

**VINICIUS CANATO SANTANA**

**Desenvolvimento de estratégias para aumento da  
imunogenicidade da vacina de DNA HIVBr18 baseadas na  
fusão com a glicoproteína D do herpes vírus humano tipo 1  
e na coadministração de citocinas**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha Neto

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Daniela Santoro Rosa

**SÃO PAULO  
2014**

**VINICIUS CANATO SANTANA**

**Desenvolvimento de estratégias para aumento da  
imunogenicidade da vacina de DNA HIVBr18 baseadas na  
fusão com a glicoproteína D do herpes vírus humano tipo 1  
e na coadministração de citocinas**

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Edecio Cunha Neto

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Daniela Santoro Rosa

**SÃO PAULO  
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santana, Vinicius Canato

Desenvolvimento de estratégias para aumento da imonogenicidade da vacina de DNA HIVBr18 baseadas na fusão com a glicoproteína D do herpes vírus humano tipo 1 e na coadministração de citocinas / Vinicius Canato Santana. -- São Paulo, 2014.

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

Orientador: Edecio Cunha Neto.

Coorientador: Daniela Santoro Rosa

Descritores: 1.HIV-1 2.Vacinas de DNA 3.Adjuvantes imunológicos  
4.Vacinas contra a aids 5.Citocinas 6.Proteínas do envelope viral 7.Herpesvirus humano 1 8.Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos  
9.Camundongos endogâmicos BALB/c

USP/FM/DBD-153/14

**Aos meus pais, Osvaldo e Laura e à minha irmã Vanessa, por todo  
amor e apoio.**

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador Prof. Dr. Edecio Cunha-Neto pelos ensinamentos, compreensão, paciência e pela presença constante em todo o desenvolvimento deste trabalho.

À minha coorientadora Prof. Dr. Daniela Santoro Rosa, pelas discussões enriquecedoras e suporte científico.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil pelas importantes sugestões fornecidas nas reuniões de quinta-feira.

Aos amigos do Biotério de Experimentação, Dr. Edilberto Postol e Luiz Mundel, pelo companheirismo e ajuda na condução dos experimentos.

Aos parceiros do grupo HIV/vacina, Rafael e Susan, pelo auxílio na condução dos experimentos e pela amizade durante estes anos.

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

À minha namorada Marcella, pelo amor e compreensão frente aos finais de semana perdidos.

Aos meus pais, irmã, avós, tios e primos por acreditarem em mim e incentivarem minhas escolhas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP.

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS .....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 EPIDEMIOLOGIA E CICLO DE VIDA DO HIV-1 .....	2
1.2 RESPOSTA IMUNE CONTRA O HIV-1.....	4
1.3 VACINAS ANTI-HIV .....	6
1.4 VACINA DE DNA HIVBR18 .....	8
1.5 ADJUVANTES MOLECULARES PARA VACINAS DE DNA.....	10
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>16</b>
3.1 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO PVAX-GDH-HIVBR18 .....	16
3.2 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS PVAX-GDH-HIVBR18_1, _2 E_3. ....	17
3.3 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO PVAX-DUO-GDH_HIVBR18.....	18
3.4 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DE FUSÃO .....	18
3.5 TRANSFEÇÃO E IMUNOFLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS HEK 293T .....	19
3.6 ANIMAIS E IMUNIZAÇÕES.....	20
3.7 SUSPENSÃO CELULAR .....	21
3.8 ENSAIO DE ELISPOT (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT SPOT).....	21
3.9 PROLIFERAÇÃO CELULAR E DETECÇÃO DE CITOCINAS INTRACELULARES.....	23
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	25
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
4.1 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO VACINAL PVAX-GDH-HIVBR18 .....	26
4.2 TESTE DE IMUNOGENICIDADE DO PLASMÍDEO PVAX-GDH-HIVBR18 .....	27
4.3 EXPRESSÃO <i>IN VITRO</i> DA PROTEÍNA GDH-HIVBR18 .....	30
4.4 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE GDH-HIVBR18.....	31
4.5 CONSTRUÇÃO DE SEQUÊNCIAS MODIFICADAS DE GDH-HIVBR18.....	35
4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO <i>IN VITRO</i> DAS PROTEÍNAS HÍBRIDAS GDH-HIVBR18 ALTERNATIVAS .....	40
4.7 TESTE DE IMUNOGENICIDADE DOS PLASMÍDEOS CODIFICANDO SEQUÊNCIAS ALTERNATIVAS DE GDH-HIVBR18 .....	42
4.8 CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO PLASMÍDEO PVAX-DUO-GDH_HIVBR18 .....	43
4.9 ANÁLISE DA MAGNITUDE DA RESPOSTA IMUNE CELULAR INDUZIDA PELA COADMINISTRAÇÃO COM PLASMÍDEOS DE CITOCINAS .....	45
4.10 ANÁLISE DA AMPLITUDE DA RESPOSTA IMUNE CELULAR INDUZIDA PELA COADMINISTRAÇÃO COM PLASMÍDEOS QUE CODIFICAM GM-CSF E IL-12 .....	47
4.11 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE CELULAR POLIFUNCIONAL INDUZIDA PELA COADMINISTRAÇÃO COM PLASMÍDEOS QUE CODIFICAM GM-CSF E IL-12 .....	50
4.12 ANÁLISE DA RESPOSTA INDUZIDA PELA COMBINAÇÃO DOS PLASMÍDEOS CODIFICANDO GM-CSF E IL-12 EM UM PROTOCOLO DE BAIXA DOSE .....	53
4.13 ANÁLISE DA RESPOSTA INDUZIDA PELA COMBINAÇÃO DOS PLASMÍDEOS CODIFICANDO IL-2 E IL-15 EM UM PROTOCOLO DE BAIXA DOSE .....	54
4.14 COADMINISTRAÇÃO DE GM-CSF À UM VETOR ADENOVÍRAL CODIFICANDO OS EPÓTIPOS DA VACINA HIVBR18 .....	56
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>7 ANEXOS.....</b>	<b>65</b>

7.1	ANEXO A - FIGURAS .....	65
7.2	ANEXO B - TABELAS .....	66
7.3	ANEXO C – MANUSCRITO ENCAMINHADO PARA PUBLICAÇÃO .....	67
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

---

<b>Ø</b>	Vazio
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>ADCC</b>	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
<b>AEC</b>	3-amino-9-ethylcarbazole
<b>AIDS</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
<b>APC</b>	Allophycocyanin (aloficocianina)
<b>BTLA</b>	B and T lymphocyte attenuator (atenuador de linfócitos B e T)
<b>CCR5</b>	C-C chemokine receptor type 5 (receptor de quimiocina C-C do tipo 5)
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation (designação de grupos)
<b>CFSE</b>	Carboxyfluorescein succinimidyl ester (carboxifluoresceína succinimidil éster)
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CTL</b>	Cytotoxic T lymphocytes (linfócitos T citotóxicos)
<b>CXCR4</b>	CXC chemokine Receptor type 4 (receptor de quimiocina CXC do tipo 4)
<b>Cy7</b>	Cianina 7
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
<b>dNTP</b>	Desoxinucleotídeos tri-fostatados
<b>EDTA</b>	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido tetracético etilenodiamínico)
<b>ELISPOT</b>	Enzyme-linked immunospot assay
<b>FITC</b>	Isoticianato de fluoresceína
<b>gD</b>	Glicoproteína D

<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)
<b>gp</b>	Glicoproteína
<b>HIV</b>	Human immunodeficiency virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
<b>HLA</b>	Human leukocyte antigen (Antígeno leucocitário Humano)
<b>HPV-16</b>	Human papiloma virus type 16 (vírus do papiloma humano tipo 16)
<b>HSV-1</b>	Herpes simplex virus type 1 (herpes vírus humano do tipo 1)
<b>HVEM</b>	Herpes virus entry mediator (mediador da entrada do herpes vírus)
<b>IFNs-I</b>	Interferons do tipo I
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon Gama
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LB</b>	Lúria Bertani
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MEM</b>	Minimum Essential Media (Meio mínimo essencial)
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex (Complexo principal de histocompatibilidade)
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>nAb</b>	Anticorpo neutralizante
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>ng</b>	Nanograma
<b>NK</b>	Natural killer (matadoras naturais)
<b>°C</b>	Grau centígrado
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline (tampão salina-fosfato)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (reação de polimerase em

	cadeia)
<b>PE</b>	Phycoerythrin (ficoeritrina)
<b>PerCP</b>	Peridinin chlorophyll protein (proteína clorofil peridina)
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleic)
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SIV</b>	Simian Immunodeficiency Virus (vírus da imunodeficiência símia)
<b>SPF</b>	Specific pathogen free (livre de patógenos específicos)
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumour necrosis factor alpha (fator de necrose tumoral alfa)
<b>UFS</b>	Unidades formadoras de spots
<b>VLPs</b>	Virus like particles (partículas semelhantes a vírus)

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 – HIV-1: estrutura da partícula viral e organização do genoma.....	3
Figura 2 – Resposta imunológica adaptativa anti-viral.....	5
Figura 3 – Esquema gráfico e clonagem do plasmídeo pVAX-gDh-HIVBr18.....	27
Figura 4 – Resposta imunológica induzida após imunização com gDh-HIVBr18 ou HIVBr18.....	29
Figura 5 – Análise de expressão da proteína gDh-HIVBr18 na face externa da membrana celular.....	31
Figura 6 – Análise <i>in silico</i> da proteínas de fusão gDh-HIVBr18.....	34
Figura 7 – Organização espacial dos novos construtos derivados de HIVBr18.....	36
Figura 8 – Porcentagem de sequências combinadas por rotinas computacionais capazes de atingir o meio extracelular completamente.....	37
Figura 9 – Análise <i>in silico</i> das proteínas de fusão gDh-HIVBr18 alternativas.....	39
Figura 10 – Análise de expressão da proteína gDh-HIVBr18, _1, _2, _3 <i>in vitro</i> .....	41
Figura 11 – Resposta imune induzida por gDh-HIVBr18 e construtos com sequências modificadas.....	42
Figura 12 – Representação esquemática do plasmídeo pVAX-DUO-gDh_HIVBr18..	43
Figura 13 - Análise de expressão da proteína gDh <i>in vitro</i> codificada por pVAX-DUO-gDh_HIVBr18.....	44
Figura 14 - Resposta imune induzida pelo vetor pVAX-DUO-gDh-HIVBr18.....	45
Figura 15 - Resposta imunológica induzida (magnitude) por HIVBr18 coadministrado a plasmídeos que codificam citocinas.....	47
Figura 16 – Resposta imunológica (amplitude) induzida pela coimunização de HIVBr18 à plasmídeos que codificam citocinas.....	49
Figura 17 – Resposta imune celular induzida por HIVBr18 associado a pGM-CSF ou pIL-12.....	51
Figura 18 – Resposta imune celular polifuncional induzida por HIVBr18 associado a pGM-CSF ou pIL-12.....	52
Figura 19 - Resposta imune induzida por HIVBr18 associado a plasmídeos que codificam as citocinas IL-12 e GM-CSF em protocolo de baixa dose.....	54
Figura 20 - Resposta imune induzida por HIVBr18 associado a plasmídeos que codificam as citocinas IL-2, IL-15 e/ou GM-CSF em protocolo de baixa dose.....	55
Figura 21 - Resposta imune induzida por Ad-HIVBr18 associado ou não a um plasmídeo que codifica GM-CSF.....	57

## RESUMO

---

Santana VC. *Desenvolvimento de estratégias para aumento da imunogenicidade da vacina de DNA HIVBr18 baseadas na fusão com a glicoproteína D do herpes vírus humano tipo 1 e na coadministração de citocinas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A formulação HIVBr18, previamente desenvolvida e testada, é uma vacina de DNA que codifica 18 epítomos CD4, promíscuos e conservados do HIV-1, e que após imunização de camundongos transgênicos para diversas moléculas de HLA de classe II humanas, observou-se proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e produção de IFN- $\gamma$  direcionadas a múltiplos epítomos codificados pela vacina. Abordamos aqui estratégias baseadas na fusão ou combinação dos epítomos codificados pela vacina HIVBr18 à glicoproteína D (gD) do HSV-1, e também na coadministração de plasmídeos que codificam citocinas (IL-2, -12, -15 e GM-CSF) visando aumentar a imunogenicidade de HIVBr18. A sequencia de DNA que codifica os 18 peptídeos da vacina HIVBr18 foi amplificada por PCR e clonada em um plasmídeo que abrigava a sequencia da gD do HSV-1. dando origem ao plasmídeo pVAX-gDh-HIVBr18. Animais imunizados com gDh-HIVBr18 apresentaram resposta imunológica similar ao grupo que recebeu somente HIVBr18, não sendo diferente também daqueles que receberam plasmídeos gDh-HIVBr18 que sofreram alterações nas sequências para melhorar o padrão de distribuição hidrofóbica e permitir a migração da proteína de fusão para o meio extracelular. Construímos e testamos um plasmídeo bicistrônico que expressa gDh e HIVBr18 isoladamente, mas também não observamos aumento na resposta imune induzida. A coadministração com o plasmídeo HIVBr18 e plasmídeos que codificam as citocinas IL-12, IL-15 e GM-CSF, proporciona um aumento na magnitude da resposta imunológica induzida contra o pool de peptídeos codificados pela vacina, entretanto sem alteração da amplitude da resposta. Além disso, o plasmídeo de GM-CSF induziu maior número de células T CD4<sup>+</sup> polifuncionais. Demonstramos também que a coadministração do plasmídeo que codifica GM-CSF, induz uma resposta imune celular de maior magnitude mesmo em uma condição de dose reduzida. Entretanto, observamos que esta citocina não é um bom adjuvante quando utilizamos como vetor de imunização um adenovírus que expressa os 18 epítomos.

Descritores: HIV-1; Vacinas de DNA; Adjuvantes imunológicos; Vacinas contra a aids; Citocinas; Proteínas do envelope viral; Herpesvirus humano 1; Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos; Camundongos endogâmicos BALB C..

**ABSTRACT**

---

Santana VC. *Developing strategies for increasing the immunogenicity of DNA vaccine HIVBr18 based on fusion with human herpes virus type 1 glycoprotein and cytokine coadministration* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

The formulation HIVBr18, previously developed and tested, is based on a DNA vaccine encoding 18 conserved and promiscuous HIV-1 CD4 epitopes and after immunization of transgenic mice for many human HLA class II molecules using this DNA vaccine, could be observed proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and IFN- $\gamma$  production directed to multiple epitopes encoded by the vaccine. We intend to explore here, strategies based on fusion or combination of epitopes encoded by HIVBr18 vaccine with glycoprotein D (gD) of HSV- 1 and also the coadministration of cytokine-encoding plasmids (pIL-2, -12, -15 and pGM -CSF) aiming to enhance immunogenicity of HIVBr18. The DNA sequence of epitopes encoded by HIVBr18 vaccine was amplified by PCR and cloned into a plasmid that contained the sequence of gD, giving rise to plasmid pVAX-gDh-HIVBr18. After mice immunization, animals immunized with this construct showed similar immune response to the group that received HIVBr18, and also the group of animals that received gDh-HIVBr18 plasmid that had been modified by exchange in peptides order to assure to the molecule a better hydrophobic distribution and allow translocation to the extracellular face of cell membrane. We constructed and injected mice with a bicistronic plasmid expressing gDh and HIVBr18, simultaneously and isolated, but no increase in the magnitude of the immune response was observed. HIVBr18 coadministration with cytokine-encoding plasmids pIL-12, pIL-15 and pGM-CSF, provides an increase in the magnitude of immune response induced against the peptides encoded by the vaccine, and similar breadth. In addition, co-immunization with pGM-CSF induced greater number of polyfunctional CD4 + T cells. We also demonstrate that, even in a low dose approach coadministration of pGM-CSF induced a higher immune response than HIVBr18 alone in the same dose. However, we observed that this cytokine is not a good adjuvant when used in combination with an adenovirus that expresses the 18 HIV-1 epitopes.

Descriptors: HIV-1; Vaccines, DNA; Adjuvants, immunologic; Aids vaccines; Cytokines; Viral envelope proteins; Herpesvirus 1, human; Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; Mice, inbred BALB C.

## 1 INTRODUÇÃO

---

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), causada pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), é uma doença sexualmente transmissível, mas também adquirida pelo contato com sangue e hemoderivados e passível de transmissão materno-fetal. A infecção pelo HIV se caracteriza por um longo período de latência, durante o qual ocorre a depleção progressiva de células do sistema imunológico, culminando em um estado de profunda imunodeficiência, seguida de morte (1). Este vírus é um membro da família *lentiviridae* e há dois tipos de HIV: HIV-1 e HIV-2, sendo o primeiro o principal responsável pela pandemia, e o segundo endêmico na região oeste da África. A infecção causada pelos dois vírus é diferente, sendo aquela causada pelo HIV-1 a que evolui para AIDS com mais rapidez, e a causada pelo HIV-2, aquela que apresenta menores índices de morbi/mortalidade. Embora o conhecimento em relação à epidemiologia, patogenia da doença e a resposta imune à infecção tenha avançado consideravelmente ao longo dos mais de 30 anos após o descobrimento da AIDS/HIV no início dos anos 1980 por Robert Gallo e Luc Montagnier, até o momento não existe uma vacina eficaz contra o HIV.

Neste sentido, há alguns anos, foi desenvolvida e vem sendo testada uma vacina anti-HIV chamada HIVBr18. Esta compõe uma formulação baseada em plasmídeos de DNA que codificam 18 epítopos conservados e promíscuos do HIV-1 (clado B). No presente trabalho aprofundamos os conhecimentos sobre esta formulação vacinal já existente, associando diversas estratégias que visaram à melhora na resposta imunológica induzida por ela. Nossos resultados mais relevantes apontam que citocinas

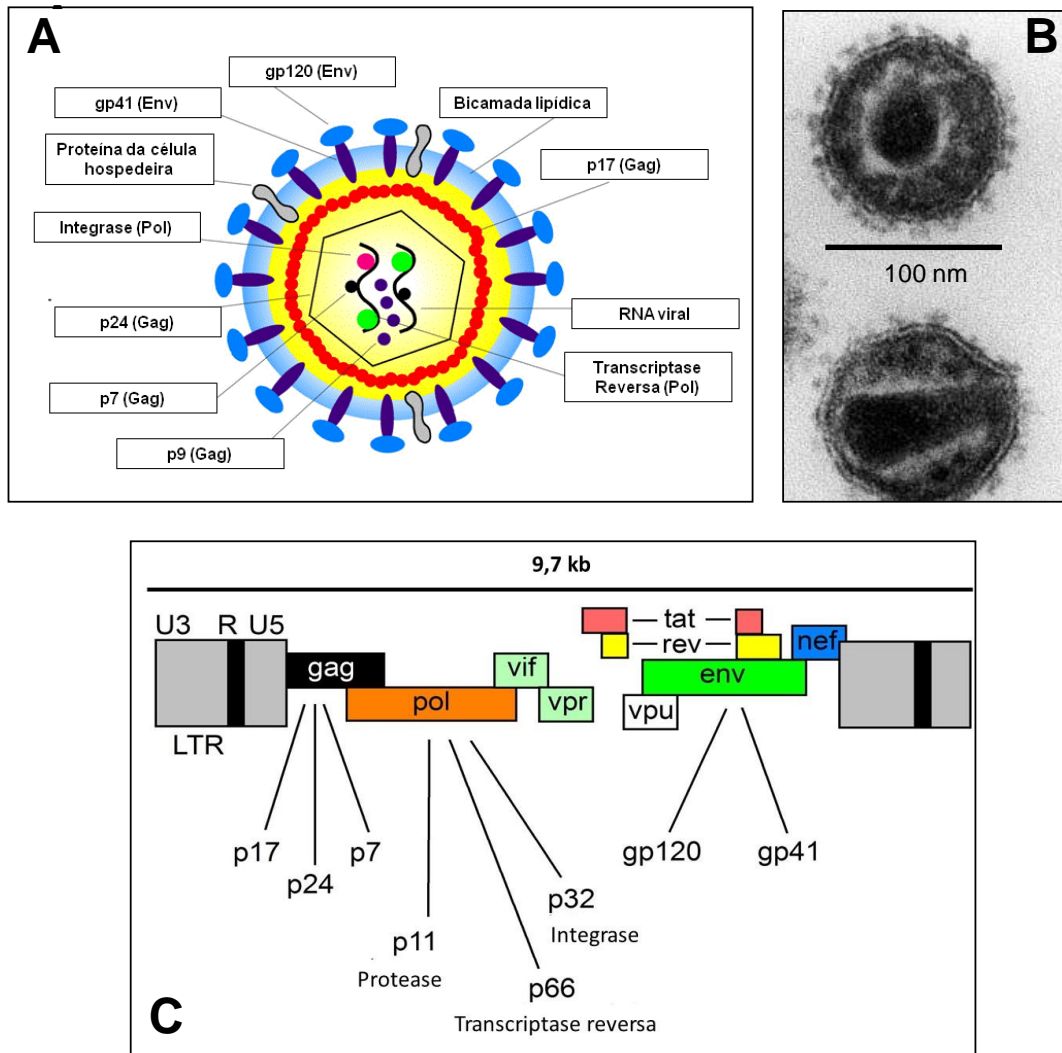
como, por exemplo, GM-CSF, quando coadministrados a esta formulação aumentam a magnitude da resposta imune celular induzida.

### 1.1 Epidemiologia e ciclo de vida do HIV-1

A infecção pelo HIV-1 atinge hoje cerca de 35 milhões de pessoas, tendo ocorrido 2,5 milhões de novos casos e 1,7 milhões de mortes no ano de 2011. Políticas de prevenção tem conseguido reduzir a incidência anual desta doença em mais de 30% desde 2001. Aproximadamente, dois terços dos adultos e das crianças infectadas pelo HIV-1 vivem na África subsaariana (UNAIDS, 2013). No Brasil, foram notificados 656.701 casos de infecção pelo HIV-1 até 2012 (Ministério da Saúde – DST/AIDS, 2012). Apesar de existir uma tendência na redução no número de novas infecções pelo HIV-1, e no aumento da sobrevivência destes pacientes, estima-se que o elevado índice de mortalidade ainda se mantém devido ao acesso inadequado à prevenção e tratamento em muitos países (2).

O HIV-1 tem a capacidade de infectar células que expressam a molécula CD4 como, por exemplo, monócitos, macrófagos, células dendríticas, e principalmente linfócitos T, dos quais aproximadamente 60% expressam esta molécula. (3). Seu genoma (duas moléculas de RNA de fita simples), com cerca de 9700 pares de bases, codificam proteínas estruturais, (Gag, Env, Pol), acessórias (Vif, Vpr, Vpu) e reguladoras (Rev, Nef e Tat) (4) (**Figura 1**).





**Figura 1 – HIV-1: estrutura da partícula viral e organização do genoma.** (A) representação esquemática da organização da partícula viral. (B) microscopia eletrônica, evidenciando o tamanho da partícula. (C) organização do genoma viral e principais proteínas codificadas. Adaptado de: <http://hivbook.com/tag/viral-genome>. LTR-repetição longa terminal. kb-kilobases.

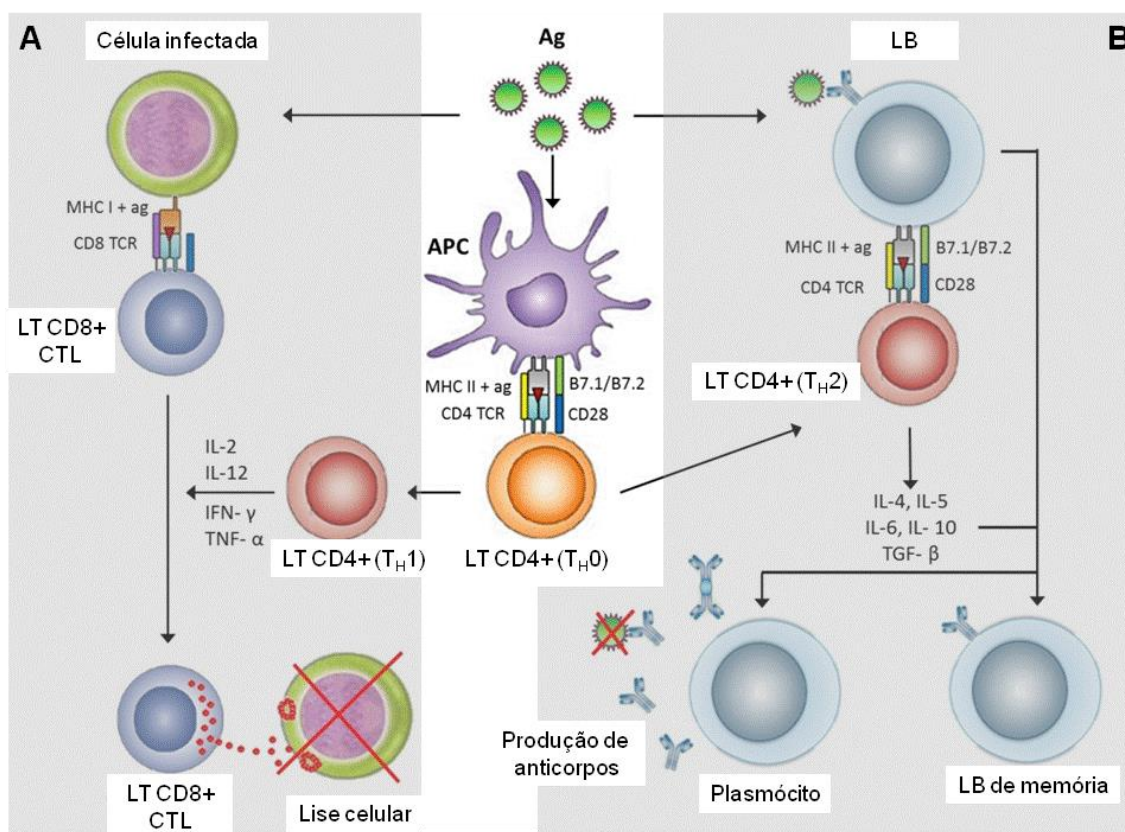
A infecção das células se dá pela interação entre glicoproteínas presentes no envelope viral (gp120 e gp41) e receptores celulares (CD4 e CCR5 ou CXCR4), e consequente fusão do envelope viral à membrana celular (5). Uma vez no citoplasma das células o vírus transcreve seu genoma de forma reversa (RNA-DNA) e pode se integrar ao genoma da célula. Instalada a infecção, novas partículas virais serão formadas, e poderão infectar novas células, sendo que, uma única célula pode produzir

até  $10^{10}$  partículas por dia (6) e esta alta taxa de replicação viral poderá resultar na morte massiva das células T CD4+ (7). Entre 10 – 12 dias pós-infecção a viremia atinge um valor acima de 100 milhões de cópias/mm<sup>3</sup> e nas semanas seguintes, é estabelecido o *set point* viral, que marca o desenvolvimento do período crônico, que pode durar vários anos (8). Neste período, há uma lenta e progressiva depleção de células T CD4+ (principalmente linfócitos T) (9). Em consequência disso, o sistema imune entra em colapso e há o aparecimento de doenças oportunistas e tumores, caracterizando a AIDS e culminando em morte. Em alguns indivíduos infectados, a viremia não é detectada por muitos anos, o que sinaliza para um eficiente controle desta, por parte do sistema imunológico. Estes indivíduos são chamados de controladores de elite, e vem sendo avaliados com o objetivo de entender os principais mecanismos envolvidos no controle da infecção pelo HIV-1 (10).

## **1.2 Resposta imune contra o HIV-1**

Tanto a resposta imune inata, quanto a adaptativa possuem um papel importante na proteção do organismo contra diversos tipos de vírus, inclusive o HIV-1. Moléculas produzidas por células apresentadoras de antígenos, como, células dendríticas e macrófagos como os IFNs-I (Interferons do tipo I) são cruciais para conter a infecção primária tanto *in vitro* como *in vivo* (11, 12). Entretanto, o estímulo crônico da imunidade inata pode ter um papel prejudicial, visto que no progresso para a AIDS, a infecção crônica gera um quadro de exaustão imunológica (13). A ativação crônica da imunidade inata se relaciona com níveis plasmáticos detectáveis de LPS (lipopolissacarídeo), provenientes da translocação de bactérias intestinais (14).

A resposta imune adaptativa contra o HIV-1 está baseada no desenvolvimento de anticorpos neutralizantes (nAb) e indução de linfócitos T CD4+ e CD8+ específicos. Sendo estes últimos capazes de reconhecer e destruir células infectadas pelo vírus (Figura 2).



**Figura 2 – Resposta imunológica adaptativa.** A partir da captação e apresentação de antígenos, via moléculas de MHC de classe I ou II, linfócitos B podem ser estimulados a se diferenciar em plasmócitos, produzindo anticorpos (B), ou então linfócitos T CD4+ e CD8+ podem ser estimulados de forma específica, culminando na lise de células infectadas (A). Adaptado de De Haes, Winni. et al. *Immunodeficiency*. 2012 (15). APC-célula apresentadora de antígeno; LB-linfócito B; LT-linfócito T; CTL-linfócito T citotóxico; Ag-antígeno viral; MHC-complexo principal de histocompatibilidade; TCR-receptor de células T.

Embora diversas evidências sugiram que os nAb possam prevenir a infecção pelo HIV-1, seu aparecimento tardio não influencia no estabelecimento da infecção. Durante a infecção natural do HIV-1, a indução de respostas mediadas por células T CD8+ direcionadas a diversos epítomos virais (16, 17), se correlaciona com a

diminuição da carga viral (18). Além disso, o papel das células T CD4+ na manutenção da resposta imune antiviral é evidente (19). Os linfócitos T CD4+ HIV-1 específicos influenciam na atividade dos linfócitos T CD8+, através de auxílio na indução e/ou manutenção dessas células (20, 21). O controle da replicação do HIV-1 e consequente diminuição da viremia estão associados a uma resposta proliferativa de células T CD4+ vigorosa em pacientes cronicamente infectados e não tratados (22, 23). Recentemente foi demonstrado também o importante papel destas células no controle direto da infecção aguda em pacientes infectados sem tratamento com antirretrovirais, visto seu papel citotóxico contra células infectadas (24, 25). Além disso, a imunização capaz de preservar as células T CD4+ de memória (26) levou a uma sobrevivência aumentada após desafio de primatas com SIV (Vírus da imunodeficiência Símia) (27).

### **1.3 Vacinas anti-HIV**

Nos últimos 20 anos, pesquisas voltadas para o desenvolvimento de uma vacina contra o HIV demonstraram que a proteção contra a doença depende não apenas da produção de anticorpos neutralizantes direcionados a proteínas do envoltório viral com função de bloqueio da infecção, mas principalmente da indução de respostas celulares específicas responsáveis pela destruição de células infectadas pelo vírus (28). Em estudos clínicos envolvendo uma vacina composta da proteína gp120, que originalmente faz parte do envelope viral, e está envolvida no processo de ligação a molécula CD4 e infecção da célula alvo, em sua forma monomérica, não foi possível demonstrar a presença de anticorpos neutralizantes contra isolados do HIV (29) e tampouco esta vacina se mostrou eficaz contra o estabelecimento de infecção (30, 31). Neste sentido, o desenvolvimento de vacinas voltadas para a ativação de respostas mediadas por células

T específicas que poderiam reduzir a viremia tais como vacinas de DNA, vetores virais, regimes vacinais do tipo indução e reforço (*Prime-Boost*), lipopeptídeos sintéticos, VLPs (*Virus Like Particles*) entre outras (32), representam uma prioridade. As estratégias que utilizam vacinas de DNA e vetores virais em protocolos de *prime-boost* homólogo e/ou heterólogo, têm demonstrado resultados promissores (33-35). Em estudos recentes com macacos Rhesus, o citomegalovírus símio (RhCMV) foi utilizado como vetor, codificando para Gag, Rev-Tat-Nef e Env do SIV. Neste caso, foi observado uma forte indução de linfócitos T CD4+ e, principalmente CD8+ de memória efetora, correlacionando com um forte controle da viremia, na ausência de anticorpos neutralizantes. Macacos vacinados controlaram a infecção e replicação do vírus na mucosa e não demonstraram disseminação sistêmica do mesmo (36, 37).

No entanto, resultados negativos obtidos em testes clínicos recentes foram observados. No ensaio denominado STEP, em que se utilizou uma vacina baseada em adenovírus recombinante, a vacinação não foi capaz de proteger contra aquisição da infecção e nem reduzir a viremia nos indivíduos vacinados e infectados (38). Esta eficácia limitada pode ser atribuída à baixa amplitude de reconhecimento antigênico pelos pacientes (apenas 1 epítipo reconhecido por produto gênico do HIV-1 por paciente); apenas 25% apresentaram indução simultânea de células T CD4+ e CD8+, e especialmente, as respostas de células T CD8+ não eram polifuncionais (39, 40). Já em outro ensaio clínico, o RV144 que envolveu mais de 16.000 indivíduos, que foi composto pelas vacinas ALVAC e AIDSVAX e visava induzir uma resposta celular, bem como uma resposta humoral contra o HIV-1, os indivíduos receberam quatro doses iniciais com o vetor recombinante Canarypox codificando para gp120, Gag e protease (ALVAC). Em seguida, foram administradas duas doses auxiliares da proteína gp120 (AIDSVAX). Os indivíduos vacinados apresentaram uma redução de 30% na taxa de

infecção, mas não houve efeito sobre a carga viral (41). As respostas imunológicas mais consistentes entre os participantes que receberam as vacinas foram proliferação de linfócitos T CD4+ e anticorpos IgG contra gp120, além de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) não foram observados altos títulos de anticorpos neutralizantes (42). Mais recentemente observou-se que em especial anticorpos de subclasse IgG3 estavam associados a proteção no ensaio RV144 (43).

De maneira geral, estes ensaios nos sugerem que a indução de respostas celulares em humanos exige o desenvolvimento de abordagens vacinais com maior poder estimulador e modulador do sistema imunológico (44). Cresce, assim, o interesse na busca de metodologias que promovam estes tipos de respostas capazes de conter o pico inicial de viremia, garantindo um *set point* conseqüentemente mais baixo e menor risco de transmissão.

#### **1.4 Vacina de DNA HIVBr18**

Desde o início dos anos 1990, com os primeiros relatos de que plasmídeos quando aplicados pela via intramuscular ou intradérmica tinham a capacidade de induzir resposta imune viral e antiviral, as vacinas de DNA têm sido utilizadas com este propósito (45, 46). Elas são formulações seguras e baratas de serem produzidas, e não necessitam de cadeia refrigerada para seu transporte e armazenamento temporário. A vacina de DNA HIVBr18 codifica epítomos CD4 promíscuos e conservados do HIV-1 (47). Esses epítomos foram descritos após o genoma completo do HIV-1 (subtipo B) ter sido varrido com um algoritmo de predição chamado TEPITOPE. Foram identificados 18 epítomos conservados para linfócitos T CD4+, provenientes do HIV-1 subtipo B, (sequência extraída de *Los Alamos Sequence Database*) previstos de se ligarem a, pelo

menos, dois terços das 25 moléculas HLA-DR descritas pelo algoritmo. A promiscuidade dos epítomos do HIV-1 descritos foi confirmada através de ensaios de ligação *in vitro* às moléculas de HLA-DR prevalentes na população (47). 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 epítomos descritos. Além disso, células mononucleares do sangue periférico de pacientes infectados pelo HIV-1 foram capazes de secretar IFN- $\gamma$  quando reestimuladas *in vitro* com os peptídeos sintéticos. Foi observado também que células de 91% dos pacientes reconheceram pelo menos um epítomo descrito, sendo que 44% deles reconheceram cinco ou mais epítomos (47), corroborando a promiscuidade observada nos testes de ligação *in vitro*.

Em seguida, um gene sintético com otimização de códon para expressão em células de mamífero foi produzido, codificando os 18 epítomos do HIV-1, separados por espaçadores GPGPG para evitar a formação de epítomos juncionais. Esta sequência sintética foi clonada no vetor pVAX-1 e passou a constituir a vacina de DNA HIVBr18. Em seguida, o grupo avaliou as propriedades imunogênicas desta vacina. Após imunização de camundongos transgênicos para diversas moléculas de HLA de classe II humanas utilizando esta vacina de DNA foi possível verificar a produção de IFN- $\gamma$  bem como ativação da proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+ contra múltiplos epítomos por ela codificados. Além disso, essa resposta de células T foi multi-alélica, ou seja, capaz de gerar respostas restritas a várias moléculas de HLA de classe II distintas (48). Recentemente, o grupo demonstrou que a imunização de camundongos BALB/c com a vacina HIVBr18 foi capaz de induzir respostas contra múltiplos epítomos, de longa duração e também células T CD4+ e CD8+ polifuncionais (49). Apesar dos resultados

obtidos com essa formulação vacinal serem bastante interessantes, se faz necessário melhorar sua capacidade imunogênica, de maneira que mais epítomos sejam reconhecidos e com maior potência, visto a limitada imunogenicidade das vacinas de DNA em humanos e primatas não humanos.

### **1.5 Adjuvantes moleculares para vacinas de DNA**

A eficácia de vacinas pode ser aumentada pelo uso de diferentes tipos de adjuvantes. Estes compostos têm sido amplamente estudados e diversas estratégias, utilizando sais de alumínio, emulsões, polímeros sintéticos e até mesmo compostos capazes de interagir com vias inibitórias/estimulatórias já foram descritas (50, 51). Para vacinas de DNA isto não é diferente. Elas apresentam boa imunogenicidade em certos modelos, como camundongos e cobaias, mas, sua eficácia é limitada em modelos maiores como primatas não humanos e, principalmente humanos. Diversas abordagens como vias/formas de administração e adjuvantes moleculares vêm sendo testadas (52), visando indução de resposta imunológica contra vírus e proteção/cura de câncer. Atualmente (de acordo com [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) acesso em 25/03/2014) mais de 100 estudos clínicos estão sendo realizados utilizando plataformas de vacinas de DNA. Como nova forma de administração, a eletroporação *in vivo* tem demonstrado potente aumento na resposta imune induzida, mesmo em modelos mais complexos, como macacos (53), entretanto ainda é uma abordagem que gera bastante desconforto ao indivíduo vacinado. Sendo assim, adjuvantes moleculares podem ser utilizados para aumentar a imunogenicidade de antígenos carregados por vacinas de DNA, sem causar maiores danos ou dor/desconforto. A fusão destes antígenos à proteínas heterólogas como CRT (calreticulina), HSP70 (do inglês *70 kilodalton heat shock protein*) e LAMP (do inglês *Lysosome-associated membrane protein*) (54-56), que possuem atividades de



direcionamento do antígeno ou modulação imunológica foram capazes de aumentar a resposta imune induzida por vacinas de DNA. Uma das proteínas que possui este perfil de carreadora e adjuvante molecular, e é utilizada para fusionar/carrear antígenos vacinais, é a glicoproteína D (gD) do Herpes Vírus Humano do tipo 1 (HSV-1). A glicoproteína gD do envelope do HSV é constituída por 394 aminoácidos, possui uma região transmembrana, definida pelos aminoácidos 340 a 364, e vários sítios de glicosilação (57). O gene completo da gD do HSV-1 possui sítio único de restrição para a enzima *Apal* (próximo a região C' terminal) e permite a clonagem em fase de sequências de DNA que codifiquem antígenos heterólogos (58). A localização de uma região âncora na porção C-terminal da proteína gD foi utilizada anteriormente para a expressão de proteínas heterólogas na superfície de células transfectadas com os derivados do vetor pRE4 (59). O efeito potencializador da gD está relacionado à competição entre a proteína gD e o atenuador de linfócitos B e T (BTLA) pelo receptor HVEM (do inglês *herpes virus entry mediator*), localizado na superfície de células apresentadoras de antígenos (APC). Aparentemente a expressão da gD na superfície de uma APC impede a ligação de BTLA, um repressor da ativação de linfócitos, ao HVEM (60). A ligação da gD ao HVEM favorece, portanto, a apresentação mais efetiva de peptídeos associados a moléculas de MHC tipo I ou tipo II a linfócitos T (61). Esta plataforma foi testada em ensaios feitos com animais imunizados com vacinas de DNA que codificavam oncoproteínas (E7 e E6) do HPV-16 fusionada à gD. Nesses estudos a fusão dos antígenos virais à gD resultou em aumento significativo da ativação de células T CD8<sup>+</sup> específicas para epítomos localizados nas oncoproteínas do HPV-16, em camundongos vacinados. O efeito imuno-estimulador da proteína gD proporcionou uma proteção profilática e terapêutica contra desafio com células tumorais que expressam as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 (62, 63). Ainda, em outro trabalho, quando utilizado

um vetor bicistrônico capaz de expressar a gD fusionada a E7 (HPV-16) ou p24 (HIV-1), simultaneamente, a imunização de camundongos resultou em potente resposta imune anti-viral e antitumoral (64).

Plasmídeos que codificam citocinas são potentes adjuvantes moleculares capazes de aumentar a resposta imune humoral e celular de vacinas de DNA. A co-expressão de diversas citocinas, como as interleucinas (IL) IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e GM-CSF (do inglês, *Granulocyte and macrophage-colony stimulating factor*), potencializa respostas a antígenos codificados por vacinas de DNA (65).

A IL-2 é uma citocina potente produzida por células T ativadas capaz de ativar múltiplos compartimentos do sistema imune e promover a proliferação clonal de células T (66). Seu uso clínico foi aprovado pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) para o tratamento de câncer renal metastático e melanoma maligno, sendo capaz de induzir respostas clínicas em 15% dos pacientes com esses tipos de câncer (67). Alguns estudos que empregam plasmídeos capazes de codificar a IL-2 têm obtido aumento significativo na resposta imunológica contra o herpesvírus bovino tipo I (68), Vírus da hepatite C (69), HIV-1 (70), e contra tumores (71). A co-expressão de IL-2 também tem sido utilizada para aumentar a resposta imune à glicoproteína D (gD) do HSV-1 utilizada como antígeno em vacinas de DNA (72).

A capacidade de IL-12 em induzir resposta imune antígeno-específica está relacionada principalmente a sua habilidade em polarizar as respostas imunológicas para um padrão Th1 (73-75). Além disso, promove maturação de células T CD8 citotóxicas e “*Natural killer*” NK (76) e atua como um sinal secundário ao antígeno no aumento da população de células T CD8+ efectoras e de memória (77-79). A IL-12 também é capaz de facilitar a apresentação de antígenos através do aumento na expressão de moléculas

de MHC classe I e II (80), associado à sua capacidade em promover a expressão de IFN- $\gamma$  (74).

O GM-CSF (do inglês “*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*”) é capaz de estimular a proliferação, diferenciação e ativação de macrófagos, neutrófilos e células apresentadoras de antígenos (81-84). Quando associado a vacinas, GM-CSF demonstrou aumentar a apresentação antigênica, atraindo células dendríticas para o sítio de vacinação (85, 86). Além disso, foi capaz de potencializar a respostas de células T específicas, priorizando o desenvolvimento de CTLs em detrimento de respostas do perfil Th2 (87). Além disso, o GM-CSF é utilizado em ensaios clínicos como adjuvante para vacinas antitumorais (melanoma) baseadas em peptídeos(88, 89) e para tratamentos de diversos tipos de tumores (90-93).

A IL-18 é um membro da superfamília da IL-1. Ela é uma citocina pro-inflamatória multifuncional, exercendo vários efeitos biológicos. Esta citocina é produzida por uma variedade de células incluindo macrófagos, células dendríticas, queratinócitos, adipócitos e células epiteliais do trato intestinal e respiratório (94, 95). O seu efeito biológico mais significativo é a indução da produção de IFN- $\gamma$  por células NK e células T (96) sendo esse efeito observado isoladamente ou quando a IL-18 é combinada com a IL-12 (97). A coadministração intramuscular de vacinas de DNA, que codificam para as proteínas Nef, Gag e Tat do HIV-1 juntamente com IL-18 foi capaz de reduzir o tempo para indução de células T citotóxicas (CTL), aumentar a secreção de IL-2 e IFN- $\gamma$  e a resposta linfoproliferativa HIV específica (98). A IL-18 quando combinada a uma vacina de DNA que codifica antígenos de *M. tuberculosis* foi capaz de promover um aumento na resposta de células T secretoras de IFN- $\gamma$ , sendo que o efeito máximo foi observado quando se utilizou a vacina de DNA associada a IL-18 e IL-12 (99).

A IL-15 pertence à família de citocinas de cadeia gama e é essencial para a geração e manutenção de células T CD8 de memória. É produzida em vários tecidos normais e pelas APCs na fase inicial da resposta imunológica. Assim como a IL-2, participa da estimulação de células B e T e ativação e manutenção de células NK (100, 101). Um plasmídeo que codifica IL-15 em combinação com uma vacina de DNA que codifica Gag do HIV-1 resultou em um aumento significativo da magnitude e longevidade da resposta de linfócitos T CD8+ específicos assim como a secreção de IFN- $\gamma$  em camundongos (102). Em um estudo realizado com macacos, a coimunização, com DNA e IL-12, seguido de DNA e IL-15, foi capaz de promover um aumento na população de células T CD8+ efectoras de memória SIV específicas (103).

## **2 OBJETIVOS**

---

### **2.1 Objetivo geral**

O presente trabalho tem por objetivo desenvolver e testar estratégias que aumentem a magnitude e amplitude da resposta imune celular induzida pela vacina de DNA HIVBr18.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Gerar uma nova vacina de DNA (pVAX-gDh-HIVBr18) após clonagem da sequência gênica que codifica 18 epítomos para células T derivados do HIV-1 (Br18) em um plasmídeo que codifica a proteína gD do HSV-1 e avaliar a resposta imune induzida por esta nova formulação em camundongos BALB/c.

- Coadministrar plasmídeos que codificam as citocinas IL-12, IL-2, GM-CSF e IL-15 à vacina HIVBr18 e avaliar a resposta imune induzida após imunização de camundongos BALB/c.

### 3 METODOLOGIA

---

#### 3.1 Construção do plasmídeo pVAX-gDh-HIVBr18

A amplificação do inserto *Br18* foi feita por PCR na qual foram utilizados como DNA molde o plasmídeo pVAX-HIVBr18 (48). Na reação de PCR foram utilizados os seguintes iniciadores:

Br18 Fw <i>XbaI</i>	5' gact <u>tctaga</u> GAGGAGCTGAGAAGCCTGTAC 3' <i>XbaI</i>
Br18 Rv <i>XbaI</i>	5' gact <u>tctaga</u> CACGTGGTGGGAAGGCCAGT 3' <i>XbaI</i>

As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 50  $\mu$ L, compreendendo 0,1 mM de cada iniciador, 50 ng de DNA molde, dNTPs (0,2 mM cada), tampão (1X), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM) e três unidades da enzima Taq DNA Polimerase High Fidelity. Foi utilizada uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5', seguido de 30 ciclos térmicos de 95 °C por 1', 58 °C por 1'e 72 °C por 1', finalizando com um passo final de extensão por 10 minutos a 72 °C. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), corados com brometo de etídeo 0,1% (v/v) e purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Em seguida, 4  $\mu$ g do amplicon foram digeridos com as enzimas *XbaI* (Fermentas), seguindo orientações do fabricante. Neste mesmo passo foi digerido o vetor pVAX-gDh que contém a sequencia codificadora da glicoproteína D do HSV-1 com seus códons otimizados para expressão em células de mamíferos.. Após duas horas de digestão, vetor e inserto foram novamente purificados, analisados em gel de agarose,

quantificados e submetidos a uma reação de ligação com a enzima DNA ligase (100 ng do vetor e 300 ng do inserto digeridos). Bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  foram transformadas com a mistura de ligação por choque térmico e incubadas em placas por 20h em meio LB sólido com Canamicina (50  $\mu$ g/ml). Os clones resultantes foram coletados, incubados em meio líquido por 12h, centrifugados e submetidos à lise alcalina seguida da precipitação com isopropanol para extração de plasmídeos. Estes foram então digeridos com a enzima XbaI para confirmação da clonagem, e analisados em gel de agarose 1%. Os plasmídeos foram sequenciados pela técnica de interrupção de síntese com dideoxynucleotídeos marcados com fluorocromos. Utilizamos o sequenciador de capilar automático (ABI 3100, Perkin-Elmer Applied Biosystems) e o kit “BigDye™ terminator DNA sequencing-2” (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Warrington, England). As sequências de nucleotídeos obtidas foram editadas e montadas no software LASERGENE (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA).

### **3.2 Construção dos plasmídeos pVAX-gDh-HIVBr18\_1, \_2 e \_3.**

Os genes codificadores dos 18 epítomos do HIV que tiveram suas ordens alteradas a partir da sequência original HIVBr18, foram sintetizados pela empresa GenSript, e posteriormente subclonados no vetor pVAX-gDh, utilizando as enzimas ApaI e XbaI, conforme descrito acima.

### 3.3 Construção do plasmídeo pVAX-DUO-gDh\_HIVBr18

Para amplificar a sequência codificadora de gDh + promotor CMV (pCMV) + sinal terminador (poli-A), utilizamos os iniciadores:

Primer	Sequência (5' – 3')	Tm (°C)
pvax fw	GATGTACGGGCCAGATATAC	52,1
pvax rv	CAGCAAGCGAACCGGAATTG	54,3

Como DNA molde utilizamos o plasmídeo pVAX-gDh (já descrito anteriormente). Após obtermos o produto da PCR (2.216 pb), digerimos o plasmídeo pVAX-HIVBr18 com a enzima *HincII* (extremidades abruptas), o qual possui apenas um sítio de reconhecimento para esta enzima entre os nucleotídeos 33-38, e religamos o plasmídeo digerido ao produto de PCR.

### 3.4 Análise *in silico* das proteínas quiméricas de fusão

A sequência de bases nucleotídicas de cada uma das proteínas analisadas foi traduzida em aminoácidos utilizando a ferramenta de tradução do Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>). Estas sequências de aminoácidos foram copiadas para a janela de entrada do analisador TMHMM Server 2.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)) e submetidas à predição do programa. Este software prevê a localização e a orientação de alfa hélices de proteínas de membrana e baseia-se em um modelo de “Hidden Markov Model” (HMM) com uma plataforma que simula fielmente o sistema biológico (104). A análise de hidrofobicidade de cada um dos 18 peptídeos foi realizada com o auxílio da ferramenta ProtParam, também do Expasy (<http://web.expasy.org/protparam/>).



### 3.5 Transfecção e imunofluorescência de células HEK 293T

Células HEK 293T ( $5 \times 10^5$  células) foram cultivadas em placas de 6 poços em meio MEM + 10% Soro Fetal Bovino (SFB) até atingirem uma confluência de 90%. Em seguida, foram lavadas com solução PBS 1X e incubadas com uma mistura de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) adicionada dos plasmídeos de interesse ou somente meio de cultura, seguindo as orientações do fabricante. Em cada poço de transfecção foi adicionada uma mistura final de 500  $\mu$ L (volume final), contendo 4  $\mu$ g de DNA diluído em 250  $\mu$ L de MEM e mais 10  $\mu$ L de lipofectamina previamente diluída em 250  $\mu$ L de MEM. As células foram mantidas com essa mistura por 4 horas e então o meio de cultivo foi repostado (volume final de 2mL). Após 24 horas, as células foram lavadas com solução PBS 1X e removidas da placa ao ser adicionado 1 mL de solução PBS + 0,5 mM EDTA. As células foram centrifugadas em tubos de 1,5 mL por 10 minutos a 1600 rpm. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 100  $\mu$ L de PBS 1X + 10% SFB e transferidas para placas de 96 poços fundo “V” onde foram incubadas por 20 minutos. Posteriormente, 2  $\mu$ L de um anticorpo anti-gD (gerado em coelho) foi adicionado em cada amostra. As células com os anticorpos foram incubadas por 60 minutos e em seguida lavadas duas vezes com PBS +10% SFB. As células foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 20 minutos e novamente lavadas com PBS 1X. As células foram diluídas e cada amostra divididas em dois poços. Metade dos poços foi tratada com uma solução de permeabilização (saponina 0,5%) por 15 minutos sendo mantida no gelo. As células foram lavadas com PBS 1X e incubadas por 60 minutos em 100  $\mu$ L de solução PBS +10% SFB contendo um anticorpo anti-rabbit IgG conjugado a Texas-Red (Texas Red® Goat Anti-Rabbit IgG Invitrogen). As células foram novamente lavadas e ressuspensas em 20  $\mu$ L de PBS 1X + 50% glicerol contendo

o corante nuclear DAPI (300 nM), colocadas entre lâmina e lamínula e analisadas em microscopia de fluorescência.

### 3.6 Animais e imunizações

Camundongos isogênicos (fêmeas) de 6 a 8 semanas de idade da linhagem BALB/c (H-2d) foram utilizados 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). O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da USP (protocolo nº 197-12). A imunização básica consistiu de três doses, com intervalo de duas semanas, pela via intramuscular (IM). Cada dose consistiu de 100 ou 50 µg do respectivo plasmídeo vacinal (diluídos em solução salina estéril – volume final de 100 µL), administrados 50 µL em cada músculo tibial anterior, direito e esquerdo. Quanto da coadministração com plasmídeos que codificam citocinas cada dose de imunização consistiu de 100 ou 25 µg de DNA/dose tanto do plasmídeo vacinal quanto do plasmídeo adjuvante que codifica a citocina, ou do plasmídeo pVAX-1 (vazio) (total de 200 ou 50 µg de DNA/dose) diluídos em 100 µL de salina e inoculados da mesma forma descrita acima. Quando da combinação de mais de uma citocina por grupo experimental, foram somados 25 µg do plasmídeo vacinal (HIVBr18), 25 µg do vetor que codifica uma das citocinas e mais 25 µg do vetor que codifica a segunda citocina. Como controle os animais que receberam apenas o plasmídeo vacinal, foram inoculados com este, adicionado de mais 50 µg de plasmídeo pVAX-1 (vazio). Em todos os experimentos, os valores atingidos pelos animais do grupo controle, foram subtraídos dos demais grupos,

sendo os seus valores não mostrados. Duas semanas após a última dose, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e os baços coletados assepticamente.

### **3.7 Suspensão celular**

As células foram obtidas após maceração suave do órgão utilizando um êmbolo de seringa estéril e lavadas por centrifugação (1700 rpm a 4 °C, por 6 minutos) com 10 mL de meio RPMI (Gibco) suplementado (L-glutamina 2 mM (Sigma), solução de aminoácidos não essenciais (1%vol/vol) (Gibco), piruvato de sódio 1mM (Gibco), 2-mercaptoetanol ( $5 \times 10^{-5}$ M) (Sigma) e os antibióticos Gentamicina (40 g/mL) e Peflacin (20 g/mL) e vitaminas (1%vol/vol)). Em seguida, as células foram tratadas com tampão hemolítico ACK (NH<sub>4</sub>Cl 0,15 M, KHCO<sub>3</sub> 1 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 mM) para lise das hemácias e em seguida lavadas duas vezes com 10 mL de meio RPMI. Ao final das lavagens, as células foram diluídas em 1 mL de meio R10/baço (meio RPMI suplementado, contendo 10% vol/vol de SFB (Gibco)) e contadas com auxílio de uma câmara de Neubauer e o corante vital Tripan Blue.

### **3.8 Ensaio de ELISPOT (Enzyme-Linked Immunosorbent Spot)**

Os ensaios de ELISPOT foram realizados utilizando-se os conjuntos de anticorpos anti-mouse IFN- $\gamma$  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-  $\gamma$  ou IL-2) foi adicionado à placa na concentração de 5  $\mu$ g/mL em volume final de 100  $\mu$ L por poço, e estocado durante a noite à 4 °C. Em seguida, os poços foram lavados e o bloqueio dos sítios inespecíficos realizado com meio R10 (RPMI 1640 + 10% SFB) por

2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados os estímulos: meio, como controle negativo, Concanavalina A (2,5 µg/mL) como controle positivo e os peptídeos do HIV-1, individuais ou em pool (5 µM), em um volume final de 100 µL. Os peptídeos foram sintetizados em fase sólida pela empresa GL Biochem Ltda (Shanghai-China), utilizando-se a estratégia de Fmoc, e suas sequências podem ser observadas no **Anexo B - Tabela 1.** Em seguida foram adicionadas às suspensões celulares na concentração de  $3 \times 10^5$  células/poço também em volume final de 100 µL. Todos os estímulos e suspensões celulares serão preparados em R10 suplementado. Após adição dos estímulos e suspensões celulares, a placa foi incubada à 37°C em estufa à 5 % de CO<sub>2</sub> durante a noite (aproximadamente 20 horas). Posteriormente, as placas foram lavadas 2 vezes com água deionizada e 3 vezes com PBS-0.05% Tween 20. O anticorpo de detecção (anti IFN- ou IL-2 biotilado) foi diluído em PBS-10% SFB e adicionado aos poços (volume 100 µL/poço) na concentração final de 2 µg/mL e incubado novamente durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem dos poços 3 vezes 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 monitorada de 15 – 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 interrompida com 5 lavagens com água deionizada. A contagem dos spots foi realizada em um estereomicroscópio automatizado com auxílio do software KS-ELISPOT (Zeiss) e os resultados expressos em número de spots por  $10^6$  células (UFS/ $10^6$  esplenócitos).

### 3.9 Proliferação celular e detecção de citocinas intracelulares

Para avaliação da proliferação celular antígeno-específica foi utilizado o ensaio de diluição de CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl diester). Durante a divisão celular, o CFSE sofre ação de esterases 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 realização dos ensaios de proliferação celular os esplenócitos isolados (concentração de  $50 \times 10^6$  células/mL) foram diluídos em PBS pré-aquecido ( $37^\circ\text{C}$ ) contendo  $1,25 \mu\text{M}$  de CFSE durante 10 minutos. 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 diluídas em meio R10 na concentração de  $1,5 \times 10^6$ /mL. As células foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo U (Nunc) na quantidade de  $5 \times 10^5$  células/ poço em volume final de  $200 \mu\text{L}$  de R10. Os esplenócitos dos animais dos grupos de imunização foram estimulados com o pool de 18 peptídeos sintéticos derivados do HIV-1. O primeiro estímulo foi feito no primeiro dia de cultura com  $5 \mu\text{M}$  do pool de peptídeos. Os controles positivos foram estimulados com  $2,5 \mu\text{g/mL}$  de Concanavalina A (Sigma) e os controles negativos não receberam estímulo. As células foram mantidas em cultura por 4 dias, a  $37^\circ\text{C}$  sob atmosfera contendo 5 % de  $\text{CO}_2$ . No quarto dia de cultura as células foram reestimuladas com  $5 \mu\text{M}$  do pool de peptídeos ou com  $2,5 \mu\text{g/mL}$  de Concanavalina A (Sigma) ou ainda somente meio de cultura (controles não estimulados). Além disso, foram adicionados  $2 \mu\text{g/mL}$  do co-estímulo anti-CD28 por poço de cultura. As células

foram mantidas em estufa por 1h na presença dos estímulos e então adicionados 0,2µL de Brefeldina A (BD GolgiPlug™) por poço. A placa de cultura foi novamente colocada na estufa e as células incubadas por mais 12h a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período a placa de cultura de fundo U (Nunc) foi centrifugada a 1300 rpm por 6 minutos, o sobrenadante descartado e adicionado 150 µL de MACS buffer (PBS com 0,5% de BSA e 2 mM de EDTA) no primeiro poço de cada triplicata, a fim de juntar o conteúdo celular de cada triplicata em um único poço. As células foram transferidas para uma placa de cultura de 96 poços de fundo V (Nunc). A placa em fundo V foi centrifugada a 1300rpm por 6 minutos, o sobrenadante descartado e as células marcadas em volume final de 50µL de MACS buffer, contendo os anticorpos anti-CD4-PerCP (BD Pharmingen) e anti-CD8-Alexa fluor 700 (BD Pharmingen), ao abrigo da luz por 40 minutos a 4°C. As células foram lavadas duas vezes com 150µL de MACS buffer e incubadas em 100µL de BD Cytotfix/Cytoperm™ por poço, durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente as células foram lavadas duas vezes com 150µL de BD Perm/Wash™ buffer e marcadas, ao abrigo da luz, em volume final de 50µL de BD Perm/Wash™ buffer, contendo os anticorpos anti-CD3-APC-Cy7 (BD Pharmingen), anti-TNF-α-PE-Cy7 (BD Pharmingen), anti-IL-2-PE (BD Pharmingen) e anti-IFN-γ-APC (BD Pharmingen) por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas duas vezes com 150µL de Perm/Wash™ buffer e ressuspensas em volume final de 200µL de MACS buffer. As amostras foram adquiridas no citômetro FACScanto (BD Biosciences) e analisadas com o auxílio do software FlowJo (versão 8.7.1, Tree Star). Para ajuste das voltagens foram utilizadas beads marcadas com os fluorocromos individualmente. Quinhentos mil eventos foram adquiridos no “gate” de linfócitos. A estratégia de “gates” utilizada pode ser observada no **Anexo A – Figura 1**.

### **3.10 Análises estatísticas**

Os dados provenientes dos experimentos de ELISPOT e citometria multiparamétrica foram plotados e analisados no programa GraphPad Prism 5 e submetidas aos testes estatísticos “one-way ANOVA” seguido do pós teste de “Bonferroni”. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4 RESULTADOS

---

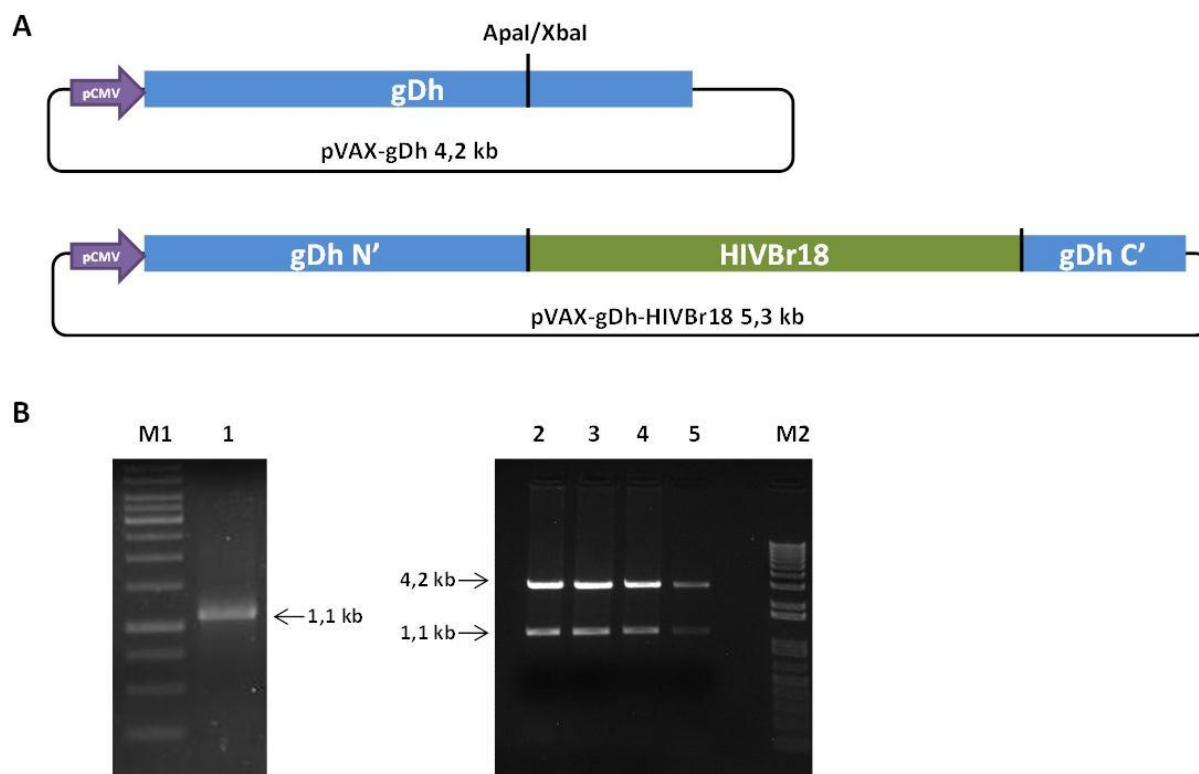
### 4.1 Construção do plasmídeo vacinal pVAX-gDh-HIVBr18

O plasmídeo pVAX-gDh foi construído através da clonagem da sequência DNA que codifica para a glicoproteína D (gD) do HSV-1, que teve seus códons otimizados para expressão em células de mamífero (gDh), no vetor pVAX-1. Como podemos observar na **Figura 3A**, a gDh possui sítios de reconhecimento das enzimas *ApaI* e *XbaI* próximos a sua região C', que permitem a clonagem de sequências gênicas no seu interior. Estas quando clonadas e expressas em forma de “sanduíche”, dão origem a proteínas híbridas/quiméricas de fusão (porção N' gD – sequência alvo – porção C' gD). Desta forma, a sequência de DNA que codifica para os 18 epítomos da vacina de DNA HIVBr18 foi amplificada por PCR, removendo-se o códon de parada e adicionando sítios de reconhecimento da enzima *XbaI* nas extremidades 5' e 3'.

Na **Figura 3B** podemos observar que o fragmento amplificado (sequência de DNA que codifica os 18 peptídeos do HIV-1 – *amplicon* Br18) corresponde ao tamanho esperado de aproximadamente 1,1 kb (referente aos 1089 pares de bases amplificados). O *amplicon* Br18 foi então digerido com as enzima *XbaI* e clonado no vetor pVAX-gDh dando origem ao plasmídeo pVAX-gDh-HIVBr18. Fazendo uma análise de restrição dos plasmídeos obtidos de quatro clones após transformações de bactérias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ , observamos que o inserto liberado corresponde ao tamanho do fragmento amplificado por PCR e que o vetor digerido possui um tamanho aproximado de 4,2 kb



(pVAX-gDh). Os clones foram sequenciados para confirmar a correta orientação do inserto.

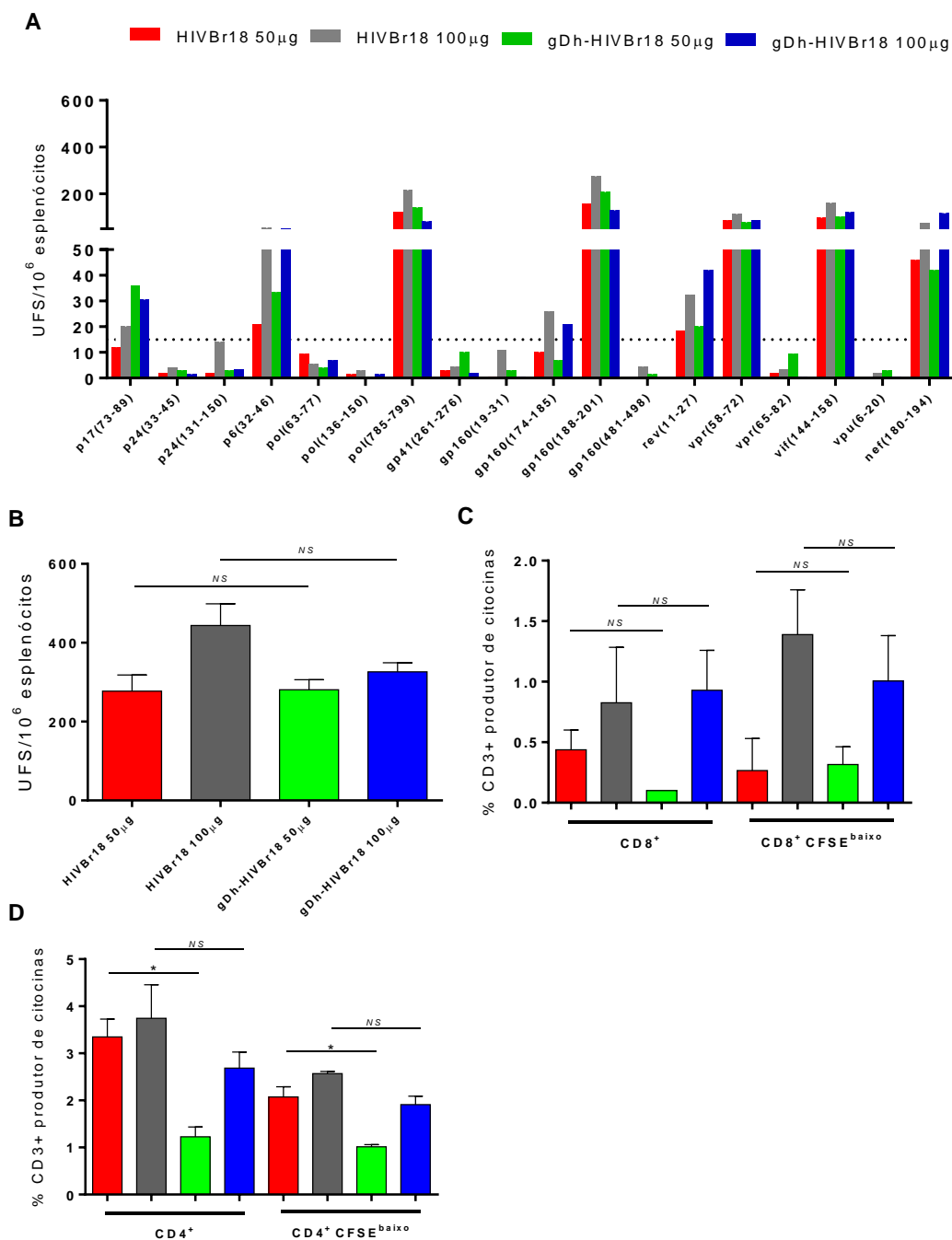


**Figura 3 – Esquema gráfico e clonagem do plasmídeo pVAX-gDh-HIVBr18.** (A): Representação do vetor e do sítio de restrição (*XbaI*) utilizado para inserir a sequência que codifica o Br18 no interior da gDh e o vetor final obtido após a clonagem. (B): Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. M1 – marcador de peso molecular (Fermentas GeneRuler 1kb DNA Ladder). Coluna 1 - amplicon Br18 gerado após amplificação por PCR a partir do seu vetor original (pVAX-HIVBr18); Colunas 2-5 - digestão enzimática (*Apal*) de quatro clones da construção final pVAX-gDh-HIVBr18; M2 - marcador de peso molecular (Invitrogen 1 kb DNA Ladder).

#### 4.2 Teste de imunogenicidade do plasmídeo pVAX-gDh-HIVBr18

Para avaliar se o novo plasmídeo vacinal seria imunogênico, inoculamos grupos de camundongos com pela via i.m. com os plasmídeos pVAX-gDh-HIVBr18 ou pVAX-HIVBr18 em duas doses diferentes (50 ou 100  $\mu\text{g}/\text{dose}$ ) e após o protocolo vacinal procedemos experimentos de ELISPOT e detecção de citocinas intracelulares por

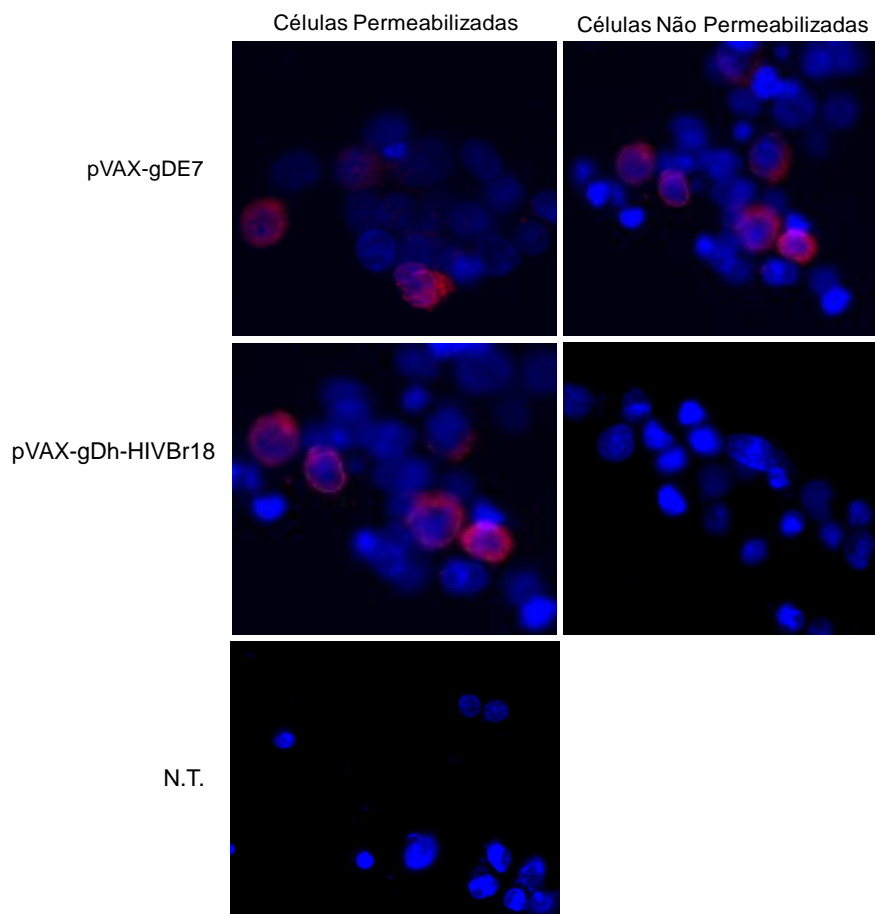
citometria de fluxo. Como controle negativo um grupo de animais foi inoculado com pVAX-gDh (100 $\mu$ g/dose). Como demonstrado na **Figura 4A** os animais imunizados com gDh-HIVBr18 apresentaram resposta imune semelhante àqueles imunizados com HIVBr18 (para ambas as doses), em relação a amplitude da resposta induzida (número de peptídeos que possuem resposta positiva). Em uma média entre três experimentos independentes, 08 (oito) peptídeos foram reconhecidos pelos grupos imunizados sendo os mais frequentes: p17(73-89), p6(32-46), pol(785-799), gp160(188-201), rev(11-27), vpr(58-65), vif(144-158), nef(180-194). Quando analisamos a magnitude da resposta (esplenócitos testados contra o “pool” de peptídeos), observamos que animais imunizados com plasmídeo que codifica gDh-HIVBr18 apresentavam número semelhante de células capazes de responder ao pool de peptídeos quando comparados aos animais imunizados com HIVBr18 (**Figura 4B**). Esse fenômeno foi observado independente da dose administrada. Além disso, em relação à capacidade de proliferação e produção de citocinas (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), observamos que células T CD8+ (**Figura 4C**) dos animais imunizados com HIVBr18 apresentavam o mesmo padrão daquelas dos animais imunizados com gDh-HIVBr18 (para ambas as doses), não havendo diferença estatística entre os grupos comparados. Já para as células T CD4+ (**Figura 4D**), observamos que a imunização com gDh-HIVBr18 alcançou uma magnitude inferior visto a porcentagem de células com capacidade de produzir citocinas, quando comparados os grupos imunizados com gDh-HIVBr18 e HIVBr18 na condição de 50  $\mu$ g/dose, não havendo diferença quando os grupos foram comparados na dose de 100  $\mu$ g/dose.



**Figura 4 – Resposta imunológica induzida após imunização com gDh-HIVBr18 ou HIVBr18.** Os dados são mostrados como a média e desvio padrão da compilação de dois experimentos independentes. Número de spots de IFN- $\gamma$  produzidos por esplenócitos dos animais imunizados com 50 ou 100  $\mu$ g de DNA/dose que foram incubados com os peptídeos individuais (A) ou o pool (B) duas semanas após a última dose. A linha pontilhada representa o valor de corte de positividade. Esplenócitos dos mesmos camundongos foram marcados com CFSE (1,25  $\mu$ M) e cultivados por 4 dias na presença de “pool” de peptídeos do HIV-1 (5  $\mu$ M) ou somente meio de cultura. No quarto dia, as células foram pulsadas por 12h com o “pool” de peptídeos ou somente meio de cultura, juntamente com o co-estímulo de anti-CD28 na presença de Brefelfina. Citometria multiparamétrica foi utilizada para determinar a frequência de células CD3+CD8+ (B) ou CD3+CD4+ (C) CFSEbaixo capazes de produzir IFN- $\gamma$ , IL-2 ou TNF- $\alpha$ .

### 4.3 Expressão *in vitro* da proteína gDh-HIVBr18

A fim de avaliar se a proteína de fusão gDh-HIVBr18 estava sendo expressa e confirmar sua localização celular foi realizado um ensaio de imunofluorescência. Células HEK-293T foram transfectadas com os plasmídeos de interesse pVAX-gDh-HIVBr18, pVAX-gDh e pVAX-gDhE7 (plasmídeo não relacionado que expressa a gDh fusionada a proteína E7 do HPV-16) ou somente meio de cultura. Após incubação com soro policlonal anti-gD e marcação com anticorpo fluorescente as células foram analisadas por microscopia. Como podemos observar na **Figura 5**, é possível detectar a expressão de gDh fusionada ao antígeno E7 do HPV-16 tanto na face externa da membrana (células não permeabilizadas), quanto na porção intracelular (células permeabilizadas). Este fato não foi observado naquelas células transfectadas com o plasmídeo pVAX-gDh-HIVBr18, nas quais foi apenas detectada a proteína de fusão intracelular em células permeabilizadas, indicando sua localização.



**Figura 5 – Análise de expressão da proteína gDh-HIVBr18 na face externa da membrana celular.** Células HEK293T foram transfectadas com diferentes plasmídeos utilizando lipofectamina e após 24h foram submetidas ou não a um processo de permeabilização, incubadas com anticorpos primário (coelho-anti-gD) e secundário (anti-coelho IgG - Texas-Red) e analisadas em microscopia de fluorescência para avaliar a expressão da proteína alvo. N.T. células não transfectadas.

#### 4.4 Análise *in silico* da sequência de aminoácidos de gDh-HIVBr18

A glicoproteína D (gD) e sua análoga gDh possuem uma região transmembranária (entre os aminoácidos 344-366) pela qual são capazes de se ancorar à membrana da célula, ficando quase que totalmente expostas na face externa da membrana celular. Como observamos na sessão anterior esta capacidade não é alterada pela fusão com a proteína E7 (uma proteína que não apresenta regiões altamente

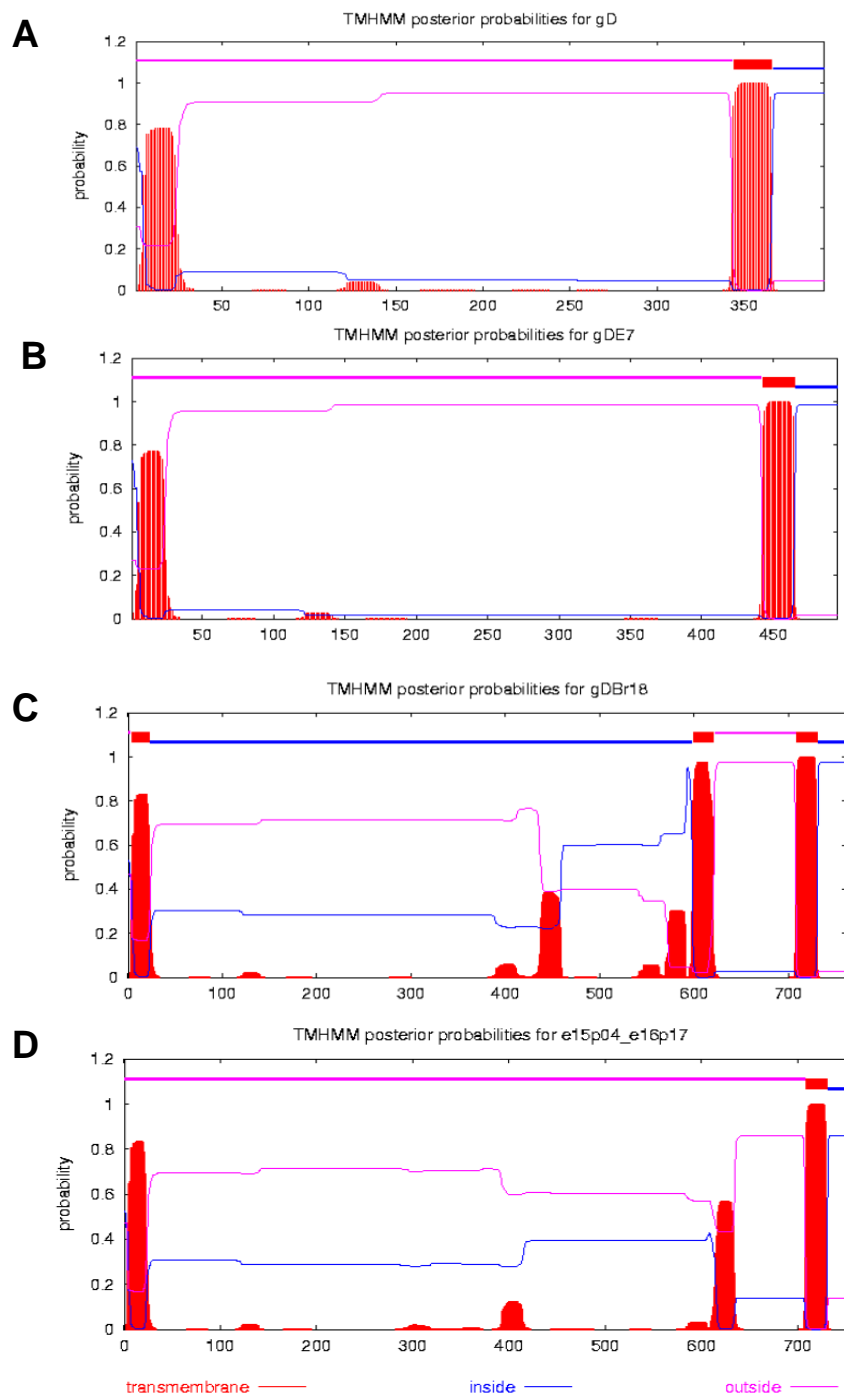
hidrofóbicas ou trans-membranárias próprias), entretanto, após ser fusionada com HIVBr18 esta capacidade da gDh é perdida.

A molécula gerada após a transcrição e tradução da sequência do HIVBr18, não é uma molécula naturalmente produzida pelo vírus (embora todos os peptídeos estejam contidos no genoma do HIV), sendo apenas uma concatenação de várias regiões unidas por espaçadores (Glicina-Prolina-Glicina-Prolina-Glicina). Cada uma destas regiões ou peptídeos, possui uma característica de hidrofobicidade única, como podemos observar no **Quadro 1** (à esquerda), onde estão plotadas a ordem em que eles estão ordenados na molécula sintetizada; a sequência de aminoácidos de cada peptídeo; e seu índice GRAVY (índice de solubilidade de uma sequência de aminoácidos: quando positivo = hidrofóbico, quando negativo = hidrofílico). A vacina HIVBr18 codifica vários peptídeos hidrofóbicos (15/18), sendo que 4 deles possuem  $\text{GRAVY} > 1$  como podemos observar no **Quadro 1**.

Br18				Br18 e14p04_e16p17			
Posição	Peptídeo	Sequência	GRAVY	Posição	Peptídeo	Sequência	GRAVY
0	p17(73-89)	EELRSLYNTVATLYCVH	0.065	0	rev(11-27)	ELLKTVRLIKFLYQSNP	-0.029
1	p24(33-45)	SPEVIPMFSALSE	0.492	1	pol(785-799)	GKILVAVHVASGYI	1.567
2	p24(131-150)	KRWIILGLNKIVRMYSPTSI	0.245	2	p24(131-150)	KRWIILGLNKIVRMYSPTSI	0.245
3	p6(32-46)	DKELYPLASLRSFG	-0.033	3	gp41(261-276)	RDLLIVTRIVELLGR	0.925
4	pol(63-77)	QRPLVTIKIGGQLKE	-0.340	4	vif(144-158)	SLQYLALVALVAPKK	0.933
5	pol(136-150)	TPVNIIGRNLLTQIG	0.433	5	p6(32-46)	DKELYPLASLRSFG	-0.033
6	pol(785-799)	GKILVAVHVASGYI	1.567	6	gp160(19-31)	TMLLGMLMICSAA	1.985
7	gp41(261-276)	RDLLIVTRIVELLGR	0.925	7	pol(63-77)	QRPLVTIKIGGQLKE	-0.340
8	gp160(19-31)	TMLLGMLMICSAA	1.985	8	p17(73-89)	EELRSLYNTVATLYCVH	0.065
9	gp160(174-185)	ALFYKLDVVPID	0.942	9	vpr(58-72)	EAIIRILQQLLFIHF	1.240
10	gp160(188-201)	NTSYRLISCNTSVI	0.207	10	gp160(481-498)	SELYLYKVVKIEPLGVAP	0.472
11	gp160(481-498)	SELYLYKVVKIEPLGVAP	0.472	11	pol(136-150)	TPVNIIGRNLLTQIG	0.433
12	rev(11-27)	ELLKTVRLIKFLYQSNP	-0.029	12	p24(33-45)	SPEVIPMFSALSE	0.492
13	vpr(58-72)	EAIIRILQQLLFIHF	1.240	13	vpr(65-82)	QQLLFIHFRIGCRHSRIG	0.039
14	vpr(65-82)	QQLLFIHFRIGCRHSRIG	0.039	14	nef(180-194)	VLEWRFD SRLAFHHV	-0.047
15	vif(144-158)	SLQYLALVALVAPKK	0.933	15	gp160(188-201)	NTSYRLISCNTSVI	0.207
16	vpu(6-20)	VLAIVALVATI IAI	3.260	16	gp160(174-185)	ALFYKLDVVPID	0.942
17	nef(180-194)	VLEWRFD SRLAFHHV	-0.047	17	vpu(6-20)	VLAIVALVATI IAI	3.260

**Quadro 1 – Lista dos 18 peptídeos codificados pelo poli-epítipo HIVBr18 original e uma versão modificada.** Sequência codificada pelo poli-epítipo original (quadro à esquerda) e uma versão modificada (quadro à direita). Encontra-se destacados os valores de peptídeos hidrofóbicos: GRAVY > 1 (preto); GRAVY > 0 e < 1 (cinza); e hidrofílicos: GRAVY < 0 (branco).

A proteína gDh possui 396 aminoácidos e sua única região trans-membranária está localizada na sua porção C' terminal, como dito anteriormente entre os aminoácidos (344-366) e quando fusionada ao HIVBr18 esta passa a ser uma proteína híbrida de fusão (gDh-HIVB18) de 761 aminoácidos e sua região trans-membranária natural passa a ficar contida entre os aminoácidos 709-731. Ao analisarmos a sequência de gDh-HIVBr18 no software TMHMM server 2.0 (disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>), observamos que são previstas de serem formadas mais duas regiões trans-membranárias entre os aminoácidos 4-23 e 599-621, como pode ser observado na **Figura 6C**, fato este que não ocorre ao analisarmos a proteína gDhE7 (**Figura 6B**) e tão pouco para gDh sozinha (**Figura 6A**).



**Figura 6 – Análise *in silico* da proteínas de fusão gDh-HIVBr18.** As seqüências de aminoácidos da proteína gDh (A) e das proteínas de fusão gDhE7 (B), gDh-HIVBr18 (C) e gDh-HIVBr18-e15p04\_e16p17 (D), foram analisadas no preditor de regiões trans-membranárias TMHMM server 2.0. No eixo X observa-se o número de resíduos de aminoácidos que compõe cada proteína avaliada e no eixo Y uma escala de probabilidade em relação àquela região ser exteriorizada, interiorizada ou permanecer transmembranar.. Porções intracelulares estão destacadas em azul, porções transmembrana destacadas em vermelho, e extracelulares destacadas em rosa acima da linha de corte de probabilidade 1,0.



Ao analisarmos a molécula gDh-HIVBr18 em específico a região transmembranária 599-621 prevista de ser formada, observamos que esta é a que contém a sequência do peptídeo “vpu” (posição 16 da molécula HIVBr18, GRAVY 3,260 - hidrofóbico) e resíduos que o flanqueiam. Geramos a hipótese que por este peptídeo ser altamente hidrofóbico ele poderia estar se comportando como uma região transmembranária, e que deveríamos colocá-lo distante de outras regiões hidrofóbicas da molécula para tentar minimizar este efeito. Tentamos ainda fazer com que os demais peptídeos hidrofóbicos ficassem organizados de maneira mais espaçada entre si. Portanto geramos uma nova sequência de HIVBr18 na qual a ordem em que os peptídeos estão dispostos na molécula foi definida tentando-se intercalar o maior número de regiões não-hidrofóbicas entre o peptídeo “vpu” e o restante da molécula (**Quadro 1** à direita). Desta forma, fomos capazes de gerar uma molécula de gDh-HIVBr18 com um arranjo de hidrofobicidade mais bem distribuído que é predita de não formar mais regiões transmembranárias intramoleculares senão àquela da própria gDh (**figura 6D**).

#### 4.5 Construção de sequências modificadas de gDh-HIVBr18

Baseados nas análises *in silico* da sequência dos epítomos codificados pela vacina HIVBr18 fusionados a gDh, pudemos propor a construção de três novas sequências, com diferentes arranjos dos peptídeos, baseadas nas características hidrofóbicas dos mesmos, e na sua capacidade de garantir, ou não, a correta exteriorização total da proteína de fusão respectiva. Geramos três novas formas de organizar a molécula, nas quais, a ordem em que os peptídeos se encontram foi alterada, tentando definir a posição mais favorável que cada peptídeo deveria ocupar (**Figura 7**).

Estes novos construtos foram possíveis de serem obtidos graças a rotinas computacionais desenvolvidas pelo Dr. Frederico M. Ferreira.

#### HIVBr18

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)
----------------	----------------	------------------	---------------	----------------	------------------	------------------	-------------------	------------------	--------------------	--------------------	--------------------	----------------	----------------	----------------	------------------	---------------	------------------

#### 1 - HIVBr18\_e15e16Tp05 - positiva

p17 (73-89)	p24 (33-45)	p24 (131-150)	p6 (32-46)	pol (63-77)	vif (144-158)	vpu (6-20)	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)	nef (180-194)
----------------	----------------	------------------	---------------	----------------	------------------	---------------	------------------	------------------	-------------------	------------------	--------------------	--------------------	--------------------	----------------	----------------	----------------	------------------

#### 2 - HIVBr18\_e15p04\_e16p17\_scrmb - positiva

rev (11-27)	pol (785-799)	p24 (131-150)	gp41 (261-276)	vif (144-158)	p6 (32-46)	gp160 (19-31)	pol (63-77)	p17 (73-89)	vpr (58-72)	gp160 (481-498)	pol (136-150)	p24 (33-45)	vpr (65-82)	nef (180-194)	gp160 (188-201)	gp160 (174-185)	vpu (6-20)
----------------	------------------	------------------	-------------------	------------------	---------------	------------------	----------------	----------------	----------------	--------------------	------------------	----------------	----------------	------------------	--------------------	--------------------	---------------

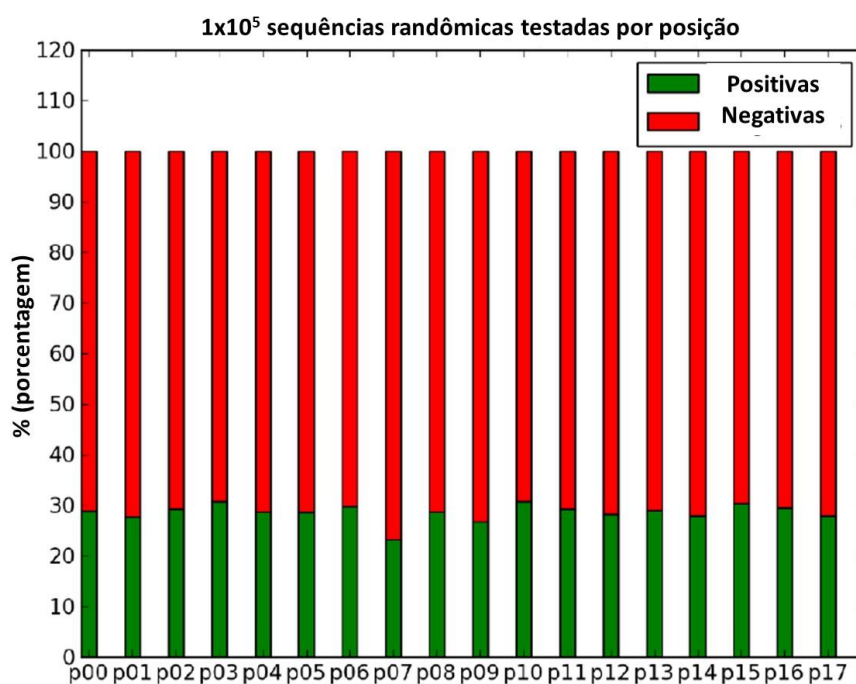
#### 3 - HIVBr18\_e15p01\_e16p02\_scrmb - negativa

rev (11-27)	vif (144-158)	vpu (6-20)	pol (785-799)	p24 (131-150)	gp41 (261-276)	p6 (32-46)	gp160 (19-31)	pol (63-77)	p17 (73-89)	vpr (58-72)	gp160 (481-498)	pol (136-150)	p24 (33-45)	vpr (65-82)	nef (180-194)	gp160 (188-201)	gp160 (174-185)
----------------	------------------	---------------	------------------	------------------	-------------------	---------------	------------------	----------------	----------------	----------------	--------------------	------------------	----------------	----------------	------------------	--------------------	--------------------

**Figura 7 – Organização espacial dos novos construtos derivados de HIVBr18.** Destacado, encontra-se o peptídeo de “vpu”, altamente hidrofóbico.

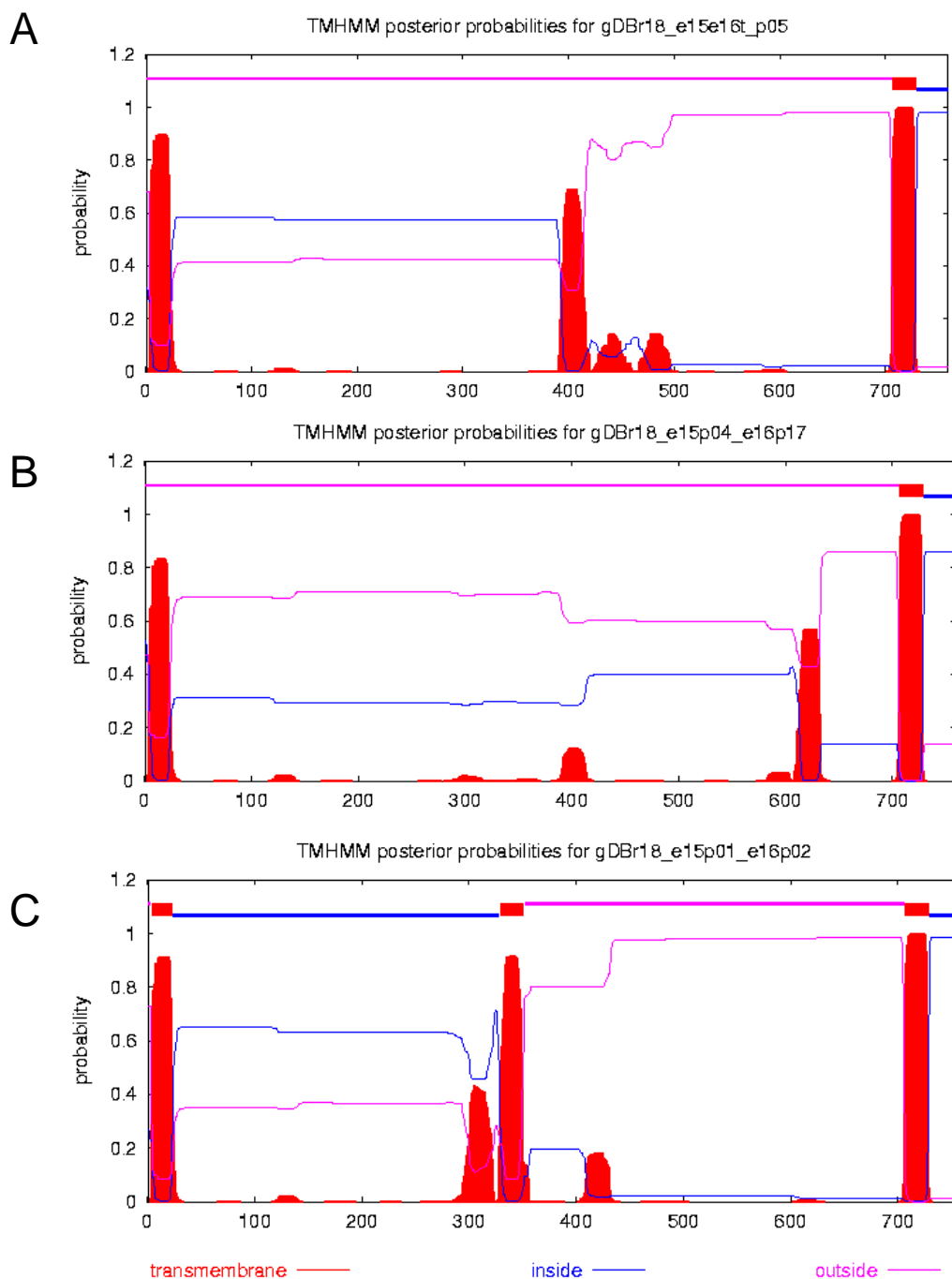
Podemos observar na **Figura 8**, que representa o gráfico do percentual de sequências de gDh-HIVBr18 negativas e positivas para o evento “alcançar a superfície externa da célula” (demonstradas em cor verde), predito pelo programa TMHMM. Neste experimento,  $1 \times 10^5$  sequências foram randomicamente organizadas e testadas para cada peptídeo fixado na sua posição, (total de 1,8 milhões de sequências verificadas das mais de  $6 \times 10^{15}$  possíveis combinações). Um por vez, cada epítipo foi mantido na sua posição original (sendo p00 a posição de número 1 e p17 a posição de número 18 – e sendo e00 o primeiro epítipo da sequência de HIVBr18 e e17 o último) variando-se aleatoriamente as posições dos demais epítipos. De imediato, verifica-se um desequilíbrio no número de sequências positivas e negativas (apenas 30% de positivas, aproximadamente), o que podemos depreender que é relativamente difícil

alcançar o evento positivo. Além disso, verifica-se que a posição individual de cada epítopo em relação à porção N-terminal da gD não exerce influência no percentual de eventos positivos, visto que este valor é praticamente conservado para todos epítopos em suas posições originais. Isso significa que o percentual de eventos positivos depende não da posição do epítopo, mas sim, da distribuição dos epítopos adjacentes. Este fato foi corroborado pela observação de que a remoção de epítopos hidrofóbicos (hidrofóbicos e15 e e16) não aumenta o percentual de eventos positivos, sendo o resultado final de eventos positivos, indiferente em relação àquele obtido mantendo os epítopos e15 e e16, pois ainda outros epítopos hidrofóbicos estão presentes.



**Figura 8 – Porcentagem de seqüências combinadas por rotinas computacionais capazes de atingir o meio extracelular completamente.** Sequências positivas (não formadoras de regiões transmembrana extras) e negativas (formadoras), obtidas através de rotinas computacionais. p00 – p17: posições ocupadas pelos 18 peptídeos codificados pelo HIVBr18. Em vermelho estão indicadas as porcentagens de seqüências negativas para cada posição em que o peptídeo original se manteve fixo e os demais foram combinados aleatoriamente em uma nova molécula. Em verde, indicada a porcentagem de seqüências positivas.

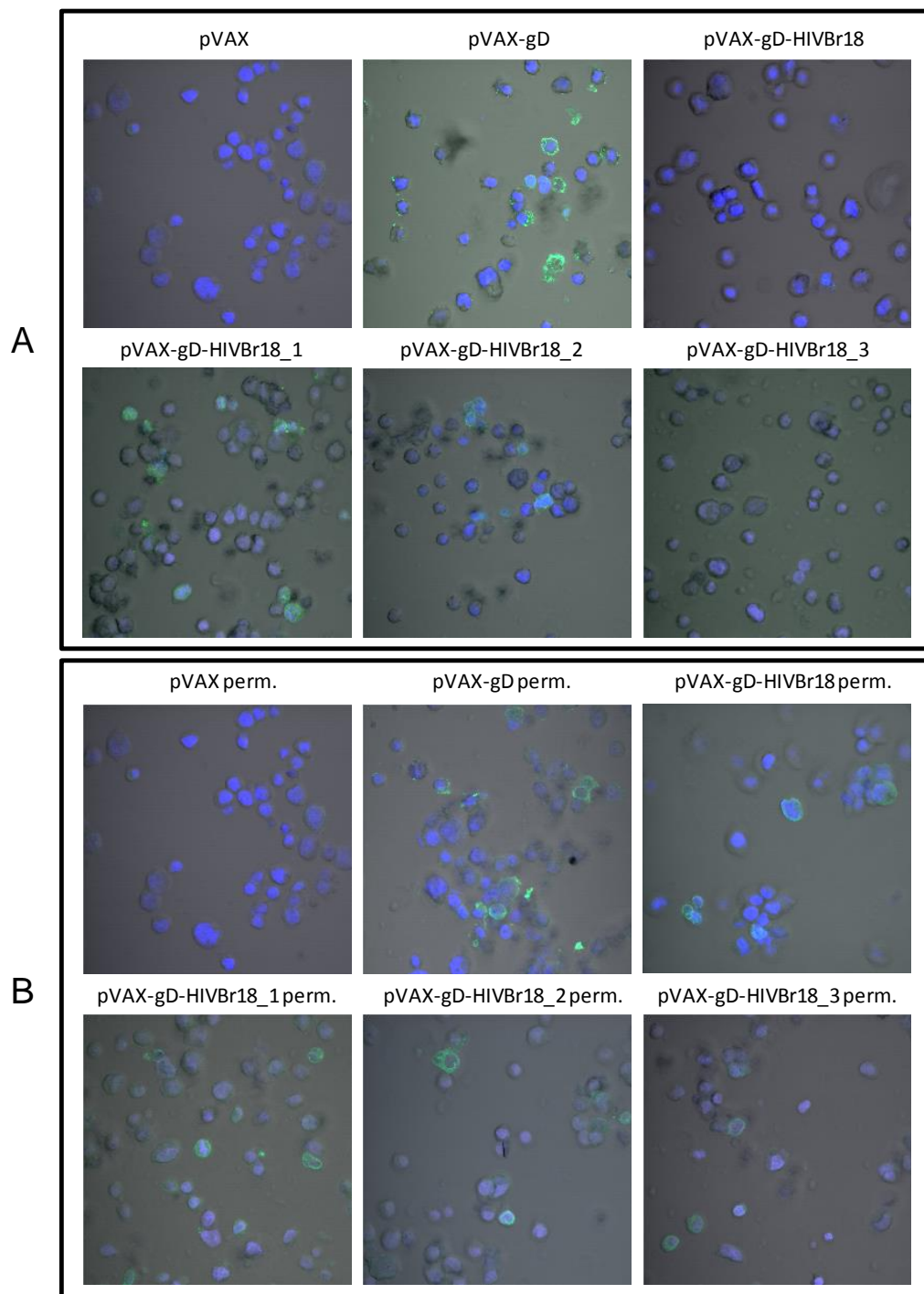
Estes novos construtos serão doravante denominados gDh-HIVBr18\_1 (gDh-HIVBr18\_e15e16Tp05), gDh-HIVBr18\_2 (gDh-HIVBr18\_e15p04\_e16p17) e gDh-HIVBr18\_3 (gDh-HIVBr18\_e15p01\_e16p02). Desta forma, fomos capazes de gerar duas novas moléculas de gDh-HIVBr18 modificadas aparentemente com um arranjo de hidrofobicidade mais bem distribuído que são preditas de não formar mais regiões transmembranárias intramoleculares (gDh-HIVBr18\_1 e gDh-HIVBr18\_2) o que poderia garantir assim a translocação e ancoramento correto da proteína de fusão na membrana; e mais uma molécula predita de continuar formando regiões hidrofóbicas (gDh-HIVBr18\_3) (**Figura 9**).



**Figura 9 – Análise *in silico* das proteínas de fusão gDh-HIVBr18 alternativas.** As seqüências de aminoácidos das proteínas de fusão gDh-HIVBr18\_1 (A), gDh-HIVBr18\_2 (B) e gDh-HIVBr18\_3 (C), foram analisadas no preditor de regiões transmembrana TMHMM server 2.0. No eixo X observa-se o número de resíduos de aminoácidos que compõe cada proteína avaliada e no eixo Y uma escala de probabilidade em relação àquela região ser exteriorizada, interiorizada ou permanecer transmembrana. Porções intracelulares estão destacadas em azul, porções transmembrana destacadas em vermelho, e extracelulares destacadas em rosa acima da linha de corte de probabilidade 1,0.

#### 4.6 Análise da expressão *in vitro* das proteínas híbridas gDh-HIVBr18 alternativas

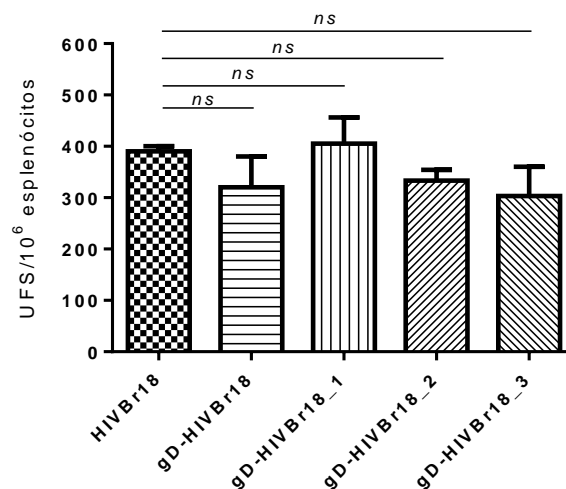
As predições *in silico* foram testadas *in vitro* transfectando células HEK 293 T com os plasmídeos. Analisando estas células por microscopia de fluorescência 24 horas após a transfecção, e submetendo as mesmas a um processo de permeabilização ou não, pudemos identificar a localização das proteínas híbridas, intra ou extracelular. Demonstramos que, em células transfectadas com os construtos gDh-HIVBr18\_1 e \_2 foi possível detectar a expressão da proteína fusionada na face externa da membrana celular (células não permeabilizadas), indicando que as mesmas foram capazes de se translocar de maneira correta (**Figura 10A**). Já em células transfectadas com o construto gDh-HIVBr18\_3 não foi possível detectar a proteína quimérica na face externa da membrana (**Figura 10A**). Já em células transfectadas e permeabilizadas detectamos todas as respectivas proteínas quiméricas no espaço intracelular.



**Figura 10 – Análise de expressão da proteína gDh-HIVBr18, \_1, \_2, \_3 *in vitro*.** Células HEK293T foram transfectadas com os diferentes plasmídeos utilizando lipofectamina e após 24h foram submetidas à permeabilização (B) ou não (A), incubadas com antissoro (*rabbit anti-gD*), anticorpo secundário (*anti-rabbit IgG – Alexa488*) e analisadas em microscopia confocal de fluorescência para avaliar a expressão da proteína alvo. Núcleos celulares corados em azul (DAPI). Células com expressão positiva destacadas em verde. Perm. = células permeabilizadas.

#### 4.7 Teste de imunogenicidade dos plasmídeos codificando sequências alternativas de gDh-HIVBr18

Para avaliar se os novos construtos seriam imunogênicos, camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados com os plasmídeos gDh-HIVBr18, gDh-HIVBr18\_1, gDh-HIVBr18\_2 ou gDh-HIVBr18\_3. Como controle negativo um grupo de animais foi imunizado somente com pVAX-gDh e como controle positivo um grupo recebeu pVAX-HIVBr18. Como demonstrado na **Figura 11**, os grupos de animais imunizados com as formas alternativas de gDh-HIVBr18 (1, 2 ou 3) apresentaram resposta imune celular semelhante a dos animais imunizados com a vacina de DNA que codifica HIVBr18 na sua forma padrão.

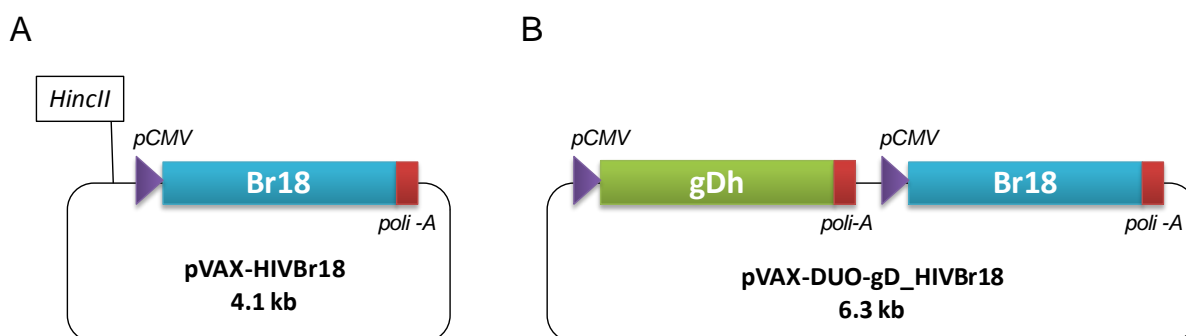


**Figura 11 – Resposta imune induzida por gDh-HIVBr18 e construtos com sequências modificadas.** Camundongos BALB/c fêmeas (N=4) foram imunizados com 100 µg de DNA dos plasmídeos pVAX-HIVBr18, pVAX-gDh-HIVBr18\_1, \_2 ou \_3, pela via i.m. num total de 3 doses com intervalos de 2 semanas. Número de spots de IFN-γ produzidos por esplenócitos dos animais imunizados que foram incubados com o pool de peptídeos do HIV-1 duas semanas após a última imunização. Os dados são mostrados como a média e desvio padrão representativos de dois experimentos independentes. O valor médio das respostas atingidas pelo grupo imunizado com pVAX-gDh foi subtraída dos demais grupos, sendo este não mostrado.



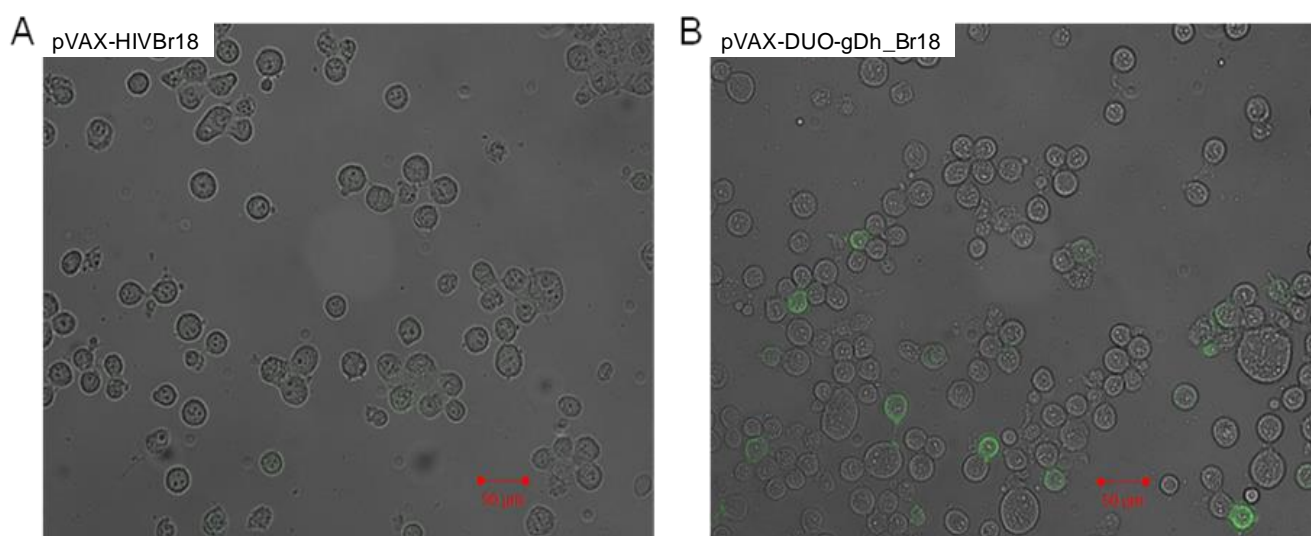
#### 4.8 Construção e análise de expressão do plasmídeo pVAX-DUO-gDh\_HIVBr18

Até aqui as estratégias de imunização com formas fusionadas de Br18 a gDh, não resultaram em aumento da resposta imune induzida. Decidimos mudar a estratégia, e construir um vetor vacinal capaz de expressar simultaneamente gDh e Br18, a partir de dois promotores distintos, como duas sequências independentes. Amplificamos por PCR toda a sequência codificadora da gDh adicionada do promotor CMV (pCMV) e da cauda poli-A (sinal de terminação transcricional) que ficam a montante e a jusante do gene em questão, já que este apresentava-se clonado no vetor pVAX-gDh. Após obter este produto, pCMV+gDh+poli-A (2.216 pb), digerimos o vetor pVAX-HIVBr18 com a enzima *HincII* que cliva este vetor em um sítio único, de forma abrupta, na posição 35 (**Figura 12A**). Este sítio encontra-se a jusante da região promotora pCMV do vetor pVAX-HIVBr18. Desta forma clonamos o produto de PCR pCMV+gDh+poli-A no vetor pVAX-HIVBr18 dando origem ao novo vetor pVAX-DUO-gDh\_HIVBr18 (**Figura 12B**).



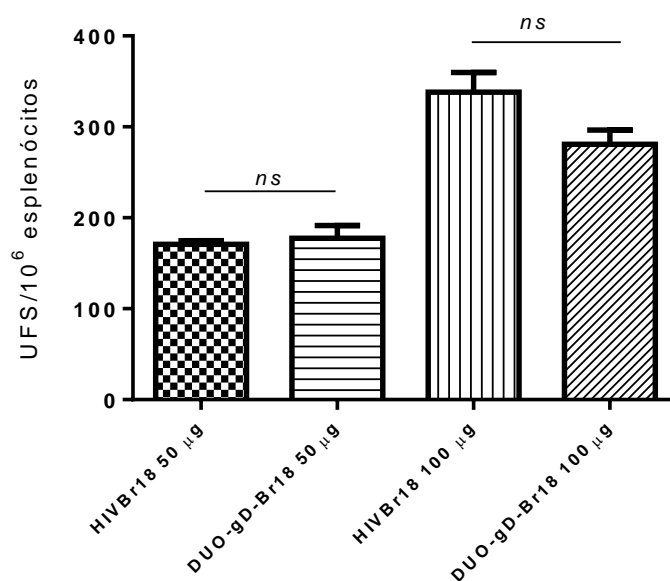
**Figura 12 – Representação esquemática do plasmídeo pVAX-DUO-gDh\_HIVBr18.** Regiões em roxo representam o promotor CMV (pCMV); regiões em vermelho representam caudas de poli-adenilação (poli-A); em verde a sequência codificante de gDh; em azul a de Br18. A) Plasmídeo pVAX-HIVBr18, em destaque o sítio de *HincII* (posição 35). B) Plasmídeo pVAX-DUO-gDh\_HIVBr18.

Para avaliar se este novo plasmídeo era capaz de dirigir a expressão de gDh em células eucariotas, realizamos um ensaio de imunofluorescência. Células HEK-293T foram transfectadas com o plasmídeo pVAX-HIVBr18 (que não codifica gDh) e com o plasmídeo pVAX-DUO-gDh\_HIVBr18. Após 24h de transfecção, as células foram incubadas com um anti-soro poli-clonal anti-gD (coelho), e em seguida com um anticorpo anti-rabbit-Alexa488. As células foram fixadas e avaliadas em microscopia de fluorescência. Como podemos observar na **Figura 13**, detectamos a expressão de gDh na superfície de células transfectadas (visto que não houve permeabilização prévia das células) com o plasmídeo pVAX-DUO-gDh\_HIVBr18, ao contrário daquelas transfectadas com pVAX-HIVBr18.



**Figura 13 - Análise de expressão da proteína gDh *in vitro* codificada por pVAX-DUO-gDh\_HIVBr18.** Células HEK293T foram transfectadas com os plasmídeos pVAX-HIVBr18 (A) e pVAX-DUO-gDh\_HIVBr18 (B) utilizando lipofectamina e após 24h foram submetidas à incubação com um anti-soro (*rabbit* anti-gD), seguida de um anticorpo secundário (anti-*rabbit* IgG – *Alexa488*) e analisadas em microscopia confocal de fluorescência para avaliar a expressão da proteína alvo. Células com expressão positiva destacadas em verde.

Ao testarmos este novo plasmídeo como imunógeno, após imunização de camundongos BALB/c e realização de ensaios de ELISPOT, observamos que o número de células produtoras de IFN- $\gamma$  específicas para o “pool” de peptídeos codificados pela vacina foi semelhante entre os grupos imunizados com o plasmídeo bicistrônico pVAX-DUO-gDh\_HIVBr18 quando comparado ao vetor original pVAX-HIVBr18 em ambas as dose testadas (50 e 100  $\mu$ g/dose) (**Figura 14**).

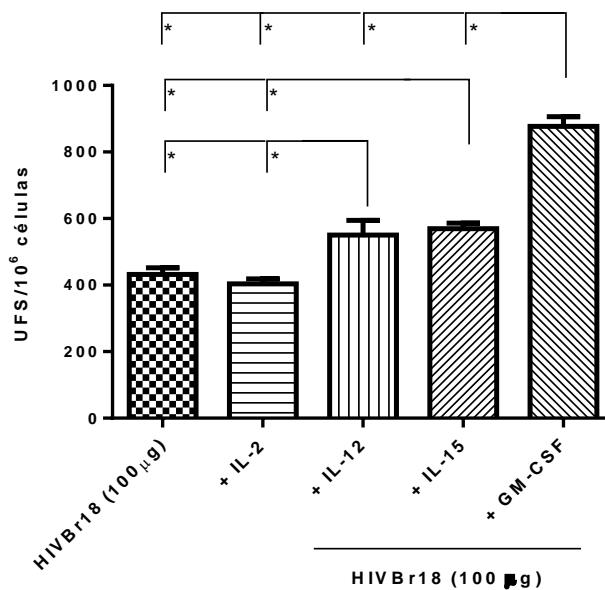


**Figura 14 - Resposta imune induzida pelo vetor pVAX-DUO-gDh-HIVBr18.** Camundongos BALB/c fêmeas (N=4) foram imunizados com 100 ou 50  $\mu$ g de DNA pela via i.m. num total de 3 doses com intervalos de 2 semanas. Número de spots de IFN- $\gamma$  produzidos por esplenócitos dos animais imunizados que foram incubados com o pool de peptídeos do HIV-1 duas semanas após a última imunização. Os dados são mostrados como a média e desvio padrão representativos de dois experimentos independentes.

#### 4.9 Análise da magnitude da resposta imune celular induzida pela coadministração com plasmídeos de citocinas

Outra estratégia utilizada para tentar aumentar a imunogenicidade da vacina HIVBr18 foi a coadministração de plasmídeos que codificam as citocinas IL-2, IL-12,

IL-15 e GM-CSF. Grupos de camundongos foram imunizados com 100 µg da vacina HIVBr18 associada ao vetor pVAX-1 (vazio) ou associada a 100 µg do plasmídeo que codificava cada uma das citocinas citadas acima. Observamos por ELISPOT um aumento na magnitude total da resposta induzida pela combinação de HIVBr18 aos plasmídeos que codificam IL-12, IL-15, e GM-CSF (**Figura 15**). Já a coadministração do plasmídeo que codifica IL-2 atingiu uma resposta imune similar a HIVBr18 sem plasmídeo adjuvante. A coadministração a GM-CSF alcançou até 100% de aumento na magnitude da resposta imune induzida somente por HIVBr18 e ainda foi estatisticamente superior quando comparada aos grupos de imunização que receberam as combinações de HIVBr18 + IL-2, + IL-15 e + IL-12. Esta última citocina foi a que apresentou resultados mais consistentes durante a repetição de experimentos.

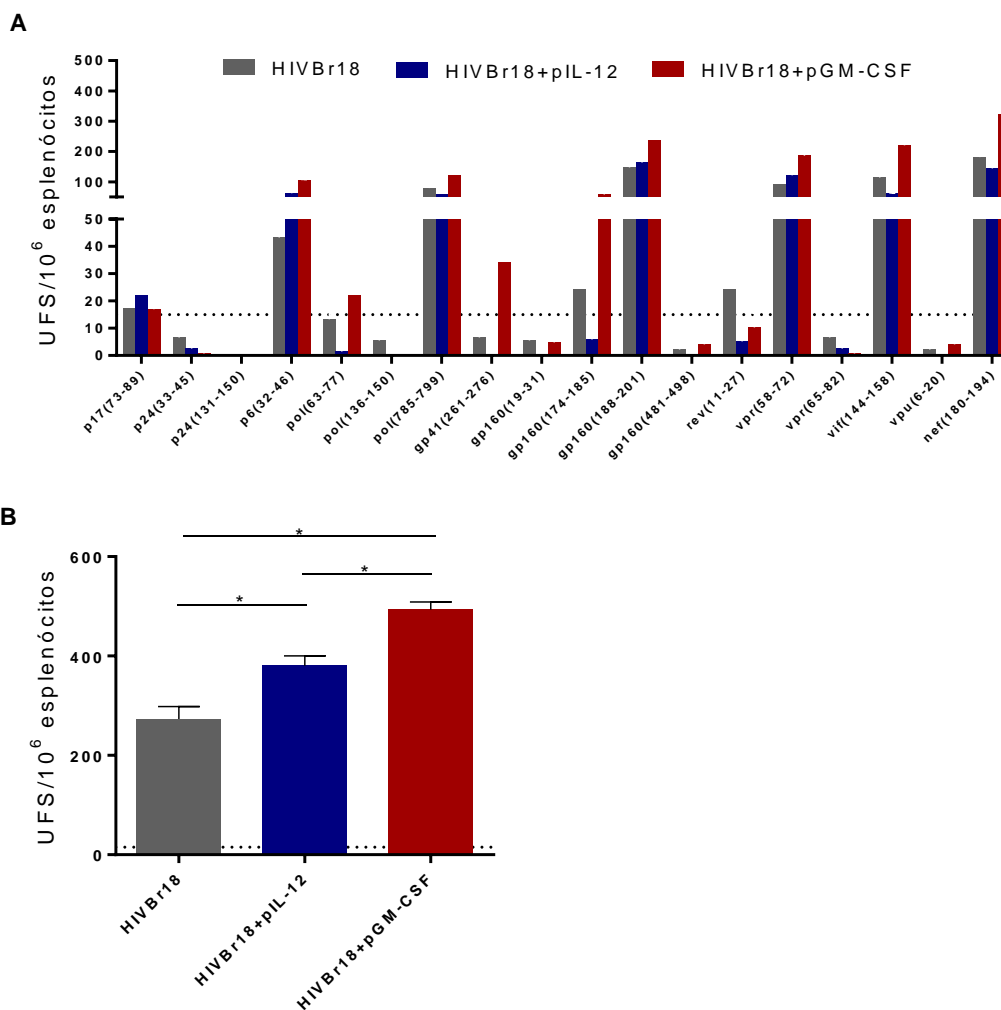


**Figura 15 - Resposta imunológica induzida (magnitude) por HIVBr18 coadministrado a plasmídeos que codificam citocinas.** Camundongos BALB/c fêmeas (N=4) foram imunizados com 100 µg de DNA de HIVBr18 associado a 100 µg de um plasmídeo codificando as citocinas IL-2, 12, 15 ou GM-CSF pela via i.m. num total de 3 doses com intervalos de 2 semanas. Número de spots de IFN- $\gamma$  produzidos por esplenócitos dos animais imunizados que foram incubados com o pool de peptídeos do HIV-1 duas semanas após a última imunização. Os dados são mostrados como a média e desvio padrão de um experimento, representativo de dois experimentos independentes. Tabela comparativa pós análise One-Way ANOVA entre todos os grupos experimentais. \* $<0,05$ . NS sem diferença estatística.

#### 4.10 Análise da amplitude da resposta imune celular induzida pela coadministração com plasmídeos que codificam GM-CSF e IL-12

Visto os resultados acima, decidimos avaliar se a coadministração de plasmídeos que codificam citocinas teria a capacidade de aumentar não somente a magnitude da resposta imune induzida, mas também a amplitude. Para atingir esta questão, selecionamos duas combinações de plasmídeos que aumentaram a magnitude da resposta: HIVBr18 + IL-12 e HIVBr18 + GM-CSF. Após imunização de camundongos com as combinações de plasmídeos acima ou com HIVBr18 + pVAX-1 (vazio) observamos por ELISPOT que os esplenócitos dos camundongos que foram

coimunizados com pIL-12 ou pGM-CSF, apresentaram uma magnitude de resposta, contra o pool de peptídeos codificados pela vacina, superior aos animais que receberam somente HIVBr18, sendo esta diferença estatisticamente significativa, confirmando os dados da sessão anterior ( $p < 0,05$ ) (**Figura 16B**). Os animais que foram co-imunizados com HIVBr18 e os plasmídeos que codificam as citocinas GM-CSF ou IL-12 apresentaram magnitude de resposta 116% e 61% maior que os imunizados somente com HIVBr18, respectivamente. Entretanto, o número médio de peptídeos reconhecidos por experimento (amplitude da resposta) foi semelhante entre os grupos testados: HIVBr18+pVAX-1 (vazio), HIVBr18+pIL-12 e HIVBr18+pGM-CSF (8 peptídeos/experimento), em um experimento representativo de 3 experimentos independentes (**Figura 16A**).

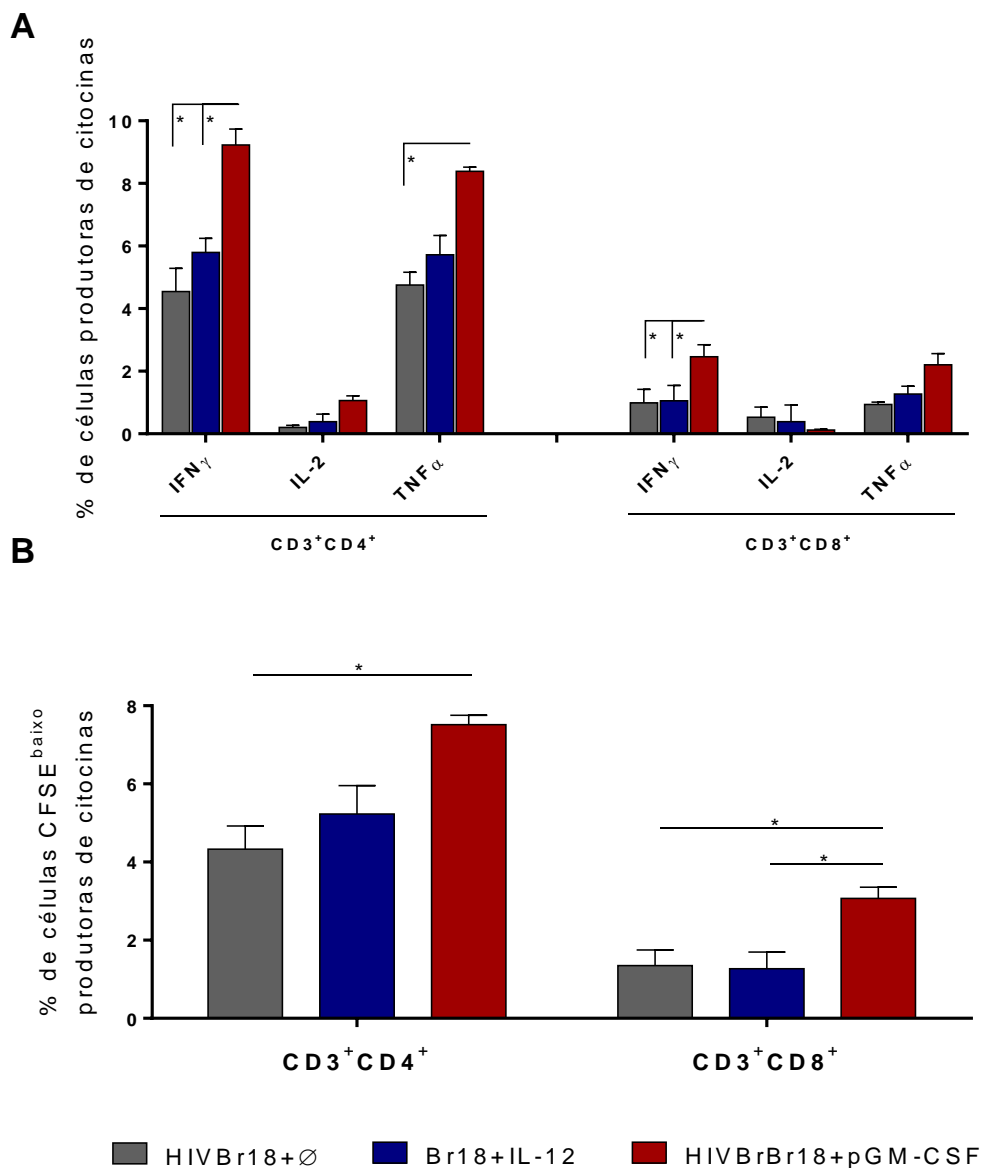


**Figura 16 – Resposta imunológica (amplitude) induzida pela coimunização de HIVBr18 à plasmídeos que codificam citocinas.** Duas semanas após a última imunização com os plasmídeos pVAX-HIVBr18 + pVAX1 ( $\emptyset$ ), pIL-12 ou pGM-CSF, esplenócitos de 6 camundongos BALB/c foram cultivados na presença de peptídeos individuais ou “pool” de peptídeos do HIV-1 (5  $\mu$ M). Os dados são mostrados como média e desvio padrão representativos de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$  A linha pontilhada representa o valor de corte de positividade, obtida a partir da soma das médias, mais três desvios padrões, dos valores de reconhecimento do grupo controle imunizado com 100  $\mu$ g de cada citocina (total 200  $\mu$ g/dose), sendo os dados deste grupo não mostrados. Os dados são mostrados como a média e desvio padrão de um experimento, representativo de três experimentos independentes.

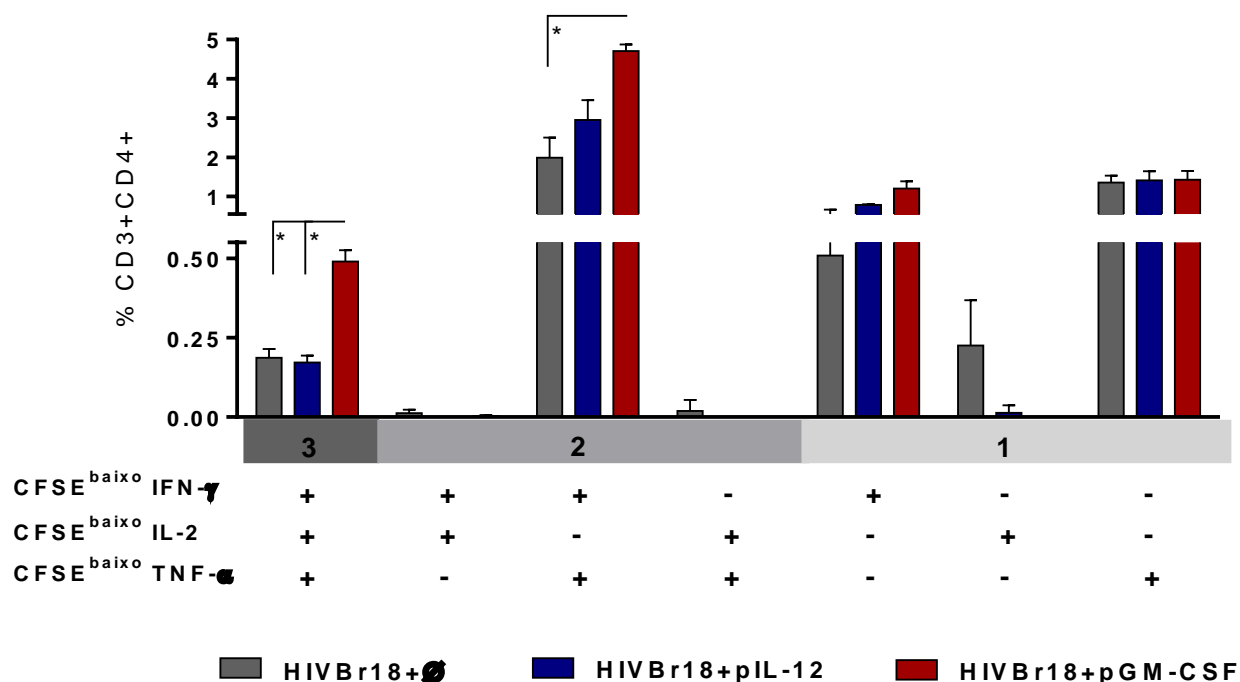
#### 4.11 Análise da resposta imune celular polifuncional induzida pela coadministração com plasmídeos que codificam GM-CSF e IL-12

Avaliamos também a proliferação celular e produção de citocinas intracelulares de esplenócitos dos animais imunizados frente ao re-estímulo antigênico. Esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com a vacina HIVBr18 associada ou não a IL-12 ou GM-CSF foram marcadas com CFSE e colocados em cultivo por quatro dias com o pool de peptídeos do HIV-1 codificados pela vacina. Ao avaliar o total de células CD3+ observamos que no grupo imunizado com HIVBr18+pGM-CSF há um maior percentual de células CD3+CD4+ capazes de produzir IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$ , e de células CD3+CD8+ capazes de produzir IFN- $\gamma$ , quando comparado ao grupo que recebeu HIVBr18 somente (**figura 17A**). Em relação à capacidade proliferativa e produção citocinas, a imunização com HIVBr18+pGM-CSF induziu maior porcentagem de células CD4+CFSE<sup>baixo</sup> e CD8+CFSE<sup>baixo</sup> capazes de produzir alguma das citocinas avaliadas (**Figura 17B**). Ainda observamos que este grupo foi o que desenvolveu o maior número de células polifuncionais, capazes de proliferar e produzir as três citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ ) concomitantemente, quando comparamos com o grupo que recebeu somente HIVBr18 ou HIVBr18 + IL-12 (**Figura 18**).





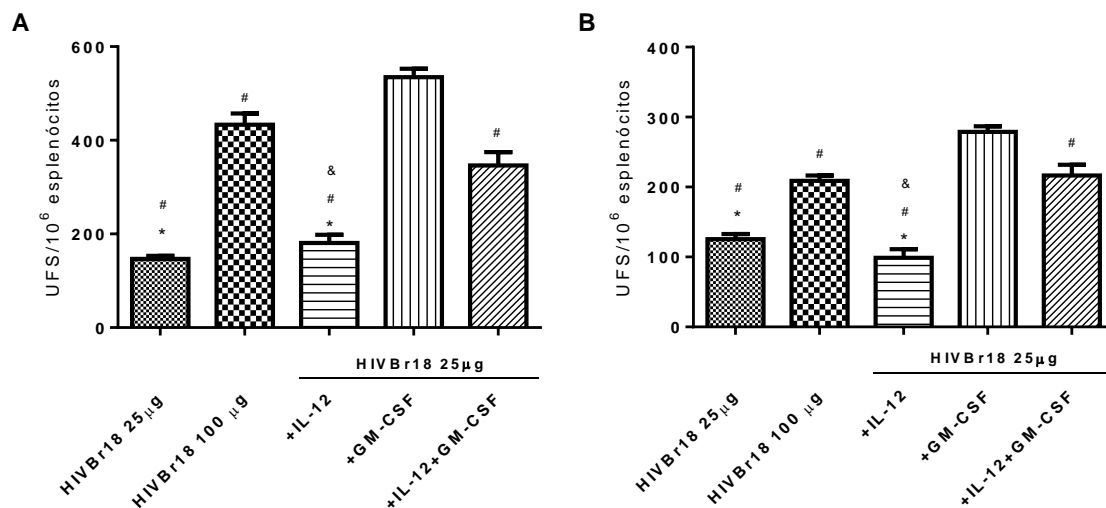
**Figura 17 – Resposta imune celular induzida por HIVBr18 associado a pGM-CSF ou pIL-12.** Camundongos BALB/c imunizados com 100  $\mu$ g do plasmídeo HIVBr18 associado a 100  $\mu$ g do plasmídeo codificando as citocinas IL-12 ou GM-CSF foram sacrificados duas semanas após a última imunização e seus esplenócitos marcados com CFSE (1,25  $\mu$ M) e cultivados durante 4 dias na presença do pool de peptídeos do HIV-1 (5  $\mu$ M), ou somente meio. No dia 4, as células foram pulsadas durante 12 horas com os peptídeos na presença de anticorpo co-estimulador (anti-CD28) e de Brefeldina A. (A) Freqüência de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ou CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> capazes de produzir IFN- $\gamma$ , IL-2 ou TNF- $\alpha$ . (B) Freqüência de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> que proliferam (CFSE<sup>baixo</sup>) e produzem IFN- $\gamma$ , IL-2 ou TNF- $\alpha$ . Respostas obtidas nas amostras incubadas somente com meio de cultura foram subtraídas das amostras estimuladas com pool. Dados representativos de dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$ .



**Figura 18 – Resposta imune celular polifuncional induzida por HIVBr18 associado a pGM-CSF ou pIL-12.** Camundongos BALB/c imunizados com 100  $\mu$ g do plasmídeo HIVBr18 associado a 100  $\mu$ g do plasmídeo codificando as citocinas IL-12 ou GM-CSF foram sacrificados duas semanas após a última imunização e seus esplenócitos marcados com CFSE (1,25  $\mu$ M) e cultivados durante 4 dias na presença do pool de peptídeos do HIV-1 (5  $\mu$ M), ou somente meio. No dia 4, as células foram pulsadas durante 12 horas com os peptídeos na presença de anticorpo co-estimulador (anti-CD28) e de Brefeldina A. Combinações Booleanas de células CD4+CFSE<sup>baixo</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-2 e/ou TNF- $\alpha$ . Respostas obtidas nas amostras incubadas somente com meio de cultura foram subtraídas das amostras estimuladas com pool. Dados representativos de dois experimentos independentes. \*p<0,05.

#### **4.12 Análise da resposta induzida pela combinação dos plasmídeos codificando GM-CSF e IL-12 em um protocolo de baixa dose**

Cientes do fato que a combinação com GM-CSF aumenta a magnitude da resposta induzida pela vacina HIVBr18, decidimos avaliar se mesmo frente a uma redução de dose este efeito se manteria. Demonstramos aqui, que este fato também pode ser observado quando utilizamos uma estratégia de imunização de baixa dose, onde empregamos apenas 25 µg do plasmídeo que codifica o antígeno Br18 (1/4 da dose anteriormente utilizada), associado a 25 µg do plasmídeo que codifica GM-CSF. Como observado na **Figura 19**, a imunização com apenas 25 µg de HIVBr18 + 25 µg de pGM-CSF, induz uma resposta imune celular (avaliada por ELISPOT para IFN-γ (Figura 16A) e IL-2 (figura 16B), de maior magnitude, quando comparado a 25 µg de HIVBr18 somente. Além disso, esta baixa dose da combinação de HIVBr18 + pGM-CSF induziu uma resposta de maior magnitude que aquela alcançada por HIVBr18 (sem adjuvante) na quantidade de 100 µg **Figura 19A** e **Figura 19B**. A combinação de HIVBr18 a plasmídeos que codificam IL-12 ou até mesmo a combinação de HIVBr18 + pIL-12 + pGM-CSF induziu uma resposta de magnitude semelhante a HIVBr18 100 µg e superior a HIVBr18 25 µg.



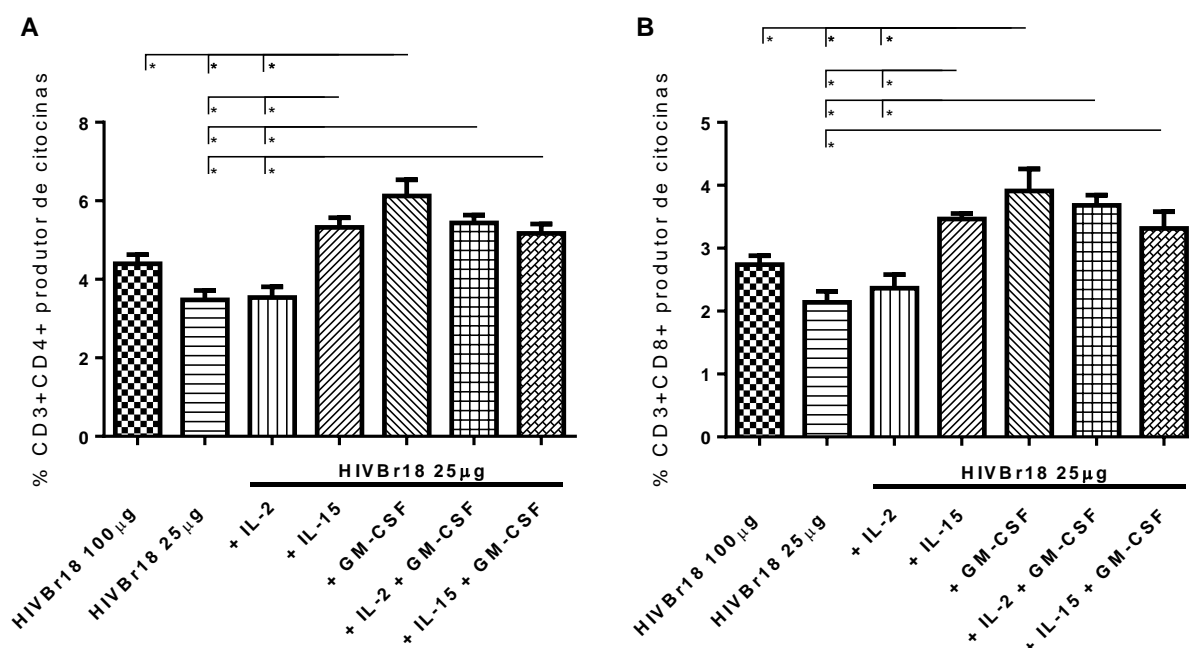
**Figura 19 - Resposta imune induzida por HIVBr18 associado a plasmídeos que codificam as citocinas IL-12 e GM-CSF em protocolo de baixa dose.** Camundongos BALB/c fêmeas (N=4) foram imunizados (i.m.) num total de 3 doses com intervalos de 2 semanas. Cada grupo de animais recebeu por dose, 100 μg do plasmídeo pVAX (controle); 25 μg de HIVBr18; 100 μg de HIVBr18; 25 μg de HIVBr18 + 25 μg de pIL-12; 25 μg de HIVBr18 + 25 μg de pGM-CSF; ou 25 μg de HIVBr18 + 25 μg de pIL-12 + 25 μg de pGM-CSF. Estão plotados média e desvio padrão dos números de spots de IFN-γ (A) e IL-2 (B) produzidos por esplenócitos dos animais imunizados que foram incubados com o pool de peptídeos do HIV-1 duas semanas após a última imunização. Tabela comparativa pós-análise estatística one-way ANOVA entre todos os grupos experimentais. Os símbolos \*, # e & representam diferenças estatísticas em relação aos grupos HIVBr18 100μg, HIVBr18 25 μg+pGM-CSF e HIVBr18 25 μg+pIL-12+pGM-CSF, respectivamente.

#### 4.13 Análise da resposta induzida pela combinação dos plasmídeos codificando

##### IL-2 e IL-15 em um protocolo de baixa dose

Ao avaliarmos outros plasmídeos que codificam citocinas nas condições de baixa dose (**Figura 20**) como possíveis adjuvantes para esta formulação de vacina de DNA, observamos que a coadministração de plasmídeos que codificam as citocinas IL-2 ou IL-15 e mesmo uma combinação destes com pGM-CSF, não alcança uma

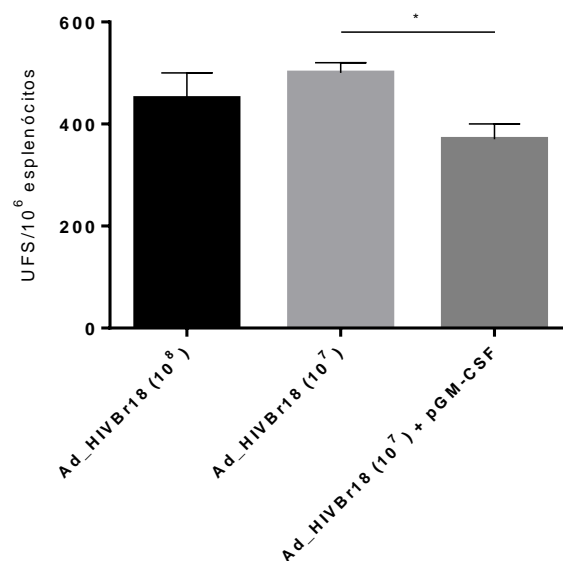
imunogenicidade superior a HIVBr18 (100  $\mu\text{g}$ ) sozinho. Após imunização e análise das populações de células T específicas para os antígenos vacinais, somente a combinação de HIVBr18 + pGM-CSF, foi capaz de aumentar o percentual de células T CD4+, quando comparado a HIVBr18, tanto na dose de 100 como na de 25  $\mu\text{g}$  de DNA/dose (Figura 20B); e de células T CD8+, quando comparado a HIVBr18 na dose de 25  $\mu\text{g}$  (Figura 20A).



**Figura 20 - Resposta imune induzida por HIVBr18 associado a plasmídeos que codificam as citocinas IL-2, IL-15 e/ou GM-CSF em protocolo de baixa dose.** . Duas semanas após a última imunização com 100  $\mu\text{g}$  de pVAX, ou 100  $\mu\text{g}$  de HIVBr18, ou 25  $\mu\text{g}$  de HIVBr18 + 25  $\mu\text{g}$  de pIL-2, ou + 25  $\mu\text{g}$  de pIL-15, ou + 25  $\mu\text{g}$  de pGM-CSF, ou + 25  $\mu\text{g}$  de pIL-2 + 25  $\mu\text{g}$  de pGM-CSF, ou + 25  $\mu\text{g}$  de pIL-15 + 25  $\mu\text{g}$  de pGM-CSF, esplenócitos de 4 camundongos BALB/c foram cultivados na presença de peptídeos individuais ou “pool” de peptídeos do HIV-1 (5  $\mu\text{M}$ ) por 12h ou somente meio de cultura juntamente com o co-estímulo de anti-CD28 na presença de Brefelfina A. Citometria multiparamétrica foi utilizada para determinar a frequência de células CD8+ (A) ou CD4+ (B) capazes de produzir citocinas. \* =  $p < 0,05$ . Relações estatisticamente não significativas foram suprimidas do gráfico.

#### **4.14 Coadministração de GM-CSF à um vetor adenovíral codificando os epótipos da vacina HIVBr18**

A coadministração de um plasmídeo que codifica GM-CSF (pGM-CSF) demonstrou-se até aqui um bom adjuvante para nossa formulação de vacina de DNA (na forma de um plasmídeo solúvel). Decidimos avaliar se esta propriedade era mantida ao associarmos pGM-CSF a um adenovírus que expressa a sequência codificante de Br18. Fizemos um mistura de diferentes quantidades de adenovírus combinado ao plasmídeo vazio (pVAX- 1) ou a pGM-CSF (ambos na quantidade de 100 µg ) e administramos pela via i.m. em camundongos BALB/c. Observamos que após imunização com  $2 \times 10^7$  ufp do adenovírus, a indução de resposta imune celular foi similar a imunização com  $2 \times 10^8$  ufp ( $p > 0,05$ ). Entretanto, ao misturarmos 100 µg de pGM-CSF à formulação de  $2 \times 10^7$  ufp de adenovírus observamos uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na magnitude da resposta imune celular específica como podemos observar na **Figura 21**.



**Figura 21 - Resposta imune induzida por Ad-HIVBr18 associado ou não a um plasmídeo que codifica GM-CSF.** Camundongos BALB/c fêmeas (N=4) foram imunizados (i.m.) num total de 3 doses com intervalos de 2 semanas. Cada grupo de animais recebeu por dose, diferentes quantidades de Ad-HIVBr18, ou Ad-B-gal (que codifica o gene da  $\beta$ -galactosidase, como vetor controle), associados ou não a pGM-CSF (100  $\mu$ g). Estão plotados os números de *spots* de IFN- $\gamma$  produzidos por esplenócitos dos animais imunizados que foram incubados com o pool de peptídeos do HIV-1 duas semanas após a última imunização. Os dados são mostrados como a média e desvio padrão das triplicatas de um experimento. \*  $p < 0,05$ . N.S. Sem diferença estatística.

## 5 DISCUSSÃO

---

A resposta imunológica induzida pela combinação da gD à HIVBr18, explorada aqui de diferentes formas, tanto como proteínas quiméricas de fusão como um plasmídeo bicistrônico, se manteve sempre semelhante a obtida pelo vetor original HIVBr18. Quando utilizamos a combinação do plasmídeo vacinal HIVBr18 com plasmídeos que codificam citocinas (IL-2, IL-12, IL-15 e GM-CSF), verificamos que a combinação HIVBr18 + pGM-CSF induziu uma resposta imunológica (indução de linfócitos T específicos) de maior magnitude que HIVBr18 administrado sozinho quer seja em um protocolo de alta ou baixa dose.

A propriedade da gD de interagir com moléculas do sistema imunológico e aumentar a imunogenicidade de outras vacinas de DNA já tem sido bastante explorada e sua capacidade de potencializar resposta imunológicas contra antígenos de HPV-16 e HIV-1 já foram demonstradas anteriormente (62, 105). Entretanto, a imunização com o plasmídeo que codifica a proteína de fusão gDh-HIVBr18 não potencializou a imunogenicidade da vacina contra os peptídeos de HIV em comparação a HIVBr18. A interação entre gD e seu receptor HVEM (presente em diversos tipos celulares, inclusive em células do sistema imunológico) ocorre no meio extracelular, quando a gD encontra-se ancorada a membrana da célula, após sua sequência gênica ser transcrita, traduzida e a proteína ser capaz de se translocar pela membrana da célula até sua face externa (106). Nossos dados de imunofluorescência apontam que a proteína de fusão gDh-HIVBr18 (construída utilizando a sequência original de HIVBr18) não se transloca



para a face externa da membrana, ficando retida no citoplasma ou mesmo na face interna da membrana. Sendo assim, não é capaz de interagir com o receptor HVEM e conseqüentemente não sendo capaz de modular a resposta imune. Isto explica o fato de não termos observado um incremento na resposta imunológica contra HIVBr18, ao contrário de outros trabalhos que utilizaram estratégia semelhante para outros antígenos (64, 107). Em nossos experimentos de transfecção de células *in vitro* e imunofluorescência sempre observamos um número baixo de células positivas, nunca superiores a 40% (eficiência de transfecção), mesmo quando utilizamos vetores que expressam somente gD como controle positivo (pVAX-gDh). Este fato pode ser explicado ou pela baixa taxa de transfecção das células, ou pela baixa capacidade do nosso soro policlonal Anti-gD reconhecer seu alvo (baixa afinidade).

A inserção da sequência de HIVBr18 na gD de forma “sanduiche” (gD N’ – Br18 – gD C’) pode ter afetado de alguma maneira a capacidade de translocação pela membrana ou ter conferido alguma conformação não compatível com a interação com HVEM. Em relação à capacidade de translocação e ancoramento à membrana, fizemos análises *in silico* do poli-epítomos HIVBr18 a fim de elucidar sua estrutura molecular. Notamos que muitos destes epítomos são hidrofóbicos, e regiões hidrofóbicas não se translocam com eficiência pela membrana celular, tendo alta afinidade pelas caudas hidrofóbicas dos fosfolipídios da membrana, sendo discriminados inclusive como porções transmembranárias em proteínas (108). A gD naturalmente possui uma região com essas características que é essencial para seu correto ancoramento, sendo que, quando fusionada a HIVBr18 outras duas regiões transmembranárias estariam sendo formadas, fazendo com que grande parte da molécula ficasse retida na região intracitoplasmática da célula, segundo predição do software TMHMM que prediz regiões transmembranárias/hidrofóbicas de proteínas (104). A forma original como os epítomos

estão dispostos no Br18 tende a formar “ilhas de hidrofobicidade” que podem alterar as porções de interação com a membrana celular da proteína gDh-HIVBr18. Ao reorganizar os epítomos em outra disposição, conseguimos de certa forma desfazer essas “ilhas” e ao submetermos a sequência da gDh-HIVBr18 com os epítomos reorganizados à predição do software TMHMM, este indicou que: se a gDh for fusionada aos epítomos nesta nova conformação, a proteína de fusão gDh-HIVBr18 (modificada) conseguiria translocar-se pela membrana, nela ficar ancorada e exposta na face externa da célula, livre para interagir com o receptor HVEM. Ao construir e testar estes novos construtos com melhor balanço de hidrofobicidade, estes fatos foram confirmados por imunofluorescência, e as sequências preditas de serem capazes de se translocar pela membrana, realmente o fizeram. Nossa hipótese de que, agora que estariam na porção extracelular, as novas proteínas de fusão gDh-HIVBr18\_1 e gDh-HIVBr18\_2 seriam capazes de induzir resposta imune mais intensa contra os peptídeos codificados pela vacina, não foi confirmada, visto que na quantidade testada, não observamos aumento na magnitude da resposta imune celular induzida por estes plasmídeos vacinais, quando comparados a HIVBr18.

Sabe-se que, a conformação que a gD adquire pode influenciar no processo de ligação ao receptor, pois, se algum sítio de interação com o seu receptor (HVEM) for modificado, a ligação gD-HVEM não ocorrerá de maneira adequada (109, 110). Portanto outras hipóteses surgem, como por exemplo, a de que uma proteína quimérica, poderia alterar de forma tão dramática a estrutura da gD, que esta não seria mais capaz de interagir com seu receptor HVEM. A inserção da sequência de HIVBr18 original ou das formas modificadas pode ter afetado de alguma maneira a conformação do sítio de ligação ao receptor HVEM fazendo com que esta molécula, mesmo que externalizada, não interaja adequadamente com o receptor.

Baseado nisso, testamos um vetor bicistrônico, capaz de expressar, *in vitro*, simultaneamente gDh e HIVBr18, de forma isolada. Após imunização, a resposta imune induzida no grupo de animais que recebeu o vetor bicistrônico foi semelhante àquela induzida nos que receberam HIVBr18. Outros trabalhos que utilizaram a gD como adjuvante à antígenos em vacinas de DNA, observaram aumento na resposta imune celular induzida, por exemplo, contra oncoproteínas do HPV-16. Nestes trabalhos, quando testaram apenas o antígeno vacinal, este por si só, era pouco imunogênico (63). No caso do HIVBr18, o próprio antígeno vacinal já é bastante imunogênico, e talvez o mecanismo imunomodulador proveniente da interação de gD-HVEM-BTLA-CD160 fique camuflado pela forte indução antigênica do HIVBr18, dada a complexidade e ampla possibilidade de combinação entre as moléculas envolvidas nesta via, ora co-estimulatória, ora co-inibitória (106, 111). Sendo assim, estratégias baseadas em proteínas quiméricas de fusão devem ser tratadas com atenção e estudos envolvendo características moleculares e conformacionais devem ser realizados/aprofundados para que estes mecanismos sejam mais bem esclarecidos.

Em nosso organograma inicial do trabalho, os plasmídeos que codificam citocinas, estavam previstos para serem testados, coadministrados a formulação gDh-HIVBr18. Baseados na literatura e experiência do grupo, esperávamos que a fusão com a gDh aumentasse a imunogenicidade da vacina HIVBr18, entretanto este fato não foi observado, e nos dedicamos a tentar desvendar tal problema. Portanto, decidimos dar início ao teste dos plasmídeos que codificam citocinas coadministrados a formulação HIVBr18 (sem estar fusionado a gDh). A coadministração de plasmídeos que codificam citocinas, como IL-12, GM-CSF, IL-15 e IL-2, visando o aumento da imunogenicidade de vacinas de DNA, têm sido explorada com resultados bastante promissores (112). Nossos resultados demonstram que os plasmídeos que codificam IL-12, IL-15 ou GM-

CSF quando administrados em um protocolo de alta dose promovem um aumento na magnitude da resposta imunológica gerada contra o pool dos 18 peptídeos do HIV-1 codificados pela vacina. Nossos dados são corroborados por outros estudos em modelo murino (86, 113-115). Para a formulação testada aqui (HIVBr18) a citocina que demonstrou melhor potencial imunomodulador foi GM-CSF. A sua capacidade de potencializar a resposta imune induzida por vacinas já foi demonstrada em estudos que inclusive utilizaram modelos de maior complexidade como primatas não humanos (116, 117) e até mesmo ensaios clínicos em humanos, para vacinas anti-tumorais e anti-virais (118, 119). Em contrapartida em um ensaio clínico em humanos que utilizou uma vacina de DNA contra malária, a coadministração com pGM-CSF se demonstrou ineficaz, pois não aumentou a resposta imune induzida e tampouco a proteção frente a um desafio com mosquitos infectados pelo agente causador da doença, apesar de ter se demonstrado segura e bem tolerada pelos participante do estudo (120).

Constatamos que a coadministração do plasmídeo que codifica GM-CSF melhora não só a magnitude da resposta, mas também a sua qualidade, induzindo células T polifuncionais e que ainda em baixas doses a coadministração com pGM-CSF é capaz de gerar uma resposta igual ou até mesmo de maior magnitude (quando comparado a somente HIVBr18 100 µg/dose), o que não foi observado para a coadministração de outras citocinas isoladas (pIL-2, -12 e -15), sendo este fato coerente com outro achado da literatura (113). Isso pode se traduzir em até mesmo uma redução na dose de antígeno, garantindo mais segurança e economia em futuros testes pré-clínicos. Nossos dados corroboram com a literatura científica que demonstra que IL-12 e, principalmente, GM-CSF como sendo bons adjuvantes moleculares (85, 86, 121) para vacinas de DNA, a qual pode ter seu potencial aumentado ainda mais, se combinada à eletroporação *in vivo* (122). Não temos conhecimento até o momento de outros

trabalhos que utilizaram GM-CSF (na forma de um plasmídeo solúvel) coadministrado a um vetor adenoviral, entretanto uma abordagem que utilizou vetores adenovirais que codificam antígenos (OVA) simultaneamente a GM-CSF demonstrou um potente efeito adjuvante desta citocina principalmente em sistema de indução-reforço em camundongos (123). Por outro lado, quando expresso por um vírus da raiva modificado para ser utilizado como vetor vacinal (expressando também Gag do HIV-1), o efeito da co-expressão de GM-CSF foi de redução na magnitude de linfócitos CD8+ antígenos específicos (124). O efeito adjuvante desta citocina se deve ao fato de um grande número de células apresentadoras de antígeno, especialmente células dendríticas (CD11c+) serem recrutadas para o local de inoculação, favorecendo assim a resposta imunológica contra os antígenos (125). Entretanto, já foi demonstrado também que quando expresso localmente em altas doses, o GM-CSF pode recrutar para o local da inoculação células mielóides supressoras (126) e que também há um mecanismo de indução de células T reguladoras GM-CSF-dependente, onde se observa proliferação destas células via um mecanismo independente de IL-2 (127). Adjuvantes moleculares como GM-CSF devem ser empregados com atenção, baseado no tipo de resposta que se deseja. A inoculação de pGM-CSF anterior a imunização, favorece um desenvolvimento de respostas com perfil Th2, e já a inoculação concomitante e até mesmo 72 horas pós imunização favorecem resposta do tipo Th1 em camundongos (128). Sendo assim, o desenvolvimento e aprimoramento de uma formulação vacinal que utiliza em sua composição um adjuvante molecular deve ser cautelosamente planejado testado.

## 6 CONCLUSÕES

---

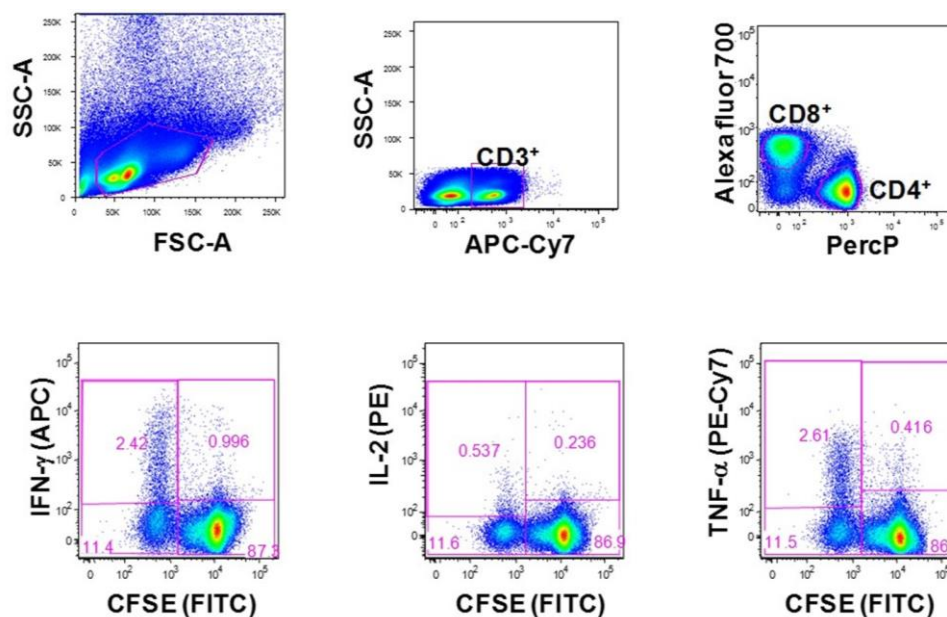
Este trabalho demonstrou que a imunização com a vacina de DNA HIVBr18, em combinação à um plasmídeo que codifica a citocina GM-CSF induz uma resposta imune celular induzida pós-vacinação de maior magnitude que a observada somente com HIVBr18, quer seja em um protocolo vacinal de alta ou baixa dose, entretanto a amplitude da resposta permaneceu semelhante.

Através da fusão de HIVBr18 à glicoproteína D (gD) do HSV-1, ou através da sua co-expressão, a partir de um vetor bicistrônico, utilizado como vetor vacinal, verificamos uma resposta induzida de mesma magnitude e amplitude àquela observada somente com HIVBr18.

Os dados obtidos indicam potencial na utilização de plasmídeos que codificam GM-CSF como adjuvantes moleculares em futuros ensaios clínicos e pré-clínicos envolvendo a formulação vacinal HIVBr18, visto a capacidade limitada de vacinas de DNA serem imunogênicas em primatas não humanos e humanos.

## 7 ANEXOS

### 7.1 Anexo A - Figuras



**Figura 1 - Estratégia de análise para identificação de células T polifuncionais.** Duas semanas após a última dose vacinal esplenócitos de 6 camundongos BALB/c foram extraídos, marcados com CFSE (1.25 $\mu$ M) e cultivados na presença do pool de peptídeos do HIV-1 (5 $\mu$ M), por 5 dias. O estímulo e o re-estímulo com o pool de peptídeos foram feitos no primeiro e quarto dia de cultura. No quarto dia de cultura foram também adicionados anti-CD28 (2 $\mu$ g/ml) como co-estímulo e brefeldina A (0,2 $\mu$ L/poço). Primeiramente foi feito um gate em linfócitos, determinado pelo tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células. Posteriormente, foi feito um gate na população CD3+ seguido de um gate na população CD4+ e um gate na população CD8+. Dentro das subpopulações de linfócitos T (CD4+ ou CD8+) foram avaliadas as produções das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 ou TNF- $\alpha$  simultaneamente à proliferação celular (baseada da diminuição da intensidade de fluorescência do CFSE). A estratégia booleana foi então aplicada, considerando o gate de células em proliferação (CFSE<sup>baixo</sup>) que produziam citocinas, para determinar todas as possíveis combinações funcionais.

## 7.2 Anexo B - Tabelas

Tabela 1 – Peptídeos do HIV-1 codificados pela vacina HIVBr18.

<b>Peptídeo</b>	<b>Proteína (aminoácidos compreendidos)</b>	<b>Sequência</b>
gag1	p17(73-89)	<b>EELRSLYNTVATLYCVH</b>
gag2	p24(33-45)	<b>SPEVIPMFSALSE</b>
gag3	p24(131-150)	<b>KRWIILGLNKIVRMYSPTSI</b>
gag4	p6(32-46)	<b>DKELYPLASLRSLFG</b>
pol1	pol(63-77) / protease (7-21)	<b>QRPLVTIKIGGQLKE</b>
pol2	pol(136-150) / protease (80-94)	<b>TPVNIIGRNLLTQIG</b>
pol3	pol(785-799) / integrase (70-84)	<b>GKILVAVHVASGYI</b>
env1	gp41(261-276)	<b>RDLLLIVTRIVELLGR</b>
env2	gp160(19-31)	<b>TMLLGMLMICSAA</b>
env3	gp160(174-185)	<b>ALFYKLDVVPID</b>
env4	gp160(188-201)	<b>NTSYRLISCNTSVI</b>
env5	gp160(481-498)	<b>SELYLYKVVKIEPLGVAP</b>
rev	rev(11-27)	<b>ELLKTVRLIKFLYQSNP</b>
vpr2	vpr(58-72)	<b>EAIIRILQQLLFIHF</b>
vpr3	vpr(65-82)	<b>QQLLFIHFRIGCRHSRIG</b>
vif	vif(144-158)	<b>SLQYLALVALVAPKK</b>
vpu	vpu(6-20)	<b>VLAIVALVVATIIAI</b>
nef	nef(180-194)	<b>VLEWRFD SRLAFHHV</b>



### 7.3 Anexo C – Manuscrito encaminhado para publicação

<http://cvi.asm.org/>



Clinical and Vaccine  
Immunology

Manuscript Submission  
and Peer Review System

[home](#) | [help for authors](#) | [help for reviewers](#) | [contact CVI™ staff](#) | [CVI™ home](#) | [logout](#)

<b>Manuscript #</b>	CVI00248-14
<b>Current Revision #</b>	0
<b>Submission Date</b>	2014-04-22 14:59:34
<b><a href="#">Current Stage</a></b>	Initial QC
<b>Title</b>	Co-expression of GM-CSF enhances T cell responses of a DNA vaccine encoding HIV-1 CD4 epitopes.
<b>Running Title</b>	pGM-CSF as an adjuvant for an HIV-1 DNA vaccine.
<b>Manuscript Type</b>	Full-Length Text
<b>Scientific Section</b>	Vaccines
<b>Corresponding Author</b>	Prof. Edecio Cunha-Neto (University of São Paulo)
<b>Contributing Authors</b>	Mr. Vinicius Canato Santana , Mr. Rafael Almeida , Dr. Susan Pereira Ribeiro , Dr. Luís Carlos Souza Ferreira , Dr. Jorge Kalil , Prof. Daniela Santoro Rosa
<b>Abstract</b>	The search for adjuvants enhancing the immunogenicity of DNA vaccines is an important goal particularly for vaccines targeting virus pathogens, such as HIV. In the present study, we evaluated the impact of cytokine-encoding plasmids co-administration as molecular adjuvants for a DNA vaccine encoding HIV-1 conserved and promiscuous CD4 epitopes, HIVBr18. BALB/c mice were immunized with HIVBr18 admixed with a second plasmid encoding one of four different cytokines: IL-2, 12, 15 or GM-CSF. All cytokine-encoding plasmid, but the one encoding IL-2, promoted an enhancement of the T cell responses in immunized mice. Nonetheless, only mice co-immunized with HIVBr18 and pGM-CSF showed significant enhancement of both CD4+ and CD8+ T cell responses, higher activation of polyfunctional CD4+ T cells and IFN- $\gamma$ -producing CD8+ T cells. Moreover, at lower doses, co-administration of pGM-CSF, in contrast to co-administration of pIL-12, enhanced activation of epitope-specific T cells in vaccinate animals. Collectively, our data demonstrate that co-expression of GM-CSF enhanced the performance of an epitope-based anti-HIV DNA vaccine and, thus, may be considered as an effective adjuvant for pre-clinical and clinical studies.
<b>Editor</b>	Not Assigned
<b>Suggested Reviewers to Include</b>	Celio Silva (Departamento de Bioquí), María Gherardi (Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA INBIRS), Sergio Costa Oliveira (UFMG)
<b>Suggested Reviewers to Exclude</b>	N/A
<b>Keywords</b>	human immunodeficiency virus, DNA vaccines, GM-CSF, interleukins, adjuvants
<b>Research Areas</b>	Vaccines, Immunology
<b>Conflict of Interest</b>	No conflict of interest.
<b>Funding Sources</b>	São Paulo Research Foundation
<b>Color Charges</b>	Yes, I agree to pay the color charges.

## 8 REFERÊNCIAS

---

1. Marcello A. Latency: the hidden HIV-1 challenge. *Retrovirology*. 2006;3.
2. 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. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;45:S255-S60.
3. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Butto S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita*. 2010;46(1):5-14.
4. Burger S, Poles MA. Natural history and pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Seminars in Liver Disease*. 2003;23(2):115-23.
5. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual Review of Immunology*. 1999;17:657-700.
6. Coffin JM. HIV POPULATION-DYNAMICS IN-VIVO - IMPLICATIONS FOR GENETIC-VARIATION, PATHOGENESIS, AND THERAPY. *Science*. 1995;267(5197):483-9.
7. Klimas N, Koneru AOB, Fletcher MA. Overview of HIV. *Psychosomatic Medicine*. 2008;70(5):523-30.
8. Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *New England Journal of Medicine*. 1998;339(1):33-9.
9. Ford ES, Puroden CE, Sereti I. Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm. *Current Opinion in Hiv and Aids*. 2009;4(3):206-14.
10. Baker BM, Block BL, Rothchild AC, Walker BD. Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2009;9(1):55-69.
11. Shirazi Y, Pitha PM. ALPHA-INTERFERON INHIBITS EARLY STAGES OF THE HUMAN-IMMUNODEFICIENCY-VIRUS TYPE-1 REPLICATION CYCLE. *Journal of Virology*. 1992;66(3):1321-8.
12. 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;263(1):78-88.
13. Sauce D, Elbim C, Appay V. Monitoring cellular immune markers in HIV infection: from activation to exhaustion. *Current Opinion in Hiv and Aids*. 2013;8(2):125-31.
14. 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. *Nature Medicine*. 2006;12(12):1365-71.
15. De Haes W, Pollard C, Vanham G, Rejman J. "Wrapped Up" Vaccines in the Context of HIV-1 Immunotherapy. Metodiev K, editor. <http://www.intechopen.com/books/immunodeficiency/-wrapped-up-vaccines-in-the-context-of-hiv-1-immunotherapy2012>. 392 p.
16. Bolesta E, Gzyl J, Wierzbicki A, Kmieciak D, Kowalczyk A, Kaneko Y, et al. Clustered epitopes within the Gag-Pol fusion protein DNA vaccine enhance

- immune responses and protection against challenge with recombinant vaccinia viruses expressing HIV-1 Gag and Pol antigens. *Virology*. 2005;332(2):467-79.
17. Gahery-Segard H, Pialoux G, Figueiredo S, Igea C, Surenaud M, Gaston J, et al. Long-term specific immune responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide-vaccine: Characterization of CD8(+)-T-cell epitopes recognized. *Journal of Virology*. 2003;77(20):11220-31.
  18. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MBA. VIRUS-SPECIFIC CD8+ CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTE ACTIVITY ASSOCIATED WITH CONTROL OF VIREMIA IN PRIMARY HUMAN-IMMUNODEFICIENCY-VIRUS TYPE-1 INFECTION. *Journal of Virology*. 1994;68(9):6103-10.
  19. 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. *Journal of Immunology*. 2007;179(12):8243-51.
  20. Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease part 1: Cellular and humoral immune responses. *Annals of Internal Medicine*. 2001;134(9):761-76.
  21. Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A. CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature*. 2009;462(7272):510-U205.
  22. 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;278(5342):1447-50.
  23. Gandhi RT, Walker BD. Immunologic control of HIV-1. *Annual Review of Medicine*. 2002;53:149-72.
  24. Streeck H, D'Souza MP, Littman DR, Crotty S. Harnessing CD4(+) T cell responses in HIV vaccine development. *Nature Medicine*. 2013;19(2):143-9.
  25. Soghoian DZ, Jessen H, Flanders M, Sierra-Davidson K, Cutler S, Pertel T, et al. HIV-Specific Cytolytic CD4 T Cell Responses During Acute HIV Infection Predict Disease Outcome. *Science Translational Medicine*. 2012;4(123).
  26. 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. *Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(6):1533-41.
  27. 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;312(5779):1530-3.
  28. Watkins DI. The hope for an HIV vaccine based on induction of CD8+ T lymphocytes--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(2):119-29.
  29. Connor RI, Korber BTM, 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. *Journal of Virology*. 1998;72(2):1552-76.
  30. Flynn MN, Forthal DN, Harro CD, Judson FN, Mayer KH, Para MF, et al. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2005;191(5):654-65.
  31. 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. *Journal of Infectious Diseases*. 2006;194(12):1661-71.

32. Robinson HL, Amara RR. T cell vaccines for microbial infections. *Nature Medicine*. 2005;11(4):S25-S32.
33. Tubiana R, Carcelain G, Vray M, Gourelain K, Dalban C, Chermak A, et al. Therapeutic immunization with a human immunodeficiency virus (HIV) type 1-recombinant canarypox vaccine in chronically HIV-infected patients: The Vacciter Study (ANRS 094). *Vaccine*. 2005;23(34):4292-301.
34. Casimiro DR, Bett AJ, Fu TM, Davies ME, Tang AM, Wilson KA, et al. Heterologous human immunodeficiency virus type 1 priming-boosting immunization strategies involving replication-defective adenovirus and poxvirus vaccine vectors. *Journal of Virology*. 2004;78(20):11434-8.
35. Hanke T, McMichael AJ, Dorrell L. Clinical experience with plasmid DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 clade A vaccine focusing on T-cell induction. *Journal of General Virology*. 2007;88:1-12.
36. 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;15(3):293-9.
37. Hansen SG, Ford JC, Lewis MS, Ventura AB, Hughes CM, Coyne-Johnson L, et al. Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature*. 2011;473(7348):523-7.
38. Appay V. 25 years of HIV research! ... and what about a vaccine? *European Journal of Immunology*. 2009;39(8):1999-2003.
39. Corey L, McElrath MJ, Kublin JG. Post-Step modifications for research on HIV vaccines. *Aids*. 2009;23(1):3-8.
40. 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;372(9653):1894-905.
41. 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;361(23):2209-20.
42. McElrath MJ. Immune responses to HIV vaccines and potential impact on control of acute HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2010;202 Suppl 2:S323-6.
43. Yates NL, Liao HX, Fong Y, Decamp A, Vandergrift NA, Williams WT, et al. Vaccine-Induced Env V1-V2 IgG3 Correlates with Lower HIV-1 Infection Risk and Declines Soon After Vaccination. *Sci Transl Med*. 2014;6(228):228ra39.
44. McMichael AJ. HIV vaccines. *Annual Review of Immunology*. 2006;24:227-55.
45. Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*. 1992;356(6365):152-4.
46. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 1993;259(5102):1745-9.
47. Fonseca SG, Coutinho-Silva A, Fonseca LAM, 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;20(18):2263-73.
48. Ribeiro SP, Rosa DS, Fonseca SG, Mairena EC, Postol E, Oliveira SC, et al. 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;5(6).

49. Rosa DS, Ribeiro SP, Almeida RR, Mairena EC, Postol E, Kalil J, et al. A DNA Vaccine Encoding Multiple HIV CD4 Epitopes Elicits Vigorous Polyfunctional, Long-Lived CD4(+) and CD8(+) T Cell Responses. *Plos One*. 2011;6(2).
50. Schijns VEJC, Lavelle EC. Trends in vaccine adjuvants. *Expert Review of Vaccines*. 2011;10(4):539-50.
51. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews Microbiology*. 2007;5(7):505-17.
52. Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, Shin TH, Lucke CE, Weiner DB. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clin Infect Dis*. 2011;53(3):296-302.
53. Rosati M, Valentin A, Jalah R, Patel V, von Gegerfelt A, Bergamaschi C, et al. Increased immune responses in rhesus macaques by DNA vaccination combined with electroporation. *Vaccine*. 2008;26(40):5223-9.
54. Cheng WF, Hung CF, Chai CY, Hsu KF, He LM, Ling M, et al. Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(5):669-78.
55. Chen CH, Wang TL, Hung CF, Yang YQ, Young RA, Pardoll DM, et al. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. *Cancer Research*. 2000;60(4):1035-42.
56. De Arruda LB, Chikhlikar PR, August JT, Marques ETA. DNA vaccine encoding human immunodeficiency virus-1 Gag, targeted to the major histocompatibility complex II compartment by lysosomal-associated membrane protein, elicits enhanced long-term memory response. *Immunology*. 2004;112(1):126-35.
57. Watson RJ, Weis JH, Salstrom JS, Enquist LW. HERPES-SIMPLEX VIRUS TYPE-1 GLYCOPROTEIN-D GENE - NUCLEOTIDE-SEQUENCE AND EXPRESSION IN ESCHERICHIA-COLI. *Science*. 1982;218(4570):381-4.
58. Cohen GH, Wilcox WC, Sodora DL, Long D, Levin JZ, Eisenberg RJ. EXPRESSION OF HERPES-SIMPLEX VIRUS TYPE-1 GLYCOPROTEIN-D DELETION MUTANTS IN MAMMALIAN-CELLS. *Journal of Virology*. 1988;62(6):1932-40.
59. Chitnis CE, Miller LH. IDENTIFICATION OF THE ERYTHROCYTE BINDING DOMAINS OF PLASMODIUM-VIVAX AND PLASMODIUM-KNOWLESI PROTEINS INVOLVED IN ERYTHROCYTE INVASION. *Journal of Experimental Medicine*. 1994;180(2):497-506.
60. Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, Yang JF, Fallarino F, Loftin SK, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nature Immunology*. 2003;4(7):670-9.
61. Cheung TC, Humphreys IR, Potter KG, Norris PS, Shumway HM, Tran BR, et al. Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(37):13218-23.
62. Diniz MO, Lasaro MO, Ertl HC, Ferreira LCS. Immune Responses and Therapeutic Antitumor Effects of an Experimental DNA Vaccine Encoding Human Papillomavirus Type 16 Oncoproteins Genetically Fused to Herpesvirus Glycoprotein D. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010;17(10):1576-83.
63. Lasaro MO, Diniz MO, Reyes-Sandoval A, Ertl HC, Ferreira LCS. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. *Microbes and Infection*. 2005;7(15):1541-50.

64. Santana VC, Diniz MO, Cariri FA, Ventura AM, Cunha-Neto E, Almeida RR, et al. Bicistronic DNA vaccines simultaneously encoding HIV, HSV and HPV antigens promote CD8<sup>+</sup> T cell responses and protective immunity. *PLoS One*. 2013;8(8):e71322.
65. Sin JI, Weiner DB. Improving DNA vaccines targeting viral infection. *Intervirology*. 2000;43(4-6):233-46.
66. Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(8):595-601.
67. Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, et al. TREATMENT OF 283 CONSECUTIVE PATIENTS WITH METASTATIC MELANOMA OR RENAL-CELL CANCER USING HIGH-DOSE BOLUS INTERLEUKIN-2. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 1994;271(12):907-13.
68. Kuhnle G, Collins RA, Scott JE, Keil GM. Bovine interleukins 2 and 4 expressed in recombinant bovine herpesvirus 1 are biologically active secreted glycoproteins. *Journal of General Virology*. 1996;77:2231-40.
69. Geissler M, Gesien A, Tokushige K, Wands JR. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *Journal of Immunology*. 1997;158(3):1231-7.
70. Moore AC, Kong WP, Chakrabarti BK, Nabel GJ. Effects of antigen and genetic adjuvants on immune responses to human immunodeficiency virus DNA vaccines in mice. *Journal of Virology*. 2002;76(1):243-50.
71. Lin CC, Chou CW, Shiau AL, Tu CF, Ko TM, Chen YL, et al. Therapeutic HER2/Neu DNA vaccine inhibits mouse tumor naturally overexpressing endogenous neu. *Molecular Therapy*. 2004;10(2):290-301.
72. Li WR, Niu B, Wang JW, Feng ZJ, Wang DX. Coexpression of interleukin-2 enhances the immunization effect of a DNA vaccine expressing herpes simplex 1 glycoprotein D. *Acta Virologica*. 2006;50(4):251-6.
73. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, Ogarra A, Murphy KM. DEVELOPMENT OF TH1 CD4<sup>+</sup> T-CELLS THROUGH IL-12 PRODUCED BY LISTERIA-INDUCED MACROPHAGES. *Science*. 1993;260(5107):547-9.
74. Manetti R, Gerosa F, Giudizi MG, Biagiotti R, Parronchi P, Piccinni MP, et al. INTERLEUKIN-12 INDUCES STABLE PRIMING FOR INTERFERON-GAMMA (IFN-GAMMA) PRODUCTION DURING DIFFERENTIATION OF HUMAN T-HELPER (TH) CELLS AND TRANSIENT IFN-GAMMA PRODUCTION IN ESTABLISHED TH2 CELL CLONES. *Journal of Experimental Medicine*. 1994;179(4):1273-83.
75. Tsung K, Meko JB, Peplinski GR, Tsung YL, Norton JA. IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. *Journal of Immunology*. 1997;158(7):3359-65.
76. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2003;14(5):361-8.
77. Curtsinger JM, Johnson CM, Mescher MF. CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *Journal of Immunology*. 2003;171(10):5165-71.

78. Valenzuela J, Schmidt C, Mescher M. The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive CD8 T cells. *Journal of Immunology*. 2002;169(12):6842-9.
79. Valenzuela JO, Hammerbeck CD, Mescher MF. Cutting edge: Bcl-3 up-regulation by signal 3 cytokine (IL-12) prolongs survival of antigen-activated CD8 T cells. *Journal of Immunology*. 2005;174(2):600-4.
80. Weiss JM, Subleski JJ, Wigginton JM, Wiltrout RH. Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2007;7(11):1705-21.
81. Wakimoto H, Abe J, Tsunoda R, Aoyagi M, Hirakawa K, Hamada H. Intensified antitumor immunity by a cancer vaccine that produces granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4. *Cancer Research*. 1996;56(8):1828-33.
82. Jager E, Ringhoffer M, Dienes HP, Arand M, Karbach J, Jager D, et al. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. *International Journal of Cancer*. 1996;67(1):54-62.
83. Jones T, Stern A, Lin R. POTENTIAL ROLE OF GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR AS VACCINE ADJUVANT. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 1994;13:S47-S53.
84. Disis ML, Bernhard H, Shiota FM, Hand SL, Gralow JR, Huseby ES, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: An effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines. *Blood*. 1996;88(1):202-10.
85. Toubaji A, Hill S, Terabe M, Qian J, Floyd T, Simpson RM, et al. The combination of GM-CSF and IL-2 as local adjuvant shows synergy in enhancing peptide vaccines and provides long term tumor protection. *Vaccine*. 2007;25(31):5882-91.
86. Barouch DH, Santra S, Tenner-Racz K, Racz P, Kuroda MJ, Schmitz JE, et al. Potent CD4(+) T cell responses elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp120 and GM-CSF. *Journal of Immunology*. 2002;168(2):562-8.
87. Ahlers JD, Dunlop N, Alling DW, Nara PL, Berzofsky JA. Cytokine-in-adjuvant steering of the immune response phenotype to HIV-1 vaccine constructs - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and TNF-alpha synergize with IL-12 to enhance induction of cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Immunology*. 1997;158(8):3947-58.
88. Weber J, Sondak VK, Scotland R, Phillip R, Wang F, Rubio V, et al. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor added to a multi-peptide vaccine for resected stage II melanoma. *Cancer*. 2003;97(1):186-200.
89. Chianese-Bullock KA, Pressley J, Garbee C, Hibbitts S, Murphy C, Yamshchikov G, et al. MAGE-A1-, MAGE-A10-, and gp100-derived peptides are immunogenic when combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and montanide ISA-51 adjuvant and administered as part of a multi-peptide vaccine for melanoma. *Journal of Immunology*. 2005;174(5):3080-6.
90. Spitler LE, Grossbard ML, Ernstoff MS, Silver G, Jacobs M, Hayes FA, et al. Adjuvant therapy of stage III and IV malignant melanoma using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Clinical Oncology*. 2000;18(8):1614-21.
91. Correale P, Marsili S, Sabatino M, Montagnani F, Giorgi G, Francini G. Immunotherapy of renal cell carcinoma with granulocyte macrophage colony

- stimulating factor and very low dose interleukin-2. *Oncology Reports*. 2005;13(4):751-6.
92. Cartron G, Zhao-Yang L, Baudard M, Kanouni T, Rouille V, Quittet P, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiates rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: Results of a phase II study. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(16):2725-31.
  93. Honkoop AH, Hoekman K, van Groeningen CJ, van der Wall E, Wagstaff J, Pinedo HM. Dose-intensive neoadjuvant chemotherapy with GM-CSF in locally advanced breast cancer (LABC). A chemo-immunotherapeutic approach? *European Journal of Cancer*. 1998;34:S5-S.
  94. Dinarello CA. Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Seminars in Nephrology*. 2007;27(1):98-114.
  95. Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003;73(2):213-24.
  96. Iannello A, Samarani S, Debbeche O, Tremblay C, Toma E, Boulassel M-R, et al. Role of Interleukin-18 in the Development and Pathogenesis of AIDS. *Aids Reviews*. 2009;11(3):115-25.
  97. Walker W, Aste-Amezaga M, Kastelein RA, Trinchieri G, Hunter CA. IL-18 and CD28 use distinct molecular mechanisms to enhance NK cell production of IL-12-induced IFN-gamma. *Journal of Immunology*. 1999;162(10):5894-901.
  98. Billaut-Mulot O, Idziorek T, Loyens M, Capron A, Bahr GM. Modulation of cellular and humoral immune responses to a multiepitopic HIV-1 DNA vaccine by interleukin-18 DNA immunization/viral protein boost. *Vaccine*. 2001;19(20-22):2803-11.
  99. Triccas JA, Sun L, Palendira U, Britton WJ. Comparative affects of plasmid-encoded interleukin 12 and interleukin 18 on the protective efficacy of DNA vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology and Cell Biology*. 2002;80(4):346-50.
  100. Carson W, Caligiuri MA. Interleukin-15 as a potential regulator of the innate immune response. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1998;31(1):1-9.
  101. Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annual Review of Immunology*. 1999;17:19-49.
  102. Kutzler MA, Robinson TM, Chattergoon MA, Choo DK, Choo AY, Choe PY, et al. Coimmunization with an optimized IL-15 plasmid results in enhanced function and longevity of CD8 T cells that are partially independent of CD4 T cell help. *Journal of Immunology*. 2005;175(1):112-23.
  103. Halwani R, Boyer JD, Yassine-Diab B, Haddad EK, Robinson TM, Kumar S, et al. Therapeutic vaccination with simian immunodeficiency virus (SIV)-DNA+IL-12 or IL-15 induces distinct CD8 memory subsets in SIV-infected macaques. *Journal of Immunology*. 2008;180(12):7969-79.
  104. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. 2001;305(3):567-80.
  105. Lasaro MO, Tatsis N, Hensley SE, Whitbeck JC, Lin S-W, Rux JJ, et al. Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. *Nature Medicine*. 2008;14(2):205-12.



106. Steinberg MW, Cheung TC, Ware CF. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunol Rev.* 2011;244(1):169-87.
107. Diniz MO, Cariri FA, Aps LR, Ferreira LC. Enhanced therapeutic effects conferred by an experimental DNA vaccine targeting human papillomavirus-induced tumors. *Hum Gene Ther.* 2013;24(10):861-70.
108. von Heijne G. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol.* 1992;225(2):487-94.
109. Awasthi S, Lubinski JM, Eisenberg RJ, Cohen GH, Friedman HM. An HSV-1 gD mutant virus as an entry-impaired live virus vaccine. *Vaccine.* 2008;26(9):1195-203.
110. Yoon M, Zago A, Shukla D, Spear PG. Mutations in the N termini of herpes simplex virus type 1 and 2 gDs alter functional interactions with the entry/fusion receptors HVEM, nectin-2, and 3-O-sulfated heparan sulfate but not with nectin-1. *Journal of Virology.* 2003;77(17):9221-31.
111. Ware CF, Sedý JR. TNF Superfamily Networks: bidirectional and interference pathways of the herpesvirus entry mediator (TNFSF14). *Curr Opin Immunol.* 2011;23(5):627-31.
112. Calarota SA, Weiner DB. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1-DNA vaccine potency through incorporation of T-helper 1 molecular adjuvants. *Immunological Reviews.* 2004;199(1):84-99.
113. Xu R, Megati S, Roopchand V, Luckay A, Masood A, Garcia-Hand D, et al. Comparative ability of various plasmid-based cytokines and chemokines to adjuvant the activity of HIV plasmid DNA vaccines. *Vaccine.* 2008;26(37):4819-29.
114. Zhai YZ, Li XM, Zhou Y, Ma L, Feng GH. Intramuscular immunization with a plasmid DNA vaccine encoding prM-E protein from Japanese encephalitis virus: enhanced immunogenicity by co-administration of GM-CSF gene and genetic fusions of prM-E protein and GM-CSF. *Intervirology.* 2009;52(3):152-63.
115. Eickhoff CS, Vasconcelos JR, Sullivan NL, Blazevic A, Bruna-Romero O, Rodrigues MM, et al. Co-administration of a plasmid DNA encoding IL-15 improves long-term protection of a genetic vaccine against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(3):e983.
116. Lai L, Kwa S, Kozłowski PA, Montefiori DC, Ferrari G, Johnson WE, et al. Prevention of infection by a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor co-expressing DNA/modified vaccinia Ankara simian immunodeficiency virus vaccine. *J Infect Dis.* 2011;204(1):164-73.
117. Robinson HL, Montefiori DC, Villinger F, Robinson JE, Sharma S, Wyatt LS, et al. Studies on GM-CSF DNA as an adjuvant for neutralizing Ab elicited by a DNA/MVA immunodeficiency virus vaccine. *Virology.* 2006;352(2):285-94.
118. Aboud S, Nilsson C, Karlén K, Marovich M, Wahren B, Sandström E, et al. Strong HIV-specific CD4+ and CD8+ T-lymphocyte proliferative responses in healthy individuals immunized with an HIV-1 DNA vaccine and boosted with recombinant modified vaccinia virus ankara expressing HIV-1 genes. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(7):1124-31.
119. Jaffee EM, Hruban RH, Biedrzycki B, Laheru D, Schepers K, Sauter PR, et al. Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation. *J Clin Oncol.* 2001;19(1):145-56.

120. Richie TL, Charoenvit Y, Wang R, Epstein JE, Hedstrom RC, Kumar S, et al. Clinical trial in healthy malaria-naïve adults to evaluate the safety, tolerability, immunogenicity and efficacy of MuStDO5, a five-gene, sporozoite/hepatic stage *Plasmodium falciparum* DNA vaccine combined with escalating dose human GM-CSF DNA. *Hum Vaccin Immunother.* 2012;8(11):1564-84.
121. Maria Rodriguez A, Fernanda Pascutti M, Maeto C, Falivene J, Pia Holgado M, Turk G, et al. IL-12 and GM-CSF in DNA/MVA Immunizations against HIV-1 CRF12\_BF Nef Induced T-Cell Responses With an Enhanced Magnitude, Breadth and Quality. *Plos One.* 2012;7(5).
122. Yen HH, Scheerlinck JP. Co-delivery of plasmid-encoded cytokines modulates the immune response to a DNA vaccine delivered by in vivo electroporation. *Vaccine.* 2007;25(14):2575-82.
123. Tenbusch M, Kuate S, Tippler B, Gerlach N, Schimmer S, Dittmer U, et al. Coexpression of GM-CSF and antigen in DNA prime-adenoviral vector boost immunization enhances polyfunctional CD8+ T cell responses, whereas expression of GM-CSF antigen fusion protein induces autoimmunity. *BMC Immunol.* 2008;9:13.
124. Wanjalla CN, Goldstein EF, Wirblich C, Schnell MJ. A role for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the regulation of CD8(+) T cell responses to rabies virus. *Virology.* 2012;426(2):120-33.
125. Haddad D, Ramprakash J, Sedegah M, Charoenvit Y, Baumgartner R, Kumar S, et al. Plasmid vaccine expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor attracts infiltrates including immature dendritic cells into injected muscles. *J Immunol.* 2000;165(7):3772-81.
126. Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res.* 2004;64(17):6337-43.
127. Kared H, Leforban B, Montandon R, Renand A, Layseca Espinosa E, Chatenoud L, et al. Role of GM-CSF in tolerance induction by mobilized hematopoietic progenitors. *Blood.* 2008;112(6):2575-8.
128. Kusakabe K, Xin KQ, Katoh H, Sumino K, Hagiwara E, Kawamoto S, et al. The timing of GM-CSF expression plasmid administration influences the Th1/Th2 response induced by an HIV-1-specific DNA vaccine. *J Immunol.* 2000;164(6):3102-11.