-restricted phenomenon (i.e. individuals with distinct MHCs will select different immunodominant

epitopes). Immunodominance of certain pathogen epitopes can also induce a detrimental effect by restricting the breadth of recognized T cell epitopes. In a recent phase I clinical trial, subjects immunized with a recombinant adenovirus 5 vector encoding the whole human immunodeficiency virus (HIV-1) proteins Gag, Pol, and Nef recognized on average a single epitope per HIV protein, a number clearly insufficient to provide protection to the highly variable HIV-1 (Watkins et al. 2008).

The Importance of CD4⁺ T Cell Help

CD4⁺ T cells play a central role in a functional adaptive immune response. They promote the optimal expansion of cytotoxic CD8⁺ T cells, maintain CD8⁺ T cell memory, and communicate with innate immune cells. Furthermore, they promote B cell differentiation into plasma cells to produce neutralizing antibodies and assist memory B cells for a swift recall response to re-infection (Yang and Yu 2009). The help provided by CD4⁺ T cells is essential for the generation of a robust primary and memory CD8⁺ T cell response and protective immunity against various viral and bacterial infections (Bevan 2004; Novy et al. 2007). Besides, CD4⁺ T cells can themselves act as antiviral effector cells either by killing infected cells directly or by secretion of antiviral cytokines, such as IFN- γ and TNF- α , and can become memory helper T cells. The importance of CD4⁺ T cells in immunity to infection is further underscored in that mice with absent or defective CD4⁺ T cell help have an impaired ability to clear viral and protozoan pathogens, such as lymphocytic choriomeningitis virus (Khanolkar et al. 2004), herpes simplex virus-1 (Rajasagi et al. 2009), and *Plasmodium* (Xu et al. 2002).

The mechanisms underlying CD4⁺ T cell help to CD8⁺ T cells are not completely understood, but recent evidence suggests that CD4⁺ T cells facilitate the activation and development of CD8⁺ T cell responses either directly through the provision of cytokines or by the major pathway, i.e. dendritic cell (DC) licensing (Lanzavecchia and Sallusto 2001; Smith et al. 2004; Wodarz and Jansen 2001). In DC licensing, the CD40 ligand-CD40 interaction results in IL-12 and IL-15 production and up-regulation of costimulatory molecules, which leads to subsequent activation and maturation of DCs, making them competent to stimulate an antigen-specific CD8⁺ T cell response (Bennett et al. 1998; Ridge et al. 1998; Schoenberger et al. 1998; Smith et al. 2004; Zhang et al. 2009). In addition to signaling via surface molecules, CD4⁺ T cell-derived IL-2 is an important component of help for CD8⁺ T cell immunity to pathogens (Livingstone et al. 2009).

Viruses with a tropism for helper T cells, such as HIV, can potentially impair the CD4⁺ cell response, resulting in

compromised cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity and persistent infection. The importance of HIV-specific CD4⁺ T cells and its association with a protective antiviral immune response has been demonstrated (Gandhi and Walker 2002). Preservation of memory CD4⁺ T cells correlated with primate survival after challenge with simian immunodeficiency virus (SIV) (Letvin et al. 2006), further showing the importance of memory CD4⁺ T cells in protection.

Tumor-associated antigen-specific CD4⁺ T cell helper activity is exerted for the induction and maintenance of CTLs, in addition to other immune cells. Moreover, CD4⁺ T cells can also possess cytotoxic ability and directly kill tumor cells (Guo et al. 2005) and thus may have a role in cancer immunotherapy (Ohkuri et al. 2009). Taken together, evidence indicates that effective CD4⁺ T cell help or direct effector action is essential for anti-infection or anticancer immunity.

Prediction of CD4⁺ T Cell Epitopes

Given the fundamental role of CD4⁺ T cell function on anti-infection/anticancer immunity, the identification and characterization of CD4⁺ T cell epitopes is a crucial step in vaccine design. It is also important for studying the immunobiology of autoimmunity, allergy, and transplantation along with immune diagnostics (Moise and De Groot 2006; Valentino and Frelinger 2009). A conventional approach to identifying T cell epitopes is to synthesize many overlapping peptides (usually 15-mers) spanning the full length of the target antigen and test for immunogenicity using T cell assays. However, this approach is time consuming, expensive (especially for whole-proteome analyses), and may not disclose all the longer CD4⁺ T cell epitopes. On the other hand, bioinformatic/in silico tools can predict which peptides are more likely to contain T cell epitopes, greatly reducing the number of candidate sequences (Gowthaman and Agrewala 2008).

T cell epitope prediction dates back to the 1980s, when the first algorithm was developed based on the identification of amphipathic helical regions on protein antigens (Berzofsky et al. 1987). Since then, new methods based initially on MHC peptide-binding motifs and, more recently, on MHC-binding properties based on scores calculated from actual peptide-binding assays have been developed. MHC class II binding prediction methods are more complex than those for MHC-I binding (Yang and Yu 2009).

A range of bioinformatic algorithms have been developed to predict MHC class II epitopes (Table 1). Since the most selective requirement for a peptide to be immunogenic is its ability to bind to the MHC molecule, most prediction methods focus on this stage of the pathway. The algorithms

Table 1 Examples of in silico tools for class II epitope prediction

Program	Prediction algorithm	URL	References
TEPITOPE	Matrix	http://www.vaccinome.com	Sturniolo et al. (1999)
ProPred	Matrix	http://www.imtech.res.in/raghava/propred/	Singh and Raghava (2003)
NetMHCII pan	ANN	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan	Nielsen et al. (2008)
MULTIPRED	ANN	http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/multipred1	Zhang et al. (2007)
EpiMatrix	Matrix	http://www.epivax.com	De Groot et al. (1997)
RANKPEP	Matrix	http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html	Reche et al. (2002)
PRED ^{BALB/c}	Matrix	http://antigen.i2r.a-star.edu.sg/predBalbc	Zhang et al. (2005)
SYFPEITHI	Matrix	http://www.syfpeithi.de	Rammensee et al. (1999)
MHC Pred	Matrix	http://www.jenner.ac.uk/MHCPred	Guan et al. (2003)

ANN artificial neural networks, URL uniform resource locator

that are used vary in complexity and accuracy. Several of them rely on the fact that most pockets in the MHC class II binding groove are shaped by clusters of polymorphic residues and thus have distinct chemical and size characteristics in different MHC class II alleles. MHC class II binding prediction methods are categorized into two main groups: quantitative and qualitative. Qualitative matrices determine the binding status (whether a peptide is a “binder” or “non-binder”) based on the predictive score (based on position-specific binding profiles) (e.g. SYFPEITHI, RANKPEP, MULTIPRED), while quantitative approaches predict the strength of binding as well (e.g. TEPITOPE, PROPPRED, NetMHCII pan, SVRMHC, ARB, and SMM-align) (Rajapakse et al. 2007; Wan et al. 2007). Several studies have compared the performances of MHC class II binding prediction methods (Gowthaman and Agrewala 2008; Lin et al. 2008; Wang et al. 2008). Briefly, the conclusions of these studies were similar, indicating that despite the difference in datasets used, the contemporary methods have shown little improvement over the older TEPITOPE algorithm (Lin et al. 2008). The TEPITOPE HLA-DR binding prediction algorithm (Sturniolo et al. 1999) uses the concept that each HLA-DR pocket can be characterized by “pocket profiles,” a quantitative representation of the interaction of all natural amino-acid residues with a given pocket (Hammer et al. 1994). A small database of pocket profiles was sufficient to generate a large number of virtual HLA-DR matrices representing a significant proportion of HLA-DR peptide-binding specificity. Such matrices were incorporated in the TEPITOPE software. For each HLA-DR specificity, TEPITOPE generated a binding score corresponding to the algebraic sum of the strength of interaction between each residue and pocket, which correlated to binding affinity. Peptide scores along a scanned protein sequence were normalized for each HLA-DR as the proportion of the best binder peptides. Since the software displays a significant number of HLA-DR specificities, it is also capable of predicting promiscuous HLA class II ligands (Panigada et al.

2002). The TEPITOPE prediction model has been successfully applied to the identification of T cell epitopes in the context of several human diseases (Bian and Hammer 2004).

The applications of computational HLA class II epitope prediction include vaccine candidate discovery, the study of pathogenesis (infectious diseases, autoimmunity, and cancer), allergy treatment, drug development, engineering of therapeutic proteins, and diagnostics. A brief account of some studies identifying epitopes with the aid of prediction algorithms performed over the last decade is presented in Table 2.

Our group and others have successfully used TEPITOPE for mapping promiscuous CD4⁺ T cell epitopes in different pathogen antigens, including HIV-1 whole proteome (Fonseca et al. 2006), *Schistosoma mansoni* Sm14 and paramyosin (Fonseca et al. 2005a; Fonseca et al. 2005b), *Plasmodium vivax* MSP-1 (Rosa et al. 2006), *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 (Iwai et al. 2007), several *Mycobacterium tuberculosis* proteins, cytomegalovirus pp65 and glyP86, and SIV whole proteome (unpublished observations). Peptide-HLA DR binding assays confirmed the capacity of the predicted epitopes to bind to several HLA class II molecules in that most peptides bound to at least 50% of the HLA-DR molecules tested. Furthermore, a significant correlation was observed between the TEPITOPE-predicted promiscuity (i.e. the number of HLA-DR molecules predicted to bind to a certain peptide) and the promiscuity observed in binding assays to multiple HLA-DR molecules (Fig. 1). Individual peptides were recognized by 25–50% of patients; combined T cell recognition of such peptides was detected in a high proportion of patients (75–90%).

Predicted CD4⁺ Epitopes and Vaccine Design

Immunization strategies that focus solely on CD8⁺ T cell immunity might prove to be insufficient because even though they might stimulate vigorous early responses, they

Table 2 Applications of computational class II epitope prediction

Applications of computational class II epitope prediction	Antigen mapped*	References
Infectious diseases pathogenesis and vaccine design	Whole HIV-1 proteome	Fonseca et al. (2006)
	HIV-1 (Gag, Pol, Nef, Rev, Tat, Vif, Vpr, and Vpu)	Wilson et al. (2001)
	Whole HIV proteome	Cohen et al. (2006)
	Merozoite surface protein 1 (<i>Plasmodium vivax</i>)	Rosa et al. (2006)
	Duffy binding protein (<i>Plasmodium vivax</i>)	Saravia et al. (2008)
	Pre-erythrocytic-stage antigens (CSP, SSP2, EXP-1, LSA-1) (<i>Plasmodium falciparum</i>)	Doolan et al. (2000)
	Translated poxvirus genome sequences	Mitra-Kaushik et al. (2007); Calvo-Calle et al. (2007)
	MPT63 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	Mustafa (2009)
	Chlamydial genome	Barker et al. (2008)
	Hemagglutinin (influenza)	Panigada et al. (2002)
	Glycoprotein 43 (gp43) (<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>)	Iwai et al. (2007)
	Fatty acid-binding protein (Sm14) (<i>Schistosoma mansoni</i>)	Fonseca et al. (2005a); Garcia et al. (2008)
	Paramyosin (<i>Schistosoma mansoni</i>)	Fonseca et al. (2005b)
Oncology pathogenesis and vaccine design	EBNA1, LMP1, LMP2 (EBV latency II malignancies)	Depil et al. (2007)
	MAGEA-4	Ohkuri et al. (2009)
	MAGE-6	Tatsumi et al. (2003)
	MAGE-3	Kobayashi et al. (2001)
	CEA (carcinoembryonic antigen)	Kobayashi et al. (2002)
	Kallikrein-4 (prostate-specific antigen)	Hural et al. (2002)
	PAP (prostatic acid phosphatase)	McNeel et al. (2001)
Allergy novel immunotherapy strategies	<i>Lol p5</i> (rye grass pollen)	de Lalla et al. (1999)
Autoimmunity	TSHR (TSH receptor, Grave's disease)	Inaba et al. (2006)
	hTg (human thyroglobulin- Thyroiditis)	Flynn et al. (2004)
	Tyrosine phosphatase IA-2 (Type I diabetes)	Honeyman et al. (1997)
	TYR, TRP1, TRP2, and Pmel17 (Vogt-Koyanagi-Hatada's uveitis)	Damico et al. (2005)
Engineering of new therapeutics	Human FPX	Koren et al. (2007)
Diagnostics	GAD65 (Type I diabetes)	Mallone and Nepom (2004)

* Protein, used in prediction algorithms to identify potential MHC-II binding peptides

will be unable to confer long-term protective immunity (Khanolkar et al. 2007). Although considerable information has been gathered on CD8⁺ T cell epitopes, comparatively few CD4⁺ T cell epitopes have been identified so far, no matter whether the origin is pathogens or tumor-associated proteins. The rational selection of protein sequences that function as promiscuous CD4⁺ epitopes in vaccine formulations is crucial for successful application of this vaccination strategy. Given their major role in determining the functional status and memory of effector responses, appropriate CD4⁺ T cell epitopes should be an essential part of any candidate vaccine. In this scenario it is thus necessary to identify the still missing CD4⁺ T cell epitopes recognized by the majority of individuals.

The advent of whole-genome sequencing and advances in bioinformatics marked the beginning of a new era that

approaches vaccine development starting from genomic information, a process named “reverse vaccinology” (Rappuoli 2000). In just a few years, reverse vaccinology applied to *Neisseria meningitidis* has resulted in the identification of more vaccine candidates than those discovered during the previous four decades of research by conventional methods (Pizza et al. 2000; Serruto and Rappuoli 2006). A related approach, termed “epitope-driven vaccine design” (De Groot et al. 2001), originally named “reverse immunogenetics” by Davenport and Hill, employs T cell-epitope mapping tools for finding new protein candidates for vaccines and diagnostic tests (Davenport and Hill 1996) (Fig. 2). Epitope-driven vaccine design allows the discovery of previously unknown and undescribed antigens and epitopes as vaccine candidates. Furthermore, predicted CD4⁺ T cell epitopes should be validated using in vitro

Fig. 1 Correlation between the prediction of promiscuous epitopes by TEPITOPE and the promiscuity assessed by binding assays to nine prevalent HLA-DR molecules. TEPITOPE prediction was performed using peptides selected at a 3% threshold (25 HLA-DR molecules scanned). Data from peptides derived from *Schistosoma mansoni* (paramyosin and Sm14); *Paracoccidioides braziliensis* (gp43); *Mycobacterium tuberculosis* (groEL2, PBP-1, 19kAg, 19Kmp, mtp40, and mce-1) and cytomegalovirus (pp65 and glyP86). HLA-DR binding data (DRB1*0101, *0301, *0401, *0405, *0701, *1101, *1302, *1501, DRB5*0101) were generated by Alessandro Sette and John Sidney (La Jolla Institute of Allergy and Immunology, USA)

evaluation of HLA binding, ex vivo assays with T cells from sensitized hosts (ELISpot assays, MHC-tetramers, flow cytometry for cytokine production and proliferation), and in vivo validation using HLA class II transgenic mice.

The rational design of promiscuous epitopes has been applied to create an artificial T_H -cell epitope by inserting anchor residues for diverse HLA-DR molecules, yielding a powerful pan-DR epitope (PADRE) that is presented by multiple HLA DR molecules (Alexander et al. 1994). The use of synthetic epitopes such as PADRE to optimize $CD8^+$ function (Kim et al. 2008) and antibody production (Rosa et al. 2004) holds promise for a new generation of highly efficacious vaccines.

The epitope-based vaccine approach allows focusing immune responses on relevant epitopes, the rational engineering of epitopes for increased potency and breadth, as well as increasing safety (Sette and Fikes 2003). The major disadvantage of the epitope-based approach is that algorithms may fail to predict all the relevant epitopes (Iwai et al. 2003). Moreover, only a limited set of HLA class I specificities have algorithms designed to them. Furthermore, whole-protein immunization resembles infection-associated immunity and may offer epitopes that can be

recognized by patients bearing such “uncharted” HLA class I specificities. This may be minimized, however, by the use of a significant number of longer, promiscuous $CD4^+$ epitopes containing $CD8^+$ T cell epitopes.

The use of the available matrix-based MHC-binding algorithms allows the potential selection of high-affinity binding peptides, the ones with a higher chance of eliciting T cell responses. From the vaccine immunologist’s point of view, however, the identification of MHC allele-specific T cell epitopes may not be enough, since one is searching for epitopes for vaccine epitopes that can effectively cover the human population, with its large diversity of HLA alleles (Wilson et al. 2001). This implies the identification of multiple “promiscuous” epitopes that can bind to multiple distinct HLA alleles (Sturniolo et al. 1999) whose combined frequency in the population approaches 100%. The alignment of peptides binding to several distinct HLA-DR molecules with TEPITOPE or other quantitative matrix MHC class II prediction algorithm can identify such potentially “promiscuous” epitopes. Since many pathogens exhibit high mutation rates, it is important to select conserved protein sequences for scanning with MHC-binding algorithms (Khan et al. 2006).

Our group recently identified a group of such epitopes from the whole proteome of the HIV-1 B-subtype consensus sequence using the TEPITOPE algorithm. This led to the identification of 18 sequences predicted to bind significantly to at least two-thirds of the HLA-DR molecules covered by the TEPITOPE algorithm, representing ca. 90% of the Caucasian population (Fonseca et al. 2006). Binding assays of the 18 selected peptides with the 9 most prevalent HLA-DR molecules in the general population confirmed the ability of the selected peptides to bind to multiple HLA-DR molecules. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from over 90% of a group of HIV-1-infected patients recognized at least one of the promiscuous peptides. All 18 peptides were recognized, and the PBMCs from most of the patients recognized multiple peptides, demonstrating that the epitopes are presented in vivo during infection. Similar responses were obtained in $CD8^+$ T cell-depleted PBMCs. Together, this may suggest that this epitope combination could have good potential for use as an immunogen against HIV. Polyepitopic recombinant vaccines, containing multiple epitopes in tandem, may alter the hierarchy of dominant epitopes, circumventing the mechanisms of escape from processing and presentation built into sequences of native viral proteins (Fu et al. 1997). In addition, a polyepitopic vaccine in which each epitope is promiscuous increases the chances that each individual in a genetically heterogeneous population acquires immunity to multiple epitopes, a necessary measure in a vaccine against the highly polymorphic HIV virus. We thus constructed a polyepitopic DNA vaccine encoding the 18 HIV-1 $CD4^+$ T

Fig. 2 Epitope-driven vaccine design flowchart

cell epitopes. Preliminary data from immunogenicity studies in mice indicate the vaccine elicits a powerful CD4⁺ and CD8⁺ T cell response, detectable against all the contained epitopes (unpublished observations). Significantly, this showed that epitope prediction by TEPITOPE can also predict epitopes recognized in nonhuman species. Rosa et al. (2006) used the TEPITOPE algorithm to identify a promiscuous CD4⁺ T cell epitope in *P. vivax* merozoite surface protein-1. Mice immunized with a recombinant *P. vivax* MSP1₁₉ protein containing the above promiscuous epitope developed significantly higher anti-MSP19 IgG antibody titers than those immunized with intact MSP1₁₉.

In addition to immunogenicity studies, several recent studies suggest that CD4⁺ T cell epitope-based vaccines may indeed have an increased protective effect. Mice immunized with TEPITOPE-selected peptides derived from *S. mansoni* Sm14 protein displayed partial protection against infectious challenge (Garcia et al. 2008). Barker et al. (2008) scanned the *Chlamydia* proteome with the SYFPEITHI and PRO-PRED algorithms to identify proteins with promiscuous epitopes. Adoptive transfer of antigen-primed CD4⁺ T cells

was found to confer significant reduction in shedding of chlamydial organisms and duration of infection. Moreover, serum from immunized mice was found to neutralize *Chlamydia* infection of a cell monolayer in vitro, demonstrating the importance of CD4 help in generating appropriate antibody responses. Despite the importance of CD4⁺ T cells, it must be kept in mind that antibodies, CD8⁺ T cells, and the delayed-type hypersensitivity reaction are the major end-effectors of acquired immunity. Thus CD4⁺ T cell-based vaccines must necessarily engage these effectors to achieve any degree of protection.

Conclusion

Increasing evidence demonstrates the critical role of CD4⁺ T cells in natural antigen encounter and immunization. We have reviewed the essential role of CD4⁺ T cell responses in the acquired immune response and the unavoidable need to include a CD4 epitope component to provide cognate help in vaccines that aim also to induce cytotoxic CD8⁺ T cells and neutralizing antibodies. In light of the availability of epitope

prediction tools, and the recent demonstration of the important immunogenicity of epitope-based vaccines, we anticipate that the near future will show an increasing number of candidate vaccines containing cassettes of promiscuous, conserved CD4⁺ T cell epitopes, with consequent improvement of immunogenicity and protection.

Acknowledgments This work was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq), the São Paulo State Research Funding Agency (FAPESP), International Centre of Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), the Ministry of Health (Brazil), and the National Institutes of Health/NIAID (grant number R03 AI 66961-03).

References

- Alexander J, Sidney J, Southwood S et al (1994) Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides immunity 1:751–761
- Barker CJ, Beagley KW, Hafner LM et al (2008) In silico identification and in vivo analysis of a novel T-cell antigen from *Chlamydia*, NrdB. Vaccine 26:1285–1296
- Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F et al (1998) Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. Nature 393:478–480
- Berzofsky JA (1988) Immunodominance in T lymphocyte recognition. Immunol Lett 18:83–92
- Berzofsky JA, Cease KB, Cornette JL et al (1987) Protein antigenic structures recognized by T cells: potential applications to vaccine design. Immunol Rev 98:9–52
- Bevan MJ (2004) Helping the CD8(+) T-cell response. Nat Rev Immunol 4:595–602
- Bian H, Hammer J (2004) Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T cell epitopes with TEPITOPE. Methods 34:468–475
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B et al (1987) The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. Nature 329:512–518
- Braga-Neto UM, Marques ET Jr (2006) From functional genomics to functional immunomics: new challenges, old problems, big rewards. PLoS Comput Biol 2:e81
- Calvo-Calle JM, Strug I, Nastke MD et al (2007) Human CD4+ T cell epitopes from vaccinia virus induced by vaccination or infection. PLoS Pathog 3:1511–1529
- Carson RT, Vignali KM, Woodland DL et al (1997) T cell receptor recognition of MHC class II-bound peptide flanking residues enhances immunogenicity and results in altered TCR V region usage. Immunity 7:387–399
- Cohen WM, Pouveller-Moratille S, Wang XF et al (2006) Scanning the HIV genome for CD4+ T cell epitopes restricted to HLA-DP4, the most prevalent HLA class II molecule. J Immunol 176:5401–5408
- Cunha-Neto E (1999) MHC-restricted antigen presentation and recognition: constraints on gene, recombinant and peptide vaccines in humans. Braz J Med Biol Res 32:199–205
- Damico FM, Cunha-Neto E, Goldberg AC, Iwai LK, Marin ML, Hammer J, Kalil J, Yamamoto JH (2005) T cell recognition and cytokine profile induced by melanocyte epitopes in HLA-DRB1*0405-positive and negative Vogt-Koyanagi-Harada uveitis patients. Invest Ophthalmol Vis Sci 46:2465–2471
- Davenport MP, Hill AV (1996) Reverse immunogenetics: from HLA-disease associations to vaccine candidates. Mol Med Today 2:38–45
- De Groot AS, Jesdale BM, Szu E et al (1997) An interactive web site providing major histocompatibility ligand predictions: application to HIV research. AIDS Res Hum Retrovir 13:529–531
- De Groot AS, Bosma A, Chinai N et al (2001) From genome to vaccine: in silico predictions, ex vivo verification. Vaccine 19:4385–4395
- De Groot AS, McMurry J, Moise L (2008) Prediction of immunogenicity: in silico paradigms, ex vivo and in vivo correlates. Curr Opin Pharmacol 8:620–626
- de Lalla C, Sturniolo T, Abbruzzese L et al (1999) Cutting edge: identification of novel T cell epitopes in Lol p5a by computational prediction. J Immunol 163:1725–1729
- Depil S, Moralès O, Castelli FA et al (2007) Determination of a HLA II promiscuous peptide cocktail as potential vaccine against EBV latency II malignancies. J Immunother 30:215–226
- Doolan DL, Southwood S, Chesnut R et al (2000) HLA-DR-promiscuous T cell epitopes from plasmodium falciparum pre-erythrocytic-stage antigens restricted by multiple HLA class II alleles. J Immunol 165:1123–1137
- Flynn JC, McCormick DJ, Brusica V et al (2004) Pathogenic human thyroglobulin peptides in HLA-DR3 transgenic mouse model of autoimmune thyroiditis. Cell Immunol 229:79–85
- Fonseca CT, Cunha-Neto E, Goldberg AC et al (2005a) Human T cell epitope mapping of the *Schistosoma mansoni* 14 kDa fatty acid-binding protein using cells from patients living in areas endemic for schistosomiasis. Microbes Infect 7:204–212
- Fonseca CT, Cunha-Neto E, Goldberg AC et al (2005b) Identification of paramyosin T cell epitopes associated with human resistance to *Schistosoma mansoni* infection. Clin Exp Immunol 142:539–547
- Fonseca SG, Coutinho-Silva A, Fonseca LA 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
- Franco A, Ferrari C, Sette A et al (1995) Viral mutations, TCR antagonism and escape from the immune response. Curr Opin Immunol 7:524–531
- Fu TM, Friedman A, Ulmer JB et al (1997) Protective cellular immunity: cytotoxic T-lymphocyte responses against dominant and recessive epitopes of influenza virus nucleoprotein induced by DNA immunization. J Virol 71:2715–2721
- Gandhi RT, Walker BD (2002) Immunologic control of HIV-1. Annu Rev Med 53:149–172
- Garcia TC, Fonseca CT, Pacifico LG et al (2008) Peptides containing T cell epitopes, derived from Sm14, but not from paramyosin, induce a Th1 type of immune response, reduction in liver pathology and partial protection against *Schistosoma mansoni* infection in mice. Acta Trop 106:162–167
- Gowthaman U, Agrewala JN (2008) In silico tools for predicting peptides binding to HLA-class II molecules: more confusion than conclusion. J Proteome Res 7:154–163
- Guan P, Doytchinova IA, Zygouri C et al (2003) MHCpred: bringing a quantitative dimension to the online prediction of MHC binding. Appl Bioinformatics 2:63–66
- Guo Y, Niiya H, Azuma T et al (2005) Direct recognition and lysis of leukemia cells by WT1-specific CD4+ T lymphocytes in an HLA class II-restricted manner. Blood 106:1415–1418
- Hammer J, Bono E, Gallazzi F et al (1994) Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based on peptide side chain scanning. J Exp Med 180:2353–2358
- Honeyman MC, Brusica V, Harrison LC (1997) Strategies for identifying and predicting islet autoantigen T-cell epitopes in insulin-dependent diabetes mellitus. Ann Med 29:401–404
- Hural JA, Friedman RS, McNabb A et al (2002) Identification of naturally processed CD4 T cell epitopes from the prostate-specific

- antigen kallikrein 4 using peptide based in vitro stimulation. *J Immunol* 169:557–565
- Inaba H, Martin W, De Groot AS et al (2006) Thyrotropin receptor epitopes and their relation to histocompatibility leukocyte antigen-DR molecules in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2286–2294
- Iwai LK, Yoshida M, Sidney J et al (2003) In silico prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* frequently recognized in primary peripheral blood mononuclear cell responses from sensitized individuals. *Mol Med* 9:209–219
- Iwai LK, Yoshida M, Sadahiro A et al (2007) T-cell recognition of *Paracoccidioides brasiliensis* gp43-derived peptides in patients with paracoccidioidomycosis and healthy individuals. *Clin Vaccine Immunol* 14:474–476
- Khan AM, Miotto O, Heiny AT et al (2006) A systematic bioinformatics approach for selection of epitope-based vaccine targets. *Cell Immunol* 244:141–147
- Khanolkar A, Fuller MJ, Zajac AJ (2004) CD4 T cell-dependent CD8 T cell maturation. *J Immunol* 172:2834–2844
- Khanolkar A, Badovinac VP, Harty JT (2007) CD8 T cell memory development: CD4 T cell help is appreciated. *Immunol Res* 39:94–104
- Kim D, Hoory T, Monie A et al (2008) Enhancement of DNA vaccine potency through coadministration of CIITA DNA with DNA vaccines via gene gun. *J Immunol* 180:7019–7027
- Kobayashi H, Song Y, Hoon DS et al (2001) Tumor-reactive T helper lymphocytes recognize a promiscuous MAGE-A3 epitope presented by various major histocompatibility complex class II alleles. *Cancer Res* 61:4773–4778
- Kobayashi H, Omiya R, Ruiz M et al (2002) Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* 8:3219–3225
- Koren E, De Groot AS, Jawa V et al (2007) Clinical validation of the “in silico” prediction of immunogenicity of a human recombinant therapeutic protein. *Clin Immunol* 124:26–32
- Lanzavecchia A, Sallusto F (2001) Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat Immunol* 2:487–492
- Letvin NL, Mascola JR, Sun Y et al (2006) Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. *Science* 312:1530–1533
- Li H, Xu CF, Blais S et al (2009) Proximal glycans outside of the epitopes regulate the presentation of HIV-1 envelope gp120 helper epitopes. *J Immunol* 182:6369–6378
- Lin HH, Zhang GL, Tongchusak S et al (2008) Evaluation of MHC-II peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. *BMC Bioinformatics* 9(suppl 12):S22
- Livingstone AM, Wilson EB, Ontiveros F, Wang JC (2009) Unravelling the mechanisms of help for CD8+ T cell responses. *Immunol Res* 45(2–3):209–217
- Mallone R, Nepom GT (2004) MHC Class II tetramers and the pursuit of antigen-specific T cells: define, deviate, delete. *Clin Immunol* 110:232–242
- McNeel DG, Nguyen LD, Disis ML (2001) Identification of T helper epitopes from prostatic acid phosphatase. *Cancer Res* 61:5161–5167
- Mitra-Kaushik S, Cruz J, Stern LJ et al (2007) Human cytotoxic CD4+ T cells recognize HLA-DR1-restricted epitopes on vaccinia virus proteins A24R and D1R conserved among poxviruses. *J Immunol* 179:1303–1312
- Moise L, De Groot AS (2006) Putting immunoinformatics to the test. *Nat Biotechnol* 24:791–792
- Moudgil KD, Deng H, Nanda NK et al (1996) Antigen processing and T cell repertoires as crucial aleatory features in induction of autoimmunity. *J Autoimmun* 9:223–227
- Mustafa AS (2009) Th1 cell reactivity and HLA-DR binding prediction for promiscuous recognition of MPT63 (Rv1926c), a major secreted protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 69:213–222
- Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T et al (2008) Quantitative predictions of peptide binding to any HLA-DR molecule of known sequence: NetMHCIIpan. *PLoS Comput Biol* 4:e1000107
- Novy P, Quigley M, Huang X et al (2007) CD4 T cells are required for CD8 T cell survival during both primary and memory recall responses. *J Immunol* 179:8243–8251
- Ohkuri T, Wakita D, Chamoto K et al (2009) Identification of novel helper epitopes of MAGE-A4 tumour antigen: useful tool for the propagation of Th1 cells. *Br J Cancer* 100:1135–1143
- Panigada M, Sturniolo T, Besozzi G et al (2002) Identification of a promiscuous T-cell epitope in *Mycobacterium tuberculosis* Mce proteins. *Infect Immun* 70:79–85
- Pizza M, Scarlato V, Masignani V et al (2000) Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 287:1816–1820
- Rajapakse M, Schmidt B, Feng L et al (2007) Predicting peptides binding to MHC class II molecules using multi-objective evolutionary algorithms. *BMC Bioinformatics* 8:459
- Rajasagi NK, Kassim SH, Kollias CM et al (2009) CD4+ T cells are required for the priming of CD8+ T cells following infection with herpes simplex virus type 1. *J Virol* 83:5256–5268
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP et al (1999) SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50:213–219
- Rappuoli R (2000) Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol* 3:445–450
- Reche PA, Glutting JP, Reinherz EL (2002) Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs. *Hum Immunol* 63:701–709
- Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P (1998) A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393:474–478
- Robinson J, Waller MJ, Fail SC et al (2009) The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res* 37(Database issue):D1013–D1017
- Rosa DS, Tzelepis F, Cunha MG et al (2004) The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. *Immunol Lett* 92:259–268
- Rosa DS, Iwai LK, Tzelepis F et al (2006) Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). *Microbes Infect* 8:2130–2137
- Sant AJ, Chaves FA, Jenks SA et al (2005) The relationship between immunodominance, DM editing, and the kinetic stability of MHC class II:peptide complexes. *Immunol Rev* 207:261–278
- Saravia C, Martinez P, Granados DS et al (2008) Identification and evaluation of universal epitopes in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 377:1279–1283
- Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI et al (1998) T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393:480–483
- Serruto D, Rappuoli R (2006) Post-genomic vaccine development. *FEBS Lett* 580:2985–2992
- Sette A, Fikes J (2003) Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Curr Opin Immunol* 15:461–470
- Singh H, Raghava GP (2003) ProPred1: prediction of promiscuous MHC Class-I binding sites. *Bioinformatics* 19:1009–1014
- Smith CM, Wilson NS, Waithman J et al (2004) Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat Immunol* 5:1143–1148

- Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS et al (1994) Crystal structure of the human class II MHC protein MHC-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368:215–221
- Sturniolo T, Bono E, Ding J et al (1999) Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol* 17:555–561
- Tatsumi T, Kierstead LS, Ranieri E et al (2003) MAGE-6 encodes HLA-DRbeta1*0401-presented epitopes recognized by CD4+ T cells from patients with melanoma or renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 9:947–954
- Valentino M, Frelinger J (2009) An approach to the identification of T cell epitopes in the genomic era: application to *Francisella tularensis*. *Immunol Res* 45(2–3):218–228
- Wan XF, Chen G, Luo F et al (2007) A quantitative genotype algorithm reflecting H5N1 Avian influenza niches. *Bioinformatics* 23:2368–2375
- Wang P, Sidney J, Dow C et al (2008) A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput Biol* 4:e1000048
- Watkins DI, Burton DR, Kallas EG et al (2008) Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat Med* 14:617–621
- Wilson CC, Palmer B, Southwood S et al (2001) Identification and antigenicity of broadly cross-reactive and conserved human immunodeficiency virus type 1-derived helper T-lymphocyte epitopes. *J Virol* 75:4195–4207
- Wodarz D, Jansen VA (2001) The role of T cell help for anti-viral CTL responses. *J Theor Biol* 211:419–432
- Xu H, Wipasa J, Yan H et al (2002) The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4(+) T cells in malaria infection. *J Exp Med* 195:881–892
- Yang X, Yu X (2009) An introduction to epitope prediction methods and software. *Rev Med Virol* 19:77–96
- Zhang GL, Srinivasan KN, Veeramani A et al (2005) PREDBALB/c: a system for the prediction of peptide binding to H2d molecules, a haplotype of the BALB/c mouse. *Nucleic Acids Res* 33(Web Server issue):W180–W183
- Zhang GL, Khan AM, Srinivasan KN et al (2007) Neural models for predicting viral vaccine targets. *J Bioinform Comput Biol* 3:1207–1225
- Zhang S, Zhang H, Zhao J (2009) The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. *Biochem Biophys Res Commun* 384:405–408

Tendências em HIV•AIDS

Volume 3 - Número 3 - 2008

Disciplina de Infectologia
Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina

PERSPECTIVAS E ESTRATÉGIAS NO DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA ANTI- HIV

PERSPECTIVES AND STRATEGIES IN THE DEVELOPMENT OF AN ANTI-HIV VACCINE

Daniela S. Rosa^{1,3}, Susan P. Ribeiro^{1,3}, Edecio Cunha-Neto^{1,2,3*}

1 – Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia-LIM 60, Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia, Departamento de Clínica Médica;

2 – Instituto do Coração (InCor)-HCFMUSP, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;

3 – Instituto de Investigação em Imunologia, Institutos do Milênio, Brasil.

*enviar correspondência para Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia-LIM 60 Fac. Medicina USP, Av. Dr. Arnaldo, 455 s. 3207/9 CEP 01246-903 - São Paulo - SP – Brasil Fone (011) 3061-8314 Fax: (011)3061-8315 edecunha@gmail.com

RESUMO

A infecção pelo HIV foi responsável por mais de 20 milhões de mortes nas últimas décadas e atualmente existem aproximadamente 40 milhões de indivíduos infectados, a maioria deles em países em desenvolvimento. Em países onde o acesso ao tratamento anti-retroviral pela população é limitado, somente uma vacina eficaz poderia fazer frente à epidemia. A despeito 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. Várias vacinas experimentais mostraram-se imunogênicas em ensaios clínicos de Fase I, porém a grande maioria não mostrou qualquer proteção em ensaios de eficácia. Diversas vacinas experimentais têm como objetivo a indução de forte resposta imune celular anti-HIV, que pode proporcionar uma proteção parcial, com diminuição da carga viral resultando em redução da transmissão e progressão mais lenta para a AIDS. Este artigo visa demonstrar os obstáculos encontrados, o status atual, as estratégias e as perspectivas para o desenvolvimento de uma vacina contra a infecção pelo HIV.

Descritores: HIV, AIDS, vacinas, imunologia, imunidade celular, vetores, ensaios clínicos HIV, vaccine, AIDS, immunology, cellular immunity, vectors

ABSTRACT

HIV infection has caused more than 20 million deaths in the last decades and approximately 40 million live with HIV infection, most of them in developing countries. Only an effective vaccine could help to control the epidemic in countries where access to antiretroviral therapy is limited. In spite of the recent advances in the knowledge of the pathogenesis of HIV infection and the ensuing immune response, so far there is no effective vaccine against HIV infection. Several experimental vaccines have been shown to be immunogenic in Phase I clinical trials, but the vast majority showed no protection in efficacy trials. Several experimental vaccines have been designed to induce strong HIV-specific cellular immune response, which can provide partial protection leading to reduction of viral load with consequent reduction of transmission and slower progression to AIDS. This article aims to demonstrate the obstacles, the current status, strategies and prospects for the development of a vaccine against HIV infection.

Keywords: HIV, vaccine, AIDS, immunology, cellular immunity, vectors, clinical trials

Introdução

A infecção pelo HIV foi responsável por mais de 20 milhões de mortes nas últimas décadas e atualmente existem aproximadamente 40 milhões de indivíduos infectados. Segundo a Organização mundial de Saúde (OMS), 600 novas infecções pelo HIV ocorrem por hora no mundo sendo a maioria delas em países em desenvolvimento. No ano de 2007 foram relatados cerca de 2,5 milhões de novas infecções e 2,1 milhões de indivíduos morreram em decorrência de doenças relacionadas a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (boletim UNAIDS, 2007). Aproximadamente dois terços dos adultos e das crianças infectadas pelo HIV vivem na África subsaariana.

Em países onde o acesso ao tratamento anti-retroviral pela população é limitado somente uma vacina eficaz poderia fazer frente à epidemia.

A despeito 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. Várias vacinas experimentais que induziram imunidade celular mostraram-se imunogênicas em ensaios clínicos de Fase I, porém a grande maioria não mostrou qualquer proteção em ensaios de vacinação profilática, ou no controle duradouro da viremia, no caso de vacinas terapêuticas (Cohen et al. 2003, Goujard *et al.*, 2007, Watkins, 2008, Priddy *et al.*, 2008, Coutinho *et al.*, 2008).

Embora o desenvolvimento de uma vacina contra o HIV tenha desafiado os esforços até o momento, alguns fatores sugerem para a sua viabilidade (tabela 1) (AIDS vaccine Blueprint, 2006). A OMS estima que, na ausência de uma vacina eficaz, surgirão cerca de 100 milhões de novos casos de infecção pelo HIV. Sendo assim, o desenvolvimento de uma vacina contra o HIV é uma prioridade de saúde pública global. Este artigo visa demonstrar os obstáculos encontrados, o status atual, as estratégias e as perspectivas para o desenvolvimento de uma vacina contra a infecção pelo HIV.

Tabela 1. Os desafios para a viabilidade e o desenvolvimento de uma vacina

pe eno n ero e in i os n o se in e a apesar a e i en e e posi o repe i a ao pro issionais o se o a r i a asais soro is or an es
lg ns in i os apren a a or e respos a i ne el lar an i es o apa es es pri i ra arga iral an eis in e e eis i in in o a progress o a oen a e a rans iss o o
ran e o rso nor al a in e o pelo a i ni a e el lar s pri e a repli a o iral por per o o e e po as e es por a a a
ni a o e pri a as n o anos o a inas e r sa en a o pro ege on ra esa io o r s ai no ei in ias ia
n i orpos ne rali an es on ra o s o apa es e in ir pro e o o ale pri a as n o anos on ra a in e o o r s r i o a i no ei in ias ia ana

1. Obstáculos para o desenvolvimento de uma vacina contra a infecção pelo HIV

Nos últimos anos, apesar de consideráveis progressos terem sido alcançados no conhecimento da biologia do HIV e inúmeros ensaios clínicos com diversos candidatos à vacina terem sido realizados, os diversos obstáculos ao desenvolvimento de uma vacina anti-HIV eficaz ainda não foram superados adequadamente (Quadro 2). A determinação do tipo de imunidade que deverá ser induzida por uma vacina eficaz assim como quais os tipos de vacinação capazes de gerar essa imunidade são questões importantes a serem respondidas.

Tabela 2. Principais obstáculos para o desenvolvimento de uma vacina anti-HIV

i ersi a e an ig ni a/gen i a os isola os irais
iper aria ili a e e re n ia ele a a e a o no r s
es r i o as l las os sis e a i ne ap sine o
s ape iral ao on role pelo sis e a i ne
n egra o o pro r s no geno a a l la ospe eira o gera o e reser a rios irais
s n ia e orrela os e pro e o
perin e o poss el o seg n o isola o e
o elos ani ais i per ei os

2.1. Diversidade genética do vírus

A análise filogenética das inúmeras cepas de HIV-1 de origens geográficas diversas permitiu a classificação em três grandes grupos distintos de parentesco genômico denominados: M, N e O. A maioria das cepas responsáveis pela pandemia pertencem ao grupo M, dentro do qual se é possível distinguir 11 subtipos (A ao K). No mundo inteiro, cerca de 50% dos indivíduos estão infectados pelo HIV-1 subtipo C, enquanto o subtipo B, predominante nos países industrializados, posiciona-se como o terceiro mais freqüente, com cerca de 12% dos pacientes infectados. Entretanto, outros subtipos do HIV-1 (A, D, F e recombinantes) estão amplamente disseminados na África e Ásia. Com relação à prevalência dos subtipos virais no Brasil, a estimativa mais recente de identificou subtipos B (77.2%), C (3.3%), D (0.5%) e F (6.4%), bem como formas recombinantes B/F e B/C em diferentes posições (Potts *et al.*, 1993; Morgado *et al.*, 1994; Guimarães *et al.*, 2002). A diversidade de seqüências inter-subtipo pode chegar a 35% e a intra-subtipo pode ser de até 20% (Gaschen *et al.*, 2002), sugerindo uma extensa variação de alvos antigênicos para respostas imunes anti-HIV.

A variabilidade genética do HIV é o principal obstáculo à obtenção de uma vacina, porque as vacinas utilizam uma seqüência viral fixa para estimular uma resposta imune que teria de ser capaz de controlar posteriormente a infecção com qualquer HIV ao qual o indivíduo se exponha, não importa o quão distinto do composto vacinal. Dado que a maioria das vacinas experimentais é elaborada a partir de isolados específicos do HIV-1 de subtipo B, o impacto de tamanha variação genética deve ser reconhecido, já que divergências genéticas de até 2% resultaram em um fracasso de uma vacina contra a infecção pelo vírus da influenza (Gaschen *et al.*, 2002). Vacinas que protegeram primatas a desafio com SIV homólogo falharam em prevenir a infecção através de um isolado heterólogo, apresentando pequenas diferenças de seqüência, não mostrando nenhuma proteção ou controle da viremia (Peters, 2001). Mutações de escape pontuais (um único resíduo de aminoácidos) resultaram em perda do reconhecimento por células T CD8+ e aumento na viremia plasmática em macacos *Rhesus* experimentalmente infectados com SIV (Barouch *et al.*, 2003). Dois casos de superinfecção em pacientes soropositivos para o HIV-1 foram publicados, demonstrando que a resposta imune que controlava o vírus da primeira infecção falhou em controlar a superinfecção por um isolado diferente (Jost *et al.*, 2002; Altfeld *et al.*, 2002). Uma vez que o reconhecimento cruzado de células T para epítomos de diferentes subtipos do HIV-1 não é completo (Fernandez *et al.*, 1997), atingindo no máximo 50-80% dos epítomos, alguns pesquisadores acreditam que vacinas ideais deveriam corresponder aos subtipos de HIV circulantes no local para aumentar as chances de proteção.

2.2. Mecanismos imunológicos contra o HIV

Outro importante motivo que contribui para a dificuldade na produção de uma vacina eficaz é a inexistência de parâmetros que definam quais mecanismos estão envolvidos na proteção contra a infecção pelo HIV; a capacidade de desencadear respostas imunes, isoladamente, não significa que a vacina candidata tem capacidade protetora. Isso quer dizer que no momento presente, não existem testes que definam se a vacina é eficaz; somente um ensaio clínico de eficácia, medindo pro-

teção induzida pela vacina, pode avaliar isso. A consequência é que em tese é necessário testar clinicamente cada vacina candidata, em ensaios com milhares de pacientes e a um custo de centenas de milhões de dólares cada. O estudo dos mecanismos envolvidos na geração das respostas imunes, juntamente com o desenvolvimento de diversas tecnologias que permitem monitorar as respostas imunes induzidas após a vacinação, contribui para a determinação de alguns correlatos de proteção durante a infecção natural pelo HIV e após a vacinação. A identificação desses correlatos é um passo fundamental no direcionamento de estratégias para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o HIV, pois permitiria avaliar vacinas candidatas em estágios anteriores.

Diversas linhas de evidência indicam que anticorpos neutralizantes, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ desempenham um importante papel na imunidade contra o HIV (revisto por Gandhi & Walker, 2002). Os anticorpos são capazes de neutralizar o HIV, impedindo dessa maneira a entrada do vírus na célula hospedeira. Embora existam várias evidências que sugerem que os anticorpos neutralizantes são capazes de prevenir a infecção pelo HIV, até o momento não foi possível a produção de um imunógeno capaz de induzir a produção de elevados títulos de anticorpos que neutralizem diversos isolados de HIV (revisto por Letvin, 2005).

Vacinas indutoras de respostas de células T podem diminuir a viremia inicial e prevenir a destruição maciça e precoce de células T CD4⁺ de memória, que auxiliam no controle da infecção e prolongam a sobrevida livre de doença. Além disso, a transmissão secundária poderá ser reduzida se a vacina auxiliar no controle da replicação viral. (Jonhston & Fauci, 2007). Os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) têm um papel reconhecido no controle viral através da lise celular direta (efeito citotóxico sobre células infectadas) e da secreção de citocinas e quimiocinas que aumentam a imunidade antiviral e suprimem a infecção (Walker *et al.*, 1987; Plata *et al.*, 1987; Borrow *et al.*, 1994; Cocchi *et al.*, 1995). As células CD8⁺ vírus específicas são capazes de lisar as células infectadas pelo HIV através do reconhecimento de peptídeos virais expostos na superfície da célula infectada juntamente com moléculas de HLA de classe I. Dessa maneira, a resposta de CTL elimina as células infectadas antes que a progênie de vírions seja liberada, demonstrando a potencial atividade antiviral dessas células. Os linfócitos T CD8⁺ podem agir também inibindo a replicação do HIV pela secreção de quimiocinas β , como MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES, as quais possuem a capacidade de se ligar aos coreceptores do HIV nas células CD4⁺ bloqueando então a entrada do vírus (revisto por Gandhi & Walker, 2002). O papel das células T CD8⁺ específicas para o HIV-1 no controle da doença foi diretamente demonstrado em modelos de infecção por SHIV em macacos (Koup *et al.*, 1994). A depleção desse tipo celular com anticorpos monoclonais anti-CD8 e posterior infecção com SIV, levou a uma incontrolada replicação viral e acelerada mortalidade (Schmitz *et al.*, 1999). Durante a infecção aguda pelo HIV, a ativação e expansão dos linfócitos T CD8⁺ HIV-específicos está relacionada com o declínio da viremia (Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994; Greenough *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1998). Em modelos de infecção em primatas, as imunizações direcionadas à indução de respostas mediadas por CTL são capazes de reduzir a carga viral, mas não de conferir proteção estéril contra a infecção pelo HIV (revisto por Letvin, 2005).

A importância de células T CD4⁺ vírus-específicas e sua associação com a resposta imune antiviral foi demonstrada em camundongos e em humanos (Novy *et al.*, 2007). Os linfócitos T CD4⁺ HIV-específicos têm papel fundamental na atividade dos linfócitos T CD8⁺, através de auxílio na indução e/ou manutenção das respostas dessas células, além de também influenciar nas respostas de linfócitos B (produtores de anticorpos) e macrófagos e/ou pela mediação direta de suas funções efetoras antivirais tais como produção de citocinas e, eventualmente efeito citotóxico (Hogan & Hammer, 2001). O controle da replicação do HIV-1 e consequente diminuição da carga viral foram associados a uma vigorosa resposta linfoproliferativa HIV-1 específica em pacientes cronicamente infectados e não tratados (Rosenberg *et al.*, 1997 e revisto por Gandhi & Walker, 2002). Essa importância é amparada pela recente observação de que imunização capaz de preservar as células T CD4⁺ de memória (Mattapallil *et al.*, 2006), leva a uma sobrevida aumentada após desafio de primatas com SIV (Letvin *et al.*, 2006). Um estudo recente utilizando clones de células T CD4⁺ mostrou que essas são capazes de suprimir a replicação viral e de lisar células T que expressam a proteína p24 do HIV-1. Esses dados deram suporte ao conceito de que as células T CD4⁺, além de prover o auxílio para a geração de CTL, possuem um efeito direto no controle da replicação viral *in vivo* (Norris *et al.*, 2004). As demonstrações subseqüentes das potentes respostas de linfoproliferação em humanos LTNP (long term non progressors) demonstraram o papel das respostas T CD4⁺ em manter o controle da infecção por HIV em humanos (Rosenberg *et al.*, 1997). Respostas de células T CD4⁺ antígeno específicas precoces podem também ser utilizadas como um fator de bom prognóstico na infecção pelo HIV (Pancré *et al.*, 2007).

Sabe-se que um dos mecanismos pelos quais as células T exercem a sua função efetora é através da secreção de citocinas. A capacidade funcional e o fenótipo das células T são determinantes críticos na indução da imunidade celular efetora. Todavia, devido à heterogeneidade da resposta de citocinas geradas por diferentes vacinas, até o momento não existem correlatos de proteção em infecções que necessitam de respostas de células T. A recente técnica de citometria de fluxo multiparamétrica vem sendo amplamente utilizada para acessar simultaneamente múltiplas funções das células T. A detecção de IFN- γ , IL-2 e TNF α por uma mesma célula podem definir a qualidade da resposta de citocinas de células T CD4⁺ e T CD8⁺ inclusive em indivíduos imunizados contra a varíola ou *Mycobacterium tuberculosis* (Darrah *et al.*, 2007, Precopio *et al.*, 2007, Beveridge *et al.*, 2007). Na infecção pelo HIV já foi demonstrado que indivíduos não progressores mantêm preferencialmente células T CD8⁺ HIV-específicas com capacidade multifuncional (IFN- γ , IL-2, TNF- α , MIP-1 β e degranulação) cujo número se correlaciona inversamente com a carga viral (Betts *et al.*, 2006). Respostas multifuncionais de células T CD4⁺ representam a maior porcentagem das respostas totais de citocinas após exposição a vírus que são eliminados ou que persistem em baixos níveis como vírus da influenza, vírus Epstein-Barr (EBV), citomegalovírus do que se comparados a indivíduos infectados pelo HIV com elevada carga viral (revisto por Seder *et al.*, 2008). Baseado nesses achados acredita-se que a qualidade da resposta funcional de células T mais do que a quantidade, seja um fator importante a ser analisado para verificar a eficácia das vacinas.

2.4. Modelos animais de infecção pelo HIV

Os ensaios clínicos de segurança e imunogenicidade (fase I/IIa) de todas as vacinas profiláticas candidatas podem requerer o envolvimento grandes números de voluntários soronegativos, com altos custos. Portanto, estudos prévios realizados em modelos animais são de extrema relevância. A falta de tais modelos retarda o progresso do desenvolvimento de vacinas (Eiben *et al*, 2002).

No caso da infecção pelo HIV a ausência de um modelo animal que reproduza com exatidão a infecção em humanos é um fator limitante no teste de novas formulações vacinais. Embora o chimpanzé seja susceptível a infecção pelo HIV, os isolados se replicam a níveis baixos e, portanto não são capazes de induzir um quadro de doença clínica. Os vírus da imunodeficiência símia (simian immunodeficiency viruses - SIVs) são capazes de desencadear em algumas espécies de macacos asiáticos uma doença com similaridades àquelas observadas em humanos (revisto por Letvin, 2006) e alguns isolados podem até desencadear imunodeficiência progressiva e morte. O vírus quimérico, denominado vírus da imunodeficiência símia-humana (SHIV) é produzido em laboratório e contém a estrutura do SIV e várias proteínas do envelope do HIV. Atualmente o modelo de infecção de macacos *Rhesus* com o SIV tem permitido a realização de avanços importantes no estudo de novas formulações vacinais, entretanto os custos de aquisição e manutenção de biotérios para primatas são elevados.

O estudo da patogênese do HIV também vem sendo realizado em camundongos transgênicos que expressam co-receptores celulares humanos, implicados na entrada do vírus nas células hospedeiras, assim como em camundongos portadores de imunodeficiência severa combinada (SCID) reconstituídos com células do sistema imune humano (camundongos *Scid-hu*) (Sun *et al.*, 2007; Zhang *et al*, 2007). Os camundongos *Scid-hu* infectados pelo HIV-1 desenvolvem elevada viremia no plasma, com infecção produtiva em tecidos linfóides que perdura por até 19 semanas. Esses animais podem servir como um modelo *in vivo* para investigar os mecanismos e a imunopatogênese da infecção pelo HIV, assim como auxiliar no desenvolvimento de novos métodos de intervenção terapêutica.

3. Diferentes estratégias utilizadas para o desenvolvimento de uma vacina anti-HIV

O desenvolvimento de novos candidatos à vacina anti-HIV envolve diferentes etapas incluindo a pesquisa básica e a realização de ensaios clínicos para posterior liberação pelas agências reguladoras (Figura 1).

Devido à biologia única do HIV e sua interação com o sistema imune, as estratégias convencionais para vacinação não tem se mostrado eficazes contra a infecção pelo HIV (Letvin *et al.*, 2005). Apesar de o uso de vírus vivo atenuado, vírus inativado e proteína recombinante ser bastante eficaz contra outras doenças causadas por vírus, no caso do HIV essas estratégias parecem ter eficácia limitada (Letvin, 2006) – e o uso de SIV-1 atenuado em macacos, que pode proteger da infecção aguda por outro SIV patogênico, invariavelmente leva os animais à morte pela perda da atenuação. Devido à limitação dessas estratégias vacinais clássicas, diferentes abordagens vêm sendo investigadas com o objetivo de gerar novos imunógenos, dentre elas, DNA plasmidial, vetores virais ou bacterianos, proteínas recombinantes, combinação de diferentes imunógenos e estratégias de *prime-boost* heterólogo (Tabela 3).

Figura 1. etapas para o desenvolvimento de uma vacina.

Tabela 3. Principais estratégias vacinais

vacinas virais	vacinas de subunidades
	plasmidial
vacinas genéticas	vetores virais recombinantes Partículas lipídicas vetores bacterianos recombinantes isômeros de genes
vacinas proteicas	Proteínas purificadas recombinantes Peptídeos sintéticos lipopeptídeos
Combinação de imunógenos e <i>prime-boost</i> heterólogo	

3.1. Vírus inteiros

As estratégias tradicionalmente utilizadas para a imunização contra infecções virais são baseadas na utilização de uma forma atenuada (rubéola, febre amarela e etc) ou inativada (poliomielite, gripe, hepatite A) do agente infeccioso. No modelo de infecção rhesus/SIV essas estratégias mostraram-se eficazes, porém por razões associadas à reativação viral e recombinação genética não são utilizadas para o HIV.

3.2. Proteínas recombinantes

Os primeiros ensaios clínicos com um candidato à vacina contra a infecção pelo HIV utilizaram proteínas recombinantes representando proteínas do envelope viral (gp120/gp160). Esses imunógenos induziram anticorpos que não possuíam a capacidade de neutralizar isolados primários do HIV e não foram capazes de

induzir uma resposta CTL. Na época, embora não se tenha obtido um amplo consenso científico, uma companhia de biotecnologia disponibilizou capital suficiente para realização de ensaios clínicos. Os resultados de dois ensaios clínicos de eficácia realizados na Tailândia e nos Estados Unidos não demonstraram proteção contra a infecção pelo HIV (Cohen, 2003).

Os lipopeptídeos são constituídos de peptídeos sintéticos ligados de maneira covalente a cadeias lipídicas e a sua utilização como imunógeno vem sendo avaliada através de diferentes ensaios clínicos (Lévy *et al.*, 2005; Gahery *et al.*, 2006). A injeção intradérmica de lipopeptídeos em voluntários sadios demonstrou ser bem tolerada, capaz de induzir uma resposta de linfócitos TCD8+ HIV-específica de mesma magnitude a observada após imunização intramuscular mesmo em menores doses (Launay *et al.*, 2007). De maneira similar, ensaios clínicos utilizando lipopeptídeos em indivíduos cronicamente infectados pelo HIV-1 e sobre tratamento, como vacina terapêutica, demonstraram a segurança e eficácia desta estratégia em reduzir a carga viral (Lévy *et al.*, 2006). Entretanto, a administração da vacina em indivíduos tratados durante a infecção primária pelo HIV não alterou a carga viral em estudo subsequente realizado pelos mesmos autores (Goujard *et al.*, 2007).

3.3. Vetores recombinantes

As vacinas de DNA, vacinas de subunidade contendo DNA codificante de parte do patógeno, são vetores de expressão de eucariotos, que utilizam sinais de tradução e transcrição, além da maquinaria proteica da célula eucariótica transfectada, para produzir os imunógenos. Com isso, quantidades suficientes de proteínas são sintetizadas e uma resposta imune apropriada é induzida. Dentre as vantagens da vacina de DNA podemos incluir a fácil construção (manipulação de vetores), produção em larga escala, maior estabilidade e uma maior segurança em relação às vacinas de patógenos atenuados. Em humanos, embora tenha sido demonstrado que as vacinas de DNA são capazes de induzir uma resposta imune antígeno-específica, a imunogenicidade é limitada (Egan *et al.*, 2006). As vacinas de DNA testadas até o momento contra o HIV se mostraram imunogênicas em diversos modelos animais e bem toleradas em humanos. Protocolos experimentais têm usado a imunoterapia baseada na administração de vacinas de DNA em pacientes infectados com HIV juntamente com o uso de terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART). Nesses estudos, vacinas de DNA foram capazes de aumentar moderadamente a resposta imune mediada por células em uma proporção dos voluntários (Estcourt *et al.*, 2004; Lu, 2008).

Diversas abordagens vêm sendo avaliadas com o objetivo de aumentar a imunogenicidade das vacinas de DNA como a eletroporação *in vivo* (Luckay *et al.*, 2007), gene gun, aplicações dérmicas através de tatuagens (Bins *et al.*, 2005) e adição de adjuvantes (Kwissa *et al.*, 2007). A maneira mais eficiente de aumentar a imunogenicidade das vacinas de DNA é o sistema de *prime-boost* heterólogo. Este consiste na administração inicial de um antígeno através de um vetor e uma dose de reforço utilizando o mesmo antígeno, porém, utilizando outro tipo de vetor. O DNA é, em geral, utilizado para as primeiras imunizações ("DNA priming"), pois dessa maneira ele é capaz de gerar uma resposta já direcionada para o padrão Th1/Tc1. Posteriormente como dose de reforço, utiliza-se então um vírus recombinante. Os vírus recombinantes também têm sido amplamente utilizados nos protocolos de vacinas anti-HIV. Diversas linhas de evidências sugerem que os vetores virais são capazes de induzir uma forte

resposta imune celular. Eles têm sido utilizados em sistemas *prime-boost* homólogo ou heterólogo, nesse caso combinando-se DNA e vírus ou dois vírus diferentes expressando o mesmo antígeno. Sua principal característica é gerar maiores magnitudes resposta de célula T e de memória imunológica, que não são obtidos em outros protocolos. Este aumento na resposta imune é demonstrado pelo aumento de células T específicas, aumento seletivo de células T de alta afinidade e maior eficácia em desafios com patógenos (revisto por Woodland, 2004). Embora inicialmente este tipo de estratégia tenha sido utilizado para indução de respostas de células T CD8+, mais recentemente foi demonstrado que tanto células T CD8+ quanto CD4+ podem ser induzidas utilizando-se estratégias apropriadas de *prime-boost*. Experimentos com protocolos de *prime-boost* envolvendo vacinas de DNA e vetores virais contendo insertos codificando proteínas do HIV mostraram que os indivíduos imunizados mantiveram controle da carga viral por mais tempo do que os que receberam placebo (Tubiana *et al.*, 2005).

Os vetores virais recombinantes mais utilizados em ensaios de vacina contra o HIV incluem o adenovírus do tipo 5 (Casimiro *et al.*, 2004), poxvírus atenuados (*canarypox*, Franchini *et al.*, 2004); vírus *vaccinia* (vacina NYVAC) e MVA (vírus da *vaccinia* Ankara modificado) (Hanke *et al.*, 2007; Ondondo *et al.*, 2006). Os vetores bacterianos recombinantes contendo antígenos do HIV também vêm sendo avaliados em estratégia de *prime-boost* heterólogo. A imunização com *Listeria monocytogenes* atenuada recombinante codificando para o gene *gag* foi capaz de induzir uma resposta imune nos tecidos vaginais de linfócitos T CD8+ HIV-específicos com atividade citotóxica (Li *et al.*, 2008). Tendo em vista que a infecção pelo HIV é também transmissível pela via de mucosa, acredita-se que imunógenos capazes de induzir uma resposta imune sistêmica e de mucosa desempenhariam um papel importante na indução de proteção.

3.4. Vacinas terapêuticas e imunoterapia

O curso da infecção pelo HIV tem sofrido consideráveis mudanças nos últimos anos devido ao uso de novos regimes de tratamento anti-retroviral que combinam inibidores da transcrição reversa, clivagem de proteínas virais e inibição da entrada do vírus. Os recentes avanços no desenvolvimento de novas terapias anti-retrovirais são muitas vezes limitados pelos efeitos colaterais e pela toxicidade das drogas (Autran *et al.*, 2003). Uma alternativa consiste no tratamento inicial com anti-retroviral a fim de restaurar a imunocompetência e posteriormente a administração de vacinas terapêuticas para reforçar a resposta imune HIV-específica (Autran *et al.*, 2004). Como consequência ocorreria um aumento na resposta imune contra o vírus, diminuição na progressão para a doença clínica e limitação do uso subsequente de drogas anti-retrovirais.

As respostas de células T HIV-específicas declinam em pacientes sob terapia anti-retroviral, provavelmente devido à uma ausência de antígeno viral. Acredita-se que a imunização terapêutica de indivíduos infectados e tratados durante a infecção aguda pode ser capaz de levar um controle da replicação viral após a interrupção do tratamento (revisto por Gandhi & Altfeld, 2005).

Existem vários candidatos a vacinas terapêuticas que já foram testadas ou estão em testes clínicos de fase I/II como: ALVAC-HIV, Remune e células dendríticas autólogas pulsadas com HIV inativado. A ALVAC-HIV é composta de um *canarypox* modificado e que expressa os genes *gag* e *env* juntamente com epítopos de *pol* e *nef*. A imunização com ALVAC-HIV

(vCP1452) juntamente com a proteína recombinante gp160 em indivíduos agudamente infectados e tratados induziu respostas de células T CD8+ HIV-específicas, porém somente uma resposta transitória de células T CD4+ (Jin *et al.*, 2002). Um estudo mais recente de fase I avaliou o impacto da imunização de indivíduos cronicamente infectados e tratados com a vacina terapêutica ALVAC-HIV (vCP1433) sozinha ou em combinação com lipopeptídeos do HIV (LIPO-6T) e administrada na presença de Interleucina 2 (IL-2). A imunização foi capaz de induzir respostas de células T CD4+ e CD8+ HIV-específicas que permitiram uma interrupção mais prolongada do tratamento anti-retroviral (Lévy *et al.*, 2006). Em contraste, uma avaliação feita pelo mesmo grupo em indivíduos tratados logo após a infecção primária demonstrou a ineficácia da mesma formulação no controle da replicação viral após a interrupção do tratamento anti-retroviral (Goujard *et al.*, 2007).

A Remune foi desenvolvida há aproximadamente 10 anos e foi um dos primeiros candidatos à vacina terapêutica anti-HIV a entrar em ensaios clínicos. A vacina é composta de um HIV inativado (contendo *env* do clado A e *gag* do clado C), depletado da glicoproteína gp120 e emulsificado em Adjuvante Incompleto de Freund. A imunização de indivíduos cronicamente infectados e tratados com a vacina Remune em ensaio de fase I é capaz de aumentar a resposta de células T CD4+ HIV-específicas (Robbins *et al.*, 2003). Em contraste, um estudo recente de fase I demonstrou a inabilidade da Remune juntamente com a IL-2 em manter a resposta de células T HIV-específicas (Hardy *et al.*, 2007).

As vacinas terapêuticas baseadas em células dendríticas utilizam células autólogas pulsadas com peptídeos ou vírus inativado. Monócitos do sangue de voluntários são diferenciados expandidos como células dendríticas *in vitro*; tais células são incubadas com o imunógeno (peptídeo ou vírus inativado) e então injetadas subcutaneamente. A imunização de indivíduos cronicamente infectados em ensaio de fase I com células dendríticas pulsadas com HIV-1 inativado foi capaz de diminuir a carga viral em uma proporção dos voluntários, e essa diminuição se correlacionou com a presença de uma robusta resposta de células T CD4+ e CD8+ HIV-específicas (Lu *et al.*, 2004). Esses estudos demonstram um importante aspecto na avaliação das vacinas terapêuticas, que inclui a análise da imunogenicidade versus eficácia (revisto por Gandhi & Altfeld, 2005); entretanto, como comentado anteriormente, a imunogenicidade não garante eficácia vacinal. Os ensaios clínicos para avaliação dos candidatos a vacinas terapêuticas devem ser realizados com o objetivo de avaliar além da capacidade imunogênica da formulação, a capacidade desta em reduzir a replicação viral.

3.5. Vacinas multiepitópicas e multialélicas

Dado o insucesso das vacinas testadas até o momento, tornou-se importante buscar novas estratégias inovadoras para uma vacina. Ao longo do tempo, os patógenos desenvolveram diversos mecanismos moleculares de escape contra o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. Esse fenômeno se baseia principalmente na capacidade do patógeno em alterar a sequência protéica antigênica impedindo assim o reconhecimento e processamento pelas células do sistema imune. É possível então que as dificuldades enfrentadas pelas vacinas experimentais testadas até hoje sejam em parte derivadas do desenho de suas sequências. Praticamente todas as vacinas experimentais testadas foram baseadas em proteínas

ou genes inteiros do HIV-1. Vacinas de DNA, recombinantes ou de vetores virais que codificam genes ou proteínas inteiras do HIV-1 permitem a reprodução dos mecanismos de escape molecular desenvolvidos pelo HIV-1 nativo ao longo da evolução do hospedeiro, em resposta às pressões imune e outras, o que pode ser responsável pela ausência de proteção conferida por tais vacinas. Uma vacina putativa baseada em epítomos – apresentados fora do contexto das sequências flanqueadoras das proteínas nativas – poderia abolir os mecanismos de escape do processamento, apresentação e reconhecimento imunológicos, levando à indução de respostas imunes celulares amplificadas. Outro aspecto essencial é que tais epítomos devem ser reconhecidos pela totalidade – ou a grande maioria – dos indivíduos, de forma a cobrir uma proporção significativa da população exposta. Em trabalho utilizando uma vacina multivalente contendo 176 peptídeos lipidados ou não lipidados, representando as regiões variáveis das proteínas *env* e *gag* do HIV, observou-se que a imunização de primatas e camundongos transgênicos foi capaz de induzir uma ampla resposta imune humoral e celular contra diversos subtipos do HIV (A-F) (Azizi *et al.*, 2008). Em estudos anteriores, o nosso grupo identificou epítomos imunodominantes novos, não previamente conhecidos, do HIV-1 reconhecidos por linfócitos T CD4+, para um possível uso vacinal. Para tal, selecionamos 18 sequências das regiões conservadas das proteínas do HIV-1 capazes de se ligar a múltiplas moléculas HLA-DR, comuns à grande maioria da população – e portanto capazes de ser reconhecidas pelos linfócitos T da população geral. Tais epítomos foram reconhecidos por linfócitos T de 90% de indivíduos infectados pelo HIV-1 em diferentes estágios clínicos da doença; cada paciente reconheceu em média 5 epítomos (Fonseca *et al.*, 2006). Com o intuito de avaliar a capacidade imunogênica da combinação de 18 epítomos para linfócitos T CD4+, desenhamos uma vacina de DNA contendo a sequência nucleotídica que codifica para cada um dos 18 epítomos e imunizamos diferentes linhagens de camundongos. A análise preliminar dos resultados demonstrou que a vacina de DNA é capaz de gerar uma resposta imune multiepitópica e multialélica, características desejáveis para uma vacina contra o HIV. Acreditamos que o desenvolvimento de novas formulações baseadas em regiões conservadas do HIV que visem o aumento da cobertura na população geneticamente heterogênea e a abrangência da proteção mesmo quanto a isolados virais mais distantes seria capaz de gerar uma vacina eficaz.

4. Ensaios Clínicos

Os ensaios clínicos vacinais contra o HIV são conduzidos de maneira semelhante à observada contra outros patógenos. Os ensaios clínicos de fase I se baseiam na segurança da formulação vacinal; fase II na segurança e imunogenicidade e fase III na segurança, imunogenicidade e eficácia. Os primeiros ensaios clínicos vacinais para o HIV foram realizados em 1987. O primeiro ensaio clínico de fase III realizado se baseou na imunização de 2500 voluntários com uma proteína recombinante representando a gp120 do subtipo B. Esse ensaio demonstrou a ineficácia da formulação vacinal em induzir proteção contra a infecção pelo HIV ou redução da carga viral em indivíduos que subsequentemente se infectaram (AIDS vaccine Blueprint, 2006). Outros ensaios clínicos de fase III utilizando a vacina Remune (HIV inativado e depletado de gp120) já se encerraram e em nenhum deles foi observado proteção (www.clinicaltrials.gov).

Durante o ano de 2007, mais de 30 ensaios clínicos foram realizados ou ainda estão em curso em mais de 26 países. Os detalhes desses ensaios estão disponíveis no site International "Aids Vaccine Initiative" (IAVI) (<http://www.iavireport.org/trialsdb>). A maior parte dos ensaios clínicos que vem sendo realizados atualmente avalia imunógenos teoricamente capazes de induzir uma forte resposta imune celular contra o HIV (Shiver *et al.*, 2002; Boyer *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2003; Wee *et al.*, 2002). Essa estratégia tem como objetivo a indução de uma proteção parcial, caracterizada por uma diminuição da viremia e conseqüente menor progressão para a doença clínica (AIDS) (Figura 2). A indução de uma forte resposta celular está correlacionada com uma baixa carga viral em indivíduos infectados e estudos em primatas demonstraram que vacinas baseadas nesse tipo de resposta são capazes de suprimir a carga viral e diminuir a transmissão (Wilson *et al.*, 2006). Ao diminuir a carga viral após a infecção, uma vacina desse tipo permitirá também uma redução na taxa de transmissão do vírus (AIDS vaccine Blueprint, 2006) uma vez que já foi demonstrado que indivíduos infectados e que possuem uma baixa carga viral (<1.700 cópias/ml) não transmitiram o vírus aos seus parceiros soronegativos (Gray *et al.*, 2001). Modelos matemáticos sugerem que uma redução de dez vezes na carga viral pode ser suficiente para reduzir em aproximadamente 35% a mortalidade associada ao HIV-1 nos primeiros 20 anos após a introdução da vacina (Davenport *et al.*, 2004).

Figura 2: O efeito da vacina baseada na resposta imune celular na replicação viral e na eliminação da transmissão. A curva superior representa a carga viral em indivíduos não vacinados, que pode atingir níveis de 30.000 cópias/ml. A curva inferior representa a carga viral em indivíduos vacinados, que permanece abaixo de 1.500 cópias/ml. A diferença entre as duas curvas é de aproximadamente 10 vezes, o que corresponde a uma redução de 35% na mortalidade associada ao HIV-1 nos primeiros 20 anos após a introdução da vacina (Davenport *et al.*, 2004).

Diversos ensaios clínicos de fase I/II estão sendo realizados utilizando vetores virais recombinantes contendo antígenos do HIV (<http://www.iavi.org/>). Existem atualmente 3 candidatos em fase mais avançada de ensaio clínico (Tabela 4). Um ensaio clínico de fase III, atualmente em andamento na Tailândia, com 16000 voluntários sob risco elevado de infecção pelo HIV, avalia a eficácia da estratégia de *prime-boost* utilizando como imunógeno um vetor viral recombinante – poxvírus atenuado-*canary-pox* (vacina ALVAC)- e a gp120 recombinante (AIDSVAX). Com base no ensaio realizado em primatas, no qual a imunização com DNA *prime* e adenovírus recombinante *boost* codificando *gag* foi capaz de reduzir a carga viral em 15 vezes nos primatas desafiados com SIVmac239 (Watkins *et al.*, 2008) uma estratégia vacinal semelhante foi selecionada para posterior ensaio clínico de fase IIb pela empresa Merck. O

Tabela 4. Principais vacinas em ensaios clínicos

Vetor	Antígeno/clado	Organizador/Responsável	Fase
Poxvírus + proteína recombinante	n ag/Pol n	en is/ a gen	
Vírus recombinante adeno-associado (AAV)	ag P		
DNA plasmidial + Adenovírus recombinante (rAd)	ag Pol e n		
Lipopeptídeos	ag Pol e		

ensaios clínicos de fase IIb, chamado de "prova de conceito", é desenhado com o objetivo de obter indicações iniciais da eficácia da vacina, utilizando um menor número de voluntários sob elevado risco de infecção e com menor tempo de duração (AIDS vaccine Blueprint 2006). A versão testada em humanos foi desenhada com o objetivo de induzir uma forte resposta celular e consistia em um mistura de três adenovírus recombinantes do sorotipo 5 (Ad5), expressando individualmente três genes do HIV-1 subtipo B: *gag*, *pol* e *nef* (Sekaly, 2008; Priddy *et al.*, 2008; Watkins *et al.*, 2008). O ensaio clínico envolveu a imunização de aproximadamente 3000 indivíduos saudáveis sob elevado risco de infecção pelo HIV. Em setembro de 2007, o ensaio foi suspenso pelo comitê de segurança. Embora as análises estatísticas não estejam completas, os resultados indicam que a vacina de adenovírus não foi capaz de conferir proteção contra a infecção pelo HIV. Em adição, os indivíduos com altos títulos de anticorpos contra o adenovírus apresentaram maior incidência de infecção pelo HIV do que aqueles que apresentavam baixos títulos de anticorpos iniciais contra o adenovírus.

Apesar das intensas investigações, nenhum mecanismo biológico ainda emergiu para explicar como a imunidade pré-existente contra o Ad5 poderia tornar as pessoas mais susceptíveis ao HIV (Cohen, 2007; Sekaly 2008; Watkins *et al.*, 2008). Uma das possíveis explicações para a maior vulnerabilidade à infecção pelo HIV nos indivíduos com altos títulos de anticorpos iniciais contra o Ad5 é devido a uma maior ativação do sistema imune logo após a vacinação. Especificamente, o HIV estabelece a infecção através das células T CD4+CCR5+ ativadas. A infecção natural com o adenovírus induz a formação de células de memória que apresentam esse fenótipo. Teoricamente, os antígenos do adenovírus codificados no vetor vacinal (Ad5) poderiam ter ativado essas células de memória, levando à expansão das mesmas, criando um ambiente propício para a replicação do HIV. Entretanto, o que foi completamente inesperado, foi a possibilidade de que uma infecção prévia por adenovírus pudesse aumentar a susceptibilidade para a infecção pelo HIV nos indivíduos vacinados.

Apesar das intensas investigações, nenhum mecanismo biológico ainda emergiu para explicar como a imunidade pré-existente contra o Ad5 poderia tornar as pessoas mais susceptíveis ao HIV (Cohen, 2007; Sekaly 2008; Watkins *et al.*, 2008). Uma das possíveis explicações para a maior vulnerabilidade à infecção pelo HIV nos indivíduos com altos títulos de anticorpos iniciais contra o Ad5 é devido a uma maior ativação do sistema imune logo após a vacinação. Especificamente, o HIV estabelece a infecção através das células T CD4+CCR5+ ativadas. A infecção natural com o adenovírus induz a formação de células de memória que apresentam esse fenótipo. Teoricamente, os antígenos do adenovírus codificados no vetor vacinal (Ad5) poderiam ter ativado essas células de memória, levando à expansão das mesmas, criando um ambiente propício para a replicação do HIV. Entretanto, o que foi completamente inesperado, foi a possibilidade de que uma infecção prévia por adenovírus pudesse aumentar a susceptibilidade para a infecção pelo HIV nos indivíduos vacinados.

A elevada prevalência de imunidade pré-existente ao adenovírus do sorotipo 5 (Ad5) na população humana pode limitar substancialmente a utilização clínica de vacinas baseadas em Ad5 para o HIV e outros patógenos. Uma alternativa promissora é a utilização de outros sorotipos de adenovírus menos freqüentes como o Ad11 e Ad35 assim como vírus quiméricos (Ad5/35) (Someya *et al.*, 2007; Barouch *et al.*, 2004).

5. O desenvolvimento da vacina anti-HIV pode se basear nas outras vacinas eficazes?

Várias formulações vacinais que são eficazes contra diferentes vírus que infectam o homem (Febre amarela, Influenza, Hepatite A e B, poliomielite, rubéola, etc). Essas vacinas são capazes de induzir proteção através da geração de anticorpos neutralizantes, respostas celulares vírus-específicas ou ambas. Recentemente, tem sido estudado o tipo de resposta imune inata desencadeada por tais vacinas eficazes; a construção de uma vacina anti-HIV com um perfil semelhante poderia ser um caminho a trilhar. Também existe a possibilidade teórica da utilização desses vírus vacinais como vetores para antígenos do HIV, o que resultaria em um imunógeno “quimérico” que poderia em tese imunizar contra os dois agentes simultaneamente.

Referências Bibliográficas

AIDS vaccine Blueprint 2006 (<http://www.iavi.org/viewfile.cfm?fid=41059>).

Altfield M, Allen TM, Yu XG, Johnston MN, Agrawal D, Korber BT, Montefiori DC, O'Connor DH, Davis BT, Lee PK, Maier EL, Harlow J, Goulder PJ, Brander C, Rosenberg ES, Walker BD. (2002). HIV-1 superinfection despite broad CD8+ T-cell responses containing replication of the primary virus. *Nature*. 420(6914):434-9.

Autran B, Carcelain G, Combadiere B, Debre P. (2004). Therapeutic vaccines for chronic infections. *Science*;305(5681):205-8.

Autran B, Debré P, Walker B, Katlama C. (2003). Therapeutic vaccines against HIV need international partnerships. *Nat Rev Immunol*. 3(6):503-8.

Azizi A, Anderson DE, Torres JV, Ogrel A, Ghorbani M, Soare C, Sandstrom P, Fournier J, Diaz-Mitoma F.(2008). Induction of broad cross-subtype-specific HIV-1 immune responses by a novel multivalent HIV-1 peptide vaccine in cynomolgus macaques. *J Immunol*. 2008 180(4):2174-86.

Barouch DH, Kunstman J, Glowczwskie J, Kunstman KJ, Egan MA, Peyerl FW, Santra S, Kuroda MJ, Schmitz JE, Beaudry K, Krivulka GR, Lifton MA, Gorgone DA, Wolinsky SM, Letvin NL. (2003). Viral escape from dominant simian immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T lymphocytes in DNA-vaccinated rhesus monkeys. *J Virol*. 77(13):7367-75.

Barouch DH, Pau MG, Custers JH, Koudstaal W, Kostense S, Havenga MJ, Truitt DM, Sumida SM, Kishko MG, Arthur JC, Koriath-Schmitz B, Newberg MH, Gorgone DA, Lifton MA, Panicali DL, Nabel GJ, Letvin NL, Goudsmit J. (2004). Immunogenicity of recombinant adenovirus serotype 35 vaccine in the presence of pre-existing anti-Ad5 immunity. *J Immunol*. 172(10):6290-7.

Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, Lederman MM, Benito JM, Goepfert PA, Connors M, Roederer M, Koup RA. (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*. 107:4781-4789.

Beveridge NE, Price DA, Casazza JP, Pathan AA, Sander CR, Asher TE, Ambrozak DR, Precopio ML, Scheinberg P, Alder NC, Roederer M, Koup RA, Douek DC, Hill AV, McShane H. (2007). Immunisation with BCG and recombinant MVA85A induces long-lasting, polyfunctional Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ memory T lymphocyte populations. *Eur J Immunol*. 37(11):3089-100.

Bins AD, Jorritsma A, Wolkers MC, Hung CF, Wu TC, Schumacher TN, Haanen JB. (2005). A rapid and potent DNA vaccination strategy defined by in vivo monitoring of antigen expression. *Nat Med*. 11(8):899-904.

Boletim UNAIDS, 2007. Disponível em:

Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. (1994). Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.*, 68(9):6103-10.

Boyer JD, Cohen AD, Vogt S, Schumann K, Nath B, Ahn L, Lacy K, Bagarazzi ML, Higgins TJ, Baine Y, Ciccarelli RB, Ginsberg RS, MacGregor RR, Weiner DB. (2000). Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 *env/rev* DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of γ -chemokines. *J. Infect. Dis*. 181, 476-483.

Cao H, Kaleebu P, Hom D, Flores J, Agrawal D, Jones N, Serwanga J, Okello M, Walker C, Sheppard H, El-Habib R, Klein M, Mbidde E, Mugenyi P, Walker B, Ellner J, Mugerwa R; HIV Network for Prevention Trials. (2003). Immunogenicity of a recombinant human immunodeficiency virus (HIV)-canarypox vaccine in HIV-seronegative Ugandan volunteers: results of the HIV Network for Prevention Trials 007 Vaccine Study. *J. Infect. Dis*. 187, 887-895.

6. Conclusões

Embora muitos avanços tenham sido obtidos nos últimos anos para o desenvolvimento de uma vacina contra o HIV, ainda perduram inúmeras barreiras científicas. A inabilidade dos imunógenos atuais em induzir a produção de elevados títulos de anticorpos capazes de neutralizar diversos isolados de HIV é o maior desafio a superar. Acredita-se que uma vacina capaz de induzir uma forte resposta imune celular HIV-específica, um objetivo que pode ser alcançado com a tecnologia e conhecimento hoje disponíveis, pode ser suficiente para reduzir a viremia, a progressão para AIDS e diminuir a taxa de transmissão do HIV. A qualidade e a durabilidade da resposta imune induzida por uma formulação vacinal poderão ser incrementadas devido aos avanços no desenvolvimento das vacinas de DNA assim como a geração de novos vetores virais que não sejam alvos da ação da imunidade pré-existente. Embora a geração de uma vacina eficaz seja um grande desafio, acredita-se que o desenho das formulações vacinais utilizando seqüências conservadas multialélicas e multiepitópicas, utilizando as novas tecnologias disponíveis para gerar respostas de células T CD4+ e CD8+ anti-HIV multifuncionais e de memória, utilizando um vetor capaz de induzir o perfil adequado de resposta inata, poderá auxiliar na consecução desse objetivo.

Casimiro DR, Bett AJ, Fu TM, Davies ME, Tang A, Wilson KA, Chen M, Long R, McKelvey T, Chastain M, Gurunathan S, Tartaglia J, Emini EA, Shiver J. (2004). Heterologous human immunodeficiency virus type 1 priming-boosting immunization strategies involving replication-defective adenovirus and poxvirus vaccine vectors. *J Virol*. 78(20):11434-8.

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

Cohen J. (2007). AIDS research. Did Merck's failed HIV vaccine cause harm? *Science*. 16;318(5853):1048-9.

Cohen, J. (2003). AIDS vaccine Trial produces disappointment and confusion. *Science*. 299:1290-91.

Coutsinos Z, Absi Z, Henin Y, Guillet JG, Launay O.(2008). Designing an effective AIDS vaccine: Strategies and current status. *Rev Med Interne*. Feb 5.

Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, Hoff ST, Andersen P, Reed SG, Morris SL, Roederer M, Seder RA. (2007). Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccinemediated protection against Leishmania major. *Nature Medicine*. 13(7):843-50.

Davenport MP, Ribeiro RM, Chao DL, Perelson AS. (2004). Predicting the impact of a non-sterilizing vaccine against human immunodeficiency virus. *J Virol*. 78(20):11340-51.

Douek DC, Kwong PD, Nabel GJ. (2006). The rational design of an AIDS vaccine. *Cell*. 24;124(4):677-81.

Egan MA, Megati S, Roopchand V, Garcia-Hand D, Luckay A, Chong SY, Rosati M, Sackette S, Weiner DB, Felber BK, Pavlakis GN, Israel ZR, Eldridge JH, Sidhu MK.(2006). Rational design of a plasmid DNA vaccine capable of eliciting cell-mediated immune responses to multiple HIV antigens in mice. *Vaccine*. 24(21):4510-23.

Eiben GL, Velders MP, Schreiber H, Cassetti MC, Pullen JK, Smith LR, Kast WM. (2002). Establishment of an HLA-A*0201 human papillomavirus type 16 tumor model to determine the efficacy of vaccination strategies in HLA-A*0201 transgenic mice. *Cancer Res*. 62(20):5792-9.

Estcourt MJ, Mc Michael AJ, Hanke T. (2004). DNA vaccines against human Immunodeficiency virus type 1. *Immunol. Rev.*, 199: 144-55.

Fernandez MH, Fidler SJ, Pitman RJ, Weber JN, Rees AD. (1997). CD4+ T-cell recognition of diverse clade B HIV-1 isolates. *AIDS*. 11(3):281-8.

Fonseca SG, Coutinho-Silva A, Fonseca LA, Segurado AC, Moraes SL, Rodrigues H, Hammer J, Kallás EG, 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(18):2263-73.

Franchini G, Gurunathan S, Baglyos L, Plotkin S, Tartaglia J.(2004). Poxvirus-based vaccine candidates for HIV: two decades of experience with special emphasis on canarypox vectors. *Expert Rev Vaccines*.3(4 Suppl):S75-88.

Gahery H, Daniel N, Charmeteanu B, Ourth L, Jackson A, et al. (2006). New CD4+ and CD8+ T cell responses induced in chronically HIV type-1-infected patients after immunizations with an HIV type 1 lipopeptide vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22: 684-694.

Gandhi RT, Altfield M. (2005). The quest for an HIV-1 therapeutic vaccine. *J Infect Dis*. 192(4):556-9.

Gandhi RT, Walker BD. (2002). Immunologic control of HIV-1. *Annu Rev Med*. 53:149-72.

Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B, Hahn BH,

- Bhattacharya T, Korber B. (2002). Diversity Considerations in HIV-1 Vaccine Selection. *Science* 296 (5577): 2354 – 60.
- Goujard C, Marcelin F, Hendl-Chavez H, Burgard M, Meiffrédy V, Venet A, Rouzioux C, Taoufik Y, El Habib R, Beumont-Mauviel M, Aboulker JP, Lévy Y, Delfraissy JF; PRL-MOVAC-ANRS 095 Study Group. (2007). Interruption of antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection: impact of a therapeutic vaccination strategy combined with interleukin (IL)-2 compared with IL-2 alone in the ANRS 095 Randomized Study. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 23(9):1105-13.
- Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, Sewankambo NK, Serwadda D, Wabwire-Mangen F, Lutalo T, Li X, vanCott T, Quinn TC; Rakai Project Team. (2001). Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet*. 357(9263):1149-53.
- Greenough TC, Brettler DB, Somasundaram M, Panicali DL, Sullivan JL. (1997). Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL), virus load, and CD4 T cell loss: evidence supporting a protective role for CTL in vivo. *J. Infect. Dis.* 176(1):118-25.
- Guimarães ML, dos Santos Moreira A, Loureiro R, Galvão-Castro B, Morgado MG; Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. (2002). High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 18(17):1261-9.
- Hanke T, Goonettilleke N, McMichael AJ, Dorrell L. (2007). Clinical experience with plasmid DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 clade A vaccine focusing on T-cell induction. *J Gen Virol*. 88(Pt 1):1-12.
- Hardy GA, Imami N, Nelson MR, Sullivan AK, Moss R, Aasa-Chapman MM, Gazzard B, Gotch FM. (2007). A phase I, randomized study of combined IL-2 and therapeutic immunisation with antiretroviral therapy. *J Immune Based Ther Vaccines*. 11:56. http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007_epiupdate_en.pdf
- Jin X, Ramanathan M Jr, Barsoum S, Deschenes GR, Ba L, Binley J, Schiller D, Bauer DE, Chen DC, Hurley A, Gebuhrer L, El Habib R, Caudrelier P, Klein M, Zhang L, Ho DD, Markowitz M. (2002). Safety and immunogenicity of ALVAC vCP1452 and recombinant gp160 in newly human immunodeficiency virus type 1-infected patients treated with prolonged highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 76(5):2206-16.
- Johnston MI, Fauci AS. (2007). An HIV vaccine—evolving concepts. *N Engl J Med*. 356(20):2073-81.
- Jost S, Bernard MC, Kaiser L, Yerly S, Hirschel B, Samri A, Autran B, Goh LE, Perrin L. (2002). A patient with HIV-1 superinfection. *N Engl J Med*. 347(10):731-6.
- Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol*. 68(7):4650-5.
- Kwissa M, Amara RR, Robinson HL, Moss B, Alkan S, Jabbar A, Villinger F, Pulendran B. (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(11):2733-46.
- Launay O, Durier C, Desaint C, Silbermann B, Jackson A, Pialoux G, Bonnet B, Poizat-Martin I, Gonzalez-Canali G, Cuzin L, Figueiredo S, Sureau M, Ben Hamouda N, Gahery H, Choppin J, Salmon D, Guérin C, Bourgault Villada I, Guillet JG; ANRS VAC16 Study Group. (2007). Cellular immune responses induced with dose-sparing intradermal administration of HIV vaccine to HIV-uninfected volunteers in the ANRS VAC16 trial. *PLoS ONE*. 22;2(1):e725.
- Letvin NL, Mascola JR, Sun Y, Gorgone DA, Buzby AP, Xu L, Yang ZY, Chakrabarti B, Rao SS, Schmitz JE, Montefiori DC, Barker BR, Bookstein FL, Nabel GJ. (2006). Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. *Science*. 12(5779):1530-3.
- Letvin NL. (2005). Progress toward an HIV vaccine. *Annu Rev Med*. 56:213-23.
- Letvin NL. (2006). Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat Rev Immunol*. 6(12):930-9.
- Lévy Y, Durier C, Lascaux AS, Meiffrédy V, Gahéry-Ségard H, Goujard C, Rouzioux C, Resch M, Guillet JG, Kazatchkine M, Delfraissy JF, Aboulker JP; ANRS 093 Study Group. (2006). Sustained control of viremia following therapeutic immunization in chronically HIV-1-infected individuals. *AIDS*. 20(3):405-13.
- Lévy Y, Gahery-Ségard H, Durier C, Lascaux AS, Goujard C, *et al.* (2005). Immunological and virological efficacy of a therapeutic immunization combined with interleukin-2 in chronically HIV-1 infected patients. *Aids*. 19: 279–286.
- Li Z, Zhang M, Zhou C, Zhao X, Iijima N, Frankel FR. (2008). Novel vaccination protocol with two live mucosal vectors elicits strong cell-mediated immunity in the vagina and protects against vaginal virus challenge. *J Immunol*. 180(4):2504-13.
- Lu S. (2008). Immunogenicity of DNA Vaccines in Humans: It Takes Two to Tango. *Hum Vaccin*. 21;4(6).
- Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. (2004). Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med*. 10(12):1359-65.
- Luckay A, Sidhu MK, Kjeker R, Megati S, Chong SY, Roopchand V, Garcia-Hand D, Abdullah R, Braun R, Montefiori DC, Rosati M, Felber BK, Pavlakis GN, Mathiesen I, Israel ZR, Eldridge JH, Egan MA. (2007). Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J Virol*. 81(10):5257-69.
- Mattapallil JJ, Douek DC, Buckler-White A, Montefiori D, Letvin NL, Nabel GJ, Roederer M. (2006). Vaccination preserves CD4 memory T cells during acute simian immunodeficiency virus challenge. *J Exp Med*. 203(6):1533-41.
- Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, *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(5):569-76.
- Norris PJ, Moffett HF, Yang OO, Kaufmann DE, Clark MJ, Addo MM, Rosenberg ES. (2004). Beyond help: direct effector functions of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4(+) T cells. *J Virol*. 78(16):8844-51.
- Novy P, Quigley M, Huang X, Yang Y. (2007). CD4 T cells are required for CD8 T cell survival during both primary and memory recall responses. *J Immunol*. 179(12):8243-51.
- Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, Segal JP, Cao Y, Rowland-Jones SL, Cerundolo V, Hurley A, Markowitz M, Ho DD, Nixon DF, McMichael AJ. (1998). Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science*. 279(5359):2103-6.
- Ondondo BO, Yang H, Dong T, di Gloria K, Suttill A, Conlon C, Brown D, Williams P, Rowland-Jones SL, Hanke T, McMichael AJ, Dorrell L. (2006). Immunisation with recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing HIV-1 gag in HIV-1-infected subjects stimulates. *Eur J Immunol*. 36(10):2585-94.
- Pancré V, Delhem N, Yazdanpanah Y, Delanoye A, Delacré M, Depil S, Morales O, Mouton Y, Aurault C. (2007). Presence of HIV-1 Nef specific CD4 T cell response is associated with non-progression in HIV-1 infection. *Vaccine*. 25(31):5927-37.
- Peters BS. (2001). The basis for HIV immunotherapeutic vaccines. *Vaccine*. 20(5-6): 688-705.
- Plata F, Autran B, Martins LP, Wain-Hobson S, Raphaël M, Mayaud C, Denis M, Guillon JM, Debré P. (1987). *Nature*. 328(6128): 348-51.
- Potts KE, Kalish ML, Lott T, Orloff G, Luo CC, *et al.* (1993). Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. Brazilian Collaborative AIDS Research Group. *AIDS*. 7(9):1191-7.
- Precopio ML, Betts MR, Parrino J, Price DA, Gostick E, Ambrozak DR, Asher TE, Douek DC, Harari A, Pantaleo G, Bailer R, Graham BS, Roederer M, Koup RA. (2007). Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med*. 204(6):1405-16.
- Priddy FH, Brown D, Kublin J, Monahan K, Wright DP, *et al.* (2008). Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. *Clin Infect Dis*. 46(11):1769-81.
- Robbins GK, Addo MM, Troung H, Rathod A, Habeeb K, Davis B, Heller H, Basgoz N, Walker BD, Rosenberg ES. (2003). Augmentation of HIV-1-specific T helper cell responses in chronic HIV-1 infection by therapeutic immunization. *AIDS*. 17(8):1121-6.
- Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, Walker BD. (1997). Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*. 278(5342):1447-50.
- Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallan BJ, Ghayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA. (1999). Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science*. 283(5403):857-60.
- Seder RA, Darrah PA, Roederer M. (2008). T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*. 8(4):247-58.
- Sekaly RP. (2008). The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med*. 205(11):7-12.
- Shiver JW, Fu TM, Chen L, Casimiro DR, Davies ME, Evans RK, Zhang ZQ, Simon AJ, Trigona WL, Dubeys SA, Huang L, Harris VA, Long RS, Liang X, Handt L, Schleif WA, Zhu L, Freed DC, Persaud NV, Guan L, Punt KS, Tang A, Chen M, Wilson KA, Collins KB, Heidecker GJ, Fernandez VR, Perry HC, Joyce JG, Grimm KM, Cook JC, Keller PM, Kresock DS, Mach H, Troutman RD, Isopi LA, Williams DM, Xu Z, Bohannon KE, Volkin DB, Montefiori DC, Miura A, Krivulka GR, Lifton MA, Kuroda MJ, Schmitz JE, Letvin NL, Caulfield MJ, Bett AJ, Youil R, Kaslow DC, Emini EA. (2002) Replication-incompetent retroviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 415, 331-335.
- Someya K, Xin KQ, Ami Y, Izumi Y, Mizuguchi H, Ohta S, Yamamoto N, Honda M, Okuda K. (2007). Chimeric adenovirus type 5/35 vector encoding SIV gag and HIV env genes affords protective immunity against the simian/human immunodeficiency virus in monkeys. *Virology*. 367(2):390-7.
- Sun Z, Denton PW, Estes JD, Othieno FA, Wei BL, Wege AK, Melkus MW, Padgett-Thomas A, Zupancic M, Haase AT, Garcia JV. (2007). Intrarectal transmission, systemic infection, and CD4+ T cell depletion in humanized mice infected with HIV-1. *J Exp Med*. 16;204(4):705-14.
- Tubiana R, Carcelain G, Vray M, Gourelain K, Dalban C, Chermak A, Rabian C, Vittecoq D, Simon A, Bouvet E, El Habib R, Costagliola D, Calvez V, Autran B, Katlama C; for the Vacciter Study group. (2005). Therapeutic immunization with a human immunodeficiency virus (HIV) type 1-recombinant canarypox vaccine in chronically HIV-infected patients: The Vacciter Study (ANRS 094). *Vaccine*. 23(34):4292-301.
- Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, Paradis TJ, Flynn T, Durno AG, Blumberg RS, Kaplan JC, Hirsch MS, Schooley RT. (1987). HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature*. 328(6128):345-8.
- Watkins DI, Burton DR, Kallas EG, Moore JP, Koff WC. (2008). Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat Med*. 14(6):617-21.
- Watkins DI. (2008). The hope for an HIV vaccine based on induction of CD8+ T lymphocytes: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103(2):119-29.
- Wee, E.G., Patel, S., McMichael, A.J. & Hanke, T. (2002). A DNA/MVA-based candidate human immunodeficiency virus vaccine for Kenya induces multi-specific T cell responses in rhesus macaques. *J. Gen. Virol*. 83, 75–80.
- Wilson NA, Reed J, Napoe GS, Piaskowski S, Szymanski A, Furlott J, Gonzalez EJ, Yant LJ, Maness NJ, May GE, Soma T, Reynolds MR, Rakasz E, Rudersdorf R, McDermott AB, O'Connor DH, Friedrich TC, Allison DB, Patki A, Picker LJ, Burton DR, Lin J, Huang L, Patel D, Heindecker G, Fan J, Citron M, Horton M, Wang F, Liang X, Shiver JW, Casimiro DR, Watkins DI. (2006). Vaccine-induced cellular immune responses reduce plasma viral concentrations after repeated low-dose challenge with pathogenic simian immunodeficiency virus SIVmac239. *J Virol*. 80(12):5875-85.
- Woodland DL. (2004). Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol*. 25(2):98-104.
- Zhang L, Kovalev GI, Su L. (2007). HIV-1 infection and pathogenesis in a novel humanized mouse model. *Blood*. 109(7):2978-81.

Distinct Outcomes of *Trypanosoma cruzi* Infection in Hamsters Are Related to Myocardial Parasitism, Cytokine/Chemokine Gene Expression, and Protein Expression Profile

Angelina M. Bilate,^{1,2,a} Priscila C. Teixeira,^{1,2} Susan P. Ribeiro,^{1,2} Thales de Brito,³ Ana Maria Silva,³ Momtchilo Russo,⁴ Jorge Kalil,^{1,2,5} and Edecio Cunha-Neto^{1,2,5}

¹Heart Institute (InCor) and ²Division of Clinical Immunology and Allergy, University of São Paulo Medical School, and ³Institute of Tropical Medicine and ⁴Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, and ⁵Institute for Investigation in Immunology—Millennium Institutes, São Paulo, Brazil

Background. *Trypanosoma cruzi*-infected outbred hamsters reproduce the range of different outcomes of Chagas disease noted in humans. We tested whether myocarditis, its mediators, and myocardial protein expression are related to the severity of the acute phase of *T. cruzi* infection in the hamster model.

Methods. Myocardium left ventricles (LVs) obtained from Syrian hamsters infected with *T. cruzi* were collected 21 days after infection. Myocarditis and the *T. cruzi* nest/antigen area were analyzed by histological and morphometric analysis. Cytokine and chemokine messenger RNA (mRNA) expression was analyzed using real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. Differentially expressed proteins were identified by 2-dimensional electrophoresis, followed by mass spectrometry.

Results. While in the acute phase of infection, 50% of animals displayed weight loss and signs of acute-phase infection (hereafter referred to as “acute-phase signs” [APS]) (e.g., lethargy, vomiting, and diarrhea). Both the *T. cruzi* nest/antigen area and the expression of interferon- γ , tumor necrosis factor- α , interleukin-10, and CCL3 mRNA were significantly increased in the LVs of animals with APS, compared with the LVs of animals without APS. Animals with APS, those without APS, and uninfected animals demonstrated distinct myocardial expression of contractile, stress response, and metabolism proteins.

Conclusions. The distinct outcomes of acute *T. cruzi* infection in Syrian hamsters are related to cardiac parasitism, cytokine expression, and changes in the expression of structural/contractile and stress response proteins that may be associated with alterations in the cardiomyocyte cytoskeleton.

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects ~13 million people in Latin America [1].

The consequences of acute *T. cruzi* infection can range from asymptomatic myocarditis, which affects the majority of infected individuals, to intense myocarditis accompanied by blood and tissue parasitism, which is found in ~10% of those who are infected [2, 3]. This subset of individuals may develop fulminant myocarditis, which is often fatal [4, 5]. On the other hand, the majority of infected individuals do not show clinical symptoms of myocarditis, but they may, decades later, develop an inflammatory cardiomyopathy known as “chronic Chagas disease cardiomyopathy.” The mechanisms that govern this differential progression remain unknown.

Data from murine models show that inflammatory cytokines play a central role in *T. cruzi* infection. The innate and adaptive immune responses triggered by the parasite lead to exacerbated production of such inflam-

Received 16 July 2007; accepted 12 November 2007; electronically published 3 July 2008.

Potential conflicts of interest: none reported.

Presented in part: 16th European Congress of Immunology, Paris, France, 6–9 September 2006 (abstract 2650); Experimental Biology 2006, San Francisco, California, 1–5 April 2006 (abstract 5401).

Financial support: São Paulo State Research Foundation (FAPESP; grants 00/14549-4 and 01/00729-3). A.M.B. and P.C.T. were supported by FAPESP (grants 06/56514-9 and 04/15322-4), and E.C.-N. and J.K. are recipients of productivity awards from the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (grants 302970-2004-5 and 307541-2003-7).

^a Present affiliation: Program of Molecular Pathogenesis, Skirball Institute of Biomedical Medicine, New York University School of Medicine, New York, New York.

Reprints or correspondence: Dr. Edecio Cunha-Neto, Laboratory of Immunology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44, Bloco II, 9° andar, São Paulo, SP 05403-000, Brazil (edecunha@gmail.com).

The Journal of Infectious Diseases 2008; 198:614–23

© 2008 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

0022-1899/2008/19804-0022\$15.00

DOI: 10.1086/590347

matory cytokines as interleukin (IL)–12, tumor necrosis factor (TNF)– α , and interferon (IFN)– γ and such chemokines as CCL3 (macrophage inflammatory protein [MIP]–1 α), CXCL10 (IFN– γ –inducible protein–10), and CCL5 (RANTES [regulated on activation, normally T cell expressed and secreted]) [6, 7]. Production of inflammatory cytokines is associated with protection against *T. cruzi* infection, and TNF receptor 1 (TNFR1)– or IFN– γ receptor (IFN γ R)–deficient mice die of infection more rapidly than do wild-type mice [8, 9]. On the other hand, it has been reported that, after *T. cruzi* infection, susceptible mouse strains display higher production of TNF– α than do resistant strains [10]. Accordingly, elevated levels of TNF– α were associated with increased parasitemia, wasting, and mortality during acute *T. cruzi* infection [11]. Even though cytokines and chemokines are essential for controlling parasite dissemination, excessive production of these mediators often results in tissue damage.

Advances in high-throughput proteomic analysis now allow for direct evaluation of large-scale protein profiles and identification of differentially expressed proteins, contributing to our understanding of disease mechanisms [12]. Using a proteomics approach, we recently described an inventory of myocardial proteins from patients with severe chronic Chagas disease cardiomyopathy [13], which allowed us to identify proteins of high abundance in the tissue, including proteins with structural, metabolic, and stress response functions.

To investigate the mechanisms involved in differential progression of Chagas disease, we developed a hamster model of *T. cruzi* infection that reproduces the range of different outcomes of Chagas disease in humans [14]. In the present study, we used the hamster model to investigate whether myocarditis and its mediators are related to the severity of the acute phase of *T. cruzi* infection. To identify novel molecular markers of disease severity, we also analyzed protein expression profiles in the myocardium of *T. cruzi*–infected hamsters, by use of the proteomics approach. On the basis of our previous findings, which showed that a subset of animals that died 21–28 days after infection displayed a high cardiac parasitism but a virtual absence of parasites in the bloodstream (A.M.B. and E.C.–N., unpublished data), we chose, in the present study, to use 21 days after infection as the time point for all analyses. In our model, high cardiac parasitism in the acute phase of infection was associated with expression of TNF– α , IFN– γ , IL–10, and CCL3 (MIP–1 α), as well as with differential myocardial expression of structural/contractile, stress response, and metabolism proteins.

METHODS

Hamsters, parasites, and infection. Twelve-week-old, female, outbred Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) were infected intraperitoneally with 10^5 *T. cruzi* (Y strain) blood trypomastigotes obtained from infected BALB/c mice. As a control,

healthy hamsters were injected with saline solution. Parasitemia was measured at 4, 7, 13, and 21 days post infection (PI) by means of direct parasite counting, as described elsewhere [15]. All protocols were approved by our internal review board.

Systemic signs of acute-phase infection (hereafter referred to as “acute-phase signs” [APS]) and weight loss. Twenty-one days PI, animals were evaluated for the presence of such APS as lethargy and wasting. For weight loss calculation, animals were weighed before and 21 days after infection.

Myocardial histopathological and immunohistochemical analysis. Ventricles were cut at the level of the papillary muscles, fixed in buffered formalin solution, embedded in paraffin, and cut into 5– μ m sections. Sections were stained with hematoxylin–eosin or were used for the detection of *T. cruzi* antigens by means of the immunoperoxidase method. For the latter use, sections were deparaffinized and incubated with polyclonal anti–*T. cruzi* serum obtained from rabbits immunized with *T. cruzi* whole homogenate. Biotinylated goat anti–mouse/rabbit IgG and Duet Strepto ABComplex (Dako) were used as a secondary antibody and for amplification, respectively. Diaminobenzadine (Sigma Chemical) was used as chromogen. Preimmune rabbit serum was used as a negative control. Inflammation and *T. cruzi* nest/antigen areas were measured using computer-aided morphometric analysis with MetaMorph software (version 5.0; Molecular Devices). The area of myocarditis or *T. cruzi* nest/antigen of all fields (20 fields/section; original magnification, $\times 200$) from 2 nonconsecutive sections was calculated and then was divided by the total area of the section. The *T. cruzi* nest/antigen area includes the area of intact amastigote nests and of antigens scattered throughout the myocardium.

RNA isolation, reverse transcription, and real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was isolated from left ventricle samples by use of the RNeasy kit for fibrous tissue (Qiagen). Contaminating DNA was removed by treatment with ribonuclease-free deoxyribonuclease I. cDNA was obtained from 5 μ g of total RNA by use of SuperScript I reverse transcriptase (Invitrogen). mRNA expression was analyzed by real-time quantitative RT-PCR performed with SYBR Green I PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 250 nmol/L of sense and antisense primers, with the use of an ABI Prism 7500 sequence detector (Applied Biosystems). The following primers were designed using Primer Express software (version 3.0; Applied Biosystems): glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) (DQ403055), 5'-CTGACATGCCGCCTGGAG-3' and 5'-TCAGTGTAGCCCAGGATGCC-3'; TNF– α (AF315292), 5'-TCAAAATTGCAACGACAAGCC-3' and 5'-TTGGCCAGGAGGGCATT-3'; IFN– γ (AF034482), 5'-GAAGCTCACCAAGATTCCGGTAA-3' and 5'-TTTTCGTGACAGGTGAGGCAT-3'; IL–10 (AF046210), 5'-GGCAACTGCAGCGCTGTC-3' and 5'-AGACGCCTTTCTCTTGGAGCTTAT-3'; CCL3 (AY819019), 5'-TGCTCTGAGCCAGGTGTCATT-3' and 5'-CAGCGACGTACTCTTGACCCC-3'; CCL5 (NM_013653), 5'-CGTGCCCCAC-

ATCAAGGAGTATT-3' and 5'-CACACACTTGGCGGTTCTT-TC-3'; CXCL10 (AY007988), 5'-TCCACGTGTTGAGATCATTGCTA-3' and 5'-GCTTTCAGTAAATCTTGATGGCC-3'; CXCR3 (NM_009910), 5'-TCAAGTGCTAGATGCCTCGGA-3' and 5'-TCGCTCTCGTTTTCCCAT-3'; and CCR2 (NM_009915), 5'-TCTTCTTGACCACCTTCCAGGA-3' and 5'-TGCAGCAGTGTGTCA-TTCAA-3'. After every PCR, an amplicon melting point curve was obtained. This yielded a single peak with the expected temperature provided by Primer Express software, confirming the specificity of the PCR. GAPDH mRNA expression was used for normalization. The relative amount of mRNA was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [16].

Myocardial protein expression profile. Left ventricular samples obtained from uninfected and infected animals were pooled into 3 groups: CTR, defined as uninfected controls ($n = 6$); APS⁻, defined as infected animals without APS ($n = 6$); and APS⁺, defined as infected animals with APS ($n = 6$). Protein separation and identification were performed as described elsewhere [13]. In brief, left ventricle tissue was homogenized in 1% SDS and 0.5 mmol/L TLCK (*N*-tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone). Proteins (250 μ g/pool/gel) were separated using 2-dimensional electrophoresis. Isoelectrofocusing was performed on immobilized pH gradient gel strips with a linear pH range (pH, 3.0–10.0) (Immobiline DryStrip gels; Amersham Biosciences). SDS-PAGE was run on a 12.5% polyacrylamide gel. Colloidal Coomassie blue–stained gels were digitized using ImageScanner, and spots were selected and matched in the 3 gels by use of ImageMaster 2D Elite software (version 3.10; Amersham Biosciences). Differentially expressed spots were analyzed as follows: first, the normalized volume of spots was calculated by dividing the volume of each spot by the total volume of all spots in the same gel. Next, the normalized volumes for spots of the APS⁺ and APS⁻ gels were divided by those for corresponding spots in CTR. Volume ratios >2.0 -fold or <0.5 -fold were considered to be up- or down-regulated, respectively. For protein identification, all selected spots were excised, subjected to trypsin digestion (10 μ g/mL), and processed using a robotic workstation (Ettan Spot Handling Workstation; Amersham Biosciences). Tryptic fragments were analyzed using matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. Proteins were identified by comparing the peptide mass fingerprint (PMF) of each spot with virtual tryptic digestion fragments, by use of (1) MALDI-TOF Evaluation software (Amersham Biosciences) along with the nonredundant National Center for Biotechnology Information database restricted to Rodentia proteins or (2) the Mascot tool (<http://www.matrixscience.com>) and Swiss-Prot databases. For differential protein expression analysis, we matched spots in the 3 gels and considered the PMF identification of 1 of the gels. The functional classification of the identified proteins was adapted from the Gene Ontology classification by use of the FatiGO tool (<http://fatigo.bioinfo.cipf.es>).

Statistics. Descriptive statistics are presented as the median value and range. The nonparametric Mann-Whitney *U* test was

Figure 1. Weight loss during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *T. cruzi*-infected hamsters were weighed before infection and 21 days post infection (PI). Weight loss was calculated using the following equation: $100 - (\text{BW 21 days PI} / \text{BW before infection} \times 100)$, where "BW" denotes body weight. APS⁻, infected animals without signs of acute-phase *T. cruzi* infection; APS⁺, infected animals with signs of acute-phase *T. cruzi* infection; CTR, uninfected controls.

used for comparison of 2 groups. Correlation analysis was performed using a nonparametric Spearman correlation test. $P < .05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

APS, weight loss, and parasitemia. Twenty-one days PI, 6 of 12 infected animals displayed systemic APS, including lethargy, vomiting, and diarrhea, whereas the remaining animals did not show any signs of disease. Weight loss at 21 days PI was significantly greater among APS⁺ animals than among APS⁻ animals (figure 1). Uninfected animals showed no significant weight loss (figure 1). Parasitemia was measured 4, 7, 13, and 21 days PI. Two of 6 APS⁺ animals had detectable parasitemia only at day 7 PI, and 1 of 6 APS⁻ animals had detectable parasitemia at days 4 and 7 PI. At days 13 and 21 PI, none of the infected animals displayed detectable parasitemia, regardless of APS status (data not shown).

Histopathological analysis: parasitism and myocarditis. The *T. cruzi* nest/antigen area in myocardium was significantly higher in APS⁺ animals than in APS⁻ animals (figure 2). Animals in both infected groups displayed intense myocarditis. Although no significant differences in the area of inflammation were observed between APS⁺ and APS⁻ animals, the pattern of inflammatory cell distribution differed between APS⁺ and APS⁻ animals. Whereas APS⁺ animals showed numerous intact nests in the myocardium and inflammatory infiltrate in areas distant from these nests, nests in APS⁻ animals were frequently disrupted and were surrounded by inflammatory cells (figure 2). The area of *T. cruzi* nest/antigen was

Figure 2. Cardiac parasitism and myocarditis in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. Representative myocardial sections from an infected animal without signs of acute-phase infection (APS⁻) (A) and an infected animal with signs of acute-phase infection (APS⁺) (B). *T. cruzi* nests (in brown) after use of the immunoperoxidase method with *T. cruzi* antiserum. The arrows point to amastigote nests, and the arrowhead points to an inflammatory infiltrate. The area of *T. cruzi* nest/antigen (Ag) (C) and the area of inflammation (D) were measured using computer-aided morphometry. PI, post infection.

not significantly correlated to the area of myocarditis, suggesting that intensity of parasitism was not associated with local inflammation.

Expression of cytokine and chemokine mRNA. Myocardial expression of TNF- α , IL-10, IFN- γ , and CCL3 mRNA was significantly higher in the APS⁺ animals than in the APS⁻ animals (figure 3). Expression of CCL5, CXCL10, CXCR3, and CCR2 mRNA did not differ significantly between the infected groups. Nevertheless, all infected animals demonstrated high levels of expression of these cytokines, chemokines, and chemokine receptors (a >2-fold increase compared with uninfected controls) (figure 3). Moreover, we found a positive correlation between the *T. cruzi* nest/antigen area and expression of TNF- α , IL-10, CCL3, and CXCR3 in all infected animals (table 1).

Differential protein expression in myocardium. Figure 4 shows the 2-dimensional electrophoresis gels of all 3 groups (CTR, APS⁻, APS⁺) and all spots selected for analysis. Table 2 shows the protein expression profile of healthy uninfected

young hamsters. As expected, the majority of spots that were identified correspond to abundant proteins, such as structural/contractile and metabolism proteins (table 2). We were also able to identify less abundant proteins, such as cellular stress response and immune response proteins (table 2). Because of the limited availability of *M. auratus* sequences in the databases used, most identified proteins were matched to other Rodentia species.

The presence of several spots with a different isoelectric point (pI) or molecular weight (MW) (multiple electrophoretic forms) corresponding to the same protein (one with the same accession number in the database) suggests the occurrence of posttranslational modifications, such as oxidation, phosphorylation, acetylation, and glycosylation, among others [17]. We were able to identify several proteins that may have undergone such modifications, such as cardiac muscle α actin (ACTC1); myosin regulatory light chain-2 (MYL2); myosin, light polypeptide 3 (MYL3); desmin (DES); and α crystallin B chain (CRYAB) (tables 2 and 3).

Figure 3. Cytokine and chemokine mRNA expression in the myocardium. Fold expression of mRNA in *Trypanosoma cruzi*-infected animals without signs of acute-phase infection (APS⁻) and in *T. cruzi*-infected animals with signs of acute-phase infection (APS⁺), compared with that in uninfected controls, was analyzed using real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. The horizontal bar denoted the median value. A, Cytokines. B, Chemokines. C, Chemokine receptors. IFN, interferon; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor.

Table 3 shows the identification of 12 of 29 spots differentially expressed in APS⁺ or APS⁻ animals compared with uninfected animals. Spots corresponding to the structural/contractile proteins DES, ACTC1, MYL2, and MYL3 were exclusively up-regulated in the myocardium of APS⁺ animals (table 3). On the other hand, 2 of 3 electrophoretic forms corresponding to car-

diac muscle α -actin were down-modulated in the myocardium of APS⁻ animals (table 3). As for stress response proteins, 2 electrophoretic forms of α -crystallin B chain were up-regulated in both infected groups, but, for form 1, the fold increase in the APS⁻ group was 2.5 higher than that in the APS⁺ group (table 3). In addition, 2 different heat shock proteins (HSPA5 and HSPA9) were up-regulated only in APS⁻ animals (table 3). We also found that 2 metabolism proteins, aspartate aminotransferase and pyruvate dehydrogenase- β , were up-regulated in APS⁻ animals only.

Because some, but not all, electrophoretic forms of a given protein were modulated in the myocardium of APS⁻ or APS⁺ animals, we analyzed fold expression by considering the sum of all spots corresponding to a same protein. This analysis showed that none of the proteins present in several electrophoretic forms (ACTC1, DES, MYL2, MYL3, and CRYAB) were up- or down-regulated in the pools from APS⁻ or APS⁺ animals, compared with pools from CTR animals (table 3).

DISCUSSION

In the present study, using a single combination of a parasite strain (Y strain) and a genetically heterogeneous host (Syrian hamster), we observed 2 distinct disease profiles upon acute *T. cruzi* infection: (1) absence of APS, low cardiac parasitism, and modestly increased expression of cytokine mRNAs; decreased expression of selective isoforms of structural/contractile proteins; and increased expression of stress response and metabolism proteins; and (2) presence of APS, high cardiac parasitism, markedly increased expression of cytokine mRNAs, and in-

Table 1. Correlation between the intensity of cardiac parasitism and the expression of cytokines and chemokines.

Fold expression of mRNA	<i>T. cruzi</i> nest/antigen area ^a	
	<i>r</i>	<i>P</i>
TNF- α	0.66 ^b	.025 ^b
IFN- γ	0.42	.194
IL-10	0.69 ^b	.019 ^b
CCL3	0.75 ^b	.008 ^b
CCL5	0.36	.270
CXCL10	0.45	.164
CCR2	0.37	.264
CXCR3	0.66 ^b	.029 ^b

NOTE. Ag, antigen; IFN, interferon; IL, interleukin; *T. cruzi*, *Trypanosoma cruzi*; TNF, tumor necrosis factor.

^a The *r* and *P* values were obtained using the Spearman correlation test.

^b Significant correlation.

Figure 4. Two-dimensional electrophoresis gels of left ventricle homogenates obtained from uninfected animals (A), *Trypanosoma cruzi*-infected animals without signs of acute-phase infection (B), and *T. cruzi*-infected animals with signs of acute-phase infection (C). MW, molecular weight; pI, isoelectric point. All the spots selected for mass spectrometry analysis are outlined. Differentially expressed proteins are denoted by ellipses and gene symbols in panel A. Matched spots are also denoted by ellipses in panels B and C. ACTC1, cardiac muscle α actin; CRYAB, α crystallin B chain; DES, desmin; GOT1, glutamate oxaloacetate transaminase 1; HSPA5, heat shock protein 5; HSPA8, heat shock protein 8; MYL2, myosin regulatory light chain-2; MYL3, myosin, light polypeptide 3; PDHB, pyruvate dehydrogenase β .

creased expression of distinct isoforms of structural/contractile and stress response proteins.

The low frequency of hamsters with detectable parasitemia after infection is consistent with the findings of previous studies using the hamster model of *T. cruzi* infection [18, 19]. The apparent dichotomy between low parasitemia observed after different time points of the acute infection in both infected groups—those with high or low cardiac parasitism (data not shown)—and tissue parasitism suggests that, even though hamsters were able to efficiently control parasite growth in the bloodstream, this control was not sufficient to prevent parasite migration and replication in the heart. Moreover, these findings also suggest that the mechanisms of initial parasite control in the blood are shared both by hamsters able to control tissue parasitism and by those unable to control it. The presence of APS concomitant with high levels of tissue parasitism in a subset of infected animals probably resulted from a *T. cruzi*-induced “cytokine storm.” Using a susceptible mouse strain (BALB/c), Truysens et al. [11] showed that elevated levels of TNF- α were associated with increased parasitemia, wasting, and mortality during the acute phase of *T. cruzi* infection. In addition, IL-10-deficient mice infected with *T. cruzi* were noted to develop a syndrome similar to endotoxic shock as a result of the enhanced production of TNF- α and IFN- γ [20]. The dichotomy between clinical signs and the intensity of cardiac parasitism in *T. cruzi*-infected hamsters suggests that a subset of animals controlled parasitism—either systemically or locally—more effectively than did the remaining animals. Because Syrian hamsters are outbred, it is possible that this difference may be based on a genetic component.

The higher myocardial expression of TNF- α , IFN- γ , IL-10, and CCL3 among APS⁺ animals (figure 3) could be associated with increased cytokine stimulation due to higher cardiac parasitism. The positive correlation between the expression of TNF- α , IL-10, CCL3, and CXCR3 mRNAs and the *T. cruzi* antigen area in the heart (table 1) corroborates this hypothesis. The correlation between the levels of cytokines and chemokines produced by macrophages, dendritic cells, or Th1 cells and the intensity of parasitism suggests the participation of both innate and adaptive immune responses triggered by *T. cruzi*. This correlation argues against a protective effect of increased levels of cytokines on the control of tissue parasitism in our model.

All infected animals, regardless of intensity of cardiac parasitism and presence of disease signs, showed similar expression of CCL5, CXCL10, CCR2, and CXCR3 (figure 3) and intense myocarditis (figure 2). These findings suggest that these chemokines, although involved in the recruitment of inflammatory cells to the heart after infection, may not be essential for the control of local parasitism. Similarly, mRNA expression for CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL2 (MCP-1), and CCL5 (RANTES) is augmented in the myocardium of *T. cruzi*-infected mice during the acute phase [21].

Table 2. Protein expression profile of the uninfected hamster myocardium.

Protein function ^a and symbol	Description	UniProt ^b accession no.	Species	Expectation	Coverage, %	Peptide masses ^c	MW/pI		Normalized volume
							E	T	
Structural/ contractile									
ACTC1	α cardiac actin	P68033	<i>M. musculus</i>	0.000	23.6	6/10	39.8/4.8	42.3/5.2	0.610
ACTC1	α cardiac actin	P68033	<i>M. musculus</i>	0.000	23.6	6/13	39.1/5.0	42.3/5.2	1.699
ACTC1	α cardiac actin	P68033	<i>M. musculus</i>	0.000	23.6	6/14	38.9/5.6	42.3/5.2	3.078
ACTC1	α cardiac actin	P68033	<i>M. musculus</i>	0.053	17.5	6/19	38.9/5.1	42.3/5.2	3.704
ACTC1	α cardiac actin	P68033	<i>M. musculus</i>	0.024	24.7	3/7	20.5/4.6	17.7/5.6	0.069
ACTC1	α cardiac actin	P68033	<i>M. musculus</i>	0.071	24.7	4/8	20.6/4.4	17.7/5.6	0.081
ACTC1	α cardiac actin	P68033	<i>M. musculus</i>	0.019	15.8	4/8	38.7/6.3	42.3/5.2	0.156
ACTC1	α cardiac actin	P68033	<i>M. musculus</i>	0.000	23.6	6/10	39.1/5.7	42.3/5.2	0.777
CNN3	Calponin-3	Q9DAW9	<i>M. musculus</i>	0.045	17.0	4/6	13.6/5.7	36.6/5.5	0.232
DES	Desmin	P48675	<i>R. norvegicus</i>	0.028	13.2	5/8	51.5/5.2	53.5/5.2	0.215
DES	Desmin	P48675	<i>R. norvegicus</i>	0.000	34.8	14/26	51.2/5.1	53.5/5.2	0.606
DES	Desmin	P48675	<i>R. norvegicus</i>	0.007	17.9	7/11	51.2/5.0	53.5/5.2	0.631
MYL2	Myosin regulatory light chain-2, ventricular/ cardiac muscle isoform	P51667	<i>M. musculus</i>	0.083	22.0	4/5	11.6/4.2	18.9/4.7	0.484
MYL3	Myosin, light polypeptide 3	P09542	<i>M. musculus</i>	0.049	32.4	5/9	15.6/5.0	22.5/5.0	1.054
MYL3	Myosin, light polypeptide 3	P09542	<i>M. musculus</i>	0.013	22.1	4/9	13.6/6.1	22.5/5.0	0.351
TNNT2	Troponin T, cardiac muscle	P50752	<i>M. musculus</i>	0.010	23.5	6/17	36.9/4.9	34.4/5.2	2.372
TPM1	Tropomyosin-1 α chain	P04692	<i>R. norvegicus</i>	0.000	27.0	12/25	30.1/4.1	32.7/4.7	4.037
TPM1	Tropomyosin-1 α chain	P04692	<i>R. norvegicus</i>	0.097	13.0	5/9	28.3/4.1	32.7/4.7	0.476
Metabolism									
ALDH2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	P47738	<i>M. musculus</i>	0.000	23.0	9/14	49.1/6.3	54.8/5.8	0.506
ATP5A1	ATP synthase subunit α , mitochondrial precursor	Q03265	<i>M. musculus</i>	0.000	23.3	8/16	51.2/9.1	58.9/9.3	1.506
ATP5B	ATP synthase subunit β , mitochondrial precursor	P56480	<i>M. musculus</i>	0.000	24.8	8/13	49.7/4.6	51.2/4.9	0.742
ATP5B	ATP synthase subunit β , mitochondrial precursor	P56480	<i>M. musculus</i>	0.000	33.9	11/21	49.1/4.8	51.2/4.9	0.612
ATP5B	ATP synthase subunit β , mitochondrial precursor	P56480	<i>M. musculus</i>	0.000	34.9	11/26	48.8/4.7	51.2/4.9	2.691
ATP5B	ATP synthase subunit β , mitochondrial precursor	P56480	<i>M. musculus</i>	0.000	16.2	5/11	46.5/4.8	51.2/4.9	0.138
NDUFS1	NADH dehydrogenase ^d Fe-S 1 protein	Q91VD9	<i>M. musculus</i>	0.009	9.4	5/5	72.9/5.3	80.8/5.5	0.136
DLST	Dihydrolipoamide S-succinyltransferase	Q9D2G2	<i>M. musculus</i>	0.000	18.1	6/6	48.2/5.5	49.3/9.2	0.193
DLST	Dihydrolipoamide S-succinyltransferase	Q9D2G3	<i>M. musculus</i>	0.000	22.7	7/8	48.2/5.6	49.3/9.2	0.227
UQCRC2	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2, mitochondrial precursor	Q9DB77	<i>M. musculus</i>	0.006	15.0	5/8	40.3/9.0	46.9/9.0	0.330
Stress response									
CRYAB	α crystallin B chain	Q9EPF3	<i>S. judaei</i>	0.094	33.7	5/17	13.4/7.4	20.0/6.8	0.824
CRYAB	α crystallin B chain	Q9EPF3	<i>S. judaei</i>	0.057	33.7	4/12	13.0/7.0	20.0/6.8	0.02
HSPA5	78-kDa GRP (GRP78) ^e	P07823	<i>M. auratus</i>	0.026	9.2	4/6	70.4/4.7	72.6/5.1	0.238
HSPA8	heat shock protein 8	Q9QZ38	<i>M. musculus</i>	0.001	12.5	6/9	67.4/5.4	71.1/5.3	0.309
HSPA8	heat shock protein 8	Q9QZ38	<i>M. musculus</i>	0.001	13.8	7/11	67.0/5.3	71.1/5.3	0.445
HSPD1	Hspd1 protein	Q8VEF4	<i>M. musculus</i>	0.041	13.9	4/6	57.4/5.6	59.6/8.2	0.118
PRDX6	1-cys peroxiredoxin protein 2 ^f	O08709	<i>M. musculus</i>	0.158	17.9	4/7	17.7/6.0	24.9/6.0	0.121
Signal transduction									
IL15RA	IL-15R α chain	Q810T6	<i>M. musculus</i>	0.038	42.3	4/11	27.3/6.6	14.0/9.8	0.359
LIME1	Lck-interacting transmembrane adapter 1	Q9EQR5	<i>M. musculus</i>	0.052	24.3	4/11	22.1/4.6	24.8/9.9	0.035
S100C	S100 calcium-binding protein A11 ^g	P50543	<i>M. musculus</i>	0.073	34.4	3/7	18.8/5.7	6.9/5.0	0.173
Other									
ADAM9	Meltrin- γ ^h	Q61072	<i>M. musculus</i>	0.039	31.3	4/4	67.8/5.6	17.5/4.9	0.132
HBA	Hemoglobin subunit α	P01945	<i>M. auratus</i>	0.014	28.4	3/8	6.3/8.2	15.3/8.1	2.769
NALD2	N-acetylated α -linked acidic dipeptidase 2	Q9C2ZR2	<i>M. musculus</i>	0.097	19.2	3/7	24.9/7.4	19.9/5.1	0.054
NALD2	N-acetylated α -linked acidic dipeptidase 3	Q9CZR2	<i>M. musculus</i>	0.089	19.2	3/7	24.6/4.7	19.9/5.1	0.075
ZMYND12	Zinc finger, MYND domain containing 12	Q56GB0	<i>M. musculus</i>	0.069	12.4	4/8	6.5/6.1	41.9/5.9	2.359

NOTE. Different spots corresponding to the same protein (with the same accession no.) were considered to be different electrophoretic forms, and those with different accession nos. were considered to be different proteins. The peptide mass fingerprints of the indicated gel were submitted to the matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) evaluation tool or the Mascot tool, by use of the nonredundant National Center for Biotechnology Information database (restricted to Rodentia). ATP, adenosine triphosphate; E, experimental molecular weight and isoelectric point; GRP, glucose-related protein; *M. auratus*, *Mesocricetus auratus*; *M. musculus*, *Mus musculus*; MW, molecular weight (in kilodaltons); MYND, myeloid, Nery, and DEAF-1; pI, isoelectric point; *R. norvegicus*, *Rattus norvegicus*; *S. judaei*, *Spalax judaei*; T, theoretical MW and pI.

^a Functions of the proteins were determined according to gene ontology conducted with the use of the FatiGO tool, available at: <http://fati.go.bioinfo.cnio.es>.

^b Accession nos. were obtained using the UniProt tool, available at: <http://www.ebi.uniprot.org>.

^c The ratio of the no. of peptides matched to the total no. of peptides.

^d Ubiquinone.

^e Heat shock protein 70-kDa protein 5.

^f Peroxiredoxin 6.

^g Calgizarin.

^h A desintegrin and metalloprotease domain 9.

Table 3. Differentially expressed proteins from the myocardium of *Trypanosoma cruzi*-infected hamsters.

										Fold change		
Protein function ^a and symbol	Description	UniProt ^b accession no.	MW/pI		PMF ^c	Coverage, %	Expectation	Peptide masses ^d	Normalized volume ^e	In APS ⁺ / CTR	In APS ⁻ / CTR	In APS ⁺ / APS ⁻
			E	T								
Structural/contractile												
DES	Desmin	P48675	51.2/5.1	53.5/5.2	CTR	34.8	0.000	14/26	0.606	2.51 ^g	1.07	2.36 ^g
	Desmin (sum of 3 spots) ^f								1.452	1.85	1.01	1.83
MYL2	Myosin regulatory light chain-2	P51667	12.5/4.2	18.9/4.7	APS ⁻	29.0	0.010	5/7	0.484	2.27 ^g	1.11	2.06 ^g
	Myosin regulatory light chain-2 (sum of 4 spots) ^f								4.763	1.43	1.13	1.27
MYL3	Myosin, light polypeptide 3	P09542	15.6/5.0	22.5/5.0	CTR	32.4	0.049	5/9	1.054	2.53 ^g	0.96	2.63 ^g
	Myosin, light polypeptide 3 (sum of 4 spots) ^f								4.798	1.49	0.81	1.83
ACTC1	Alpha-cardiac actin (form 1)	P68033	42.1/5.9	42.3/5.2	APS ⁺	16.2	0.038	5/8	0.38	2.10 ^g	0.93	2.26 ^g
ACTC1	Alpha-cardiac actin (form 2)	P68033	41.7/5.8	42.3/5.2	APS ⁺	26.5	0.000	7/16	1.076	1.38	0.44 ^g	3.18 ^g
ACTC1	Alpha-cardiac actin (form 3)	P68033	41.5/5.6	42.3/5.2	APS ⁺	26.5	0.000	7/18	3.753	1.22	0.42 ^g	2.90 ^g
	Alpha-cardiac actin (sum of 8 spots) ^f								17.391	0.81	0.96	0.84
Metabolism												
GOT1	APT	P05201	38.4/7.1	46.5/6.7	APS ⁻	11.6	0.014	5/7	0.406	1.61	2.15 ^g	0.75
PDHB	Pyruvate dehydrogenase β	Q505N8	30.1/5.3	35.2/5.6	APS ⁻	21.3	0	5/10	0.225	1.24	2.08 ^g	0.60
Stress response												
CRYAB	α crystallin B chain (form 1)	Q9EPF3	13.5/7.0	20.9/6.8	APS ⁻	33.7	0.003	5/9	0.020	2.75 ^g	6.80 ^g	0.40 ^g
CRYAB	α crystallin B chain (form 2)	Q9EPF3	14.8/7.0	20.9/6.8	APS ⁺	33.7	0.014	4/10	0.029	2.72 ^g	2.41 ^g	1.13
	α crystallin B chain (sum of 3 spots) ^f								0.874	0.91	1.51	0.60
HSPA5	78-kDa GRP (GRP78) ^h	P07823	74.1/4.8	72.5/5.1	APS ⁺	18.3	0.002	6/15	0.261	1.10	2.06 ^g	0.53
HSPA9	70-kDa heat shock protein precursor ⁱ	O35501	69.3/5.6	74.0/5.9	APS ⁻	14.9	0.091	7/9	0.406	1.39	2.06 ^g	0.67
Nonidentified												
NI 1			11.1/6.1						0.066	1.53	0.71	2.15 ^g
NI 2			13.4/7.8						0.082	1.28	4.79 ^g	0.27 ^g
NI 3			14.3/5.7						0.072	2.39 ^g	1.44	1.65
NI 4			14.3/6.4						0.113	3.14 ^g	1.85	1.70
NI 5			26.4/6.5						0.074	1.97	0.73	2.70 ^g
NI 6			30.6/7.0						0.351	1.02	0.32 ^g	3.21 ^g
NI 7			36.6/6.4						0.208	0.77	0.42 ^g	1.85
NI 8			39.1/6.7						0.287	1.35	0.55	2.43 ^g
NI 9			39.1/7.0						0.199	1.40	0.56	2.50 ^g
NI 10			39.6/7.8						0.475	0.60	0.38 ^g	1.59
NI 11			42.0/6.8						0.164	1.07	0.54	2.00 ^g
NI 12			52.4/7.1						0.177	0.75	1.50	0.50 ^g
NI 13			64.3/6.1						4.072	0.72	1.57	0.46 ^g
NI 14			64.6/6.2						1.777	0.64	1.39	0.46 ^g
NI 15			70.3/5.3						0.124	1.16	2.53 ^g	0.46 ^g
NI 16			73.3/7.3						0.528	0.33 ^g	1.02	0.32 ^g
NI 17			74.2/7.6						0.174	0.87	5.02 ^g	0.17 ^g

NOTE. Different spots corresponding to the same protein (those having the same accession no.) were considered to be different electrophoretic forms, and those having different accession nos. were considered to be different proteins. APS⁻, infected animals without acute phase signs; APS⁺, infected animals with acute phase signs; APT, aspartate aminotransferase; CTR, uninfected controls; E, experimental MW and pI; GOT1, glutamate oxaloacetate transaminase 1; GRP, glucose-regulated protein; MW, molecular weight (in kilodaltons); NI, nonidentified spot; pI, isoelectric point; PMF, peptide mass fingerprinting of the indicated gel; T, theoretical MW and pI.

^a Functions of the proteins were determined according to gene ontology conducted with the use of the FatiGO tool, available at: <http://fati.go.bioinfo.cnio.es>.

^b Accession nos. were obtained using the UniProt tool, available at: <http://www.ebi.uniprot.org>.

^c The PMFs were submitted to the matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight (MALDI-TOF) evaluation tool or MASCOT tool, by use of the nonredundant National Center for Biotechnology Information database (restricted to Rodentia).

^d The ratio of the no. of peptides matched to the total no. of peptides.

^e Normalized volume of the corresponding spot in the control gel.

^f Sum of the normalized volume of all the spots corresponding to the given protein.

^g Differentially expressed spots (>2.0, up-regulated; <0.5, down-regulated)

^h Heat shock protein 70-kDa protein 5.

ⁱ 75-kDa glucose regulated protein.

Using the proteomics approach with 2-dimensional electrophoresis and mass spectrometry, we described, for the first time, the protein expression profile of myocardia from healthy young Syrian hamsters (*M. auratus*) (table 2). We were also able to identify 29 differentially expressed protein spots in the myocardium of *T. cruzi*-infected animals, compared with uninfected animals (table 3). Because a very small number of sequenced proteins are available for *M. auratus*, we used databases restricted to all Rodentia, which allowed us to identify hamster proteins that are similar to those of other Rodentia. Most of the proteins identified in the hamster myocardium were also identified by our group in a previous study that described the protein expression profile in the myocardium of patients with Chagas disease cardiomyopathy [13].

In our study, the up-regulation of selective forms of the structural/contractile proteins (ACTC), muscle-specific intermediate filament (DES), proteins involved in cardiac myofibril assembly (MLC2), and proteins involved in actin cytoskeleton regulation (MYL3) in APS⁺ animals but not in APS⁻ animals (table 3), might be associated with the greater cardiac parasitism observed among infected animals with APS (figure 2). Several studies have shown that *T. cruzi*-infected cells display significant alterations in cytoskeleton and sarcomeric architecture [22–24] induced by trypomastigote-derived factors [25]. Moreover, independent groups have shown that *T. cruzi*-infected *Calomys callosus* or hamsters display disruption of heart cytoskeleton [23, 26]. In our study, the altered expression of structural/contractile proteins could be a consequence of compensatory mechanisms triggered by disruption of sarcomeres and microfilaments caused by the presence of large nests of *T. cruzi*. On the other hand, we cannot rule out the possibility that the increased expression of cytokines among APS⁺ animals may also play a role in the modulation of contractile proteins of the host cells. It has been shown that inflammatory cytokines induce the expression of natriuretic peptides that are associated with a hypertrophic response that also regulates the expression of contractile proteins [27, 28].

The increased expression of stress response proteins, such as CRYAB, HSPA5, and HSPA9, in infected animals, compared with uninfected controls (table 3), might be associated with a stress response triggered by *T. cruzi* infection. CRYAB, a member of the small heat shock proteins family, acts as chaperone, protects against oxidative stress and apoptosis, regulates actin filament dynamics, and protects the integrity of desmin intermediate filaments against extracellular stress [29, 30]. Mutations of the CRYAB gene in humans lead to myopathy and cardiomyopathy [31]. Glucose-related proteins, such as HSPA5 and HSPA9, are endoplasmic reticulum chaperones whose primary function is the folding of nascent proteins. The inverse relation observed between parasitism and expression of stress response protein is paradoxical, because one could expect that a high parasite load could cause increased stress and, therefore, augmented stress response protein production. Given the observed changes in

contractile protein expression (table 3), our data are consistent with a possible protective effect of CRYAB against *T. cruzi*-induced cytoskeletal damage. Moreover, knowing that heat shock proteins mediate myocardium protection [32], one can hypothesize that APS⁻ animals may have an enhanced ability to cope with parasitism and with *T. cruzi*-induced cardiomyocyte damage. However, we cannot exclude the possibility that the increased CRYAB is not causally related to parasite restraint.

The up-regulation of the energy metabolism proteins glutamate oxaloacetate transaminase 1 (GOT1) and pyruvate dehydrogenase- β in the myocardium of APS⁻ animals may be associated with a high ATP demand after *T. cruzi* infection. GOT1 and PDHB are involved in the tricarboxylic acid cycle and the glycolysis pathway, respectively. The identification of GOT1 in the myocardium could also result from a contamination from plasma, because high levels of this enzyme are frequently observed after infections, including acute *T. cruzi* infection [33]. PDHB is usually present in low levels in the heart, but glucose metabolism is found to be up-regulated during cardiac dysfunction [34]. Up-regulation of these energy metabolism proteins exclusively in the myocardium of APS⁻ animals may be associated with an increased metabolic rate of cardiomyocytes.

The differential expression of some electrophoretic forms of ACTC1, DES, MYL2, MYL3, and CRYAB in APS⁺ or APS⁻ myocardium suggests that protein expression modulation occurred at the posttranslational level. We can hypothesize that the balance between isoforms of a given protein may be involved in differential progression of the acute phase of *T. cruzi* infection. Posttranslational modifications occur as a result of several biological processes, such as the inflammatory response [35], oxidative stress, and energy metabolism [36]. It is unlikely that the presence of distinct electrophoretic forms in CTR and APS⁺ animals but not in APS⁻ animals was due to technical problems, such as manipulation-induced alterations, because the samples were handled in the same way and because all 3 gels were run on the same day.

We demonstrated that acute *T. cruzi* infection in Syrian hamsters leads to distinct outcomes. APS⁺ animals have high cardiac parasitism that could be the underlying reason for the increased expression of the cytokines TNF- α , IFN- γ , and IL-10 and the chemokine CCL3 (MIP-1 α). The local changes in the expression of structural/contractile proteins could be related either to the high parasitism or to the increased expression of cytokines/chemokines. The finding that animals with low parasitism display increased levels of CRYAB and unchanged levels of structural proteins, whereas animals with high parasitism show lower levels of CRYAB, increased expression of structural proteins, and increased production of cytokines, is in line with a possible protective effect of CRYAB isoforms against cytoskeleton disruption [29, 30] and the reported inhibitory action of such isoforms on inflammatory cytokine production [32]. Although our data indicate a dichotomy between tissue parasitism and modulated

CRYAB isoform expression, it would be interesting to investigate whether the intense parasitism limits CRYAB expression in APS⁺ hamsters or whether CRYAB protects against intracellular *T. cruzi* infection.

Acknowledgments

We thank José Maria Alavarez Mosig, Fernando Pretel, and Luís Sardinha for providing the parasites, Alexandre Keller for technical assistance with the Metamorph software, Andréia C. Kuramoto for technical assistance with the proteomics, and Kellen C. Faé for critical reading of the manuscript.

References

- Morel CM, Lazdins J. Chagas disease. *Nat Rev Microbiol* **2003**; 1:14–5.
- Chagas C. New human trypanosomiasis: studies on morphology and life cycle of *Schizotrypanum cruzi*, n. gen, n. sp. etiological agent of new human disease [in Portuguese]. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1909**; 1:159–218.
- Dias E, Laranja FS, Miranda A, Nobrega G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation* **1956**; 14:1035–60.
- Parada H, Carrasco HA, Anez N, Fuenmayor C, Inglessis I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiol* **1997**; 60:49–54.
- Andrade ZA. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1999**; 94:71–80.
- Cunha-Neto E, Rizzo LV, Albuquerque F, et al. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res* **1998**; 31:133–7.
- Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol* **2002**; 18:262–5.
- Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon- γ - and tumor necrosis factor-RI-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* **2001**; 158:1433–40.
- Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* **2001**; 159:1723–33.
- Russo M, Starobinas N, Ribeiro-Dos-Santos R, Minoprio P, Eisen H, Hontebeyrie-Joskowicz M. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* **1989**; 11: 385–95.
- Truyens C, Torrico F, Lucas R, De Baetselier P, Buurman WA, Carlier Y. The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **1999**; 67:5579–86.
- Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE. Cardiovascular proteomics: evolution and potential. *Circ Res* **2001**; 88:763–73.
- Teixeira PC, Iwai LK, Kuramoto AC, et al. Proteomic inventory of myocardial proteins from patients with chronic Chagas' cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res* **2006**; 39:1549–62.
- Bilate AM, Salemi VM, Ramires FJ, et al. The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis. *Microbes Infect* **2003**; 5: 1116–24.
- Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **1962**; 4:389–96.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method. *Methods* **2001**; 25:402–8.
- Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**; 7:391–403.
- Ramírez LE, Lages-Silva E, Soares-Júnior JM, Chapadeiro E. The hamster (*Mesocricetus auratus*) as experimental model in Chagas' disease: parasitological and histopathological studies in acute and chronic phases of *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Soc Bras Med Trop* **1994**; 27:163–9.
- Cabriner-Santos M, Lages-Silva E, Chapadeiro E, Ramírez LE. *Trypanosoma cruzi*: characterization of reinfection and search for tissue tropism in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Exp Parasitol* **2001**; 99:160–7.
- Hölscher C, Mohrs M, Dai WJ, et al. Tumor necrosis factor α -mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun* **2000**; 68:4075–83.
- Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* **2000**; 2:851–66.
- Pereira MCS, Costa M, Chagas-Filho C, de Meirelles MN. Myofibrillar breakdown and cytoskeletal alterations in heart muscle cells during invasion by *Trypanosoma cruzi*: immunological and ultrastructural study. *J Submicrosc Cytol Pathol* **1993**; 25:559–69.
- Taniwaki NN, Andreoli WK, Calabrese KS, da Silva S, Mortara RA. Disruption of myofibrillar proteins in cardiac muscle of *Calomys callosus* chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with immunosuppressive agent. *Parasitol Res* **2005**; 97:323–31.
- Melo TG, Almeida DS, Meirelles MN, Pereira MC. Disarray of sarcomeric α -actinin in cardiomyocytes infected by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* **2006**; 133:171–8.
- Rodríguez A, Rioult MG, Ora A, Andrews NW. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J Cell Biol* **1995**; 129:1263–73.
- Colmanetti FH, Teixeira Vde P, Rodrigues ML, Chica JE, Reis MG, dos Santos VM. Myocardiocyte ultrastructure and morphometrical analysis in hamsters experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Ultrastruct Pathol* **2005**; 29:139–47.
- Chandrasekar B, Mummidi S, Claycomb WC, Mestril R, Nemer M. Interleukin-18 is a pro-hypertrophic cytokine that acts through a phosphatidylinositol 3-kinase-phosphoinositide-dependent kinase-1-Akt-GATA4 signaling pathway in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **2005**; 280:4553–67.
- Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol* **2005**; 167:305–13.
- Quinlan R. Cytoskeletal competence requires protein chaperones. *Prog Mol Subcell Biol* **2002**; 28:219–33.
- Arrigo AP, Ducasse C. Expression of the anti-apoptotic protein Hsp27 during both the keratinocyte differentiation and dedifferentiation of HaCat cells: expression linked to changes in intracellular protein organization? *Exp Gerontol* **2002**; 37:1247–55.
- Vicart P, Caron A, Guicheney P, et al. A missense mutation in the α B-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* **1998**; 20:92–5.
- Delogu G, Signore M, Mechelli A, Famularo G. Heat shock proteins and their role in heart injury. *Curr Opin Crit Care* **2002**; 8:411–6.
- Sardinha LR, Elias RM, Mosca T, et al. Contribution of NK, NK T, $\gamma\delta$ T, and $\alpha\beta$ T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **2006**; 74:2031–42.
- Augustus AS, Buchanan J, Park TS, et al. Loss of lipoprotein lipase-derived fatty acids leads to increased cardiac glucose metabolism and heart dysfunction. *J Biol Chem* **2006**; 281:8716–23.
- Proost P, Struyf S, Van Damme J. Natural post-translational modifications of chemokines. *Biochem Soc Trans* **2006**; 34:997–1001.
- Sheeran FL, Pepe S. Energy deficiency in the failing heart: linking increased reactive oxygen species and disruption of oxidative phosphorylation rate. *Biochim Biophys Acta* **2006**; 1757:543–52.

10. APROVACÇÃO CAPPESq