Rafael Ribeiro Almeida

**Imunogenicidade de vacinas de DNA codificando
peptídeos conservados e promíscuos do HIV-1, em
camundongos BALB/c**

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

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

São Paulo

2011

Rafael Ribeiro Almeida

**Imunogenicidade de vacinas de DNA codificando
peptídeos conservados e promíscuos do HIV-1, em
camundongos BALB/c**

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

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

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Rafael Ribeiro

Imunogenicidade de vacinas de DNA codificando peptídeos conservados e promíscuos do HIV-1, em camundongos BALB/c / Rafael Ribeiro Almeida. -- São Paulo, 2011.

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

Orientador: Edecio Cunha-Neto.

Descritores: 1.Vacinas contra AIDS 2.Linfócitos T CD4 positivos
3.Cobertura vacinal 4.Camundongos endogâmicos BALB/c 5.Imunossupressão

USP/FM/DBD-187/11

Aos meus pais, Otacílio e Mércia, pelo apoio incondicional

Agradecimentos

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

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil pelas discussões enriquecedoras.

Às minhas co-orientadoras Prof. Dr. Daniela e Dr. Susan, por todos os ensinamentos e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Douglas Nixon da Universidade da Califórnia, São Francisco, pela atenção e pelo grande interesse em relação ao meu trabalho e pelas excepcionais discussões e contribuições para o desenvolvimento do mesmo.

Aos gentis senhores do Biotério de Experimentação, Edil e Luiz, pela amizade e por toda a ajuda com os experimentos.

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

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

Referências:

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

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

Abreviaturas dos títulos dos periódicos:

List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas.....	i
Lista de figuras.....	vi
Lista de tabelas.....	viii
Lista de figuras anexas.....	ix
Lista de tabelas anexas.....	x
Resumo.....	xii
Abstract.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1. AIDS.....	2
1.2. Epidemiologia.....	3
1.3. Origem e diversidade genética do HIV.....	3
1.4. Ciclo de vida do HIV.....	7
1.5. Patogênese da infecção pelo HIV.....	9
1.6. Resposta imunológica contra o HIV.....	11
1.7. Estratégias vacinais contra o HIV.....	15
2. Objetivos.....	23
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. Metodologia.....	25
3.1. Seleção dos peptídeos.....	26
3.2. Construção dos plasmídeos codificando os peptídeos selecionados.....	26
3.3. Transformação de bactérias DH5 α por choque térmico.....	27
3.4. Extração e purificação do DNA plasmídial.....	27
3.5. Quantificação e avaliação da integridade dos plasmídeos purificados.....	28

3.6.	Síntese dos peptídeos.....	29
3.7.	Camundongos e imunizações.....	29
3.8.	Suspensão de células esplênicas.....	30
3.9.	Ensaio de proliferação celular contra peptídeos individuais do HIV-1	30
3.10.	Marcação intracelular de citocinas e proliferação celular.....	31
3.11.	ELISPOT para IFN- γ	32
3.12.	Análise Estatística.....	33
4.	Delineamento experimental.....	34
5.	Resultados.....	36
5.1.	Identificação de peptídeos promíscuos e conservados do HIV-1 para linfócitos T CD4 ⁺	37
5.2.	Desenho e construção dos plasmídeos vacinais.....	45
5.3.	Avaliação da amplitude da resposta imune induzida pelos diferentes esquemas de imunização em camundongos BALB/c.....	48
5.4.	Avaliação da magnitude e do perfil funcional da resposta imune induzida pelas diferentes estratégias de imunização em camundongos BALB/c.....	53
6.	Discussão.....	69
7.	Conclusões.....	78
8.	Anexos.....	80
8.1.	Anexo A – Figuras.....	81
8.2.	Anexo B – Tabelas.....	86
8.3.	Anexo C – Aprovação CAPPesq.....	88

8.4.	Anexo D1 – Certificado subclonagem HIVBr27.....	89
8.5.	Anexo D2 – Certificado subclonagem HIVenv7.....	90
9.	Referências bibliográficas.....	91
10.	Publicação.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	porcentagem
aa	aminoácidos
ADCC	citotoxicidade celular dependente de anticorpo
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
APC	Allophycocyanin (aloficocianina)
ART	Antiretroviral therapy (Terapia antirretroviral)
BD	Benton Dicson
BFA	Brefeldina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CBA	Cytometric Bead Array
CCR5	C-C chemokine receptor type 5 (receptor de quimiocina C-C do tipo 5)
CD	Cluster of Differentiation (designação de grupos)
CDC	Centers for disease control and prevention (Centro para Controle e Prevenção de Doenças)
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester (carboxifluoresceína succinimidil éster)
CO₂	Dióxido de carbono
Con A	Concanavalina A
CTL	Cytotoxic T lymphocytes (linfócitos T citotóxicos)
CXCR4	CXC chemokine Receptor type 4 (receptor de quimiocina CXC do tipo 4)
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido tetracético etilenodiamínico)

ELISPOT	Enzyme-linked immunospot assay
<i>et al</i>	e outros
FITC	Isoticianato de fluoresceína
Fmoc	N-9-fluorenilmetoxycarbonil
CRFs	Circulating recombinant forms (Formas recombinants circulantes)
FSC	Forward Scatter
g	Gramas
GALT	Tecido linfóide associado à mucosa intestinal
gp	Glicoproteína
HAART	Higly active antiretroviral therapy (Terapia antirretroviral altamente ativa)
HIV-1	Human immunodeficiency vírus type 1 (Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1)
HIV-2	Human immunodeficiency vírus type 2 (Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 2)
HLA-DR	Human leukocyte antigen, subclass DR (Antígeno leucocitário Humano, subclasse DR)
HRP	Horseradish peroxidase
IFN-γ	Interferon gama
IFN-α	Interferon alfa
IL-2	Interleucina 2
IL-10	Interleucina 10
I.M	Intramuscular
IMT	Instituto de Medicina Tropical
InCor	Instituto do Coração
Kb	Quilobase
KCl	Cloreto de potássio
KHCO₃	Bicarbonato de potássio
L T	Linfócitos T

LB	Lúria Bertani
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LPS	Lipopolissacarídeo
LTNP	Long term non progressors (Não progressores por longo tempo)
M	Major (principal)
MB	Macs Buffer
mDCs	Mieloid dendritic cells (células dendríticas mielóides)
mg	Miligramas
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MHC	Major histocompatibility complex (Complexo principal de histocompatibilidade)
MIP-1α	Macrophage Inflammatory Protein alpha (proteína alfa inflamatória de macrófagos)
MIP-1β	Macrophage Inflammatory Protein betha (proteína beta inflamatória de macrófagos)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Ácido ribonucleico mensageiro)
N	Non major e Non outlier
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanogramas
NH₄Cl	Cloreto de amonio
NK	Natural killer (matadoras naturais)
NKT	Natural Killer T cells
nm	Nanômetro
NOD	Non-obese diabetic
O	Outlier

°C	Grau centígrado
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	p-value (valor de p)
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline (tampão salina-fosfato)
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação de polimerase em cadeia)
pDCs	Plasmocitoid dendritic cells (células dendríticas plasmocitóides)
PE	Phycoerythrin (ficoeritrina)
PercP	Peridinin chlorophyll protein (proteína clorofil peridina)
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PN-DST/AIDS	Programa Nacional – Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS
PRED^{BALB/c}	Algoritmo de predição para moléculas H2 de camundongos BALB/c
qsp	Quantidade suficiente para
R10	Meio RPMI suplementado com 10% de SFB
RANTES	Chemokine (C-C motif) ligand 5 (Ligante de quimiocina 5 (motivo C-C))
RhCMV	Citomegalovírus símio
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleic)
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse transcriptase
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDS	Sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)
SFB	Soro Fetal Bovino

SHIV	Vírus quimérico da imunodeficiência símia
SIV	Simian Immunodeficiency Virus (vírus da imunodeficiência símia)
SPF	Specific pathogen free (livre de patógenos específicos)
SSC	Side Scatter
TAE	Tampão Tris-acetato/EDTA
TBE	Tris/Borato/EDTA
TEPITOPE	Algoritmo de predição de epitopos restritos para moléculas de HLA classe II
TLR	Toll like receptor
TNF-α	Tumour necrosis factor alpha (fator de necrose tumoral alfa)
U	Unidades
UFS	Unidades formadoras de spots
V	Volts
vol	Volume
μg	Micrograma
μL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore filogenética do HIV-1 e seus subtipos.....	5
Figura 2A: Distribuição global dos subtipos e formas recombinantes circulantes do HIV-1.....	6
Figura 2B: Distribuição dos subtipos e formas recombinantes circulantes do HIV-1 no Brasil.....	6
Figura 3: Ciclo de vida do HIV-1.....	8
Figura 4: Infecção pelo HIV-1 e resposta imunológica.....	14
Figura 5: Identificação de peptídeos pelo algoritmo TEPITOPE.....	39
Figura 6: Alinhamento dos peptídeos identificados com as sequências consenso dos subtipos do HIV-1.....	40
Figura 7: Construção dos plasmídeos vacinais.....	46
Figura 8: Análise da integridade dos genes HIVenv7 e HIVBr27, subclonados no vetor pVAX1.....	47
Figura 9: Secreção de IFN- γ em resposta a estimulação com peptídeos individuais do HIV-1.....	50
Figura 10: Proliferação celular contra peptídeos individuais do HIV-1, baseada no ensaio de diluição de CFSE.....	51
Figura 11: Secreção de IFN- γ em resposta a estimulação com <i>pool</i> de peptídeos do HIV-1 em camundongos imunizados com HIVBr18, HIVBr27 ou HIVenv7+HIVBr27.....	56
Figura 12: Proliferação celular contra os <i>pools</i> de peptídeos do HIV-1, baseada em diluição de CFSE.....	57
Figura 13: Produção de citocinas em resposta aos <i>pools</i> de peptídeos do HIV-1.....	58
Figura 14: Proliferação celular e produção de citocinas em resposta ao <i>pool</i> de peptídeos do HIV-1.....	63

Figura 15: Frequência de células T CD4 ⁺ que proliferam e produzem citocinas em resposta ao <i>pool</i> de peptídeos do HIV-1.....	65
Figura 16: Frequência de células T CD8 ⁺ que proliferam e produzem citocinas em resposta ao <i>pool</i> de peptídeos do HIV-1.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1A: Peptídeos promíscuos e conservados do HIV-1.....41

Tabela 1B: Predição de ligação dos peptídeos às moléculas MHC
de classe I e II de camundongos BALB/c.....42

Tabela 2: Conservação das sequências dos peptídeos selecionados
entre os consensos dos subtipos do HIV-1.....43

Tabela 3: Frequência de isolados do HIV-1 de acordo com número
de mutações em relação aos peptídeos identificados.....44

LISTA DE FIGURAS ANEXAS

Figura 1: Estratégia de análise da proliferação celular contra peptídeos individuais do HIV-1.....	81
Figura 2: Proliferação celular baseada em diluição de CFSE.....	82
Figura 3: Proliferação celular baseada em diluição de CFSE.....	83
Figura 4: Estratégia de análise para avaliação da produção intracelular de citocinas em resposta ao <i>pool</i> de peptídeos do HIV-1.....	84
Figura 5: Estratégia de análise para identificação de células T polifuncionais.....	85

LISTA DE TABELAS ANEXAS

Tabela 1: Sequência de aminoácidos dos peptídeos codificados pela vacina HIVBr18.....	86
Tabela 2: Resumo dos resultados de ELISPOT de IFN- γ e proliferação celular contra peptídeos individuais do HIV-1	87

Resumo

Almeida, RR. Imunogenicidade de vacinas de DNA codificando peptídeos conservados e promíscuos do HIV-1, em camundongos BALB/c [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011

Resumo

A pandemia de AIDS é um dos principais problemas de saúde pública no mundo e demanda o desenvolvimento de uma vacina eficaz. Uma abordagem vacinal ideal, baseada em resposta celular contra o HIV-1, deveria induzir uma resposta imune mediada tanto por células T CD4⁺ quanto CD8⁺. A diversidade genética do HIV-1 é uma grande preocupação para o desenvolvimento de uma vacina e sequências consenso têm sido utilizadas a fim de contornar a barreira imposta por essa diversidade. A escolha apropriada dos antígenos a comporem as construções vacinas também é relevante, visto que proteínas como Gag e Vif têm se mostrado bastante imunogênicas, enquanto alguns trabalhos têm demonstrado que Env possui características imunossupressoras e que respostas celulares contra esse antígeno podem ser danosas aos indivíduos vacinados. Nosso grupo demonstrou que uma vacina de DNA (HIVBr18) codificando 18 peptídeos para linfócitos T CD4⁺, promíscuos (capazes de se ligarem a múltiplas moléculas HLA-DR) e conservados na sequência consenso do subtipo B do HIV-1 foi capaz de induzir uma resposta celular ampla, polifuncional e de longa duração em camundongos BALB/c e transgênicos para moléculas HLA. Neste trabalho identificamos 34 peptídeos potencialmente reconhecidos por linfócitos T CD4⁺, promíscuos e conservados na sequência consenso dos consensos do grupo M do HIV-1. Uma vacina de DNA (HIVBr27) codificando 27 dos 34 peptídeos (exceto os 7 peptídeos de Env identificados) induziu uma resposta mais ampla e de maior magnitude que a vacina HIVBr18 em camundongos BALB/c. Além disso, a vacina HIVBr27 induziu maior frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ polifuncionais, capazes de proliferar e produzir as citocinas IFN- γ e TNF- α . Desenvolvemos também uma vacina de DNA (HIVenv7) codificando os 7 peptídeos de Env do HIV-1 identificados. A co-imunização de HIVenv7+HIVBr27 reduziu a amplitude da resposta celular contra peptídeos codificados pela vacina HIVBr27. Além disso, a co-imunização reduziu a magnitude da resposta e a frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ polifuncionais contra o *pool* de 27 peptídeos codificados por essa vacina. A vacina HIVBr27, desenhada para induzir uma resposta de linfócitos T CD4⁺ ampla e intensa contra peptídeos promíscuos e conservados da sequência consenso dos consensos do grupo M do HIV-1, é mais imunogênica e mais completa que a vacina HIVBr18, tendo potencial de conferir, em grande cobertura populacional, imunidade contra os diversos subtipos circulantes do vírus. O fenômeno observado na

co-imunização com HIVenv7 sugere que a inclusão do envelope em imunógenos contra o HIV-1 possa ser prejudicial. Por outro lado, isto faz desse plasmídeo um alvo promissor para terapias imunológicas que visem indução de imunossupressão.

Descritores: 1. Vacinas contra AIDS 2. Linfócitos T CD4 positivos 3. Cobertura vacinal 4. Camundongos endogâmicos BALB/c 5. Imunossupressão

Almeida, RR. Immunogenicity of DNA vaccines encoding conserved and promiscuous HIV-1 peptides, in BALB/c mice [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011

Abstract

The AIDS pandemic is a worldwide major public health problem and requires the development of an effective vaccine. An ideal vaccine approach based on cellular immune responses against HIV-1 should induce an immune response mediated by both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. HIV-1 genetic diversity is a major concern for developing a vaccine and consensus sequences have been used to circumvent the barrier posed by this diversity. The appropriate choice of antigens to compose the vaccines is also relevant, since proteins such as Gag and Vif have been shown to be immunogenic, while some studies have shown that Env has immunosuppressive characteristics and cellular responses against this antigen can be harmful to vaccinated individuals. Our group has demonstrated that a DNA vaccine (HIVBr18) encoding “promiscuous” multiple HLA-DR binding, conserved B-subtype HIV-1 CD4⁺ T cell epitopes was able to induce a broad, polyfunctional and long lasting T cell response in BALB/c and HLA transgenic mice. In this work we identified 34 promiscuous and conserved sequences within the group M HIV-1 consensus of the consensus sequence, potentially recognized by CD4⁺ T cells. A DNA vaccine (HIVBr27) encoding 27 of the 34 peptides (except the 7 Env identified peptides) induced a broader and higher magnitude T cell response than HIVBr18 vaccine in BALB/c mice. Moreover, the vaccine HIVBr27 induced a higher frequency of polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells, able to proliferate and produce the cytokines IFN- γ and TNF- α . We also developed a DNA vaccine (HIVenv7) encoding the 7 HIV-1 Env identified peptides. Co-immunization with HIVenv7+HIVBr27 reduced the breadth of the cellular immune response against the HIVBr27 encoded peptides. Besides, co-immunization reduced the magnitude of the response and the frequency of polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells against the pool of 27 peptides encoded by this vaccine. The HIVBr27 vaccine, designed to induce a broad and intense CD4⁺ T cell response against promiscuous and conserved peptides within the group M HIV-1 consensus of the consensus sequence, is more immunogenic and more complete than the vaccine HIVBr18, having the potential to provide, with wide population coverage, immunity against various circulating subtypes of the virus. The phenomenon observed in the co-immunization with HIVenv7 suggests that the inclusion of the envelope in immunogens against HIV-1 may be harmful. On the other hand, these results suggest that HIVenv7 is a promising target for immune therapies aimed at inducing immunosuppression.

Descriptors: 1. AIDS vaccines 2. CD4 positive T lymphocytes 3. Immunization coverage 4. BALB/c Inbred mice 5. Immunosuppression

1. Introdução

1.1. AIDS

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é causada por uma infecção crônica com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). O início oficial da epidemia é marcado pelo relato do Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos em 1981, que reportou a presença de pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* em cinco homens homossexuais (Gottlieb *et al*, 1981). A confirmação de que a AIDS era causada por um agente infeccioso ocorreu entre 1983 e 1984 após o isolamento de um retrovírus proveniente do sangue de pacientes com a doença (Barresinoussi *et al*, 1983; Levy *et al*, 1984).

O retrovírus HIV é capaz de infectar linfócitos T CD4⁺, assim como outras células, incluindo monócitos. O vírus infecta as células alvo utilizando a molécula CD4 como seu receptor principal e as moléculas CCR5 ou CXCR4 como co-receptores. Durante as primeiras semanas da infecção os pacientes podem apresentar sintomas semelhantes ao da gripe, com a presença de erupções cutâneas. É observada uma deterioração gradual das funções imunológicas do paciente ao longo do curso da infecção, à medida que os linfócitos T CD4⁺ são destruídos. Indivíduos com contagem dessas células abaixo de 200 células/mm³ se tornam extremamente vulneráveis a doenças oportunistas e a cânceres (Klimas *et al*, 2008).

A infecção pelo HIV ocorre principalmente pela rota sexual, sendo as mulheres mais propensas a se infectar durante o intercuro heterossexual. A transmissão também pode ocorrer pelo contato direto com sangue ou hemoderivados, no momento de uma transfusão sanguínea ou pela utilização de seringas contaminadas. Outra forma de transmissão que pode ocorrer é a vertical, da mãe para o recém nascido (Quinn, 2008). O tratamento para infecção com HIV é feito com o auxílio de antirretrovirais (ARV) e até o momento 20 drogas estão disponíveis para uso. Estas variam de inibidores das enzimas virais, como a transcriptase reversa, protease e integrase até inibidores de fusão, como os antagonistas de CCR5 (ART-Guidelines, 2008). Embora o tratamento tenha assegurado maior qualidade de vida e longevidade aos pacientes, existem problemas relacionados ao desenvolvimento de resistência por seleção de vírus mutantes. Os países mais afetados pela AIDS são subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, sendo, então, pouco capazes de arcar com as despesas na manutenção das drogas antirretrovirais à disposição da população (Cohen *et al*, 2008).

1.2. Epidemiologia

O número de indivíduos infectados pelo HIV-1 desde o início da pandemia já ultrapassa 60 milhões e o número de mortos por AIDS chega aos 25 milhões. Isto coloca a infecção pelo HIV-1 como uma das mais importantes nas últimas décadas e mobiliza grandes esforços para sua contenção. Segundo dados recentes do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS, aproximadamente 33 milhões de pessoas vivem com HIV, sendo 67% dessas na região da África sub-Sahariana (UNAIDS, 2009). Registros da Organização Mundial da Saúde estimam que 600 mil pessoas sejam infectadas pelo HIV-1 a cada hora (Who, 2008). O Brasil apresenta-se como um dos países mais afetados pela pandemia na América Latina, com mais de 500 mil pessoas vivendo com HIV/AIDS. Até junho de 2009, 183 mil óbitos haviam sido constatados (UNAIDS, 2009).

A epidemia HIV/AIDS no Brasil tem se disseminado de forma mais lenta nos últimos anos devido a alguns fatores como a modificação do comportamento nos seguimentos populacionais sob alto risco e a implementação de medidas preventivas. Outro fator importante nesse contexto foi o surgimento das terapias antirretrovirais que, ao controlar a carga viral em pessoas infectadas, contribui para a redução da transmissão. A inclusão da Terapia Antirretroviral de Alta Atividade em 1996 foi o marco principal na redução da propagação da epidemia (Fonseca & Bastos, 2007). Entretanto, uma vacina eficaz contra o HIV se faz necessária para auxiliar no combate contra o vírus.

1.3. Origem e diversidade genética do HIV

O HIV, agente etiológico da AIDS, é um retrovírus derivado do Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) (Salemi *et al*, 2001). A pandemia de AIDS teve seu início relativamente recente na população humana, datando do início da década de 80. Entretanto, amostras de sangue coletadas na África em 1959 já possuíam rastros da infecção pelo HIV (Zhu *et al*, 1998). O primeiro contato do homem com o vírus possivelmente ocorreu devido à contaminação direta com sangue de primatas não humanos, no momento da caça (Chitnis *et al*, 2000).

O HIV pode ser geneticamente diferenciado em dois tipos: HIV-1 e HIV-2. O primeiro é similar ao vírus SIVcpz, isolado de chimpanzés na África equatorial ocidental. Esta região é marcada por altos índices de infecção e foi considerada o

epicentro da pandemia. O aparecimento posterior de infecções pelo HIV nos Estados Unidos, Europa e outros países foi também relacionado ao mesmo vírus que surgiu na África. O HIV-2 é endêmico da África ocidental e possui como ancestral o SIVsm, isolado de macacos mangabeus fuligentos nessa região. Os dois tipos virais possivelmente surgiram em decorrência de várias transmissões independentes entre primatas não humanos e humanos e acabaram se fixando na população humana (Gao *et al*, 1999).

O HIV-1 é o principal responsável pela pandemia de AIDS e divide-se em três grupos: M (major), O (Outlying) e N (New). O grupo M, que é relacionado a mais de 90% dos casos de infecção, pode ser dividido em pelo menos 10 subtipos, sendo eles A, B, C, D, F, G, H, I, J e K (figura 1), além de várias formas recombinantes. As formas recombinantes (CRFs) são resultado da recombinação genética em indivíduos infectados por mais de um subtipo do vírus e são passíveis de transmissão. A diversidade genética entre subtipos pode chegar a 35% e dentro de um mesmo subtipo variar entre 15 e 20% (Taylor & Hammer, 2008; Thomson *et al*, 2002). Isto se deve principalmente à grande quantidade de erros cometidos pela enzima transcriptase reversa (RT) na transcrição do RNA viral em DNA, um passo essencial no ciclo de vida de um retrovírus. Além disso, outros fatores podem contribuir para diversificação genética, como a alta taxa de replicação, o número de mutações em cada ciclo de vida e a propensão viral para recombinação genômica. O vírus pode, ainda, ter sua variabilidade genética aumentada devido a pressões ambientais, como as terapias farmacológicas e fatores relacionados ao hospedeiro (Najera *et al*, 2002; Wainberg, 2004). A fim de contornar o problema relacionado à diversidade genética do HIV-1, modelos evolucionários têm sido desenvolvidos para gerar sequências consenso e ancestrais. Enquanto uma sequência consenso é criada determinando-se o aminoácido mais comum em cada posição após um alinhamento entre sequências, uma sequência ancestral leva em consideração, por exemplo, os critérios de máxima verossimilhança adotados em construções de árvores filogenéticas. Tanto as sequências consenso quanto ancestrais são vantajosas no desenvolvimento de vacinas contra o HIV-1 por apresentarem similaridade às diversas formas circulantes do vírus e possuem potencial de induzir respostas imunológicas contra essas (Gaschen *et al*, 2002).

Figura 1: Árvore filogenética do HIV-1 e seus subtipos. Adaptado de (Letvin, 2006).

Os subtipos do HIV-1 mais prevalentes no mundo são: C (47%), A (27,2%), B (12,3%) e D (5,3%) (figura 2A). A África sub-Sahariana, região onde se encontra a maioria dos casos de HIV/AIDS, possui os subtipos A e C como os maiores responsáveis pelas infecções (Takebe *et al*, 2004). No Brasil, os subtipos mais prevalentes são: B (77.2%), F (6.4%), C (3.3%) e D (0.5%), bem como as formas recombinantes B/F e B/C (Guiniaraes *et al*, 2002; Morgado *et al*, 1994) (figura 2B).

Grande parte das vacinas desenvolvidas até o momento se baseia em regiões virais derivadas da sequência do subtipo B do HIV-1, principalmente pelo fato desse ser o grande responsável por infecções nos Estados Unidos e Europa (Letvin, 2006). Entretanto, uma vacina capaz de induzir imunidade contra um vasto número de subtipos do HIV-1 seria interessante para controlar a pandemia de AIDS que afeta, principalmente, os países da África.

Figura 2A: Distribuição global dos subtipos e formas recombinantes circulantes do HIV-1. Adaptado de (Taylor & Hammer, 2008).

Figura 2B: Distribuição dos subtipos e formas recombinantes circulantes do HIV-1 no Brasil. Adaptado de (Morgado *et al*, 2002).

1.4. Ciclo de vida do HIV

A infecção de células alvo pelo HIV tem início com a interação entre proteínas virais e receptores na superfície celular. O envelope do HIV é um complexo protéico trimérico, composto das proteínas gp120 e gp41. A primeira liga-se à glicoproteína CD4, presente na superfície de monócitos/macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, micróglia e 60% dos linfócitos T circulantes. Esta ligação causa mudanças conformacionais na gp120, expondo um domínio protéico que se liga especificamente aos receptores de quimiocinas CCR5 ou CXCR4. Após a ligação da gp120 ao CD4, a porção N-terminal da gp41 penetra na membrana celular. Isto leva a uma aproximação da partícula viral e a célula, fusionando-as (Markosyan *et al*, 2003; Melikyan *et al*, 2000). A expressão diferencial dos receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 nas células alvo tem sido apontada como o principal determinante do tropismo viral. O CXCR4 é expresso em diversas células, incluindo linfócitos, enquanto o CCR5 está presente em monócitos/macrófagos, células dendríticas e linfócitos T ativados. Os vírus que infectam células CCR5⁺ são denominados R5 e os vírus que infectam células CXCR4⁺ são denominados X4 (Broder & Berger, 1995).

Após a fusão do vírus à membrana celular, o *core* protéico libera o RNA viral no citoplasma. Esse é convertido em DNA pela transcriptase reversa, em um processo que envolve a formação de um híbrido RNA-DNA, a quebra desse e a síntese do DNA de fita dupla. A ausência de atividade revisora na transcriptase reversa torna-se, nesse momento, fundamental para geração de mutações e, conseqüentemente, diversidade genética do HIV (Bebenek *et al*, 1989). O DNA proviral recém formado é então integrado no genôma da célula alvo, que deve estar em um estado ativado. Monócitos/macrófagos, micróglia e linfócitos T CD4⁺ em estado quiescente, após a infecção, tornam-se importantes reservatórios virais (Chun *et al*, 1997).

A transcrição do DNA proviral em RNA mensageiro ocorre em células ativadas. O processo de tradução resulta primeiramente nas proteínas regulatórias Tat e Rev. A primeira é responsável por se ligar ao RNA viral no núcleo e dar início à transcrição de RNAs codificadores das enzimas e proteínas estruturais do vírus. A proteína Rev auxilia na transcrição desses RNAs e na expressão protéica, promovendo, assim, a formação de partículas virais maduras. As proteínas codificadas pelos genes pol e gag formam o *core* da partícula viral em maturação. O gene env codifica para a proteína gp160, que posteriormente sofre clivagem e dá origem às proteínas do envelope, gp120 e gp41.

A formação de uma nova partícula viral ocorre em um processo coordenado. Duas fitas de RNA se associam com as enzimas replicativas, enquanto as proteínas que compõem o *core* as envolvem, formando o capsídeo viral. A partícula imatura então migra para a superfície celular. As moléculas precursoras são clivadas pela protease, gerando uma nova partícula viral infecciosa, que brota da membrana celular hospedeira (Gomez & Hope, 2005) (figura 3).

Figura 3: Ciclo de vida do HIV-1. A partícula viral se liga à célula hospedeira pelo contato da glicoproteína gp120 com as moléculas CD4 e CCR5. O RNA viral é liberado no citoplasma, transcrito de forma reversa em DNA e esse é integrado no genoma hospedeiro. Novas moléculas de RNA são formadas, assim como novas proteínas virais. A protease cliva precursores protéicos em suas formas derivadas, o RNA viral é envolto em proteínas do vírus, dando origem ao capsídeo. O envelope é formado e novas partículas virais brotam da célula hospedeira. **Adaptado de (Weiss, 2001).**

1.5. Patogênese da infecção pelo HIV

A infecção pelo HIV ainda é cercada por algumas incertezas. Não se sabe ao certo se o vírus é transmitido como partículas livres ou associado a células do muco cervico-vaginal ou do sêmen. Sabe-se, entretanto, que o SIV pode ser transmitido sob as duas formas (Lai *et al*, 2009). Os vírus que alcançam e cruzam o epitélio mucoso possivelmente o fazem por transcitose ou por contato direto com células dendríticas intraepiteliais. Mucosas danificadas por trauma físico ou infecções genitais permitem que os vírus cruzem mais facilmente a barreira epitelial (Galvin & Cohen, 2004; Haaland *et al*, 2009).

A fase de eclipse da infecção pelo HIV ocorre durante um período de, aproximadamente, 10 dias após a transmissão. Neste momento o RNA viral não é detectável no plasma. O estabelecimento da infecção provavelmente ocorre por um único foco de células T CD4⁺ infectadas, dada homogeneidade do vírus fundador. O recrutamento de células T susceptíveis à infecção, em resposta à precoce resposta imunológica inata local, permite que a replicação viral se mantenha (Li *et al*, 2009). A taxa de erros cometidos pela transcriptase reversa e a ação antiviral desempenhada por proteínas APOBEC podem resultar na produção de vírus defeituosos e culminar no fracasso de muitos focos de infecção (Bishop *et al*, 2004). Partículas virais e/ou células infectadas chegam ao linfonodos drenantes ao fim da fase de eclipse, onde ocorre então a infecção de células T CD4⁺CCR5⁺ ativadas. Células dendríticas podem internalizar partículas virais e levá-las a células T ativadas, exacerbando ainda mais o processo (Geijtenbeek *et al*, 2000). Linfócitos B também podem estar envolvidos nesta fase inicial de espalhamento da infecção, devido à ligação de vírus a receptores do complemento (CD21) (Moir *et al*, 2000). O tecido linfóide associado à mucosa intestinal (GALT) torna-se então o alvo principal da infecção pelo HIV. Aproximadamente 20% das células T CD4⁺ neste local são infectadas e até 60% das células não infectadas se ativam e morrem localmente por apoptose, liberando partículas apoptóticas que podem suprimir o sistema imunológico (Gasper-Smith *et al*, 2008). Até 80% das células T CD4⁺ podem ser depletadas no GALT nas primeiras 3 semanas de infecção (Brenchley *et al*, 2004).

O pico de viremia, caracterizado por intensa replicação viral no GALT e outros tecidos linfóides, alcança mais de um milhão de cópias de RNA por mililitro (mL) de sangue entre 21 e 28 dias após a infecção pelo HIV. O número de células T CD4⁺ é baixo durante esse período, posteriormente retornando a níveis próximos do normal no

sangue, mas não no *GALT* (Brenchley *et al*, 2004). A soro-conversão ocorre entre três e cinco semanas após o contato com o vírus. A presença de infecção na ausência de níveis detectáveis de anticorpos é denominada janela imunológica (Weber, 2006). A fase seguinte é caracterizada pela queda da carga viral, que ocorre durante um período de 12 a 20 semanas após o pico de viremia, até chegar a um nível mais estável (*set point*) (Schacker *et al*, 1998). O *set point* é caracterizado por ausência de sintomas e mantido por um balanço entre a replicação viral e a resposta imunológica. Neste momento observa-se o aparecimento de variantes virais selecionadas pela pressão imunológica, que havia surgido logo antes do estabelecimento do pico de viremia (Borrow *et al*, 1994; Price *et al*, 1997). Alguns indivíduos, denominados controladores de elite, conseguem controlar eficientemente a viremia sem tratamento e permanecem por longos períodos com a carga viral indetectável (Saez-Cirion *et al*, 2007).

A ativação de células da resposta imunológica inata, assim como linfócitos T e B, é um marco da infecção pelo HIV e isto não ocorre apenas em células específicas para o vírus. De fato, é observada uma correlação positiva entre marcadores de ativação em células T CD8⁺ e progressão para AIDS, assim como uma extensiva ativação e apoptose de células T e B (Gasper-Smith *et al*, 2008; Liu *et al*, 1997). Diversos eventos são relacionados à ativação imunológica, ainda que isso não esteja claramente definido. Entre eles são destacados a infecção viral direta das células do sistema imunológico, produção de citocinas pro-inflamatórias por células da resposta inata, translocação microbiana, perda de células T reguladoras e co-infecção crônica por micobactérias e vírus (McMichael *et al*, 2010). Outro fato que também caracteriza a infecção pelo HIV é a disfunção progressiva do sistema imunológico, quer seja contra antígenos do vírus, ou contra antígenos de outros patógenos (Bussmann *et al*, 2010; Douek *et al*, 2003; Foley *et al*, 1992; Opravil *et al*, 1991). A meia vida dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ é reduzida, a migração de células T se torna anormal, ocorre exaustão dessas células e redução da quantidade de células T de memória (Douek *et al*, 2003; Grossman *et al*, 2002).

Após 10 anos de infecção crônica, aproximadamente 50% dos indivíduos sem tratamento vão acabar desenvolvendo sintomas, associados à queda no número de linfócitos T CD4⁺. A queda no número dessas células leva ao aparecimento de doenças oportunistas, como pneumonia por *Pneumocystis carinii*, sarcoma de kaposi, criptosporidose, toxoplasmose e micobacteriose semelhante a tuberculose. Os indivíduos podem apresentar inchaço difuso dos linfonodos, perda de peso, febre e

distúrbios gastro-intestinais. O sistema nervoso também é afetado, com a presença de encefalopatia progressiva e demência. Anemia e linfopenia são frequentemente detectáveis (Fanales-Belasio *et al*, 2010).

1.6. Resposta imunológica contra o HIV

A primeira linha de defesa contra infecções é composta pelo sistema imunológico inato. As células matadoras naturais (NK), as células NKT, as células dendríticas plasmocitóides (pDCs) e as mielóides (mDCs) são responsáveis por funções efetoras e reguladoras dessa resposta imunológica inicial (Mogensen *et al*, 2010). Os receptores do tipo *Toll* (TLR) são um importante grupo de receptores que reconhecem padrões moleculares (PRR) e estão diretamente envolvidos no reconhecimento e resposta contra o HIV. A estimulação de TLR7/8 induz a produção de diversas citocinas com papel antiviral, sendo o IFN- α uma das principais. De fato, a infecção pelo HIV-1 ou pelo SIV são marcadas por uma alta produção dessa citocina (Diop *et al*, 2008; Stacey *et al*, 2009). O IFN- α é capaz de ativar tanto células da resposta imune adaptativa quanto inata, incluindo a atividade citolítica de células NK (Tomescu *et al*, 2007). Entretanto, uma estimulação persistente de sua produção na infecção crônica pode contribuir para a patologia associada ao HIV (Rodríguez *et al*, 2006). As células NK e NKT podem controlar a replicação viral por atividade citotóxica direta em células infectadas e pela produção de citocinas e quimiocinas. Além disso, essas células podem interagir com células dendríticas e influenciar a resposta dos linfócitos T. Durante a infecção aguda pelo HIV observa-se ativação e proliferação de células NK e NKT e essas apresentam um aumento de atividade quando testadas *ex vivo* (McMichael *et al*, 2010).

A resposta adaptativa contra o HIV tem seu início marcado pelo aparecimento de linfócitos T específicos contra o vírus pouco antes do pico de viremia ser estabelecido e chega ao seu auge entre uma e duas semanas após esse período. Este momento é também marcado pela redução progressiva da carga viral (McMichael *et al*, 2010). Uma seleção de mutações ocorre devido à pressão imunológica exercida pelos linfócitos T CD8⁺ e o *set point* viral é estabelecido (Bernardin *et al*, 2005). A resposta celular precoce contra o HIV normalmente é direcionada às proteínas do envelope e a Nef. Proteínas mais conservadas como Pol e a subunidade p24 de Gag se tornam alvo da resposta celular em momentos mais tardios e isso pode representar um fato

importante no controle da viremia (Goonetilleke *et al*, 2009; Turnbull *et al*, 2009). Respostas contra epitopos imunodominantes presentes em proteínas conservadas provavelmente resultam em *set point* virais mais baixos (Streeck *et al*, 2009). Diferentemente da resposta celular inicial contra o HIV, que foca em poucos epitopos virais, a resposta tardia é ampla e frequentemente ocorre contra mais de 10 epitopos (Addo *et al*, 2003). Uma resposta celular ampla contra o envelope, entretanto, foi correlacionada a um aumento da viremia em indivíduos na África do Sul (Kiepiela *et al*, 2007). Foi observado também que uma resposta de linfócitos T CD8⁺ específica a um determinado epitopo do envelope do HIV-1 estava associada a marcadores de progressão para AIDS, como uma alta carga viral (Ngumbela *et al*, 2008).

Os linfócitos T CD8⁺ podem controlar a replicação viral por outros mecanismos além da resposta citotóxica contra células infectadas, sendo um deles a secreção de quimiocinas β , como MIP-1 α , MIP- 1 β e RANTES. Essas quimiocinas se ligam aos co-receptores do vírus na superfície dos linfócitos T CD4⁺ e impedem que ocorra a infecção. A liberação das quimiocinas é um processo antígeno-específico e pode auxiliar no desenvolvimento da atividade citotóxica dos linfócitos citolíticos (Gandhi & Walker, 2002).

Os linfócitos T CD4⁺ HIV-específicos também participam no desenvolvimento de uma resposta imunológica contra a infecção e isto se dá pela produção de citocinas que auxiliam na indução e manutenção da atividade dos linfócitos citolíticos, bem como na estimulação da produção de anticorpos por linfócitos B (Hogan & Hammer, 2001). A depleção progressiva das células T CD4⁺ associa-se com um declínio na atividade de células citolíticas. Isto pode, em parte, explicar a perda do controle da carga viral em um indivíduo cronicamente infectado que ainda apresenta células T CD8⁺ vírus-específicas (Gandhi & Walker, 2002). Indivíduos que conseguem controlar a viremia sem a ajuda da terapia antiretroviral apresentam uma resposta policlonal, persistente e vigorosa de linfócitos T CD4⁺ vírus-específicos, resultando na produção de interferon gama (IFN- γ) e quimiocinas β . Os indivíduos com as respostas mais fortes eram aqueles que controlavam melhor a viremia (Rosenberg *et al*, 1997). A proliferação dos linfócitos T CD4⁺ vírus-específicos foi, ainda, correlacionada a uma forte resposta de células citolíticas vírus-específicas e o conseqüente controle da viremia (Kalams *et al*, 1999). Em outro estudo constatou-se que indivíduos com uma resposta de linfócitos T CD4⁺ forte e específica contra p24 na fase inicial da infecção estabeleciam valores mais reduzidos de carga viral nas fases posteriores, quando comparados a indivíduos que desenvolviam uma resposta fraca contra p24 na fase

inicial da infecção (Gloster *et al*, 2004). Respostas de células T CD4⁺ contra Gag foram fortemente associadas a uma menor carga viral e maior contagem de células T CD4⁺ em pacientes cronicamente infectados pelo subtipo C do HIV-1 (Ramduth *et al*, 2009). Além disso, observou-se que indivíduos que progridem lentamente para AIDS possuíam uma resposta de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ e IL-2 contra Gag que se correlaciona negativamente com a carga viral e positivamente com a resposta de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ contra a mesma proteína (Boaz *et al*, 2002). Mais do que apenas um papel assessor na resposta imunológica, foi observado também que linfócitos T CD4⁺ específicos contra p24 possuíam um papel citolítico direto, sendo capazes de suprimir a replicação viral *ex vivo* (Norris *et al*, 2004).

A produção de anticorpos contra o HIV é geralmente expressiva e direcionada às proteínas estruturais do vírus. Apesar disso, apenas uma pequena parte desses anticorpos possuem atividade neutralizante e podem, então, participar na inibição da infecção viral. Epitopos das proteínas do envelope viral que se ligam aos receptores da célula a ser infectada são os principais alvos dos anticorpos neutralizantes. A maioria dos anticorpos neutraliza virions livres, antes que ocorra a infecção de uma célula alvo (Klasse & Sattentau, 2002). Entretanto, o HIV-1 pode ser transmitido entre células próximas por um mecanismo denominado sinapse virológica. Este processo foi documentado na transmissão do vírus entre células T CD4⁺ e mesmo entre células T CD4⁺ e células dendríticas. As partículas virais transmitidas dessa forma são então menos acessíveis aos anticorpos neutralizantes (Arrighi *et al*, 2004). Vacinas indutoras de anticorpos amplamente neutralizantes seria a melhor forma de evitar a infecção pelo HIV. Entretanto, até o momento nenhuma vacina desenvolvida foi capaz de desempenhar tal função. A resposta celular contra o HIV é importante no controle da infecção e os linfócitos T CD4⁺ têm se mostrado uma peça fundamental nesse contexto (Barouch, 2008; Letvin, 2006). Portanto, uma construção vacinal incluindo epitopos para linfócitos T CD4⁺ poderia ser uma estratégia interessante para auxiliar o combate contra o vírus e retardar a progressão para AIDS.

Figura 4: Infecção pelo HIV-1 e resposta imunológica. Viremia no plasma (superior), e dinâmica de alterações no compartimento de linfócitos T CD4⁺ (inferior). A infecção aguda é caracterizada por uma elevada viremia plasmática (linha vermelha superior), queda acentuada de células CD4⁺ (linha verde inferior) e níveis baixos de anticorpos específicos (linha alaranjada tracejada inferior). A viremia decai com o aparecimento de células CD8⁺ citotóxicas (CTL) (linha azul tracejada inferior) e o *set point* viral é atingido (linha vermelha superior). O *set point* viral pode diferir entre os indivíduos (ex. linha vermelha tracejada superior). O risco de transmissão é maior durante o pico de viremia, cai durante a fase assintomática e volta a aumentar após o desenvolvimento de AIDS (círculos preenchidos – superior). A diversidade viral aumenta ao fim da fase assintomática e início da AIDS (círculos preenchidos – superior). A depleção de células T CD4⁺ no tecido linfóide associado ao intestino (GALT) é alta e constante ao longo do curso da infecção (círculos preenchidos – inferior). **Adaptado de (Simon et al, 2006).**

1.7. Estratégias vacinais contra o HIV

O desenvolvimento de vacinas contra o HIV aborda diversos conceitos genéticos e imunológicos, tanto do hospedeiro quanto do vírus, e pode ser dividido em estratégias vacinais tradicionais e recentes. As estratégias tradicionais envolvem vírus vivos atenuados, vírus mortos e subunidades protéicas. Embora este conjunto de tecnologias tenha demonstrado grande sucesso em vacinas contra outros vírus, elas ainda desempenham uma utilidade limitada contra o HIV. A imunização com vírus atenuados fornece uma proteção substancial contra o SIV em modelos envolvendo macacos resos (Reynolds *et al*, 2008; Wyand *et al*, 1996). Entretanto, preocupações quanto à segurança dessa estratégia a tornam improvável de ser testada em humanos (Baba *et al*, 1999; Learmont *et al*, 1999). Vírus mortos e subunidades protéicas possuem uma capacidade baixa de induzir anticorpos neutralizantes, assim como células T CD8⁺, sendo pouco eficazes contra o HIV (Barouch, 2008). As estratégias vacinais recentes incluem DNA plasmidial e vetores virais recombinantes, construídos para expressar antígenos do HIV. Os plasmídeos são bastante simples de usar e muito versáteis, porém as respostas imunológicas induzidas são geralmente fracas. Múltiplas doses, adjuvantes, ou mesmo novas tecnologias como a eletroporação *in vivo*, são requeridos para que haja uma efetiva imunização de primatas não humanos e humanos (Barouch *et al*, 2000; Casimiro *et al*, 2003; Graham *et al*, 2006; Liu *et al*, 2008). A maioria dos testes clínicos em andamento, entretanto, utiliza vetores virais administrados sozinhos ou como reforço de imunizações prévias com plasmídeos (Barouch, 2008). Embora vacinas indutoras de imunidade celular não sejam capazes de bloquear a infecção viral, modelos animais têm demonstrado que essa abordagem é eficiente no controle da replicação do vírus (Hansen *et al*, 2009; Wilson *et al*, 2009). Portanto, a expectativa é de que tais vacinas sejam capazes de controlar a viremia também no contexto humano, prevenir a destruição acentuada de células T CD4⁺ de memória e reduzir a transmissão do vírus (Barouch & Korber, 2010; Johnston & Fauci, 2007). De fato, uma baixa viremia (menor que 2.000 cópias de RNA/ml de sangue) está associada à progressão mais lenta para AIDS, assim como a uma menor taxa de transmissão (Gray *et al*, 2001; Quinn *et al*, 2000; Wawer *et al*, 2005).

Os ensaios clínicos de eficácia de vacinas contra o HIV em andamento ou encerrados são fonte de valiosas informações para o desenvolvimento de novas estratégias vacinais. A vacina AIDSVAX, desenhada para indução de anticorpos contra a proteína gp120, foi utilizada em dois estudos de eficácia de fase III, conduzidos nos Estados Unidos e Tailândia e não foi observada proteção contra a

infecção (Flynn *et al*, 2005; Pitisuttithum *et al*, 2006). O ensaio clínico de fase IIb (STEP), conduzido pela indústria farmacêutica Merck, baseou-se em uma vacina trivalente composta por adenovírus 5 codificando para as proteínas Gag, Pol e Nef do HIV-1. Este ensaio visava à indução de uma resposta imunológica celular e foi encerrado em 2007 por ausência de eficácia. Foram observadas frequências similares de resposta de linfócitos T CD8⁺ específicos contra Gag tanto em participantes que receberam a vacina como no grupo controle (40% vs 42%, respectivamente) (McElrath *et al*, 2008). A resposta de linfócitos T CD8⁺ foi direcionada a apenas um epítipo da vacina, em média, sendo observada resposta para epítipos tanto de regiões conservadas quanto não conservadas das proteínas. Análises da sequência viral dos participantes que receberam a vacina sugerem que uma pressão imunológica foi exercida pela imunização, em um momento precoce, sobre vírus fundadores da infecção (Rolland *et al*, 2009). Não houve proteção contra infecção e nem mesmo redução da viremia nos indivíduos vacinados e infectados. Essa falta de eficiência tem sido relacionada à baixa amplitude de resposta induzida (Corey *et al*, 2009; Watkins *et al*, 2008). Um regime vacinal de *prime/boost* envolvendo plasmídeos e adenovírus 5, codificando 8 dos 9 genes do SIV (exceto env), testado em macacos resos, induziu reconhecimento de uma média de 12 epítipos provenientes das proteínas Gag, Pol e Nef e se mostrou bastante protetor, enfatizando a importância da amplitude de resposta induzida na imunização (Wilson *et al*, 2009). Outros modelos experimentais envolvendo macacos resos demonstraram que vacinas capazes de induzir respostas amplas contra o SIV são eficientes no controle da infecção (Fuller *et al*, 2006; Liu *et al*, 2009; Reynolds *et al*, 2008; Sun *et al*, 2010; Wilson *et al*, 2009). A importância da amplitude de resposta no controle do SIV é sugerida por um estudo que avaliou, comparativamente, um regime de *prime/boost* (DNA-NYVAC) expressando 3 proteínas estruturais (Gag, Pol e Env), 3 proteínas regulatórias (Rev, Tat e Nef) ou a combinação dos dois. A administração da combinação de todos os antígenos resultou em competição antigênica, refletindo-se na redução da magnitude de resposta contra cada antígeno individual. Apesar disso, a resposta contra mais antígenos do vírus (ainda que em menor magnitude) pelos animais que receberam o complexo vacinal acarretou em menor carga viral na fase aguda de infecção e melhor controle da viremia por longo período (Hel *et al*, 2006).

O ensaio RV144, conduzido na Tailândia, foi concluído recentemente. Este ensaio era 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 (Rerks-Ngarm *et al*, 2009). As respostas imunológicas mais consistentes entre os participantes que receberam as vacinas foram proliferação de linfócitos T CD4⁺ e anticorpos contra gp120, além de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Não foram observados altos títulos de anticorpos neutralizantes (McElrath, 2010).

Modificações nas abordagens vacinais têm sido sugeridas após o encerramento dos últimos ensaios clínicos e a qualidade da resposta imunológica induzida é uma das questões a ser levada em consideração. As células polifuncionais, ou seja, células capazes de desempenhar muitas funções, como proliferação e produção simultânea de várias citocinas, são relacionadas à qualidade da resposta imunológica e têm sido foco de novas estratégias vacinais (Seder *et al*, 2008). Algumas observações provenientes de estudos com pacientes infectados e modelos vacinais em primatas não humanos corroboram com a importância da qualidade da resposta a ser induzida por uma vacina. Foi observado que pacientes infectados pelo HIV-2 possuíam uma resposta de células T CD4⁺ e CD8⁺ antígeno específica com características mais polifuncionais do que pacientes infectados pelo HIV-1 e isto poderia estar associado ao melhor prognóstico daqueles pacientes (Duvall *et al*, 2008). Constatou-se também que indivíduos controladores de elite infectados pelo HIV-1 possuíam uma resposta celular polifuncional mais acentuada do que os indivíduos não controladores e os sob HAART (Owen *et al*, 2010). Modelos experimentais também sugerem que as células polifuncionais sejam importantes. Macacos resos infectados pelo SIVmac239 submetidos a uma imunização passiva após a infecção, com anticorpos neutralizantes, tiveram uma rápida indução de células T CD4⁺ polifuncionais vírus específicas na fase aguda. Na fase crônica, apesar da ausência de anticorpos neutralizantes, a viremia manteve-se controlada e isto foi acompanhado pela presença de células polifuncionais específicas contra Gag (Yamamoto *et al*, 2009). Células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória efetora, produtoras de IFN- γ , TNF- α e MIP-1 β foram associadas ao sucesso no controle da infecção pelo SIVmac239 conseguido com imunização utilizando o RhCMV como vetor vacinal (Hansen *et al*, 2009).

Além da qualidade da resposta induzida, os antígenos a serem incluídos nas formulações vacinais também têm um papel de destaque na eficiência das vacinas. A proteína Gag é muito imunogênica e respostas celulares específicas contra tal

proteína vêm sendo associadas a um melhor controle da carga viral (Kiepiela *et al*, 2007). Vif é a proteína acessória mais reconhecida, somente ficando atrás das proteínas altamente imunogênicas Nef, Gag e Pol (Masemola *et al*, 2004). Foi observado que primatas capazes de controlar a infecção pelo SIV (controladores de elite) apresentam respostas precoces de linfócitos T CD8⁺ específicas contra Vif e Nef, sugerindo um papel protetor de tais respostas (Yant *et al*, 2006). Enquanto respostas imunes celulares induzidas contra Gag, Pol, Nef e Vif têm sido relacionadas a uma maior proteção contra a infecção em modelos experimentais, as respostas celulares induzidas contra o envelope mostram-se contraditórias e muitas vezes ineficientes. De fato, macacos *pigtail*, imunizados com um regime de *prime/boost* (DNA-FPV-VV) codificando Gag, Pol (SIV_{mac239}), Tat, Rev e Env (HIV-1), capazes de estabelecer respostas de linfócitos T CD8⁺ específicas contra Env, apresentavam carga viral equivalente a dos animais que não possuíam esse tipo de resposta, após desafio com SHIV_{mn229}. Além disso, apenas uma melhora discreta na retenção do número de linfócitos T CD4⁺ na periferia foi observada nos respondedores contra Env. Em contraste, os animais que estabeleceram uma resposta de linfócitos T CD8⁺ específica contra Gag apresentaram controle da carga viral superior e uma grande vantagem na retenção do número de linfócitos T CD4⁺ na periferia, quando comparados a animais que não desenvolviam o mesmo tipo de resposta. Em outro estudo do mesmo grupo foi observado que a resposta de linfócitos T CD8⁺ contra Env induzida por imunização terapêutica (PBMC pulsado com peptídeos de Gag ou peptídeos provenientes das 9 proteínas de SIV_{mac239}) em macacos *pigtail* não era capaz de impactar significativamente a replicação viral ou a progressão da doença. Além disso, foi constatado que os respondedores contra apenas Gag eram capazes de controlar melhor a replicação viral do que aqueles que apresentavam respostas contra Gag e Env, sugerindo uma interferência da resposta celular contra Env na eficiência vacinal (Peut & Kent, 2007; Peut & Kent, 2009). A interferência do envelope do HIV-1 na resposta induzida por vacinas foi também sugerida por outro grupo após observações de que tanto células dendríticas quanto células 293T, expressando Env de vários isolados do HIV em sua superfície, eram capazes de inibir a ativação e a proliferação de células T CD4⁺, *in vitro*, em resposta a anti-CD3 (Fernando *et al*, 2007). De fato, é descrito na literatura que a proteína gp120 do HIV-1, assim como alguns de seus peptídeos derivados, possui propriedades imunossupressoras, tanto sobre células da resposta imune inata quanto da adaptativa. Foi observado que um peptídeo derivado da gp120 pode induzir a redução da expressão e da função dos receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 em monócitos (Deng *et al*, 1999). Além disso,

demonstrou-se que a gp120 é capaz de inibir a ativação de células dendríticas plasmocitóides mediada por TLR9 e a consequente produção de IFN- α (Martinelli *et al*, 2007). Foi observado também que a ativação de células T reguladoras CD4⁺ após incubação de PBMC humano com gp120 era suficiente para proteger camundongos NOD-Scid em um modelo experimental de doença do enxerto contra hospedeiro (Becker *et al*, 2009).

As vacinas indutoras de resposta celular contra o HIV-1 desenvolvidas até o momento são em sua maioria destinadas a induzir respostas mediadas por linfócitos T CD8⁺ (Watkins, 2008). Entretanto, a participação dos linfócitos T CD4⁺ na imunidade contra o HIV-1, evidenciada por estudos com pacientes infectados, e modelos de vacinas experimentais têm corroborado com a importância do desenvolvimento de uma vacina indutora de tal subtipo celular. De fato, foi observado que a vacinação de macacos resos com o vírus atenuado SIVmac239 Δ nef induziu alta frequência de células T CD4⁺ efectoras e resultou no controle da viremia tanto após desafio com um vírus homólogo ao vacinal quanto após desafio heterólogo (Gauduin *et al*, 2006; Reynolds *et al*, 2008; Wyand *et al*, 1999). Em outro estudo com macacos resos, 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⁺ de memória efetora e os macacos foram capazes de controlar a viremia, na ausência de anticorpos neutralizantes. Quatro macacos vacinados controlaram a infecção do vírus na mucosa e não demonstraram disseminação sistêmica do mesmo (Hansen *et al*, 2009). Foi observado que células T CD4⁺ específicas para Nef e Gag eram capazes de eliminar macrófagos infectados pelo SIV, sugerindo um papel efetor direto destas células no combate a reservatórios do vírus (Sacha *et al*, 2009). Além disso, a imunização de macacos resos depletados de linfócitos T CD4⁺ reduziu a proteção mediada por linfócitos T CD8⁺ contra o desafio com o SIVmac251, demonstrando a importância da resposta conjunta destes subtipos celulares no controle da infecção (Vaccari *et al*, 2008).

As vacinas testadas até o momento são, em sua maioria, compostas por genes ou proteínas inteiras do HIV-1. Dessa forma, as mutações de escape induzidas pela pressão do sistema imunológico permanecem no imunógeno, o que pode estar relacionado ao baixo potencial de proteção das mesmas (McElrath *et al*, 2008; Rerks-Ngarm *et al*, 2009). Além disso, a imunodominância observada em regimes de imunização com proteínas inteiras é sugerida como redutora da amplitude de resposta, uma vez que a resposta imunológica acaba sendo direcionada a apenas alguns

epitopos imunodominantes (Mok *et al*, 2008; Sercarz *et al*, 1993; Toes *et al*, 1997). Vacinas multiepitópicas poderiam contornar o problema relacionado ao acúmulo de mutações nos imunógenos ao abordar regiões conservadas e excluir regiões flanqueadoras (podem ter mutações que afetam o processamento), abolindo assim mecanismos de escape de processamento, apresentação e reconhecimento imunológicos (Allen *et al*, 2004) além de potencialmente aumentar a amplitude da resposta imune induzida ao reduzir a imunodominância característica de vacinas baseadas em proteínas inteiras. As vacinas baseadas em epitopos podem combinar múltiplos epitopos de células T alinhados e focar a resposta imune no grupo de epitopos selecionados, como por exemplo, epitopos conservados e altamente antigênicos. Nessa estratégia vacinal cada epitopo isoladamente pode ser imunogênico e algumas observações já foram feitas sobre a capacidade dessas vacinas em induzir respostas amplas e potentes (Fuller *et al*, 2007; Ishioka *et al*, 1999; Tenzer *et al*, 2009). De fato, foi observado que vacinas multiepitópicas foram capazes de proteger camundongos BALB/c contra desafios utilizando *Plasmodium yoelli* e *P. c. adami* (Bharadwaj *et al*, 1998; Scorza *et al*, 2005).

A grande diversidade genética do HIV-1 exige o desenvolvimento de vacinas que sejam capazes de induzir uma imunidade protetora ampla, contra as diversas variantes circulantes do vírus. As vacinas de mosaico, baseadas em algoritmos que recombinam sequências do HIV-1, são exemplos de estratégias que têm como objetivo melhorar a cobertura vacinal (Fischer *et al*, 2007). Estudos experimentais realizados em macacos resos sugerem que essas estratégias podem ser eficientes para induzir respostas celulares amplas, em diferentes contextos de imunização (Barouch *et al*, 2010; Santra *et al*, 2010). A utilização de regiões conservadas entre vários subtipos do vírus, assim como sequências consenso do grupo M do HIV-1 também têm sido testadas por alguns grupos a fim de contornar o problema da diversidade viral (Letourneau *et al*, 2007; Rolland *et al*, 2007). As vacinas compostas por regiões de múltiplos subtipos virais também têm sido utilizadas visando contornar o mesmo problema (Catanzaro *et al*, 2006; Chakrabarti *et al*, 2005; Graham *et al*, 2006; Kong *et al*, 2003; Malm *et al*, 2005; Seaman *et al*, 2005).

No contexto de vacinas indutoras de respostas imunes contra regiões conservadas entre os subtipos circulantes do HIV-1, foi observado que macacos resos imunizados com um plasmídeo codificando para o envelope do HIV-1 (sequência consenso do grupo M) ou um plasmídeo codificando para a mesma proteína (isolado subtipo B) desenvolveram respostas celulares equivalentes contra peptídeos do

envelope de um isolado do subtipo B não homólogo. Além disso, foi observado que os macacos imunizados com a sequência consenso do grupo M desenvolveram respostas celulares mais intensas contra peptídeos do envelope de isolados dos subtipos A, C e G, quando comparados a macacos imunizados com a sequência do subtipo B (Santra *et al*, 2008). Três linhagens de camundongos (incluindo BALB/c) foram imunizadas com imunógenos codificando para o envelope do HIV-1. Os animais que receberam a sequência consenso do grupo M desenvolveram uma resposta celular mais intensa contra peptídeos do envelope dos subtipos A, B e C, quando comparado aos animais imunizados com as sequências não homólogas dos mesmos subtipos ou até mesmo aqueles imunizados com a combinação das três sequências (Weaver *et al*, 2006). Até o momento, entretanto, nenhuma vacina foi desenhada para induzir, em grande cobertura populacional, uma resposta ampla de linfócitos T CD4⁺ contra peptídeos conservados entre os vários subtipos circulantes do HIV-1.

Tendo em vista a importância da indução de uma resposta mediada por linfócitos T CD4⁺ no desenvolvimento de uma vacina contra o HIV-1, assim como os benefícios previamente descritos sobre a inclusão de múltiplos epitpos em uma vacina, a utilização de algoritmos de predição de epitopos para linfócitos T CD4⁺ pode ser uma ferramenta interessante no desenvolvimento de estratégias vacinais contra o HIV-1. O algoritmo TEPITOPE, estruturado para predição de epitopos para linfócitos T CD4⁺, baseia-se em matrizes matemáticas, determinadas a partir de dados quantitativos de ligação entre todos os resíduos de aminoácidos naturais e os bolsões de interação presentes em moléculas HLA-DR. Uma pontuação de ligação peptídeo-HLA-DR é gerada para cada região de 9 aminoácidos da proteína varrida com o algoritmo. Peptídeos que possuem alta pontuação de interação são sinalizados como potenciais ligadores a moléculas de HLA-DR descritas no algoritmo (Sturniolo *et al*, 1999). A identificação de trechos da proteína previstos de se ligarem a múltiplas moléculas HLA-DR permite assim a seleção de epitopos promíscuos, considerados importantes no desenvolvimento de vacinas que visam induzir respostas imonológicas com grande cobertura populacional. A eficiência desse algoritmo tem sido demonstrada em diversos campos de pesquisa, compreendendo desde doenças infecciosas e alérgicas até o estudo do câncer (de Lalla *et al*, 1999; Fonseca *et al*, 2005a; Fonseca *et al*, 2005b; Iwai *et al*, 2007; Schroers *et al*, 2002). Além disso, foi evidenciado que epitopos identificados com este algoritmo possuem propriedades que os permitem se ligar a moléculas MHC de classe II de outras espécies, como camundongos BALB/c (BenMohamed *et al*, 2003; Rosa *et al*, 2006).

Com o auxílio do algoritmo TEPITOPE, o nosso grupo identificou 18 peptídeos na sequência consenso do subtipo B do HIV-1. Foi observado em teste de ligação peptídeo-HLA-DR que a maioria dos peptídeos se ligou a pelo menos 50% das moléculas testadas. Além disso, cada molécula HLA-DR se ligou a múltiplos peptídeos, a maioria se ligando a 10 ou mais. Estes peptídeos foram reconhecidos por células mononucleares do sangue de mais de 90% dos pacientes infectados pelo HIV-1, avaliados no estudo. Em média, cada paciente reconheceu 5 peptídeos, considerando a produção de IFN- γ tanto por células T CD4⁺ quanto CD8⁺. (Fonseca *et al*, 2006). Uma vacina de DNA (HIVBr18) codificando esses peptídeos mostrou-se bastante imunogênica em camundongos transgênicos para moléculas HLA de classe II, apresentando grande amplitude de resposta (16 dos 18 peptídeos reconhecidos) e grande cobertura vacinal, sendo observadas respostas imunes contra os peptídeos codificados pela vacina em todas as linhagens de camundongos utilizadas (Ribeiro *et al*, 2010). A vacina HIVBr18 mostrou-se também capaz de induzir uma resposta ampla, polifuncional e de longa duração em camundongos BALB/c (Rosa *et al*, 2011). Essa plataforma vacinal aborda conceitos importantes no desenvolvimento de uma vacina contra o HIV-1. Dentre os conceitos abordados, a inclusão de múltiplos epitopos para linfócitos T CD4⁺, conservados entre as variantes circulantes do subtipo B do HIV-1 compõe a estratégia de induzir uma resposta imune forte, mediada por esse subtipo celular, potencialmente capaz de contornar o problema do escape imunológico relacionado à diversidade viral. Além disso, esse desenho vacinal visa induzir respostas imunes com grande cobertura populacional, via inclusão de epitopos promíscuos, previstos de se ligarem a múltiplas moléculas HLA-DR.

Baseado nos resultados promissores obtidos por nosso grupo, o presente estudo tem como objetivo desenvolver uma vacina de DNA capaz de induzir uma resposta imune, mediada por linfócitos T CD4⁺, mais ampla que a observada nas imunizações com HIVBr18, assim como estender a cobertura da diversidade viral, antes focada apenas no subtipo B, para todos os principais subtipos virais circulantes no mundo. Além disso, pretende-se avaliar a influência da resposta imune induzida contra peptídeos do envelope do HIV-1 sobre a resposta imune induzida contra peptídeos de outras proteínas do vírus. Para isso, almeja-se desenhar uma vacina de DNA codificando um maior número de peptídeos promíscuos e conservados para linfócitos T CD4⁺ do que o presente na vacina HIVBr18 e desenhar também uma vacina de DNA codificando peptídeos do envelope do HIV-1, utilizando como base a sequência consenso dos consensos do grupo M do HIV-1.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho é avaliar a imunogenicidade de vacinas de DNA codificando peptídeos do HIV-1 em camundongos BALB/c

2.2. Objetivos específicos

1. Identificar grande número de peptídeos da sequência consenso dos consensos do grupo M do HIV-1, potencialmente reconhecidos por linfócitos T CD4⁺.
2. Construir vacinas de DNA codificando os peptídeos identificados.
3. Avaliar o efeito do aumento no número de peptídeos do HIV-1 codificados por uma vacina de DNA sobre a amplitude e magnitude da resposta imune induzida pela vacina HIVBr18.
4. Avaliar a influência da co-imunização com uma vacina de DNA codificando peptídeos do envelope do HIV-1 sobre a imunogenicidade de uma vacina de DNA codificando peptídeos das outras proteínas do vírus.

3. Metodologia

3.1. Seleção dos peptídeos

Utilizamos a sequência consenso dos consensos do proteoma completo do HIV-1, grupo M, obtida em <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html> para fazer a seleção dos peptídeos vacinais. A fim de identificar os peptídeos para linfócitos T CD4⁺ potencialmente promíscuos nós utilizamos o algoritmo TEPITOPE (Sturniolo *et al*, 1999) com um limiar de ligação de 5% (o peptídeo selecionado possui características que o incluem no grupo dos 5% melhores ligadores a moléculas HLA-DR, testados para o desenvolvimento do algoritmo). Selecionamos 34 peptídeos de 15-24 aa, pertencentes à 8 das 9 proteínas do HIV-1, previstos de se ligarem a, pelo menos, 18 das 25 moléculas de HLA-DR determinadas pela matriz do algoritmo. Os peptídeos selecionados foram então alinhados com as sequências consenso dos subtipos A, B, C, D, F, G e H do HIV-1, utilizando-se o programa BioEdit. Aqueles peptídeos que possuíam todos os seus aminoácidos conservados em, pelo menos, 50% dos subtipos foram escolhidos.

3.2. Construção dos plasmídeos codificando os peptídeos selecionados

Desenhemos dois genes sintéticos codificando os 34 peptídeos selecionados. Um gene foi desenhado para codificar, de forma concatenada, os 27 peptídeos do HIV-1 selecionados: protease (53-75), protease (79-95), RT (343-357), RT (354-368), RT (369-391), RT (413-427), RT (431-445), RT (528-546), integrase (28-43), integrase (69-85), integrase (96-113), integrase (216-235), integrase (249-268), p17 (72-90), p17(131-132)/p24(1-18), p24 (33-48), p24 (127-145), p24 (138-153), p24 (182-201), vif (1-15), vif (142-158), rev (9-27), vpr (29-42), vpr (58-80), vpu (13-26), nef (67-87) e nef (133-156). O outro gene sintético foi desenhado para codificar, de forma concatenada, os 7 peptídeos pertencentes ao envelope do HIV-1: gp160(483-502), gp160(516-531), gp160(553-576), gp160(678-694), gp160(692-711), gp160(757-772) e gp160(790-808). As sequências dos peptídeos foram separadas por sequências codificando espaçadores GPGPG, para evitar a formação de epitopos juncionais e, consequentemente, possíveis interferências no processamento e apresentação dos mesmos (Livingston *et al*, 2002). As sequências de nucleotídeos dos genes sintéticos foram otimizadas com códons preferencialmente utilizados por mamíferos e uma sequência de Kozak foi incluída na terminação 5', a fim de favorecer a expressão protéica. Os genes sintéticos desenhados foram sintetizados (EZBiolab, USA <http://www.ezbiolab.com>) e sub-clonados no vetor de expressão pVAX1 (Invitrogen),

utilizando-se as enzimas de restrição EcoRI e Xho I (Invitrogen). Os plasmídeos gerados foram denominados HIVBr27 (codifica para 27 peptídeos do HIV-1) e HIVenv7 (codifica para 7 peptídeos do envelope do HIV-1). A presença dos insertos e a orientação dos mesmos dentro dos plasmídeos vacinais foram determinadas por sequenciamento direto, utilizando o oligonucleotídeo T7. O plasmídeo vacinal HIVBr18, que codifica para 18 epitopos da sequência consenso do subtipo B do HIV-1, foi obtido como descrito previamente (Ribeiro *et al*, 2010).

3.3. Transformação de bactérias DH5α por choque térmico

Para a transformação, aproximadamente 200 ng do DNA plasmidial foram adicionados em tubos de microcentrífuga contendo alíquotas de 100 µL de bactérias DH5α competentes. Após incubação em gelo por 30 minutos, os tubos foram colocados a 42°C por 2 minutos e recolocados em gelo por 5 minutos. Em seguida, acrescentaram-se 400 µL de meio SOC e os tubos foram incubados a 37°C por 1 hora, sob agitação. O volume total da mistura foi semeado em placas de LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina (Sigma) e estas foram incubadas a 37°C durante 14-16h para seleção dos clones resistentes ao antibiótico.

3.4. Extração e purificação do DNA plasmidial

A purificação em larga escala dos plasmídeos vacinais HIVBr27, HIVenv7 e HIVBr18, bem como do vetor vazio pVAX1, foi feita utilizando-se o “kit” Endofree Giga Plasmid Purification da Qiagen. Inicialmente foi realizada a cultura de bactérias *E. coli* DH5α, transformadas com cada plasmídeo em 5 mL de meio LB líquido (Invitrogen) contendo ampicilina (100(g/mL). A cultura das bactérias transformadas com cada plasmídeo foi incubada durante 8 horas a 37°C sob agitação (250 rpm) (Orbital Shaker Hepa Filter – Thermo Forma). A seguir, cada cultura foi diluída na razão de 1:500 em 2,5 litros de LB líquido, contendo ampicilina (100(g/mL) e incubada novamente a 37°C sob agitação (250rpm) durante 16 horas. Após esse período, o material foi centrifugado à 6000g por 15 minutos a 4°C (SORVALL RC5C Instrument). O sobrenadante foi desprezado e o pellet de bactérias foi ressuspenso em 125 mL de tampão P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM e RNase). Posteriormente, foram adicionados 125mL de tampão P2 (NaOH 200 mM; SDS 1 %) e esperou-se 5 minutos para a completa lise da parede bacteriana. Em seguida, adicionou-se 125 mL do

tampão P3 (acetato de potássio 3,0 M pH 5,5) para neutralização da reação. A solução com as bactérias lisadas foi então transferida para um filtro cedido pelo “kit” e mantida em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente, para que todo o material composto pela parede e genoma bacterianos flutuasse sobre o líquido contendo o DNA de interesse. Após esse período o líquido foi filtrado à vácuo, lavado com 50 mL do tampão FWB2 (acetato de potássio 1M, pH 5,0) e mantido no gelo por 30 minutos após adição de 30mL de tampão para remoção de endotoxinas. O filtrado foi aplicado em uma coluna de cefarose (Qiagen) previamente equilibrada com 75mL de tampão QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15% e Triton X-100 0,15 %). Após a aplicação do filtrado, a resina foi lavada com 600mL de tampão QC (NaCl 1,0 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %) e o DNA plasmidial foi eluído com 100 mL de tampão QN (NaCl, 25 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %). O DNA eluído foi precipitado com 70mL de isopropanol e centrifugado a 14.000g por 30 minutos a 4°C. Posteriormente o DNA foi lavado com 10mL de etanol 70% (em água livre de endotoxinas) e centrifugado a 14000g por 10 minutos a 4°C. Finalmente o pellet foi ressuspenso em 2,0 mL de água estéril livre de endotoxinas.

3.5. Quantificação e avaliação da integridade dos plasmídeos purificados

Após a purificação dos plasmídeos como descrito acima, foi realizada a quantificação e a avaliação da integridade dos produtos purificados. A quantificação dos plasmídeos foi realizada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 a 280nm, utilizando-se o aparelho Nanodrop Spectrophotometer ND-1000. A avaliação da integridade dos plasmídeos foi feita utilizando-se as enzimas de restrição: i) EcoRI e Xho I para pVAX1, HIVBr27 e HIVenv7 ii) Hind III e Xho I para HIVBr18. Em síntese, aproximadamente 400ng dos plasmídeos foram incubados à 37°C de 2 à 4 horas com as respectivas enzimas (1U/μg) e seus respectivos tampões (React II) na concentração de 1x. Em seguida, os produtos da digestão de cada amostra foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 %. Para isso, as amostras foram ressuspenso em tampão de eletroforese para concentração final de 1x (0,25% azul de bromofenol; 40% de sacarose em água) e o material foi submetido à eletroforese em tampão TAE (Tris-acetato 40mM; EDTA 1 mM pH 8) à 140V por aproximadamente 1hora. O padrão Ready load 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen) foi utilizado como marcador de peso molecular. O gel foi corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídio (Invitrogen) e a visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta no aparelho

Multimage™ Light Cabinet Filter Positions (Software Alpha Imager).

3.6. Síntese dos peptídeos

Os 34 peptídeos da sequência consenso dos consensos do HIV-1 selecionados neste estudo foram sintetizados em fase sólida pela empresa *GL Biochem* (Shanghai) Ltda, utilizando-se a estratégia de Fmoc. A pureza e qualidade dos peptídeos foram determinadas por cromatografia líquida de alto desempenho e por espectrometria de massa, mostrando valores frequentemente superiores a 90%. Os peptídeos correspondentes aos 18 peptídeos presentes no plasmídeo vacinal HIVBr18 foram sintetizados em fase sólida no nosso laboratório, utilizando-se a estratégia de Fmoc. A pureza e qualidade dos peptídeos foram determinadas como descrito acima, resultando também em valores frequentemente superiores a 90%.

3.7. Camundongos e imunizações

Camundongos isogênicos fêmeas de 6 a 8 semanas de idade da linhagem BALB/c (H-2^d) 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 prédio do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IMT/FMUSP). Os experimentos envolvendo os animais foram realizados de acordo com o guia do comitê ético da Universidade de São Paulo. Os camundongos (6 animais por grupo) receberam uma injeção de 10 mM de cardiotoxina (Sigma) cinco dias antes da imunização. Os grupos experimentais foram divididos em pVAX1 vazio, HIVBr18, HIVenv7, HIVBr27 e HIVenv7+HIVBr27. A imunização foi realizada em 3 doses, administradas nas semanas 0, 2 e 4. Os animais receberam 50 µL de DNA em cada quadríceps (1µg/µL), totalizando 100 µg de DNA por animal a cada dose. Os animais co-imunizados (HIVenv7+HIVBr27) receberam 50 µL, em cada quadríceps, de uma solução contendo 100 µg de cada plasmídeo. Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ duas semanas após a última imunização.

3.8. Suspensão de células esplênicas

Camundongos BALB/c imunizados foram sacrificados 2 semanas após a última dose e os baços foram retirados. As células esplênicas foram obtidas após maceração do órgão e foram lavadas com 10 mL de meio RPMI (Gibco) e centrifugadas a 1700 RPM por 6 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram tratadas com tampão hemolítico ACK (NH_4Cl 0.15M, KHCO_3 1mM, Na_2EDTA 0.1mM) e lavadas duas vezes com meio RPMI (10 mL por lavagem). Ao final das lavagens, as células foram ressuspensas em 1mL de meio RPMI completo (meio RPMI suplementado com L-glutamina 2 mM (Sigma), solução de aminoácidos não essenciais (1% vol/vol) (Gibco), piruvato de sódio 1mM, 2 β -Mercaptoetanol 5×10^{-5} M (Sigma), 10% vol/vol de soro fetal bovino (Gibco) e os antibióticos Gentamicina (40 $\mu\text{g/mL}$) e Peflacin (20 $\mu\text{g/mL}$)).

3.9. Ensaio de proliferação celular contra peptídeos individuais do HIV-1

Esplenócitos recém isolados (concentração de 100×10^6 células/mL) foram ressuspensos em PBS pré-aquecido e marcados com 1.25 μM de CFSE durante 10 minutos a 37°C. Em seguida, o material foi centrifugado a 1700rpm por 6 minutos e a reação interrompida pela adição de 5mL de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino. As células foram lavadas duas vezes pelo processo de centrifugação a 1700rpm por 6 minutos, adicionando meio RPMI (5 mL por lavagem). Finalmente as células foram ressuspensas em meio RPMI completo e contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer. As células foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo U (Nunc) na concentração de 1.5×10^6 /mL em volume final de 200 μL de RPMI completo por poço, na presença ou ausência de peptídeos sintéticos derivados do HIV-1, em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 por 5 dias. Os peptídeos sintéticos selecionados correspondem aos epitopos para linfócitos T CD4^+ utilizados nas construções e foram adicionados às culturas na concentração de 5 μM . Os controles positivos foram estimulados com 2mg/mL de Concanavalina A (Sigma). Todas as culturas foram feitas em triplicatas. Após 5 dias, a placa de cultura de fundo U (Nunc) foi centrifugada a 1300rpm por 6 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 150 μL de MACS *buffer* (PBS com 0,5% de BSA e 2mM de EDTA) no primeiro poço de cada triplicata, a fim de se juntar o conteúdo celular de cada triplicata em um único poço. As células foram então transferidas para uma placa de cultura de 96 poços em fundo V (Nunc). A placa em fundo V foi centrifugada a 1300rpm por 6 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram marcadas em volume final de 50 μL de MACS *buffer*,

contendo os anticorpos anti-CD3-PE (BD Pharmingen), anti-CD4-PerCP (BD Pharmingen) e anti-CD8-APC (BD Pharmingen), ao abrigo da luz por 40 minutos a 4°C. As células foram lavadas duas vezes com 150µL de MACS *buffer* e ressuspensas em volume final de 200µL de MACS *buffer*. As amostras foram adquiridas usando-se o citômetro FACScanto (BD Biosciences) e analisadas com o auxílio do *software* FlowJo (versão 8.7.1, Tree Star). Para se avaliar a proliferação celular, foram adquiridos 50×10^3 eventos no “gate” de linfócitos. A porcentagem proliferativa de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (células CFSE^{baixo}) foi determinada na população celular CD3⁺ e definida como positiva quando superior ao *cutoff*, em pelo menos 75% dos experimentos realizados. O *cutoff* foi determinado pela média mais 3 desvios padrões da proliferação obtida dos esplenócitos provenientes de camundongos imunizados com pVAX1 vazio, estimulados com cada peptídeo individual.

3.10. Marcação intracelular de citocinas e proliferação celular

Esplenócitos recém isolados (concentração de 100×10^6 células/mL) foram ressuspensos em PBS pré-aquecido e marcados com 1.25 µM de CFSE durante 10 minutos a 37°C. As células foram lavadas, contadas e ressuspensas em meio RPMI completo, como descrito anteriormente para o ensaio de proliferação celular. As células foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo U (Nunc) na concentração de 2.5×10^6 /mL em volume final de 200µL de RPMI completo por poço. Os esplenócitos dos animais de cada grupo de imunização foram estimulados com seus respectivos *pools* de peptídeos. As células do grupo imunizado com HIVBr18 foram estimuladas com o *pool* de 18 peptídeos, as células do grupo HIVBr27 com o *pool* de 27 peptídeos, as células do grupo HIVenv7 com o *pool* de 7 peptídeos. As células do grupo co-imunizado com HIVenv7+HIVBr27 foram estimuladas com os *pools* de 7 peptídeos, de 27 peptídeos ou com um *pool* composto pela soma dos dois anteriores (*pool* de 34 peptídeos). O primeiro estímulo foi feito no primeiro dia de cultura com 5µM do *pool* de peptídeos. Os controles positivos foram estimulados com 2,5µg/mL de Concanavalina A (Sigma). Todas as culturas foram feitas em triplicatas. As células foram mantidas em cultura por 5 dias, a 37°C e 5% de CO₂. No quarto dia de cultura as células foram reestimuladas com 5µM dos diferentes *pools* de peptídeos ou com 2,5µg/mL de Concanavalina A (Sigma). Além disso, foram adicionados 2µg/ml do co-estímulo anti-CD28 por poço de cultura. As células foram mantidas em estufa por 1h na presença dos estímulos e então foram adicionados 0,2µL de Brefeldina A (BD GolgiPlug™) por poço. A placa de cultura foi novamente colocada na estufa e as células foram

incubadas por mais 12h a 37°C e 5% de CO₂. A placa em fundo U foi então centrifugada e as células transferidas para uma placa em fundo V (Nunc), como descrito anteriormente para o ensaio de proliferação celular. A placa em fundo V foi centrifugada a 1300rpm por 6 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram 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 foram 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 foram 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-TNFα-PE-Cy7 (BD Pharmingen), anti-IL-2-PE (BD Pharmingen) e anti-IFNγ-APC (BD Pharmingen) por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas duas vezes com 150µL de MACS *buffer* e ressuspensas em volume final de 200µL de MACS *buffer*. As amostras foram adquiridas usando-se o citômetro FACScanto (BD Biosciences) e analisadas com o auxílio do *software* FlowJo (versão 8.7.1, Tree Star). Para se avaliar a proliferação e o perfil de produção de citocinas das células, foram adquiridos 500x10³ eventos no “gate” de linfócitos. A porcentagem proliferativa de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (células CFSE^{baixo}) foi determinada na população celular CD3⁺ e definida como positiva quando superior ao *cutoff*. Este foi determinado pela média mais 3 desvios padrões da proliferação obtida dos esplenócitos provenientes de camundongos imunizados com pVAX1 vazio, estimulados com cada *pool* de peptídeos.

3.11. ELISPOT para IFN-γ

Os ensaios de ELISPOT foram realizados utilizando-se os sets *anti-mouse* IFN-γ (BD). O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Em síntese, o anticorpo de captura (*purified anti-mouse* IFN-γ) foi adicionado à placa na concentração de 5µg/mL em volume final de 100µL e estocado durante a noite à 4°C. Em seguida os poços foram lavados com 200µL de RPMI contendo 10% de soro fetal bovino e foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com meio RPMI (10%SFB) 200µL/poço por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados os estímulos: meio RPMI, como controle negativo, Con A (2,5µg/poço) como controle positivo e peptídeos do HIV-1 (5µM) em um volume final de 100µL, assim como as suspensões celulares na concentração de 3 x 10⁵ células/poço

também em volume final de 100µL, sendo todos preparados em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino e 30U/mL de IL-2 recombinante humana. A placa foi novamente incubada a 37 °C na estufa a 5% de CO₂ durante a noite. Posteriormente as placas foram lavadas 2x com água deionizada e 3x com PBS-0.05%Tween 20. O anticorpo de detecção (anti IFN-γ biotinilado) foi diluído em PBS-10%SFB e adicionado aos poços (volume 100 µL/poço) na concentração final de 2µg/mL e incubado novamente durante 2hs à temperatura ambiente. Após lavagem dos poços 3x com PBS-0.05%Tween 20, o conjugado enzimático (streptavidin-HRP) foi diluído em PBS-10% SFB para concentração final de 1x e adicionado aos poços (100 µL/poço), seguido de mais uma etapa de incubação de 1h à temperatura ambiente. Para revelação, os poços foram lavados 4x com PBS-0.05%Tween 20 e posteriormente 2x com PBS. Foram adicionados então 100µL da solução final de substrato/poço AEC (3-amino-9-ethylcarbazole - BD) e a formação de spots foi monitorada de 5 – 60 minutos, levando em consideração o aumento do background nos poços que eram controle negativo. Passado esse período o corante foi retirado e a reação foi interrompida com 5 lavagens da placa com água deionizada.

A contagem dos *spots* foi realizada em Microscópio automatizado (Zeiss) com auxílio do *software* KS-ELISPOT (Zeiss) e os resultados foram expressos em número de *spots* por 10⁶ células. Foram considerados positivos os estímulos cujo número de *spots*/milhão de células foi superior ao *cutoff* do experimento em questão. O *cutoff* foi definido como sendo a média de *spots* mais 3 desvios padrões, obtido na análise do grupo pVAX1 vazio, estimulado com os peptídeos individuais, codificados pelas vacinas. O valor determinado para o *cutoff* foi de 15 *spots*/milhão de células.

3.12. Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5®. O Teste T de *Student* foi utilizado para comparar um parâmetro entre dois grupos. O Teste *Two Way Anova* seguido do pós teste *Bonferroni* foram utilizados para comparações entre mais de dois grupos ou comparações de vários parâmetros.

4. Delineamento experimental

5. Resultados

5.1. Identificação de peptídeos promíscuos e conservados do HIV-1 para linfócitos T CD4⁺

A fim de desenvolver uma nova vacina de DNA contra o HIV-1, capaz de induzir imunidade a diversos subtipos virais circulantes no mundo, obtivemos a sequência consenso dos consensos do grupo M do HIV-1 do ano de 2004 em <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html> para posterior determinação de potenciais epitopos para linfócitos T CD4⁺. A sequência consenso dos consensos é resultado do alinhamento das sequências consenso dos subtipos A, B, C, D, F, G, H, J e K do HIV-1.

A identificação dos peptídeos do HIV-1 para linfócitos T CD4⁺ foi feita com o auxílio do algoritmo TEPITOPE (Sturniolo *et al*, 1999), utilizando-se um limiar de ligação de 5%. O limiar utilizado é um pouco mais permissivo que o limiar de 3%, utilizado para identificação dos peptídeos codificados pela vacina HIVBr18. Isto permitiu a identificação de um maior número de peptídeos do HIV-1, potencialmente reconhecidos por linfócitos T CD4⁺.

Com o intuito de desenvolver uma vacina capaz de induzir uma resposta imune ampla, na maioria dos indivíduos vacinados, contra um grande número de isolados do HIV-1, selecionamos os peptídeos previstos de se ligarem a, pelo menos, 18 das 25 moléculas de HLA-DR descritas pelo TEPITOPE. Os peptídeos selecionados foram então alinhados com as sequências consenso dos subtipos A1, B, C, D, F1, F2, G e H do HIV-1, utilizando-se o programa BioEdit. Aqueles peptídeos que possuíam todos os seus aminoácidos conservados em, pelo menos, 50% dos subtipos foram escolhidos (figura 6).

Identificamos um total de 50 peptídeos com o algoritmo TEPITOPE. Após a análise de conservação dos aminoácidos entre os subtipos do HIV-1, feita com o BioEdit, obtivemos um número final de 34 peptídeos do HIV-1, pertencentes a 8 das 9 proteínas principais. Os peptídeos selecionados estão distribuídos ao longo do proteoma do HIV-1 da seguinte forma: 7 peptídeos de Env, 13 de Pol, 6 de Gag, 2 de Vif, 1 de Rev, 2 de Vpr, 1 de Vpu e 2 de Nef. Os peptídeos selecionados possuem uma sequência central que pode conter um ou mais *cores* de 9 aminoácidos. O aminoácido P1 de cada *core* é sempre determinado como hidrofóbico. Pelo menos 2 aminoácidos flaqueadores foram adicionados a cada lado da sequência central de nãoâmeros dos peptídeos a fim de facilitar a interação dos mesmos com TCR. Os flaqueadores da porção inicial dos

peptídeos integrase (249-268) e nef (133-156) são também componentes de *cores* presentes nesses peptídeos. O número de resíduos de aminoácidos dos peptídeos selecionados variou entre 14 e 24. A tabela 1A contém informações a respeito dos peptídeos selecionados, como a localização na sequência HXB2, o número de resíduos de aminoácidos, a sequência e a porcentagem das moléculas de HLA-DR descritas pelo algoritmo que cada peptídeo foi previsto de se ligar. A tabela 2 mostra o número de mutações presentes nas sequências consenso dos subtipos do HIV-1 em relação aos peptídeos identificados na sequência consenso do grupo M. As sequências dos isolados do HIV-1 depositadas em *Los Alamos HIV database* foram também alinhadas com os peptídeos identificados utilizando-se o recurso *Quick Align* da própria base de dados. A tabela 3 mostra as frequências de isolados do HIV-1, independente do subtipo do vírus, determinadas de acordo com o número de mutações em relação aos peptídeos identificados na sequência consenso do grupo M. Não foi possível determinar a frequência de mutantes em relação ao peptídeo vpr (58-80). A tabela 1 dos anexos mostra a sequência dos peptídeos codificados pela vacina HIVBr18, previamente desenvolvida por nosso grupo.

Para determinarmos se a imunização de camundongos BALB/c com vacinas de DNA codificando para os peptídeos selecionados induziria resposta imunológica nesses animais, utilizamos o algoritmo PRED^{BALB/c} (Zhang *et al*, 2005) para prever a ligação dos peptídeos às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II de camundongos BALB/c. O algoritmo PRED^{BALB/c} possui matrizes matemáticas de predição baseadas em testes de ligação entre peptídeos e moléculas MHC de camundongos BALB/c e inclui predição para o conjunto completo de moléculas MHC de classe I (H2-D^d, H2-K^d e H2-L^d) e classe II (I-A^d e I-E^d). O limiar de positividade utilizado para a avaliação dos epitopos foi de 8,0. Como mostrado na tabela 1B, todos os 34 peptídeos foram previstos de se ligarem a, pelo menos, uma molécula MHC de classe II de camundongos BALB/c. Além disso, 30 dos 34 peptídeos foram previstos de se ligarem a, pelo menos, uma das moléculas MHC de classe I de camundongos BALB/c (os peptídeos gp160(516-531), RT(343-357), p24(182-201) e vif(1-15) não foram previstos de se ligar a moléculas MHC de classe I).

Estes resultados demonstram que os peptídeos identificados cobrem grande parte das proteínas do HIV-1 e apresentam potencial de se ligar a múltiplas moléculas de HLA-DR. Além disso, o algoritmo PRED^{BALB/c} previu que os peptídeos

identificados são potenciais ligantes de moléculas MHC de classe I e II de camundongos BALB/c, tornando possível a análise da imunogenicidade dos mesmos nessa linhagem animal.

Figura 5: Identificação de peptídeos pelo algoritmo TEPITOPE. O algoritmo TEPITOPE possui matrizes matemáticas que representam perfis de ligação de peptídeos a 25 moléculas de HLA-DR frequentes na população caucasiana. Na região esquerda da janela (destacada em verde) pode-se observar a representação das 25 moléculas de HLA-DR descritas pelo algoritmo. A sequência protéica de interesse é varrida pelo algoritmo e os peptídeos com alta pontuação de ligação a cada uma das moléculas de HLA-DR são sinalizados em azul. O aminoácido âncora P1 (hidrofóbico) de cada peptídeo é sinalizado em vermelho. Peptídeos previstos de se ligarem a várias moléculas de HLA-DR (pelo menos 18 das 25 moléculas descritas) foram denominados promíscuos e selecionados.

Figura 6: Alinhamento dos peptídeos identificados com as sequências consenso dos subtipos do HIV-1. As sequências consenso dos subtipos do HIV-1 disponíveis em *Los Alamos HIV database* (<http://www.hiv.lanl.gov>) foram alinhadas com os peptídeos identificados utilizando-se o programa BioEdit. As sequências dos peptídeos do consenso dos consensos, identificados como ligadores a múltiplas moléculas HLA-DR, estão marcadas em preto. Posições com sequência idêntica ao consenso dos consensos são identificadas como pontos. As mutações são mostradas com letras correspondentes aos aminoácidos mutados para cada posição na sequência. A cor de cada letra reflete o grupo funcional dos aminoácidos. As sequências que possuíam cada uma de suas posições de aminoácidos conservados em, pelo menos, 50% dos subtipos foram selecionadas. A) Peptídeo não selecionado devido à grande frequência de mutações em relação aos consensos dos subtipos do HIV-1. B) Peptídeo conservado entre os subtipos e selecionado.

Peptídeo	Nº de resíduos	Sequência de aminoácidos	% de ligação a moléculas de HLA-DR
gp160(483-502)	20	LYKYKVVKIEPLGVAPT KAK	100
gp160(516-531)	16	GAV FL GFLGAAGSTM G	92
gp160(553-576)	24	SNL L RAIEAQ QHLL QLTVWGI KQL	76
gp160(678-694)	17	WLWY KIF MIVGGL I G	100
gp160(692-711)	20	LIG L RIVFAV L SIVNRV RQG	100
gp160(757-772)	16	WDD L RSLCLFSY HRLR	88
gp160(790-808)	19	WEAL KYL W NLL QYW GQELK	84
protease(53-75)	23	FIK V RQYDQIL I ECG KKA IGTV	80
protease(79-95)	17	PTP V NIGRN MLTQ IGC	80
RT(343-357)	15	QEP F KNLKTGYAK M	76
RT(354-368)	15	YAK M RS AHTNDV KQL	72
RT(369-391)	23	TEA V QKI ATESI VIW GKTPK FRL	80
RT(413-427)	15	EW E FVNT PPLV KLWY	72
RT(431-445)	15	KE I VGAET FV DGA	92
RT(528-546)	19	KE KV YLSW VPA HKGIGNE	76
integrase(28-43)	16	LPPI V AK EVAS CDKC	76
integrase(69-85)	17	EGK I LVA VH VASGY E	92
integrase(96-113)	18	ET A Y FIL KL AG RWPVK I	84
integrase(216-235)	20	QIT KIQ N FRV Y RDS RDPIW	84
integrase(249-268)	20	V VIQ DN SD IKV PPR KAK II	100
p17(72-90)	19	SE E L RS LYNT VAT LYCV HQ	88
p17(131-132)/p24(1-18)	20	NY P IVQ N LQ QGM V HQA ISPR	88
p24(33-48)	16	SPE V IP MFS AL SEG AT	96
p24(127-145)	19	GE IY KRW IIL GLNK IV RM Y	100
p24(138-153)	16	LN KI VR MY SPV SIL DI	100
p24(182-201)	20	KN W MT TETLL VQ NAN PDCK TI	80
vif(1-15)	16	MENRWQ VM IVWQ VDR	84
vif(142-158)	17	VGS LQY LALTAL ITPKK	72
rev(9-27)	18	DE E LL KA V RI KILYQ SNP	100
vpr(29-42)	14	EA V R HFP RPWL HGL	72
vpr(58-80)	23	EAI IR LQ QLLF HFRIGC QHSR	100
vpu(13-26)	14	IV ALI IA IV V WTIV	100
nef(67-87)	21	GFP V RPQ VPL RPMTY KGA FDL	84
nef(133-156)	24	I RY PLT FGW CFKL VPVDP RE EEA	84

Tabela 1A: Peptídeos promíscuos e conservados do HIV-1. A primeira coluna mostra a localização de cada peptídeo na sequência HXB2 do HIV-1, disponível na base de dados de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>). Peptídeos novos, ainda não descritos como epitopos para linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺, na base de dados de Los Alamos, estão marcados em verde. O número de resíduos, a sequência de aminoácidos e a porcentagem de ligação de cada peptídeo às moléculas de HLA-DR descritas pelo algoritmo são também mostrados. Os resíduos flanqueadores e âncoras P1 hidrofóbicos são mostrados em preto e vermelho, respectivamente, na coluna com a sequência de aminoácidos de cada peptídeo. Os resíduos que compõem cada *core* dos nonâmeros são representados em azul.

Peptídeo	Predição H2-D ^D	Predição H2-K ^D	Predição H2-L ^D	Predição I-A ^D	Predição I-E ^D
gp160(483-502)	9.78	8.46	5.30	9.60	9.80
gp160(516-531)	7.94	6.20	4.02	9.60	8.68
gp160(553-576)	8.58	8.42	6.22	9.70	9.90
gp160(678-694)	9.40	9.60	4.70	8.40	9.50
gp160(692-711)	9.20	8.20	4.22	9.60	9.90
gp160(757-772)	8.50	6.00	6.12	9.02	9.16
gp160(790-808)	9.20	8.50	7.40	9.30	9.90
protease(53-75)	9.40	7.00	5.72	8.64	9.60
protease(79-95)	9.70	6.10	4.70	8.72	8.40
RT(343-357)	8.58	6.00	5.30	8.96	9.80
RT(354-368)	7.66	5.26	5.96	9.60	9.16
RT(369-391)	9.66	7.58	5.36	9.42	9.60
RT(413-427)	9.30	9.70	7.50	8.30	9.18
RT(431-445)	9.20	8.00	7.50	9.60	9.22
RT(528-546)	8.96	6.10	7.50	9.60	9.70
integrase(28-43)	9.60	6.10	5.96	9.60	10.00
integrase(69-85)	9.20	8.98	5.04	9.70	9.76
integrase(96-113)	10.00	6.00	4.60	9.10	10.00
integrase(216-235)	9.40	9.12	5.38	9.30	9.80
integrase(249-268)	9.96	6.10	6.00	9.70	9.90
p17(72-90)	9.66	9.40	7.40	9.50	9.64
p17(131-132)/p24(1-18)	9.60	5.66	6.20	9.70	9.50
p24(33-48)	8.82	6.10	6.82	9.10	5.12
p24(127-145)	9.40	8.90	5.78	7.24	9.82
p24(138-153)	9.66	8.96	6.50	9.50	9.70
p24(182-201)	7.74	6.16	7.00	9.70	10.00
vif(1-15)	7.98	5.70	5.04	8.64	9.14
vif(142-158)	9.40	9.40	7.80	9.70	9.34
rev(9-27)	10.00	7.24	4.00	9.60	9.70
vpr(29-42)	8.30	6.20	7.68	8.42	8.06
vpr(58-80)	8.18	7.74	7.60	9.56	9.60
vpu(13-26)	8.42	8.28	1.50	9.50	8.20
nef(67-87)	9.46	6.00	7.50	8.90	9.80
nef(133-156)	9.62	9.24	7.80	9.60	9.80

Tabela 1B: Predição de ligação dos peptídeos às moléculas MHC de classe I e II de camundongos BALB/c. O algoritmo PRED^{BALB/c} (<http://cvc.dfci.harvard.edu/balbc/>) foi utilizado para predição de ligação dos peptídeos às moléculas MHC de classe I e II de camundongos BALB/c. O limiar de positividade adotado foi de 8,0. Os valores acima do limiar encontram-se em negrito.

Peptídeos			Número de aminoácidos mutados em relação ao consenso dos subtipos do HIV-1							
Identificação	N° de resíduos	Sequência	A1	B	C	D	F1	F2	G	H
gp160(483-502)	20	LYKYKVVKIEPLGVAPTKAK	1	0	3	1	1	0	4	2
gp160(516-531)	16	GAFLGFLGAAGSTMG	0	1	0	1	0	1	1	1
gp160(553-576)	24	SNLLRAIEAQHLLQLTVWGKQL	1	1	1	1	1	1	0	2
gp160(678-694)	17	WLWYIKIFMIVGGLIG	0	1	0	0	0	0	0	0
gp160(692-711)	20	LIGLRIVFAVLSIVNRVRQG	2	1	1	1	1	1	0	1
gp160(757-772)	16	WDDLRSCLCLFSYHRLR	0	0	0	1	3	2	0	2
gp160(790-808)	19	WEALKYLWNLQYWGOELK	3	3	4	1	3	1	2	1
protease(53-75)	23	FKVRQYDQILIECGKKAIGTV	1	1	0	1	3	2	1	3
protease(79-95)	17	PTPVNIIGRNMLTQIGC	0	1	1	1	0	0	1	1
RT(343-357)	15	QEPKRLKTKGYAKM	2	1	0	1	0	3	2	0
RT(354-368)	15	YAKMRSATNDVKQL	2	2	1	2	0	3	2	1
RT(369-391)	23	TEAVQKIATESIVWGKTPKRL	6	1	1	1	1	3	3	0
RT(413-427)	15	EWEFVNTPLVVKLWY	0	0	0	0	0	0	0	1
RT(431-445)	15	KEPIVGAETFPYVDGA	1	0	1	1	1	1	3	3
RT(528-546)	19	KEKVLVSWVPAHKGGGNE	1	1	1	1	0	1	0	0
integrase(28-43)	16	LPPIVAKEIVASCDKC	0	1	0	1	1	1	0	0
integrase(69-85)	17	EGKIILVAVHVASGYIE	1	0	0	1	0	0	0	1
integrase(96-113)	18	ETAYRLKLAGRPVKVI	2	2	1	2	1	1	0	1
integrase(216-235)	20	QITKIQNFRVYRDSRDPW	0	1	1	1	1	2	0	2
integrase(249-268)	20	VVIQDNSDIKVVPRKAKII	1	1	1	2	0	1	1	0
p17(72-90)	19	SEELRSLYNTVATLYCVHQ	1	0	2	1	1	0	2	4
p17(131-132)/p24(1-18)	20	NYPVQNQQQMVHQAISPR	3	0	0	0	0	0	1	1
p24(33-48)	16	SPEVIPMFSALSEGAT	0	0	1	0	0	0	0	0
p24(127-145)	19	GEYKRWIILGLNKIVRMY	1	0	1	0	1	0	0	1
p24(138-153)	16	LNKIVRMYSVPVSILDI	0	1	0	0	0	0	0	0
p24(182-201)	20	KNWMTETLLVQNANPDCKTI	2	1	0	1	1	0	1	0
vif(1-15)	16	MENRWQVMIVWQVDR	0	0	1	0	0	0	0	0
vif(142-158)	17	VGSLQYLALTALITPKK	3	1	1	0	1	0	2	2
rev(9-27)	18	DEELKAVRIIKILYQSNP	0	3	2	2	2	1	1	4
vpr(29-42)	14	EAVRHFRPWVHLGL	0	1	1	2	0	1	0	2
vpr(58-80)	23	EAIRILQQLLFIHFRIGCOHSR	2	0	0	0	1	1	0	2
vpu(13-26)	14	IVALIIAIVVWTV	1	3	0	1	0	1	2	2
nef(67-87)	21	GFPVRPQVPLRPMTYKGAFDL	1	1	1	2	1	1	0	0
nef(133-156)	24	IRYPLTRGWCRKLVVPDPREVEEA	2	2	2	1	1	2	4	3

Tabela 2: Conservação das sequências dos peptídeos selecionados entre os consensos dos subtipos do HIV-1. A identificação dos peptídeos na sequência HXB2, o número de resíduos e a sequência de aminoácidos dos mesmos são demonstrados. O número de aminoácidos não idênticos nas sequências consenso dos subtipos do HIV-1 em relação aos peptídeos selecionados é também demonstrado.

Peptídeos		Frequência de isolados do HIV-1 com mutações em relação aos peptídeos identificados						
Identificação	Sequência	0 aa	1 aa	2 aa	3 aa	4 aa	5 aa	≥6 aa
gp160(483-502)	LYKYKVVKIEPLGVAPTAK	9.70%	18.60%	20.70%	24.90%	16.70%	3.70%	5.70%
gp160(516-531)	GAVFLGFLGAAGSTMG	27.50%	46.60%	12.90%	8.90%	3.00%	0.20%	0.90%
gp160(553-576)	SNLLRAIEAQHLLQLTVWGKQL	12.30%	49.50%	26.40%	6.60%	1.60%	1.10%	2.50%
gp160(678-694)	WLWYKIRIMIVGGLIG	47.90%	33.30%	11.60%	4.60%	1.30%	0.40%	0.90%
gp160(692-711)	LIGLRIVFAVLSIVNRVRQG	7.00%	37.80%	28.90%	13.30%	5.80%	1.70%	5.50%
gp160(757-772)	WDDLRSLLCLFSYHRLR	30.00%	37.80%	17.30%	7.90%	2.30%	0.40%	4.30%
gp160(790-808)	WEALKYLWNLQYWGQELK	0.10%	4.70%	15.90%	30.60%	24.90%	13.70%	10.10%
protease(53-75)	FKVRQYDQILIEICGKKAIGTV	14.40%	21.20%	22.50%	18.60%	10.70%	6.00%	6.60%
protease(79-95)	PTPVNIIGRNMLTQIGC	19.10%	54.40%	20.60%	4.30%	0.90%	0.40%	0.30%
RT(343-357)	QEPFKNLKTGKYAKM	22.00%	39.10%	29.30%	6.70%	1.10%	1.00%	0.80%
RT(354-368)	YAKMRSANTNDVKQL	2.80%	22.50%	35.90%	28.90%	7.10%	1.00%	1.80%
RT(369-391)	TEAVQKIATESIVWGKTPKFRLL	6.00%	30.60%	29.40%	15.00%	7.30%	5.20%	6.50%
RT(413-427)	EWEPVNTPLVKLWY	86.00%	11.20%	2.40%	0.20%	0.10%	0.10%	0.00%
RT(431-445)	KEPIVGAETFYVDGA	22.80%	40.50%	25.50%	9.70%	1.00%	0.10%	0.40%
RT(528-546)	KEKVYLSWVPAHKIGGNE	17.30%	62.30%	17.30%	2.60%	0.20%	0.20%	0.10%
integrase(28-43)	LPPIVAKEIVASCDKC	36.60%	42.80%	14.30%	4.30%	1.60%	0.20%	0.20%
integrase(69-85)	EGKILVAVHVASGYIE	36.40%	47.40%	13.40%	2.00%	0.40%	0.40%	0.00%
integrase(96-113)	ETAYFLKLAGRWVVKVI	13.40%	40.00%	34.90%	9.40%	1.60%	0.40%	0.30%
integrase(216-235)	QITKIQNFRVYRDSRDIW	21.00%	50.90%	19.30%	6.60%	1.60%	0.50%	0.10%
integrase(249-268)	VVQDNSDIKVPRRKAKII	41.40%	41.80%	13.10%	2.60%	0.50%	0.20%	0.40%
p17(72-90)	SEELRSLYNTVATLYCVHQ	3.20%	12.00%	24.70%	28.40%	18.00%	6.10%	7.60%
p17(131-132)/p24(1-18)	NYPIVQNLQGQMVHQAIAPR	23.20%	29.10%	19.00%	13.70%	9.40%	2.60%	3.00%
p24(33-48)	SPEVIPMFSALSEGAT	41.50%	46.80%	9.10%	0.80%	0.80%	0.10%	0.90%
p24(127-145)	GEYKRWIILGNKIVRMV	45.40%	43.70%	7.20%	1.40%	0.50%	0.10%	1.70%
p24(138-153)	LNKIVRMVSPVSILDI	62.10%	32.50%	4.20%	0.40%	0.20%	0.03%	0.57%
p24(182-201)	KNWMTETLVQNANPDCKTI	35.30%	40.10%	18.80%	4.10%	0.60%	0.10%	1.00%
vif(1-15)	MENRWQVMVWQVDR	64.50%	28.50%	6.20%	0.80%	0.00%	0.00%	0.00%
vif(142-158)	VGSLQLALTALITPKK	5.30%	30.60%	26.30%	17.60%	12.40%	3.80%	4.00%
rev(9-27)	DELLKAVRIKLYQSNP	1.00%	8.30%	23.60%	28.10%	21.80%	11.10%	6.10%
vpr(29-42)	EAVRHFRPWVHLGL	24.70%	46.00%	25.30%	3.80%	0.20%	0.00%	0.00%
vpr(58-80)	EAIIRILQQLLRHFRIGCQHSR	20.00%	0.00%	80.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
vpu(13-26)	IVALIAIVVWTV	2.80%	12.40%	22.60%	28.90%	22.00%	8.20%	3.10%
nef(67-87)	GFPVRPQVPLRPMTYKGAFDL	10.90%	37.80%	32.00%	14.10%	3.50%	0.60%	1.10%
nef(133-156)	IRYPLTFGWCFKLVPVDPREVEEA	0.50%	6.10%	14.00%	23.00%	25.10%	18.20%	13.10%

Tabela 3: Frequência de isolados do HIV-1 de acordo com número de mutações em relação aos peptídeos identificados. A identificação dos peptídeos na sequência HXB2 e a sequência de aminoácidos dos mesmos são demonstrados. As frequências de mutantes em relação aos peptídeos identificados foram determinadas considerando todos os subtipos depositados em *Los Alamos HIV database*.

5.2. Desenho e construção dos plasmídeos vacinais

Dois plasmídeos vacinais foram desenhados para codificar os peptídeos identificados. Um plasmídeo (HIVenv7) contém o gene sintético codificando para os 7 peptídeos do envelope do HIV-1 e o outro plasmídeo (HIVBr27) contém o gene sintético codificando para os outros 27 peptídeos do HIV-1 identificados. As sequências nucleotídicas dos peptídeos estão dispostas de forma concatenada nos insertos, separadas por espaçadores codificando glicinas e prolinas (GPGPG) (Livingston *et al*, 2002). A disposição das sequências dos peptídeos nos genes pode ser observada na figura 7A. A sequência nucleotídica dos genes HIVBr27 e HIVenv7 pode ser observada na figura 7B e 7C, respectivamente. Os genes foram sintetizados e subclonados no vetor pVAX1 (EZBiolab, USA <http://www.ezbiolab.com>) (figura 7D). A eletroforese após a digestão dos plasmídeos contendo os genes HIVenv7 e HIVBr27, com as enzimas de restrição EcoRI e Xho I, mostrou ter havido a liberação dos insertos com os tamanhos próximos ao esperado de 510pb e 1884pb, respectivamente (figura 8).

Estes dados sugerem que os genes sintéticos HIVenv7 e HIVBr27, desenhados para avaliar a imunogenicidade dos peptídeos identificados, foram inseridos de forma correta no plasmídeo pVAX1 e possuem o tamanho esperado em pares de bases.

gp160(483-502)	gp160(516-531)	gp160(553-576)	gp160(678-694)	gp160(692-711)	gp160(757-772)	gp160(790-808)
-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

protease(53-75)	protease(79-95)	RT(343-357)	RT(354-368)	RT(369-391)	RT(413-427)	RT(431-445)	RT(528-546)	integrase(28-43)
integrase(69-85)	integrase(96-113)	integrase(216-235)	integrase(249-268)	p17(72-90)	p17(131-132)/p24(1-18)	p24(33-48)	p24(127-145)	p24(138-153)
p24(182-201)	vif(1-15)	vif(142-158)	rev(9-27)	vpr(29-42)	vpr(58-80)	vpu(13-26)	nef(67-87)	nef(133-156)

GAATTC
ACCCATCTGGCACCCTGGCCCCGCGCCCTGGCCCTAGCTACCCCTGTGAACATCATGGCAGGCAATATGCTG
AGCCAGATCGCGCTGCGCCCTCGCCCTGGCCGAGGAGCTTTCAGAAACCTGAAGACCGGAACATGACG
CCAGAGTGGCCCCCTGGCCCTGGCCCTGATCCGCAAGATGAGGAGCGCCCAACCAACGACGTGAAGACGCT
TGCCCCCTGGCCCTGGCCCTGACCGAGGCCCTGCAGAGATGATGCCACGAGACATGTGATCTTGGGGCAAG
GACCCCTAAGTTTCAGGCTGCGCCCTGGCCCTGGAGTGGGAGTTCTGTGAACACCCCTCTCTGTT
AGCTGTGGTATCGCCCCCTGGCCCTGGCCCTGAGAGGAGCTGTGGCCGCCGAGACCTGTGATGTGACG
CGCCCTCGCCCTGGCCCTGGCCCTGAGGAAGAAGTGTACTGATGCTGGTGCTGCCCTCAAGGCCATCGG
CGGCAACGAGGCCCCCTGGCCCTGGCTGCTGCTCTTATCTGGCCCAAGGAGATGCTGGCCACGCTGCAC
AAGTGCGCCCTGGCCCTGGCGAGGGCGAAGATCTCTTGGTGCCCTGCATCTGGCCACGCGCTACA
CTGAGCGCCCTGGCCCTGGCGAGACCGCTACTTACCTGAGTGGCTGCGCGGAGAGGTGGCTCTGTAA
GGTGATCGCCCTGGCCCTGGCCCTGCAGATCAACGAATTCAGCAAGTATCGAGGTGTATACAGAGGAGTGC
AGGGAACCTTATCTGGCGCCCTGGCCCTGGGTGTGATCTCAGGACCAACAGGACATCAAGGTGTGCT
CTAGGAGGAAGGCCAAGATCATCTGCCCTGGCCCTGGAGCGAGGAGCTGAAGAGCCTGTACAACA
CTGTGGCCACCTGTGATCTGGCTGCACACCGCCCTGGCCCTGGTAACCTACCTTGTGTGCAAGCTCT
CAGGGCGCAGATGTGACGACGAGCTATAGCCCTACGCTGCCCTGGCCCTGGAGCCCTGAGGTGATGCC
CTATGTTACGCGCCCTGAGCGAGGGCGCCACCCCGCCCTGGCCCTGGCGGCAAGTATCAACAGAGGTG
GATCATCTGTGGCCCTGGAACAAGATCTGTAGGATGTATCGCCCTGGCCCTGGCTGCAACAAGATGTT
AGGATGTACAGCCCTGTGAGCATCTGGACATCTGCCCTGGCCCTGGCAAGCACTGTGATGACCGAGA
CCCTGCTGTGTGACAGACGCAACCTGTACGACGAACCATCGCCCTGGCCCTGGCATGAGGAACAAG
TGACGAGTATGATGTGCTGTGGAGGTGACAGAGGCCCTGGCCCTGGCTGGGCGAGCTCTGCAATGAT
CTGGCCCTGAGCGCCCTGATACCCCTAAGAAGCGCCCTGGCCCTGGCGACGAGGAGCTGCTGAAGG
CCGTGAGGATCATCAAGATCTGTACGAGCAACCCCTGCCCTGGCCCTGGAGGCTGTGAGGCA
CTCTTCAGGCTCTGGCTGTCAGGCGCTGGCCCTGGCCCTGGCGAGGCACTATAGGATCTGACAG
AGCTGCTGTCTACCATCTCAGAGTGGCTGCGACGACAGCAGCGCCCTGGCCCTGGCTGATGCTGGC
CTGATCATGCTGCTGTGGTGTGGACATCTGTGCGCCCTGGCCCTGGCTGCTGCTGTGAGGCTCT
AGGTGCTCTGAGGCTATGACCTACAAAGGGCGCCTTGACCTCGCCCTGGCCCTGGCATCAGGTA
CCCTCTGACCTTGGCTGGTGTCTCAAGCTGGTGGCTGGACCTAGGAGGTTGAGGAGGAGGCCATG
CTCAGC

GAATTCGAGGAGGCTGCTGACAAGTACAAGGTGAAGATCGAAGCTCTGGGCGTGGCCCTACAA
GGCCAAAGCGCCCTGGCGTGGCGGCGCGTGTCTTGGGCTCTTGGGCGCGCCGAGCAGCATTA
GGCGGCTCTGGCCCTGGCTGAGCAAGACTCTGTGAGGGCCATGAGGCCAGCCAGCAGCTCTGACAGTGA
CCGTGTGGGGCATCAAGACGCTGCGCCCTGGCCCTGGCTGCGTGTGTATCAATGATCTCATCAT
GATCTGGGCGCGCTGATCGGCGCGCCCTGGCCCTGGCTGCGTGTGATCTGGCGTGAAGTCTGTGCT
AGCAGTCGTGAACAGGGTGAAGCGAGGCGCGCCCTGGCCCTGGCTGGGACAGCTGAGGAGCGTGT
CTGTGTCAGTACCAACAGGCTGAGGCGCGCCCTGGCCCTGGCTGGGAGGCCCTGAAGTACCTGTGGAAAC
CTGCTGAGTACCTGGGCGCGCAAGAGCTGAAGTACCTGAGTACG

Figura 7: Construção dos plasmídeos vacinais. A) Disposição dos peptídeos nos genes HIVenv7 (azul) e HIVBr27 (cinza). Sequência nucleotídica dos genes sintéticos HIVBr27 (B) e HIVenv7 (C) com otimização de códons para expressão em células de mamíferos. Estão também representados a sequência de Kozak, a sequência espaçadora que codifica GP GPG, o códon de parada e os sítios das enzimas de restrição EcoRI e Xho I. D) Mapa do vetor pVAX1, utilizado para subclonagem dos genes.

Figura 8: Análise da integridade dos genes HIVenv7 e HIVBr27, subclonados no vetor pVAX1. Após amplificação e purificação, os plasmídeos contendo os genes foram digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e Xho I e foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. O vetor pVAX1 possui 3 Kb, os genes HIVenv7 e HIVBr27 possuem 510pb e 1884pb, respectivamente. Estão representados os produtos da digestão dos plasmídeos (D) assim como o plasmídeo não digerido (ND). O padrão molecular utilizado foi o *Ready-load 1 Kb plus DNA ladder*. Algumas bandas do padrão foram sinalizadas com o seu tamanho, em pares de bases, correspondente.

5.3. Avaliação da amplitude da resposta imune induzida pelos diferentes esquemas de imunização em camundongos BALB/c

Com o objetivo de avaliar, comparativamente, a amplitude da resposta imune induzida pelos diversos esquemas de imunização, imunizamos camundongos BALB/c com 3 doses dos imunógenos HIVBr18, HIVenv7, HIVBr27, HIVenv7+HIVBr27 ou vetor vazio pVAX1. A amplitude da resposta induzida pelas vacinas foi avaliada por ELISPOT de IFN- γ e proliferação celular baseada em diluição de CFSE. A estratégia de análise adotada para avaliação da proliferação celular é mostrada na figura 1 dos anexos.

Observamos que esplenócitos provenientes de camundongos imunizados com a vacina HIVBr18 e estimulados com os peptídeos, individualmente, secretaram IFN- γ contra 7 dos 18 peptídeos codificados pela vacina (figura 9A). A co-imunização com HIVenv7+HIVBr27 induziu secreção de IFN- γ contra 9 dos 34 peptídeos codificados (figura 9B). A imunização com a vacina HIVBr27 induziu uma resposta mais ampla, sendo que esplenócitos dos animais imunizados secretaram IFN- γ contra 11 dos 27 peptídeos codificados (figura 9C). A imunização com a vacina HIVenv7 foi pouco imunogênica, induzindo secreção de IFN- γ apenas contra o peptídeo gp160 (483-502).

A imunização com a vacina HIVBr18 induziu proliferação de células T CD4⁺ contra 5 peptídeos, sendo eles: gp160 (188-201), p17 (73-89), protease (7-21), rev (11-27) e vif (144-158) (figura 2A dos anexos). Com exceção do peptídeo rev (11-27), todos os peptídeos que induziram proliferação de células T CD4⁺ também induziram secreção de IFN- γ . A imunização com HIVBr18 também induziu proliferação de células T CD8⁺, porém contra apenas 3 epitopos, sendo eles: p17 (73-89), protease (7-21) e rev (11-27) (figura 2B dos anexos). A co-imunização com HIVenv7+HIVBr27 induziu proliferação de células T CD4⁺ contra 5 peptídeos, sendo eles: gp160 (692-711), p24 (127-145), RT (369-391), RT (413-427) e integrase (216-235) (figura 3A dos anexos). A proliferação de células T CD8⁺ foi induzida contra os mesmos 5 peptídeos (figura 3B dos anexos). A imunização com HIVBr27 induziu proliferação de células T CD4⁺ contra 8 peptídeos, sendo eles: p17 (72-90), p24 (127-145), RT (369-391), RT (413-427), RT (528-546), integrase (216-235), rev (9-27) e vpr (58-80) (figura 10A). A proliferação de células T CD8⁺ foi induzida contra 6 peptídeos: p17 (72-90), p24 (127-145), RT (369-391), RT (413-427), RT (528-546) e integrase (216-235) (figura 10B). Não observamos proliferação celular antígeno específica pelos esplenócitos de camundongos imunizados com a vacina HIVenv7. Quando consideramos esplenócitos de animais imunizados com HIVBr27 ou co-imunizados com HIVenv7+HIVBr27, todos os peptídeos que induziram proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ também induziram secreção de IFN- γ . A tabela 2 dos anexos mostra um resumo dos resultados obtidos no ensaio de ELISPOT de IFN- γ e no ensaio de proliferação celular baseado em diluição de CFSE.

Estes resultados, em conjunto, demonstram que a imunização com HIVBr27 induz uma resposta imunológica mais ampla, quando comparada a HIVBr18, a

HIVenv7 ou a HIVenv7+HIVBr27, refletindo-se tanto na secreção de IFN- γ como na proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ em resposta ao estímulo com peptídeos individuais do HIV-1. Além disso, os resultados sugerem que a vacina HIVenv7 é capaz de induzir uma resposta imunomodulatória, uma vez que sua co-imunização com HIVBr27 levou a uma redução na amplitude de resposta tanto em termos de secreção de IFN- γ quanto em termos de proliferação celular antígeno específica.

Figura 9: Secreção de IFN- γ em resposta a estimulação com peptídeos individuais do HIV-1. Duas semanas após a última dose com HIVBr18, HIVenv7+HIVBr27 ou HIVBr27, esplenócitos de 6 camundongos BALB/c foram extraídos e cultivados, na presença dos peptídeos do HIV-1 (5 μ M), por 14h, a fim de se avaliar a secreção de IFN- γ em resposta aos peptídeos vacinais pelo ensaio de ELISPOT. Secreção de IFN- γ em resposta aos peptídeos da vacina HIVBr18 (A), HIVenv7+HIVBr27 (B) e HIVBr27 (C). As fatias de cada gráfico são proporcionais à quantidade de *spots* obtida nos ensaios contra cada peptídeo. Respostas acima do limiar de 15 *spots*/10⁶ células foram consideradas positivas. O número de *spots*/10⁶ células obtido no grupo controle, imunizado com o vetor pVAX1 vazio, foi subtraído de cada grupo experimental. Dados provenientes da média de 3 experimentos.

A)

B)

Figura 10: Proliferação celular contra peptídeos individuais do HIV-1, baseada no ensaio de diluição de CFSE. Duas semanas após a última dose com HIVBr27, esplenócitos de 6 camundongos BALB/c foram marcados com CFSE (1.25 μ M) e cultivados na presença de peptídeos individuais do HIV-1 (5 μ M), por 5 dias. A proliferação de células T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) antígeno específicas foi analisada por citometria de fluxo. O limiar de proliferação foi determinado pela média mais 3 desvios padrões da proliferação contra os peptídeos individuais obtido no grupo de camundongos imunizados com o vetor pVAX1 vazio. Foram considerados positivos para proliferação apenas peptídeos que induziram proliferação acima do limiar em, pelo menos, 3 dos 4 experimentos realizados.

5.4. Avaliação da magnitude e do perfil funcional da resposta imune induzida pelas diferentes estratégias de imunização em camundongos BALB/c

A fim de avaliar a magnitude e o perfil funcional das diferentes estratégias de imunização, camundongos BALB/c foram imunizados com 3 doses dos imunógenos HIVBr18, HIVenv7, HIVBr27, HIVenv7+HIVBr27 ou vetor vazio pVAX1. As respostas imunológicas (proliferação celular e produção de citocinas) foram avaliadas em resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1. O estímulo foi feito com o *pool* de peptídeos correspondente a cada grupo de imunização, ou seja, os esplenócitos dos grupos imunizados com HIVBr18, HIVenv7 ou HIVBr27 foram estimulados com os *pools* de 18, 7 ou 27 peptídeos codificados pelas vacinas, respectivamente. Os esplenócitos do grupo co-imunizado com HIVenv7+HIVBr27 foram estimulados com os *pools* de 7, 27 ou 34 peptídeos, codificados pela vacina.

Primeiramente avaliamos a secreção de IFN- γ em resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1. Os esplenócitos de camundongos imunizados com HIVBr18, HIVenv7 ou HIVBr27 foram estimulados com os *pools* de peptídeos correspondentes a cada vacina e a secreção de IFN- γ foi avaliada pelo ensaio de ELISPOT. A imunização com HIVBr27 induziu a resposta de maior magnitude, sendo detectados 316 *spots*/10⁶ células contra o *pool* de 27 peptídeos. A imunização com HIVBr18 induziu 207 *spots*/10⁶ células contra o *pool* de 18 peptídeos (figura 11A). A imunização com HIVenv7 isoladamente foi pouco imunogênica, induzindo uma resposta de 22 *spots*/10⁶ células contra o *pool* de 7 peptídeos.

Com o intuito de avaliar a influência da resposta imune direcionada a peptídeos do envelope do HIV-1 sobre a resposta imune contra peptídeos de outras proteínas do vírus, avaliamos a secreção de IFN- γ em resposta ao *pool* de 27 peptídeos codificados pela vacina HIVBr27 no grupo co-imunizado com HIVenv7+HIVBr27. Observamos uma redução de 316 *spots*/10⁶ células para apenas 183 *spots*/10⁶ células (figura 11B). Quando avaliamos a secreção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos co-imunizados com HIVenv7+HIVBr27 em resposta aos *pools* de 7 e 34 peptídeos, detectamos 74 e 237 *spots*/10⁶ células, respectivamente.

Avaliamos posteriormente a magnitude de proliferação celular contra os *pools* de peptídeos do HIV-1. Os esplenócitos de camundongos imunizados com HIVBr18, HIVenv7, HIVBr27 ou HIVenv7+HIVBr27 foram estimulados com os *pools* de peptídeos, nos dias 0 e 4 de cultura celular. Observamos que as vacinas HIVBr18 e HIVBr27 induziram proliferação em 7.0% e 8.8% das células T CD4⁺, respectivamente

(figura 12). As imunizações com HIVBr18 e HIVBr27 também foram capazes de induzir proliferação de células T CD8⁺, sendo observado valores de 6.3% e 8.5%, respectivamente (figura 12A). As imunizações com HIVenv7 e HIVenv7+HIVBr27 induziram proliferação em 0.3% e 7.2% das células T CD4⁺, quando estimulamos *in vitro* os esplenócitos com os *pools* de 7 e 34 peptídeos, respectivamente. Os valores de proliferação de células T CD8⁺ foram 1.1% e 8.9%, respectivamente. Os valores obtidos para proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ no grupo co-imunizado com HIVenv7+HIVBr27 e estimulado com o *pool* de 34 peptídeos não foram significativamente diferentes dos obtidos no grupo imunizado com HIVBr27, estimulado com o *pool* de 27 peptídeos. Entretanto, quando avaliamos a proliferação celular em resposta ao *pool* de 27 peptídeos nos grupos imunizados com HIVBr27 e HIVenv7+HIVBr27, observamos valores significativamente menores no grupo co-imunizado, sendo 8.8% e 4.8% para células T CD4⁺ e 8.5% e 4.2% para células T CD8⁺, respectivamente (figura 12B).

Avaliamos a produção das citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α por células T CD4⁺ e CD8⁺ em resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1. Para isso, esplenócitos de camundongos imunizados com as vacinas HIVBr18, HIVenv7, HIVBr27 e HIVenv7+HIVBr27 foram estimulados como descrito anteriormente para o ensaio de proliferação celular. Com o auxílio da marcação intracelular de citocinas e a citometria de fluxo, identificamos células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras das citocinas previamente citadas. A estratégia de análise adotada para avaliação intracelular da produção de citocinas pode ser observada na figura 4 dos anexos.

A imunização com HIVenv7 foi pouco imunogênica, induzindo produção das citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α com valores semelhantes ao grupo imunizado com o controle pVAX1 vazio, tanto para células T CD4⁺ quanto CD8⁺. As imunizações com HIVBr18 ou HIVBr27 induziram frequências semelhantes de células T CD4⁺ produtoras de IL-2 (0.16% e 0.20%), respectivamente. Entretanto, a imunização com HIVBr27 induziu maior frequência de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ ou TNF- α , quando comparada com HIVBr18, sendo 4.80% e 4.00% para IFN- γ e 3.60% e 2.40% para TNF- α , respectivamente (figura 13A). A imunização com HIVBr27 induziu frequências significativamente maiores de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ (2.50%) e TNF- α (1.40%) quando comparadas às obtidas na imunização com HIVBr18, com valores de 1.00% e 0.54% para IFN- γ e TNF- α , respectivamente. A frequência de células T CD8⁺ produtoras de IL-2 induzidas pela imunização com HIVBr27 e HIVBr18 foi de 0.10% e 0.22%, respectivamente (figura 13A). A co-imunização com HIVenv7+HIVBr27 induziu

frequências significativamente menores de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ ou TNF- α em resposta ao *pool* de 27 peptídeos, quando comparada a HIVBr27. Os valores foram 2.90% para IFN- γ e 2.00% para TNF- α . A frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-2 não foi significativamente diferente entre os dois grupos, sendo 0.08% e 0.2%, respectivamente (figura 13B). Assim como observado para células T CD4⁺ produtoras de citocinas, observamos que as frequências de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ ou TNF- α em resposta ao *pool* de 27 peptídeos, induzidas pela co-imunização, foram significativamente menores que as induzidas pela imunização com HIVBr27. Os valores foram 1.40% para IFN- γ e 0.70% para TNF- α . Não foi observada produção de IL-2 por linfócitos T CD8⁺ no grupo co-imunizado (figura 13B). As frequências de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras das citocinas IFN- γ , IL-2 ou TNF- α em resposta ao *pool* de 34 peptídeos foram semelhantes às encontradas para os esplenócitos de animais do grupo imunizado com HIVBr27, estimulados com o *pool* de 27 peptídeos. A frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras das citocinas IFN- γ , IL-2 ou TNF- α em resposta ao *pool* de 7 peptídeos foi muito variável entre os experimentos, mas permanecendo sempre muito abaixo dos valores obtidos para os estímulos com os *pools* de 27 e 34 peptídeos.

Figura 11: Secreção de IFN- γ em resposta a estimulação com *pool* de peptídeos do HIV-1 em camundongos imunizados com HIVBr18, HIVBr27 ou HIVenv7+HIVBr27. Duas semanas após a última dose com HIVBr18, HIVBr27 ou HIVenv7+HIVBr27, esplenócitos de 6 camundongos BALB/c foram cultivados na presença dos *pools* de peptídeos do HIV-1 (5 μ M), por 14h, a fim de se avaliar a secreção de IFN- γ pelo ensaio de ELISPOT. Os esplenócitos de camundongos imunizados com HIVBr18 foram estimulados com o *pool* de 18 peptídeos enquanto que os esplenócitos dos animais imunizados com HIVBr27 e HIVenv7+HIVBr27 foram estimulados com o *pool* de 27 peptídeos. O número de *spots*/10⁶ células obtido no grupo controle, imunizado com o vetor pVAX1 vazio, em resposta aos diferentes *pools* de peptídeos foi subtraído de cada grupo experimental. Dados provenientes da média de 3 experimentos. ***p<0.001.

Figura 12: Proliferação celular contra os *pools* de peptídeos do HIV-1, baseada em diluição de CFSE. Duas semanas após a última dose com HIVBr18, HIVBr27 ou HIVenv7+HIVBr27, esplenócitos de 6 camundongos BALB/c foram marcados com CFSE (1.25μM) e cultivados na presença dos *pools* de peptídeos do HIV-1 (5μM), por 5 dias. Os esplenócitos de camundongos imunizados com HIVBr18 foram estimulados com o *pool* de 18 peptídeos enquanto que os esplenócitos dos animais imunizados com HIVBr27 e HIVenv7+HIVBr27 foram estimulados com o *pool* de 27 peptídeos. O estímulo e o re-estímulo com os *pools* de peptídeos foram feitos no primeiro e quarto dia de cultura, respectivamente. No quarto dia de cultura foi também adicionado anti-CD28 (2μg/ml) como co-estímulo. A proliferação antígeno específica foi analisada por citometria de fluxo, considerando os *gates* CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺. Porcentagem de células T CD4⁺ (esquerda) e células T CD8⁺ (direita) que proliferam em resposta ao estímulo com os *pools* de peptídeos do HIV-1. A) Comparação entre HIVBr18 e HIVBr27. B) Comparação entre HIVBr27 e HIVenv7+HIVBr27. O valor da proliferação proveniente de células não estimuladas e o valor obtido de células do grupo pVAX1, estimuladas com os *pools* de peptídeos, foram descontados dos grupos de imunização. * (p<0.05), *** (p<0.001).

Figura 13: Produção de citocinas em resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1.

Duas semanas após a última dose com HIVBr18, HIVBr27 ou HIVenv7+HIVBr27, esplenócitos de 6 camundongos BALB/c foram extraídos e cultivados na presença dos *pools* de peptídeos do HIV-1 (5 μ 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 μ g/ml) como co-estímulo e brefeldina A (0,2 μ L/poço). As células foram marcadas em sua superfície com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, permeabilizadas e marcadas intracitoplasmaticamente com anticorpos anti-IFN- γ , anti-IL-2, anti-TNF- α e anti-CD3. A) Frequência de células T CD4⁺ (esquerda) e CD8⁺ (direita) em respostas aos *pools* de 18 (barras verdes) e 27 peptídeos (barras pretas). B) Frequência de células T CD4⁺ (esquerda) e CD8⁺ (direita) em resposta ao *pool* de 27 peptídeos nos grupos imunizados com HIVBr27 (barras pretas) e HIVenv7+HIVBr27 (barras azuis). O valor obtido no grupo pVAX1, na presença dos *pools* de peptídeos, foi descontado dos grupos de imunização. *** (p<0.001); ** (p<0.01).

Ao avaliarmos, em conjunto, a proliferação celular e a produção intracelular de citocinas, observamos que a grande maioria das células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ e TNF- α (valores em torno de 70%) em resposta aos *pools* de peptídeos estavam dentro do *gate* de células T CFSE^{baixo}, para as imunizações com HIVBr18, HIVBr27 e HIVenv7+HIVBr27. No caso da co-imunização HIVenv7+HIVBr27 os valores em torno de 70% foram observados em resposta aos *pools* de 34, 27 e 7 peptídeos, apesar da baixa imunogenicidade do último. As frequências de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IL-2 dentro do *gate* de células T CFSE^{baixo} foram em torno de 50% e 30%, respectivamente, para todas as vacinas.

Devido à observação de que grande parte das células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de citocinas estava presente dentro do *gate* de células T CFSE^{baixo}, optamos por verificar se as células T eram capazes de proliferar e produzir citocinas simultaneamente em resposta aos *pools* de peptídeos do HIV-1. As células foram marcadas e caracterizadas quanto ao fenótipo (células T CD4⁺ ou CD8⁺), quanto à capacidade proliferativa (CFSE^{alto} ou CFSE^{baixo}) e quanto à capacidade de produzir as citocinas IFN- γ , IL-2 ou TNF- α .

As imunizações com HIVBr18 e HIVBr27 induziram células T CD4⁺ capazes de proliferar e produzir IFN- γ (2.70% e 3.90%), IL-2 (0.16% e 0.26%) ou TNF- α (1.80% e 3.13%) (figura 14A). Os valores obtidos para a co-imunização HIVenv7+HIVBr27 em resposta ao *pool* de 34 peptídeos foram semelhantes aos encontrados para o grupo imunizado com HIVBr27, estimulado com 27 peptídeos. As frequências de células T CD4⁺ que proliferam e produzem IFN- γ ou TNF- α foram significativamente menores no grupo co-imunizado, estimulado com o *pool* de 27 peptídeos, quando comparado ao grupo imunizado com HIVBr27, estimulado com o mesmo *pool*. Os valores encontrados foram: 1.90% para IFN- γ e 1.60% para TNF- α . A frequência de células T CD4⁺ que proliferam e produzem IL-2 (0.11%) em resposta ao *pool* de 27 peptídeos também foi menor no grupo imunizado com HIVenv7+HIVBr27, porém não de forma significativa (figura 14B). Quando avaliamos as células T CD8⁺ que proliferavam e produziam IFN- γ ou TNF- α , observamos que a imunização com HIVBr27 foi capaz de induzir frequências significativamente maiores que a imunização com HIVBr18, sendo 1.76% e 0.96% para IFN- γ e 1.74% e 0.9% para TNF- α , respectivamente. As frequências de células T CD8⁺ que proliferam e produzem IL-2 foram 0.34% e 0.28% para HIVBr27 e HIVBr18, respectivamente (figura 14A). A co-imunização HIVenv7+HIVBr27 induziu frequências de células T CD8⁺ que proliferam e produzem citocinas em resposta ao *pool* de 34 peptídeos semelhantes às encontradas para o

grupo imunizado com HIVBr27, estimulado com o *pool* de 27 peptídeos. Assim como observado para células T CD4⁺, a estimulação de esplenócitos de animais co-imunizados utilizando-se o *pool* de 27 peptídeos induziu frequências significativamente menores de células T CD8⁺ que proliferam e produzem IFN- γ (0.98%) ou TNF- α (0.90%), quando comparado ao grupo imunizado com HIVBr27 (figura 14B). A imunização com HIVenv7 foi pouco imunogênica, sendo detectadas frequências muito baixas de células T CD4⁺ e CD8⁺ que proliferam e produzem citocinas em resposta ao *pool* de 7 peptídeos. A estimulação de esplenócitos provenientes do grupo co-imunizado com o *pool* de 7 peptídeos também induziu uma baixa frequência de células que proliferam e produzem citocinas.

Para prosseguir com as análises, utilizamos a estratégia booleana disponível no *software* Flowjo. Ela possibilita a avaliação de todas as combinações possíveis das funções desempenhadas pelas células, gerando um estudo mais detalhado das células polifuncionais induzidas pelas vacinas. A figura 5 dos anexos exemplifica a estratégia de análise adotada para identificar células polifuncionais. Observamos que as imunizações com HIVBr18, HIVBr27 ou HIVenv7+HIVBr27 induziram células T CD4⁺ polifuncionais, capazes de proliferar e produzir as citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α em diversas combinações. Ao compararmos as imunizações com HIVBr27 ou HIVBr18, observamos que a primeira foi capaz de induzir frequências significativamente maiores de células CFSE^{baixo} que produzem IFN- γ /TNF α em combinação (2.5% e 1.5%) ou somente TNF α (0.55% e 0.28%), respectivamente (figura 15A). A imunização com HIVenv7+HIVBr27 induziu frequências significativamente menores de células CFSE^{baixo} que produzem IFN- γ /TNF α em combinação (1.23%) ou somente IFN- γ (0.58%) em resposta ao *pool* de 27 peptídeos, quando comparada à imunização com HIVBr27, com valores de 2.5% para IFN- γ /TNF α e 1.16% para IFN- γ (figura 15B). O estímulo de esplenócitos de animais imunizados com HIVenv7+HIVBr27 utilizando-se o *pool* de 34 peptídeos induziu frequências semelhantes de células T CD4⁺ polifuncionais, quando comparado à imunização com HIVBr27, utilizando-se o *pool* de 27 peptídeos como estímulo. Observamos que as vacinas HIVBr18, HIVBr27 ou HIVenv7+HIVBr27 induziram frequências semelhantes de células T CD4⁺ CFSE^{baixo} produtoras de 1 citocina (em torno de 40%), 2 citocinas (em torno de 50%) e 3 citocinas (em torno de 4%) (figura 15C).

Ao analisarmos as células T CD8⁺ polifuncionais, comparando as vacinas HIVBr27 e HIVBr18, observamos que a primeira foi capaz de induzir frequências significativamente maiores de células CFSE^{baixo} que produzem IFN- γ /TNF α em

combinação (1.12% e 0.47%) ou somente TNF α (0.58% e 0.18%), respectivamente (figura 16A). A imunização com HIVenv7+HIVBr27 induziu frequências significativamente menores de células CFSE^{baixo} que produzem IFN- γ /TNF α em combinação (0.47%), IFN- γ (0.30%) ou somente TNF α (0.32%) em resposta ao *pool* de 27 peptídeos, quando comparada à imunização com HIVBr27, com valores de 1.12% para IFN- γ /TNF α , 0.59% para IFN- γ e 0.58% para TNF α (figura 16B). O estímulo de esplenócitos de animais imunizados com HIVenv7+HIVBr27 utilizando-se o *pool* de 34 peptídeos induziu frequências semelhantes de células T CD8⁺ polifuncionais, quando comparado à imunização com HIVBr27, utilizando-se o *pool* de 27 peptídeos como estímulo. Observamos que as vacinas HIVBr18, HIVBr27 ou HIVenv7+HIVBr27 induziram frequências semelhantes de células T CD4⁺ CFSE^{baixo} produtoras de 1 citocina (em torno de 50%), 2 citocinas (em torno de 40%) e 3 citocinas (em torno de 4%) (figura 16C).

Estes resultados, em conjunto, sugerem que a vacina HIVBr27 é mais imunogênica que a vacina HIVBr18, principalmente quando se considera a proliferação de células T CD8⁺ e a produção de citocinas, tanto por células T CD4⁺ quanto CD8⁺, em resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1. A imunização com a vacina HIVBr27 foi indutora de frequências significativamente superiores de células T CD4⁺ e CD8⁺ polifuncionais, quando comparada à imunização com HIVBr18. Além disso, observamos que a co-imunização de HIVenv7+HIVBr27 levou a uma redução bastante significativa na proliferação e na produção de citocinas em resposta ao *pool* de 27 peptídeos do HIV-1, tanto em células T CD4⁺ quanto CD8⁺, o que sugere um papel immunossupressor da imunização com o plasmídeo HIVenv7.

Figura 14: Proliferação celular e produção de citocinas em resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1. Duas semanas após a última dose com HIVBr18, HIVBr27 ou HIVenv7+HIVBr27, esplenócitos de 6 camundongos BALB/c foram extraídos, marcados com CFSE (1.25 μ M) e cultivados na presença do *pool* de peptídeos do HIV-1 (5 μ M), por 5 dias. Os esplenócitos de camundongos imunizados com HIVBr18 foram estimulados com o *pool* de 18 peptídeos enquanto que os esplenócitos dos animais imunizados com HIVBr27 e HIVenv7+HIVBr27 foram estimulados com o *pool* de 27 peptídeos. O estímulo e o re-estímulo com os *pools* de peptídeos foram feitos no primeiro e quarto dia de cultura. No quarto dia de cultura foram também adicionados anti-CD28 (2 μ g/ml) como co-estímulo e brefeldina A (0,2 μ L/poço). As células foram marcadas em sua superfície com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, permeabilizadas e marcadas intracitoplasmaticamente com anticorpos anti-IFN- γ , anti-IL-2, anti-TNF- α e anti-CD3. Citometria multiparamétrica foi utilizada para determinar a frequência de células T CD4⁺ (esquerda) e células T CD8⁺ (direita) capazes de proliferar e produzir IFN- γ , IL-2 ou TNF- α . A) Comparação entre as vacinas HIVBr18 e HIVBr27. B) Comparação entre as vacinas HIVBr27 e HIVenv7+HIVBr27. O valor obtido no grupo pVAX1, na presença dos *pools* de peptídeos, foi descontado dos grupos de imunização. ** (p<0.01), *** (p<0.001).

Figura 15: Frequência de células T CD4⁺ que proliferam e produzem citocinas em resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1. Duas semanas após a última dose com HIVBr18, HIVBr27 ou HIVenv7+HIVBr27, esplenócitos de 6 camundongos BALB/c foram marcados com CFSE (1.25μM) e cultivados na presença do *pool* de peptídeos do HIV-1 (5μM), por 5 dias. Os esplenócitos de camundongos imunizados com HIVBr18 foram estimulados com o *pool* de 18 peptídeos enquanto que os esplenócitos dos animais imunizados com HIVBr27 e HIVenv7+HIVBr27 foram estimulados com o *pool* de 27 peptídeos. O estímulo e o re-estímulo com os *pools* de peptídeos foram feitos no primeiro e quarto dia de cultura. No quarto dia de cultura foram também adicionados anti-CD28 (2μg/ml) como co-estímulo e brefeldina A (0,2μL/poço). As células foram marcadas em sua superfície com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, permeabilizadas e marcadas intracitoplasmaticamente com anticorpos anti-IFN-γ, anti-IL-2, anti-TNF-α e anti-CD3. Uma análise booleana foi utilizada para determinar dentro das células que proliferam, a frequência de células T CD4⁺ capazes de produzir, em qualquer combinação, as citocinas IFN-γ, IL-2 e TNF-α. A) Comparação entre as vacinas HIVBr18 e HIVBr27. B) Comparação entre as vacinas HIVBr27 e HIVenv7+HIVBr27. C) Representação, em gráfico de pizza, da porcentagem de células produtoras de 1, 2 ou 3 citocinas, para cada vacina. O valor obtido no grupo pVAX1, na presença dos *pools* de peptídeos, foi descontado dos grupos de imunização. ** (p<0.01), *** (p<0.001).

Figura 16: Frequência de células T CD8⁺ que proliferam e produzem citocinas em resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1. Duas semanas após a última dose com HIVBr18, HIVBr27 ou HIVenv7+HIVBr27, esplenócitos de 6 camundongos BALB/c foram marcados com CFSE (1.25μM) e cultivados na presença do *pool* de peptídeos do HIV-1 (5μM), por 5 dias. Os esplenócitos de camundongos imunizados com HIVBr18 foram estimulados com o *pool* de 18 peptídeos enquanto que os esplenócitos dos animais imunizados com HIVBr27 e HIVenv7+HIVBr27 foram estimulados com o *pool* de 27 peptídeos. O estímulo e o re-estímulo com os *pools* de peptídeos foram feitos no primeiro e quarto dia de cultura. No quarto dia de cultura foram também adicionados anti-CD28 (2μg/ml) como co-estímulo e brefeldina A (0,2μL/poço). As células foram marcadas em sua superfície com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, permeabilizadas e marcadas intracitoplasmaticamente com anticorpos anti-IFN-γ, anti-IL-2, anti-TNF-α e anti-CD3. Uma análise booleana foi utilizada para determinar dentro das células que proliferam, a frequência de células T CD8⁺ capazes de produzir, em qualquer combinação, as citocinas IFN-γ, IL-2 e TNF-α. A) Comparação entre as vacinas HIVBr18 e HIVBr27. B) Comparação entre as vacinas HIVBr27 e HIVenv7+HIVBr27. C) Representação, em gráfico de pizza, da porcentagem de células produtoras de 1, 2 ou 3 citocinas, para cada vacina. O valor obtido no grupo pVAX1, na presença dos *pools* de peptídeos, foi descontado dos grupos de imunização. * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).

6. Discussão

Neste trabalho nós identificamos com o auxílio do algoritmo TEPITOPE 34 peptídeos do HIV-1, conservados, promíscuos e potencialmente reconhecidos por linfócitos T CD4⁺. A imunização de camundongos BALB/c com HIVBr27, codificando 27 dos 34 peptídeos identificados, foi capaz de induzir uma resposta de amplitude e magnitude superiores às obtidas com a vacina HIVBr18, previamente desenvolvida pelo grupo. Além disso, foi observado que a co-imunização de HIVenv7 (que codifica 7 peptídeos de Env do HIV-1 identificados) juntamente com HIVBr27 acarretou na redução da amplitude e magnitude de resposta induzida por essa, sugerindo uma papel imunossupressor do plasmídeo HIVenv7.

Uma vez que o algoritmo TEPITOPE (Sturniolo *et al*, 1999) é capaz de prever, em uma sequência protéica, regiões potencialmente ligadoras a múltiplas moléculas HLA-DR, o presente estudo utilizou-se do mesmo para identificação dos peptídeos a serem incluídos nas vacinas de DNA. Isto foi feito com o intuito de propiciar o desenvolvimento de uma plataforma vacinal que fosse capaz de induzir uma resposta de linfócitos T CD4⁺ de grande cobertura populacional. A eficiência do algoritmo TEPITOPE em prever peptídeos promíscuos para linfócitos T CD4⁺ tem sido demonstrada em diversas áreas de pesquisa, compreendendo desde doenças infecciosas e alérgicas até o estudo do câncer (de Lalla *et al*, 1999; Fonseca *et al*, 2005a; Fonseca *et al*, 2005b; Iwai *et al*, 2007; Schroers *et al*, 2002). Entretanto, como o TEPITOPE trata-se de um algoritmo de predição, testes de ligação peptídeo-HLA-DR são necessários para se confirmar a promiscuidade dos peptídeos identificados.

Devido ao fato do presente trabalho ter como objetivo avaliar a imunogenicidade de vacinas de DNA codificando peptídeos identificados com o algoritmo TEPITOPE em camundongos BALB/c (H-2^d), a viabilidade do mesmo poderia ser afetada por esse algoritmo prever ligação de peptídeos a moléculas HLA-DR e não ligação a H-2^d. Já foi observado que peptídeos identificados com o TEPITOPE possuem propriedades que os permitem se ligar a moléculas MHC de classe II de outras espécies, inclusive camundongos BALB/c (BenMohamed *et al*, 2003; Rosa *et al*, 2006; Rosa *et al*, 2011). Apesar disso, procuramos confirmar a viabilidade da utilização da linhagem de camundongos mencionada fazendo uma predição de ligação dos peptídeos identificados às suas moléculas MHC de classe I e II utilizando o algoritmo PRED^{BALB/c} (Zhang *et al*, 2005). Todos os peptídeos identificados foram previstos de se ligarem a moléculas MHC de classe I e/ou II de camundongos BALB/c, dando um suporte à execução do presente estudo.

O nosso grupo em trabalho anterior identificou, com o auxílio do TEPITOPE, 18 peptídeos na sequência consenso do subtipo B do HIV-1. Foi observado em teste de ligação peptídeo-HLA-DR que a maioria dos peptídeos identificados se ligou a pelo menos 50% das moléculas testadas e que cada molécula HLA-DR se ligou a múltiplos peptídeos, o que reforça a capacidade do algoritmo de prever peptídeos promíscuos (Fonseca *et al*, 2006). A identificação dos peptídeos foi feita com um limiar de predição de 3%, ou seja, cada peptídeo selecionado possuía características que o incluíam no grupo dos 3% melhores ligadores a moléculas HLA-DR, testados para o desenvolvimento do algoritmo. Uma vacina de DNA (HIVBr18) codificando esses peptídeos mostrou-se bastante imunogênica em camundongos transgênicos para moléculas HLA de classe II, apresentando grande amplitude de resposta (16 dos 18 peptídeos reconhecidos) e grande cobertura vacinal, sendo observadas respostas imunes contra os peptídeos codificados pela vacina em todas as linhagens de camundongos utilizadas (Ribeiro *et al*, 2010). Esta vacina também foi imunogênica em camundongos BALB/c, sendo observada uma resposta ampla e de grande magnitude contra seus peptídeos (Rosa *et al*, 2011). Neste estudo, visando desenvolver uma vacina capaz de induzir uma resposta imune ainda mais ampla e de maior magnitude que a observada na imunização com a vacina HIVBr18, utilizamos o limiar de ligação do TEPITOPE de 5%, ou seja, cada peptídeo selecionado possuía características que o incluíam no grupo dos 5% melhores ligadores a moléculas HLA-DR. Isto foi feito com o intuito de diminuir a estringência de análise e, conseqüentemente, selecionar uma quantidade de peptídeos superior a do estudo anterior. De fato, o limiar de predição é passível de mudança e pode variar de acordo com o objetivo de cada estudo a ser realizado (Bian & Hammer, 2004). A estratégia acima mencionada foi eficaz e com isso conseguimos identificar, na sequência consenso dos consensos do grupo M do HIV-1, 34 peptídeos promíscuos e conservados entre os subtipos virais, potencialmente reconhecidos por linfócitos T CD4⁺. É válido ter em mente que a redução na estringência de análise, entretanto, pode levar à identificação de peptídeos que não se ligam de fato a moléculas HLA-DR ou que possuem baixo poder de ligação, afetando negativamente a imunogenicidade da vacina composta por tais peptídeos.

Neste estudo, a construção de plasmídeos vacinais codificando peptídeos de 15 a 24 aminoácidos em detrimento de proteínas inteiras do HIV-1 condiz primeiramente com o objetivo de induzir uma resposta mediada por linfócitos T CD4⁺ (facilitado com o uso do algoritmo TEPITOPE para identificação dos peptídeos). Além disso, a

imunização com múltiplos peptídeos concatenados consegue evitar a imunodominância observada em regimes de imunização com proteínas inteiras (Mok *et al*, 2008; Sercarz *et al*, 1993; Toes *et al*, 1997).

O desenvolvimento de uma vacina indutora de uma resposta imune ampla contra o HIV-1 foi determinado em nosso estudo com o objetivo de promover uma imunidade capaz de contornar os problemas relacionados às mutações de escape frequentemente sofridas pelo vírus e, conseqüentemente, ser mais eficiente no controle da replicação viral. Nesse contexto, é interessante notar que os linfócitos T CD4⁺ (alvos diretos da nossa plataforma vacinal), ao contrário dos linfócitos T CD8⁺, toleram um número maior de mutações em seus epitopos alvos (Wilson *et al*, 2004), sendo possivelmente mais capazes de lidar com a diversificação do HIV-1.

O estudo *STEP*, encerrado em 2007, fornece indícios de que uma resposta ampla contra o HIV-1 seja necessária para conferir um controle eficaz da replicação viral, uma vez que sua falta de eficácia é relacionada à baixa amplitude de resposta observada nos indivíduos vacinados (Barouch & Korber, 2010; Corey *et al*, 2009; Watkins *et al*, 2008). De fato, a amplitude de resposta mediada por linfócitos T CD8⁺ foi considerada um forte correlato de controle da infecção pelo HIV-1 e da progressão para AIDS (Chouquet *et al*, 2002). Diversos trabalhos surgiram após o encerramento do estudo *STEP* e modelos experimentais envolvendo macacos resos demonstram que vacinas capazes de induzir respostas amplas contra o SIV são eficientes no controle da infecção (Fuller *et al*, 2006; Hel *et al*, 2006; Liu *et al*, 2009; Reynolds *et al*, 2008; Sun *et al*, 2010; Wilson *et al*, 2009). Nesse contexto, avaliamos se a vacina HIVBr27 (que codifica 27 dos 34 peptídeos identificados nesse estudo) seria capaz de induzir uma resposta mais ampla comparada à obtida com HIVBr18 e ser, assim, mais promissora que essa no controle da replicação do HIV-1. De fato, como almejado, observamos que a vacina HIVBr27 foi capaz de induzir produção de IFN- γ e proliferação celular contra um maior número de peptídeos quando comparada a HIVBr18. É interessante notar que a vacina HIVBr27 induziu reconhecimento de 11 peptídeos do HIV-1, número próximo ao obtido com uma vacina eficaz no controle da replicação do SIV após desafio heterólogo, que foi indutora de resposta contra 12 peptídeos desse vírus (Wilson *et al*, 2009). Ainda em relação a números, é sugerido que uma resposta imune efetiva contra pelos menos 5 peptídeos, localizados em regiões de importância funcional e estrutural para o SIV, seja capaz de controlar a replicação viral como fazem as terapias antiretrovirais ou até mesmo os anticorpos neutralizantes (Watkins, 2008). A vacina HIVBr27, por induzir uma resposta imune

contra múltiplas regiões conservadas do HIV-1, é uma estratégia que vai de encontro às informações citadas anteriormente, visto que sequências conservadas geralmente se encontram em regiões importantes para o desenvolvimento funcional e estrutural do vírus (Altfeld & Allen, 2006).

É interessante notar que todos os peptídeos da vacina HIVBr27 capazes de induzir proliferação de células T CD8⁺ também induziram proliferação de linfócitos T CD4⁺. Essa resposta convergente entre os dois subtipos celulares em primeiro lugar sugere a coexistência de motivos ligadores a MHC de classe I e II nos peptídeos selecionados e pode indicar a presença de auxílio cognato desempenhado por células T CD4⁺, como visto em diversos contextos de respostas imunológicas (Hwang *et al*, 2007; Kumaraguru *et al*, 2005; Nchinda *et al*, 2010; Ryu *et al*, 2009; Smith *et al*, 2004). Entretanto, análises mais detalhadas da resposta funcional de células T CD8⁺ são necessárias para confirmar essa observação. Mesmo assim, a utilização da vacina HIVBr27 como fonte de auxílio cognato para vacinas indutoras de resposta mediada por linfócitos T CD8⁺ é factível e deve ser abordada em estudos posteriores. Outra importante observação neste trabalho foi a de que a vacina HIVBr27 induziu secreção de IFN- γ e proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ contra um maior número de peptídeos de Pol que a vacina HIVBr18, sendo 4 e 1, respectivamente. Isto poderia influenciar positivamente no impacto da imunização com a vacina HIVBr27 sobre o controle da replicação do HIV-1, visto que as proteínas derivadas de Pol são tidas como bastante imunogênicas (Masemola *et al*, 2004). De fato, foi observado que uma resposta celular contra essa região se relacionava a uma melhor preservação do número de linfócitos T CD4⁺ em um modelo vacinal eficaz contra o SIV (Martins *et al*, 2010).

Em contraste à vacina HIVBr18, desenhada para induzir resposta contra regiões conservadas do subtipo B do HIV-1, a vacina HIVBr27 aborda a indução de uma resposta contra regiões conservadas entre os diversos subtipos circulantes do vírus. Esse fato condiz com a importância de se desenvolver uma vacina que forneça controle da replicação viral em escala global, principalmente se levarmos em consideração que a África, região mais afetada pela pandemia de AIDS, possui registros de infecção por vários subtipos e formas recombinantes circulantes do HIV-1. De fato, alguns grupos vêm desenvolvendo estratégias vacinais para contornar a barreira imposta pela variabilidade genética do HIV-1. As vacinas de mosaico, baseadas em algoritmos que recombina sequências do vírus, são um exemplo de estratégia que tem como objetivo melhorar a cobertura vacinal (Fischer *et al*, 2007).

Estudos experimentais realizados em macacos resos sugerem que essa estratégia pode ser eficiente para induzir respostas celulares amplas, em diferentes contextos de imunização (Barouch *et al*, 2010; Santra *et al*, 2010). Vacinas compostas por regiões de múltiplos subtipos virais, assim como pertencentes à sequência consenso do grupo M, também têm sido utilizadas visando induzir respostas imunológicas que forneçam proteção em diversos contextos de infecção pelas variantes circulantes do HIV-1 (Catanzaro *et al*, 2006; Chakrabarti *et al*, 2005; Graham *et al*, 2006; Kong *et al*, 2003; Letourneau *et al*, 2007; Malm *et al*, 2005; Rolland *et al*, 2007; Seaman *et al*, 2005). Apesar da vacina HIVBr27 ser baseada na sequência consenso dos consensos do grupo M do HIV-1, como visto em vacinas de outros grupos, a nossa plataforma é desenhada para indução de resposta imune mediada por linfócitos T CD4⁺ contra múltiplos peptídeos conservados e promíscuos, proporcionando o reconhecimento dos mesmos em uma percentagem superior de indivíduos, o que de fato é inovador no campo de pesquisa de vacinas contra o HIV-1.

Além da amplitude de resposta induzida pelas vacinas HIVBr18 e HIVBr27, visamos avaliar comparativamente a magnitude e a qualidade das respostas induzidas. O nosso estudo considerou como qualidade de resposta o conceito de produção de múltiplas citocinas simultânea à proliferação das células antígeno específicas (células polifuncionais) (Seder *et al*, 2008). Observamos que a vacina HIVBr27 não somente induziu uma resposta mais ampla que a vacina HIVBr18 como também foi responsável pela indução de uma resposta de maior magnitude do que essa, tanto em termos de proliferação celular quanto produção de citocinas em resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1, fazendo daquela uma plataforma vacinal mais imunogênica que a vacina HIVBr18 e possivelmente mais eficiente do que essa no controle da replicação do HIV-1. Constatamos que a vacina HIVBr27 induziu freqüências significativamente maiores de células T CD4⁺ e CD8⁺ polifuncionais, capazes de proliferar e produzir as citocinas IFN- γ e/ou TNF- α contra o *pool* de peptídeos do HIV-1, quando comparada à HIVBr18. Esse resultado sugere que a vacina HIVBr27 seja uma candidata mais eficiente que a HIVBr18 no controle do HIV-1 visto que células polifuncionais têm sido relacionadas ao melhor prognóstico de pacientes infectados pelo HIV-2, bem como ao sucesso dos controladores de elite em manter a replicação do HIV-1 sob controle na ausência de terapia antiretroviral (Duvall *et al*, 2008; Owen *et al*, 2010). A presença de uma resposta polifuncional de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ também foi associada ao controle do SIV (Hansen *et al*, 2009; Yamamoto *et al*, 2009). Além disso, foi observado que a vacina YF-17D (eficaz contra

o vírus da febre amarela) e a vacina da varíola são fortes indutoras de células T polifuncionais (Akondy *et al*, 2009; Precopio *et al*, 2007), fato esse também associado à proteção conferida por uma vacina contra *M. tuberculosis* (Aagaard *et al*, 2009). Em conjunto, essas características sugerem que a vacina HIVBr27, desenhada para induzir uma resposta de grande cobertura populacional mediada por linfócitos T CD4⁺, direcionada a regiões conservadas entre os diversos subtipos do HIV-1 é de fato uma vacina candidata com um potencial de sucesso talvez ainda superior ao previsto para HIVBr18, justificando estudos mais detalhados da mesma em modelos envolvendo primatas não humanos ou mesmo em ensaios clínicos.

Além do estudo comparativo entre as vacinas HIVBr18 e HIVBr27, o nosso grupo também visava avaliar a interferência da co-imunização de uma vacina de DNA (HIVenv7) codificando os 7 peptídeos do envelope do HIV-1 identificados nesse estudo sobre a resposta obtida com a HIVBr27. A separação dos peptídeos acima citados, criando-se a vacina HIVenv7, foi feita após análise cuidadosa da literatura. Primeiramente, a não utilização de Env em formulações vacinais que visam induzir resposta imune celular contra SIV/HIV-1 foi sugerida em um trabalho em que se observou um controle eficaz do SIV após imunização *prime/boost* (DNA-ad5) codificando todas as proteínas do SIV, exceto Env (Wilson *et al*, 2009). Segundo, foi observado que uma resposta mediada por linfócitos T CD4⁺ após imunização de macacos resos com o vírus varicela-zoster (VVZ) atenuado, codificando Env, se correlacionava com aumento da replicação do SIV após desafio, depleção mais acelerada de linfócitos T CD4⁺ e progressão mais acentuada para AIDS (Staprans *et al*, 2004). Por último, evidências sugeriam que proteínas do envelope do HIV-1 assim como seus peptídeos derivados poderiam afetar tanto células da resposta imune inata quanto adaptativa (Becker *et al*, 2009; Deng *et al*, 1999; Fernando *et al*, 2007; Martinelli *et al*, 2007; Wang *et al*, 1995; Wilson *et al*, 1997).

Observamos que a vacina HIVenv7, quando administrada em conjunto com a vacina HIVBr27, era capaz de induzir a redução da amplitude tanto da produção de IFN- γ quanto da proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ contra os peptídeos codificados pela última. A capacidade reduzida de resposta de linfócitos T ao estímulo *in vitro* com peptídeos codificados pela HIVBr27 pode se dever a fatores como a indução de células T reguladoras no local da imunização, capazes de influenciar negativamente na formação de clones responsivos, possivelmente pela produção de citocinas imunomodulatórias como IL-10 e TGF- β . De fato, foi observado em um estudo que a expansão de células T CD4⁺Foxp3⁺ após imunização com influenza

inativado (PR8/A/34) era capaz de suprimir a resposta de linfócitos T CD4⁺ tanto primária como de memória contra o vírus (Surls *et al*, 2010). Outro mecanismo poderia ser a ligação de gp120 à superfície celular (possivelmente CXCR4) que mostrou ser capaz de induzir anergia em linfócitos T naive, dependente de sinalização via PKA, (Masci *et al*, 2003). Além disso, foi observado que o pre-tratamento de clones de linfócitos T específicos para o toxóide de tétano com gp120 era capaz de inibir a produção de IL-2 e a proliferação dessas células frente ao estímulo específico, fato esse relacionado à supressão da translocação de PKC e à redução de fosfatos de inositol e cálcio intracelular (Chirmule *et al*, 1990). A inibição da resposta *in vitro* de linfócitos T CD4⁺ ao estímulo com IL-2 também foi observada, sendo relacionada à falta de ativação da via Jak/STAT nessas células após tratamento com as proteínas gp120 e gp41 em conjunto. (Kryworuchko *et al*, 2003). A interação entre células apresentadoras de antígenos e os linfócitos poderia estar também alterada durante a co-imunização, contribuindo para baixa responsividade desses. Um estudo sugere que a indução de indoleamina 2,3 dioxigenase em células dendríticas plasmocitoides via contato gp120-CD4 é capaz de reduzir a capacidade proliferativa de linfócitos T CD4⁺ (Boasso *et al*, 2007). Em outro estudo foi observado que o tratamento de linfócitos T CD4⁺ com gp120 é capaz de inibir a ativação dessas células via anti-CD3, por interferir na expressão de CD40L nos linfócitos e CD80 (B7.1) nas células apresentadoras de antígeno (Chirmule *et al*, 1995). Também foi observado que o silenciamento de SOCS1 em células dendríticas, após tratamento *in vivo* com RNA de interferência (siRNA), era capaz de reduzir a supressão dessas células, induzida por gp120. Isto foi acompanhado pelo aumento da resposta celular e humoral contra gp120 nos animais imunizados com pCMV/R-gp140CF (Song *et al*, 2006). A exposição de células dendríticas humanas, derivadas de monócitos da medula óssea, à gp120 levou à maturação anormal dessas células, perda da capacidade aloestimulatória e ausência de produção de IL-12, com conseqüente incapacidade de induzir proliferação de células T (Fantuzzi *et al*, 2004). Estes resultados podem, pelo menos em parte, sugerir mecanismos para a redução da proliferação e da produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ contra peptídeos codificados pela HIVBr27 após co-imunização com HIVenv7. Indícios da interferência de peptídeos do envelope do HIV-1, como o gp160(579-604) e o gp160(499-511), na proliferação tanto de células T CD4⁺ quanto CD8⁺, induzida por diferentes estímulos, como anticorpos anti-CD3, concanavalina A e IL-2, foram também obtidos por outros grupos (Wang *et al*, 1995; Wilson *et al*, 1997) e dão suporte aos nossos achados. É interessante observar que os peptídeos descritos nos 2 trabalhos citados anteriormente se encontram em regiões próximas ou mesmo

compartilham alguns resíduos de aminoácidos com peptídeos presentes na vacina HIVenv7, sendo eles: gp160(483-502) e gp160(553-576). É importante mencionar que a imunização com HIVenv7 sozinha foi pouco imunogênica, havendo pouca produção de IFN- γ , contra apenas um peptídeo. A vacina HIVenv7 também se mostrou incapaz de induzir proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ contra seus peptídeos codificados. Tal fato pode ter ocorrido pela incapacidade dos mesmos de se ligarem a moléculas MHC murinas e, conseqüentemente, induzir respostas mediadas por linfócitos T ou por uma imunossupressão induzida contra a resposta dirigida aos próprios peptídeos da vacina. A incapacidade dos peptídeos de Env de se ligarem as moléculas H2^d poderia explicar a baixa imunogenicidade da vacina HIVenv7, mas não suas características supressoras. A imunização de outras linhagens murinas, como C57BL/6 poderia avaliar um possível efeito de restrição MHC.

A imunossupressão observada com a co-imunização HIVenv7+HIVBr27 traz informações importantes em relação ao desenvolvimento de vacinas contra o HIV-1. Como citado anteriormente, os indícios da imunossupressão pelo envelope do HIV-1 e seus peptídeos derivados foram obtidos, na sua grande maioria, por ensaios *in vitro*. Nesse estudo, entretanto, fortes indícios *in vivo* sugerem que peptídeos do envelope são de fato imunomoduladores da resposta imune celular. Tal observação contribui para reforçar o questionamento sobre a inclusão ou não de proteínas ou peptídeos do envelope do HIV-1 em vacinas que visam à indução desse tipo de resposta. O mapeamento e possível exclusão de regiões imunomoduladoras do envelope previamente à sua inclusão em vacinas seria uma estratégia a ser adotada para minimizar os danos da utilização desse imunógeno. O estudo da imunomodulação mediada por outras proteínas do HIV-1 também se faz pertinente, como de fato já foi descrito que a co-imunização de Tat e gp120, em vetor bicistrônico, é capaz de reduzir a resposta celular contra a gp120 e que tal fato é dependente de IL-10 (Gupta *et al*, 2008), sugerindo um papel imunossupressor da proteína Tat. Além das contribuições para o campo de vacinas contra o HIV-1, os dados obtidos nesse estudo também nos encorajam a testar a vacina HIVenv7, bem como seus peptídeos codificados, em estratégias imunomoduladoras contra doenças auto-imunes ou alérgicas, na tentativa de gerar novas terapias.

7. Conclusões

Em suma, os resultados aqui apresentados sugerem que a vacina HIVBr27, desenhada com o intuito de induzir uma resposta de linfócitos T CD4⁺ ampla e intensa contra peptídeos promíscuos e conservados da sequência consenso dos consensos do grupo M do HIV-1, é uma plataforma vacinal mais imunogênica e mais completa que a vacina HIVBr18, tendo potencial de conferir, em grande cobertura populacional, imunidade contra os diversos subtipos circulantes do vírus. A observação dos efeitos imunossupressores da vacina codificando peptídeos de Env sugere que a inclusão do envelope em imunógenos contra o HIV-1 possa ser prejudicial. Por outro lado, isto faz do plasmídeo HIVenv7 um alvo promissor para terapias imunológicas que visem indução de imunossupressão.

8.1. Anexo A – Figuras

Figura 1: Estratégia de análise da proliferação celular contra peptídeos individuais do HIV-1. Duas semanas após a última dose com HIVBr18, HIVenv7, HIVBr27 ou HIVenv7+HIVBr27, esplenócitos de 6 camundongos BALB/c foram extraídos, marcados com CFSE (1.25μM) e cultivados na presença de peptídeos individuais do HIV-1 (5μM), por 5 dias. 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 sub-populações de linfócitos T (CD4⁺ ou CD8⁺) foi avaliada a diminuição da intensidade de fluorescência de CFSE, que reflete a proliferação antígeno específica.

Figura 2: Proliferação celular baseada em diluição de CFSE. Duas semanas após a última dose com HIVBr18, esplenócitos de 6 camundongos BALB/c foram extraídos, marcados com CFSE (1.25 μ M) e cultivados na presença de peptídeos individuais do HIV-1 (5 μ M), por 5 dias. A proliferação de células T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) antígeno específicas foi analisada por citometria de fluxo. O limiar de proliferação foi determinado pela média mais 3 desvios padrões da proliferação contra os peptídeos individuais obtido no grupo de camundongos imunizados com o vetor pVAX1 vazio. Foram considerados apenas peptídeos que induziram proliferação acima do limiar em, pelo menos, 3 dos 4 experimentos realizados.

Figura 3: Proliferação celular baseada em diluição de CFSE. Duas semanas após a última dose com HIVenv7+HIVBr27, esplenócitos de 6 camundongos BALB/c foram extraídos, marcados com CFSE (1.25 μ M) e cultivados na presença de peptídeos individuais do HIV-1 (5 μ M), por 5 dias. A proliferação de células T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) antígeno específicas foi analisada por citometria de fluxo. O limiar de proliferação foi determinado pela média mais 3 desvios padrões da proliferação contra os peptídeos individuais obtido no grupo de camundongos imunizados com o vetor pVAX1 vazio. Foram considerados apenas peptídeos que induziram proliferação acima do limiar em, pelo menos, 3 dos 4 experimentos realizados.

Figura 4: Estratégia de análise para avaliação da produção intracelular de citocinas em resposta ao *pool* de peptídeos do HIV-1. Duas semanas após a última dose com HIVBr18, HIVenv7, HIVBr27 ou HIVenv7+HIVBr27, esplenócitos de 6 camundongos BALB/c foram extraídos e cultivados na presença do *pool* de peptídeos do HIV-1 (5 μ 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 μ g/ml) como co-estímulo e brefeldina A (0,2 μ 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 sub-populações de linfócitos T (CD4⁺ ou CD8⁺) foi avaliada a produção intracelular das citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Os *gates* representativos de cada citocina são provenientes de células estimuladas com Concanavalina A (Con A).

Figura 5: Estratégia de análise para identificação de células T polifuncionais.

Duas semanas após a última dose com HIVBr18, HIVenv7, HIVBr27 ou HIVenv7+HIVBr27, esplenócitos de 6 camundongos BALB/c foram extraídos, marcados com CFSE (1.25μM) e cultivados na presença do *pool* de peptídeos do HIV-1 (5μM), 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 (2μg/ml) como co-estímulo e brefeldina A (0,2μL/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 sub-populações de linfócitos T (CD4⁺ ou CD8⁺) foram avaliadas as produções das citocinas IFN-γ, IL-2 ou TNF-α 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^{baixo}) que produziam citocinas, para determinar todas as possíveis combinações funcionais. Os dados apresentados são provenientes de esplenócitos estimulados com o *pool* de 27 peptídeos do HIV-1.

8.2. Anexo B – Tabelas

Peptídeo	Sequência de aminoácidos
p17(73-89)	EELRSLYNTVATLYCVH
p24(33-45)	SPEVIPMFSALE
p24(131-150)	KRWIILGLNKIVRMYSPTSI
p6(32-46)	DKELYPLASLRSLFG
protease (7–21)	QRPLVTIKIGGQLKE
protease (80–94)	TPVNIIGRNLLTQIG
integrase (70–84)	GKIILVAVHVASGYI
gp41(261-276)	RDLLLIVTRIVELLGR
gp160(19-31)	TMLLGMLMICSAA
gp160(174-185)	ALFYKLDVVPID
gp160(188-201)	NTSYRLISCNTSVI
gp160(481-498)	SELYLYKVVKIEPLGVAP
rev(11-27)	ELLKTVRLIKFLYQSNP
vpr(58-72)	EAIIRILQQLLFIHF
vpr(65-82)	QQLLFIHFRIGCRHSRIG
vif(144-158)	SLQYLALVALVAPKK
nef(180-194)	VLEWRFDSRLAFHHV
vpu(6-20)	VLAIVALVVATIIAI

Tabela 1: Sequência de aminoácidos dos peptídeos codificados pela vacina HIVBr18. A primeira coluna mostra a localização de cada peptídeo na sequência HXB2 do HIV-1, disponível na base de dados de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov>). A segunda coluna mostra a sequência de aminoácidos de cada peptídeo codificado pela vacina HIVBr18.

HIVBr18					
ELISPOT IFN- γ		Proliferação			
Peptídeo	N° spots/10 ⁶ células	LT CD4 ⁺	%	LT CD8 ⁺	%
p17(73-89)	28.86	p17(73-89)	4.55	p17(73-89)	4.25
p6(32-46)	18.32	protease(7-21)	6.19	protease(7-21)	5.29
protease(7-21)	77.15	gp160(188-201)	1.71	rev(11-27)	1.45
gp160(188-201)	79.37	vif(144-158)	2.05		
vpr (65-82)	89.91	rev(11-27)	1.30		
vif (144-158)	94.91				
nef (180-194)	46.62				
limiar	15.00	limiar	1.22	limiar	1.18

HIVenv7+HIVBr27					
ELISPOT IFN- γ		Proliferação			
Peptídeo	N° spots/10 ⁶ células	LT CD4 ⁺	%	LT CD8 ⁺	%
gp160(483-502)	53.835	gp160(692-711)	1.76	gp160(692-711)	1.37
gp160(692-711)	110.445	p24(127-145)	2.30	p24(127-145)	4.27
RT(369-391)	29.415	RT(369-391)	1.53	RT(369-391)	1.78
RT(413-427)	78.255	RT(413-427)	1.57	RT(413-427)	1.56
RT(528-546)	33.3	integrase(216-235)	2.71	integrase(216-235)	3.63
integrase(216-235)	52.725				
p24(127-145)	130.98				
vpr(58-80)	15.54				
nef(133-156)	18.87				
limiar	15.00	limiar	1.22	limiar	1.18

HIVBr27					
ELISPOT IFN- γ		Proliferação			
Peptídeo	N° spots/10 ⁶ células	LT CD4 ⁺	%	LT CD8 ⁺	%
p17(72-90)	21.09	p17(72-90)	1.89	p17(72-90)	1.41
p24(127-145)	117.11	p24(127-145)	1.97	p24(127-145)	3.84
RT(369-391)	32.19	RT(369-391)	2.60	RT(369-391)	1.86
RT(413-427)	45.51	RT(413-427)	1.64	RT(413-427)	1.77
RT(528-546)	46.07	RT(528-546)	3.09	RT(528-546)	3.80
integrase(96-113)	21.09	integrase(216-235)	3.42	integrase(216-235)	4.77
integrase(216-235)	154.29	rev(9-27)	1.66		
vif(1-15)	19.43	vpr(58-80)	2.28		
vif(142-158)	41.07				
rev(9-27)	22.20				
vpr(58-80)	31.64				
limiar	15.00	limiar	1.22	limiar	1.18

Tabela 2: Resumo dos resultados de ELISPOT de IFN- γ e proliferação celular contra peptídeos individuais do HIV-1. Os resultados do ensaio de ELISPOT de IFN- γ são apresentados como a média de 3 experimentos. O limiar determinado foi de 15 spots/10⁶ células. Os peptídeos que induziram proliferação celular acima do limiar em, pelo menos, 3 dos 4 experimentos realizados, foram considerados positivos e mostrados na tabela. O limiar de proliferação é resultado da média mais 3 desvios padrões da proliferação obtida nos esplenócitos de camundongos imunizados com o vetor vazio pVAX1 e estimulados com os peptídeos individuais do HIV-1. Tanto os valores de limiar quanto os valores de proliferação celular são provenientes de um experimento representativo.

8.3. Anexo C – Aprovação CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 01/07/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0653/09**, intitulado: **"IMUNOGENICIDADE DE VACINA DE DNA CONTENDO EPITOPOS DO HIV-1 TIPO M EM CAMUNDONGOS BALB/C"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Edecio Cunha-Neto**

Pesquisador (a) Executante: **Rafael Ribeiro Almeida**

CAPPesq, 01 de Julho de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcfmusp.usp.br / secretariacappesq2@hcfmusp.usp.br

MF

8.4. Anexo D1 – Certificado subclonagem HIVBr27

Your Innovation Partner in Drug Discovery!

Certificate of Analysis

Project ID: 75145-1

Construct Information:

Gene Name: HIVBr27

Gene Length: 1884 bp

Cloning Vector: pUC57

Cloning Strategy: EcoRV

Clone ID: T43558

QC Items	Specifications	Results
Sequencing Alignment	Sequencing results are consistent with the target.	☒ Pass ☐ Fail
Vector Sequence	The flanking sequences of the cloning site are correct.	☒ Pass ☐ Fail
Reading Frame	☒ Not requested. ☐ Frame is correct and consistent with client's requirement.	☒ Pass ☐ Fail
Restriction Digests	The size of inserted fragment is right and free of any contaminated bands.	☒ Pass ☐ Fail
PCR Amplification	Amplification is correct and construct is free of any contaminated bands.	☒ Pass ☐ Fail
DNA Quality	☒ Miniprep: 4 µg/tube, OD _{260/280} =1.7-2.0 ☐ Maxiprep: 50 µg/tube, OD _{260/280} =1.8-2.0 Free of contamination.	☒ Pass ☐ Fail
Appearance	Clear and free of foreign particles.	☒ Pass ☐ Fail
Additional Test		

QC Results

Lane 1: Marker
Lane 2: HIVBr27
Lane 3: HIVBr27
Lane 4: HIVBr27

KB Ladder
of GenScript

BL3000
of GenScript

Certified by:

Catharina

Date: 08/17/2009

8.5. Anexo D2 – Certificado subclonagem HIVenv7

Your Innovation Partner in Drug Discovery

Certificate of Analysis

Project ID: 75145-3

Construct Information:

Gene Name: HIVenv7

Gene Length: 510 bp

Cloning Vector: pUC57

Cloning Strategy: EcoRV

Clone ID: Y45432

QC Items	Specifications	Results
Sequencing Alignment	Sequencing results are consistent with the target.	☒ Pass ☐ Fail
Vector Sequence	The flanking sequences of the cloning site are correct.	☒ Pass ☐ Fail
Reading Frame	☒ Not requested ☐ Frame is correct and consistent with client's requirement.	☒ Pass ☐ Fail
Restriction Digests	The size of inserted fragment is right and free of any contaminated bands.	☒ Pass ☐ Fail
PCR Amplification	Amplification is correct and construct is free of any contaminated bands.	☒ Pass ☐ Fail
DNA Quality	☒ Miniprep: 4 µg/tube, OD _{260/280} =1.7~2.0 ☐ Maxiprep: 50 µg/tube, OD _{260/280} =1.8~2.0 Free of contamination.	☒ Pass ☐ Fail
Appearance	Clear and free of foreign particles.	☒ Pass ☐ Fail
Additional Test		

QC Results

Gene: HIVenv7
Size: 510bp
Date: 08/05/2009
Ref: 75145-3

XX Ladder
of GenScript

XL3000
of GenScript

Certified by:

Catherine

Date: 08/05/2009

9. Referências bibliográficas

- Aagaard C, Hoang T, Izzo A, Billeskov R, Troudt J, Arnett K, Keyser A, Elvang T, Andersen P, Dietrich J (2009) Protection and Polyfunctional T Cells Induced by Ag85B-TB10.4/IC31 (R) against *Mycobacterium tuberculosis* Is Highly Dependent on the Antigen Dose. *Plos One* **4**
- Addo MM, Yu XG, Rathod A, Cohen D, Eldridge RL, Strick D, Johnston MN, Corcoran C, Wurcel AG, Fitzpatrick CA, Feeney ME, Rodriguez WR, Basgoz N, Draenert R, Stone DR, Brander C, Goulder PJR, Rosenberg ES, Altfeld M, Walker BD (2003) Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *Journal of Virology* **77**: 2081-2092
- Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H, Quyyumi F, Garg S, Altman JD, Del Rio C, Keyserling HL, Ploss A, Rice CM, Orenstein WA, Mulligan MJ, Ahmed R (2009) The Yellow Fever Virus Vaccine Induces a Broad and Polyfunctional Human Memory CD8(+) T Cell Response. *Journal of Immunology* **183**: 7919-7930
- Allen TM, Altfeld M, Yu XG, O'Sullivan KM, Lichterfeld M, Le Gall S, John M, Mothe BR, Lee PK, Kalife ET, Cohen DE, Freedberg KA, Strick DA, Johnston MN, Sette A, Rosenberg ES, Mallal SA, Goulder PJR, Brander C, Walker BD (2004) Selection, transmission, and reversion of an antigen-processing cytotoxic T-lymphocyte escape mutation in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology* **78**: 7069-7078
- Altfeld M, Allen TM (2006) Hitting HIV where it hurts: an alternative approach to HIV vaccine design. *Trends in Immunology* **27**: 504-510
- Arrighi JF, Pion M, Garcia E, Escola JM, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB, Piguet V (2004) DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *Journal of Experimental Medicine* **200**: 1279-1288
- ART-Guidelines. (2008) Panel on Antiretroviral Guidelines for Adult and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. *Department of Health and Human Services*, pp. pp 1–128.
- Baba TW, Liska V, Khimani AH, Ray NB, Dailey PJ, Penninck D, Bronson R, Greene MF, McClure HM, Martin LN, Ruprecht RM (1999) Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nature Medicine* **5**: 194-203
- Barouch DH (2008) Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature* **455**: 613-619
- Barouch DH, Korber B (2010) HIV-1 Vaccine Development After STEP. *Annual Review of Medicine* **61**: 153-167
- Barouch DH, O'Brien KL, Simmons NL, King SL, Abbink P, Maxfield LF, Sun YH, La Porte A, Riggs AM, Lynch DM, Clark SL, Backus K, Perry JR, Seaman MS, Carville A, Mansfield KG, Szinger JJ, Fischer W, Muldoon M, Korber B (2010)

- Mosaic HIV-1 vaccines expand the breadth and depth of cellular immune responses in rhesus monkeys. *Nature Medicine* **16**: 319-U116
- Barouch DH, Santra S, Schmitz JE, Kuroda MJ, Fu TM, Wagner W, Bilska M, Craiu A, Zheng XX, Krivulka GR, Beaudry K, Lifton MA, Nickerson CE, Trigona WL, Punt K, Freed DC, Guan LM, Dubey S, Casimiro D, Simon A, Davies ME, Chastain M, Strom TB, Gelman RS, Montefiori DC, Lewis MG, Emini EA, Shiver JW, Letvin NL (2000) Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* **290**: 486-492
- Barresinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axlerblin C, Vezinetbrun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L (1983) ISOLATION OF A T-LYMPHOTROPIC RETROVIRUS FROM A PATIENT AT RISK FOR ACQUIRED IMMUNE-DEFICIENCY SYNDROME (AIDS). *Science* **220**: 868-871
- Bebenek K, Abbotts J, Roberts JD, Wilson SH, Kunkel TA (1989) SPECIFICITY AND MECHANISM OF ERROR-PRONE REPLICATION BY HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-1 REVERSE-TRANSCRIPTASE. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 16948-16956
- Becker C, Taube C, Bopp T, Michel K, Kubach J, Reuter S, Dehzad N, Neurath MF, Reifenberg K, Schneider FJ, Schmitt E, Jonuleit H (2009) Protection from graft-versus-host disease by HIV-1 envelope protein gp120-mediated activation of human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Blood* **114**: 1263-1269
- BenMohamed L, Bertrand G, McNamara CD, Gras-Masse H, Hammer J, Wechsler SL, Nesburn AB (2003) Identification of novel immunodominant CD4(+) Th1-type T-cell peptide epitopes from herpes simplex virus glycoprotein D that confer protective immunity. *Journal of Virology* **77**: 9463-9473
- Bernardin F, Kong D, Peddada L, Baxter-Lowe LA, Delwart E (2005) Human immunodeficiency virus mutations during the first month of infection are preferentially found in known cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *Journal of Virology* **79**: 11523-11528
- Bharadwaj A, Sharma P, Joshi SK, Singh B, Chauhan VS (1998) Induction of protective immune responses by immunization with linear multiepitope peptides based on conserved sequences from Plasmodium falciparum antigens. *Infection and Immunity* **66**: 3232-3241
- Bian HJ, Hammer J (2004) Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T cell epitopes with TEPITOPE. *Methods* **34**: 468-475
- Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, Malim MH (2004) APOBEC-mediated editing of viral RNA. *Science* **305**: 645-645
- Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Fuchs D, Shearer GM (2007) HIV inhibits CD4(+) T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **109**: 3351-3359
- Boaz MJ, Waters A, Murad S, Easterbrook PJ, Vyakarnam A (2002) Presence of HIV-1 gag-specific IFN-gamma+IL-2(+) and CD28(+)IL-2(+) CD4 T cell responses is

- associated with nonprogression in HIV-1 infection. *Journal of Immunology* **169**: 6376-6385
- Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MBA (1994) VIRUS-SPECIFIC CD8+ CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTE ACTIVITY ASSOCIATED WITH CONTROL OF VIREMIA IN PRIMARY HUMAN-IMMUNODEFICIENCY-VIRUS TYPE-1 INFECTION. *Journal of Virology* **68**: 6103-6110
- Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC (2004) CD4(+) T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *Journal of Experimental Medicine* **200**: 749-759
- Broder CC, Berger EA (1995) FUSOGENIC SELECTIVITY OF THE ENVELOPE GLYCOPROTEIN IS A MAJOR DETERMINANT OF HUMAN-IMMUNODEFICIENCY-VIRUS TYPE-1 TROPISM FOR CD4(+) T-CELL LINES VS PRIMARY MACROPHAGES. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 9004-9008
- Bussmann BM, Reiche S, Bieniek B, Krzmaric I, Ackermann F, Jassoy C (2010) Loss of HIV-specific memory B-cells as a potential mechanism for the dysfunction of the humoral immune response against HIV. *Virology* **397**: 7-13
- Casimiro DR, Chen L, Fu TM, Evans RK, Caulfield MJ, Davies ME, Tang A, Chen MC, Huang LY, Harris V, Freed DC, Wilson KA, Dubey S, Zhu DM, Nawrocki D, Mach H, Troutman R, Isopi L, Williams D, Hurni W, Xu Z, Smith JG, Wang S, Liu X, Guan LM, Long R, Trigona W, Heidecker GJ, Perry HC, Persaud N, Toner TJ, Su Q, Liang XP, Youil R, Chastain M, Bell AJ, Volkin DB, Emini EA, Shiver JW (2003) Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *Journal of Virology* **77**: 6305-6313
- Catanzaro AT, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Enama ME, Moodie Z, Gu L, Martin JE, Novik L, Chakrabarti BK, Butman BT, Gall JGD, King CR, Andrews CA, Sheets R, Gomez PL, Mascola JR, Nabel GJ, Graham BS, Vaccine Research C (2006) Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 candidate vaccine delivered by a replication-defective recombinant adenovirus vector. *Journal of Infectious Diseases* **194**: 1638-1649
- Chakrabarti BK, Ling X, Yang ZY, Montefiori DC, Panet A, Kong WP, Welcher B, Louder MK, Mascola JR, Nabel GJ (2005) Expanded breadth of virus neutralization after immunization with a multiclade envelope HIV vaccine candidate. *Vaccine* **23**: 3434-3445
- Chirmule N, Kalyanaraman VS, Oyaizu N, Slade HB, Pahwa S (1990) INHIBITION OF FUNCTIONAL-PROPERTIES OF TETANUS ANTIGEN-SPECIFIC T-CELL CLONES BY ENVELOPE GLYCOPROTEIN GP120 OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS. *Blood* **75**: 152-159
- Chirmule N, McCloskey TW, Hu R, Kalyanaraman VS, Pahwa S (1995) HIV GP120 INHIBITS T-CELL ACTIVATION BY INTERFERING WITH EXPRESSION OF

- COSTIMULATORY MOLECULES CD40 LIGAND AND CD80 (B71). *Journal of Immunology* **155**: 917-924
- Chitnis A, Rawls D, Moore J (2000) Origin of HIV type 1 in colonial French Equatorial Africa? *Aids Research and Human Retroviruses* **16**: 5-8
- Chouquet C, Autran B, Gomard E, Bouley JM, Calvez V, Katlama C, Costagliola D, Riviere Y, Grp IS (2002) Correlation between breadth of memory HIV-specific cytotoxic T cells, viral load and disease progression in HIV infection. *Aids* **16**: 2399-2407
- Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen XF, DiGiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, BarditchCrovo P, Siliciano RF (1997) Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 Infection. *Nature* **387**: 183-188
- Cohen MS, Hellmann N, Levy JA, DeCock K, Lange J (2008) The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic. *Journal of Clinical Investigation* **118**: 1244-1254
- Corey L, McElrath MJ, Kublin JG (2009) Post-Step modifications for research on HIV vaccines. *Aids* **23**: 3-8
- de Lalla C, Sturniolo T, Abbruzzese L, Hammer J, Sidoli A, Sinigaglia F, Panina-Bordignon P (1999) Cutting edge: Identification of novel T cell epitopes in Lol p5a by computational prediction. *Journal of Immunology* **163**: 1725-1729
- Deng XY, Ueda H, Su SB, Gong WH, Dunlop NM, Gao JL, Murphy PM, Wang JM (1999) A synthetic peptide derived from human immunodeficiency virus type 1 gp120 downregulates the expression and function of chemokine receptors CCR5 and CXCR4 in monocytes by activating the 7-transmembrane G-protein-coupled receptor FPRL1/LXA4R. *Blood* **94**: 1165-1173
- Diop OM, Ploquin MJY, Mortara L, Faye A, Jacquelin B, Kunkel D, Lebon P, Butor C, Hosmalin A, Barre-Sinoussi F, Mueller-Trutwin MC (2008) Plasmacytoid dendritic cell dynamics and alpha interferon production during simian immunodeficiency virus infection with a nonpathogenic outcome. *Journal of Virology* **82**: 5145-5152
- Douek DC, Picker LJ, Koup RA (2003) T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annual Review of Immunology* **21**: 265-304
- Duvall MG, Precopio ML, Ambrozak DA, Jaye A, McMichael AJ, Whittle HC, Roederer M, Rowland-Jones SL, Koup RA (2008) Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *European Journal of Immunology* **38**: 350-363
- Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S (2010) HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita* **46(1)**: 5-14
- Fantuzzi L, Purificato C, Donato K, Belardelli F, Gessani S (2004) Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and

functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for AIDS pathogenesis. *Journal of Virology* **78**: 9763-9772

Fernando K, Hu HT, Ni HP, Hoxie JA, Weissman D (2007) Vaccine-delivered HIV envelope inhibits CD4(+) T-cell activation, a mechanism for poor HIV vaccine responses. *Blood* **109**: 2538-2544

Fischer W, Perkins S, Theiler J, Bhattacharya T, Yusim K, Funkhouser R, Kuiken C, Haynes B, Letvin NL, Walker BD, Hahn BH, Korber BT (2007) Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. *Nature Medicine* **13**: 100-106

Flynn MN, Forthal DN, Harro CD, Judson FN, Mayer KH, Para MF, Gilbert PB, Hudgens MG, Metch BJ, Self SG, Berman PW, Francis DP, Gurwith M, Heyward WL, Jobes DV, Peterson ML, Popovic V, Sinangil FM, Adamczyk A, Baker RL, Brand D, Brown SJ, Buchbinder S, Buggy BP, Cade J, Caldwell MC, Celum C, Creticos C, Coutinho RA, Lindenburg K, Daly P, DeJesus E, Di-Carlo R, Fenstersheib M, Flynn N, Forthal D, Gripshover B, Gorse GJ, Belshe R, Grossman H, Henry K, Hewitt RG, Hogg R, Jacobson JM, Jemsek J, Judson F, Kahn JO, Keefer MC, Kessler H, Koblin B, Kostman J, Lally M, Logue K, Marmor M, Mayer K, McKinsey D, Miskin BM, Morales JO, Mulligan MJ, Myers RA, Novak R, Para M, Piliero P, Poblete R, Rhame F, Riddler S, Richter RW, Sampson JH, Sands M, Santiago S, Shikuma C, Somero MS, Thomas E, Thompson M, Tyring SK, Vincelette J, Vrooman PS, Yangco BG, rgp HIVVSG (2005) Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *Journal of Infectious Diseases* **191**: 654-665

Foley P, Kazazi F, Biti R, Sorrell TC, Cunningham AL (1992) HIV-INFECTION OF MONOCYTES INHIBITS THE LYMPHOCYTE-T PROLIFERATIVE RESPONSE TO RECALL ANTIGENS, VIA PRODUCTION OF EICOSANOIDS. *Immunology* **75**: 391-397

Fonseca CT, Cunha-Neto E, Goldberg AC, Kalil J, de Jesus AR, Carvalho EM, Correa-Oliveira R, Hammer J, Sidney J, Sette A, Oliveira SC (2005a) Identification of paramyosin T cell epitopes associated with human resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection. *Clinical and Experimental Immunology* **142**: 539-547

Fonseca CT, Cunha-Neto E, Goldberg AC, Kalil J, de Jesus AR, Carvalho EM, Correa-Oliveira R, Oliveira SC (2005b) Human T cell epitope mapping of the *Schistosoma mansoni* 14-kDa fatty acid-binding protein using cells from patients living in areas endemic for schistosomiasis. *Microbes and Infection* **7**: 204-212

Fonseca MGP, Bastos FI (2007) Twenty-five years of the AIDS epidemic in Brazil: principal epidemiological findings, 1980-2005. *Cadernos De Saude Publica* **23**: S333-S344

Fonseca SG, Coutinho-Silva A, Fonseca LAM, Segurado AC, Moraes SL, Rodrigues H, Hammer J, Kallas EG, Sidney J, Sette A, Kalil J, Cunha-Neto E (2006) Identification of novel consensus CD4 T-cell epitopes from clade B HIV-1 whole genome that are frequently recognized by HIV-1 infected patients. *Aids* **20**: 2263-2273

- Fuller DH, Rajakumar PA, Wu MS, McMahon CW, Shipley T, Fuller JT, Bazmi A, Trichel AM, Allen TM, Mothe B, Haynes JR, Watkins DI, Murphey-Corb M (2006) DNA immunization in combination with effective antiretroviral drug therapy controls viral rebound and prevents simian AIDS after treatment is discontinued. *Virology* **348**: 200-215
- Fuller DH, Shipley T, Allen TM, Fuller JT, Wu MS, Horton H, Wilson N, Widera G, Watkins DI (2007) Immunogenicity of hybrid DNA vaccines expressing hepatitis B core particles carrying human and simian immunodeficiency virus epitopes in mice and rhesus macaques. *Virology* **364**: 245-255
- Galvin SR, Cohen MS (2004) The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 33-42
- Gandhi RT, Walker BD (2002) Immunologic control of HIV-1. *Annual Review of Medicine* **53**: 149-172
- Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen YL, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**: 436-441
- Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B, Hahn BH, Bhattacharya T, Korber B (2002) AIDS - Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science* **296**: 2354-2360
- Gasper-Smith N, Crossman DM, Whitesides JF, Mensali N, Ottinger JS, Plonk SG, Moody MA, Ferrari G, Weinhold KJ, Miller SE, Reich CF, Qin L, Self SG, Shaw GM, Denny TN, Jones LE, Pisetsky DS, Haynes BF (2008) Induction of plasma (TRAIL), TNFR-2, Fas ligand, and plasma microparticles after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission: Implications for HIV-1 vaccine design. *Journal of Virology* **82**: 7700-7710
- Gauduin MC, Yu Y, Barabasz A, Carville A, Piatak M, Lifson JD, Desrosiers RC, Johnson RP (2006) Induction of a virus-specific effector-memory CD4(+) T cell response by attenuated SIV infection. *Journal of Experimental Medicine* **203**: 2661-2672
- Geijtenbeek TBH, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GCF, Middel J, Cornelissen I, Nottet H, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y (2000) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**: 587-597
- Gloster SE, Newton P, Cornforth D, Lifson JD, Williams I, Shaw GM, Borrow P (2004) Association of strong virus-specific CD4 T cell responses with efficient natural control of primary HIV-1 infection. *Aids* **18**: 749-755
- Gomez C, Hope TJ (2005) The ins and outs of HIV replication. *Cellular Microbiology* **7**: 621-626
- Goonetilleke N, Liu MKP, Salazar-Gonzalez JF, Ferrari G, Giorgi E, Ganusov VV, Keele BF, Learn GH, Turnbull EL, Salazar MG, Weinhold KJ, Moore S, Letvin

- N, Haynes BF, Cohen MS, Hrabec P, Bhattacharya T, Borrow P, Perelson AS, Hahn BH, Shaw GM, Korber BT, McMichael AJ, B CCC (2009) The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *Journal of Experimental Medicine* **206**: 1253-1272
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A (1981) PNEUMOCYSTIS-CARINII PNEUMONIA AND MUCOSAL CANDIDIASIS IN PREVIOUSLY HEALTHY HOMOSEXUAL MEN - EVIDENCE OF A NEW ACQUIRED CELLULAR IMMUNODEFICIENCY. *New England Journal of Medicine* **305**: 1425-1431
- Graham BS, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Enama ME, Moodie Z, Martin JE, McCluskey MM, Chakrabarti BK, Lamoreaux L, Andrews CA, Gomez PL, Mascola JR, Nabel GJ, Vaccine Research S (2006) Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 DNA candidate vaccine. *Journal of Infectious Diseases* **194**: 1650-1660
- Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, Sewankambo NK, Serwadda D, Wabwire-Mangen F, Lutalo T, Li XB, vanCott T, Quinn TC, Rakai Project T (2001) Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet* **357**: 1149-1153
- Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RMM, Paul WE (2002) CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: Are we closer to understanding the cause? *Nature Medicine* **8**: 319-323
- Guinaraes ML, Moreira AD, Loureiro R, Galvao-Castro B, Morgado MG, Brazilian Network HIVIC (2002) High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *Aids Research and Human Retroviruses* **18**: 1261-1269
- Gupta S, Boppana R, Mishra GC, Saha B, Mitra D (2008) HIV-1 tat suppresses gp120-specific T cell response in IL-10-dependent manner. *Journal of Immunology* **180**: 79-88
- Haaland RE, Hawkins PA, Salazar-Gonzalez J, Johnson A, Tichacek A, Karita E, Manigart O, Mulenga J, Keele BF, Shaw GM, Hahn BH, Allen SA, Derdeyn CA, Hunter E (2009) Inflammatory Genital Infections Mitigate a Severe Genetic Bottleneck in Heterosexual Transmission of Subtype A and C HIV-1. *Plos Pathogens* **5**
- Hansen SG, Vieville C, Whizin N, Coyne-Johnson L, Siess DC, Drummond DD, Legasse AW, Axthelm MK, Oswald K, Trubey CM, Piatak M, Lifson JD, Nelson JA, Jarvis MA, Picker LJ (2009) Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nature Medicine* **15**: 293-299
- Hel Z, Tsai WP, Trynieszewska E, Nacsa J, Markham PD, Lewis MG, Pavlakis GN, Felber BK, Tartaglia J, Franchini G (2006) Improved vaccine protection from simian AIDS by the addition of nonstructural simian immunodeficiency virus genes. *Journal of Immunology* **176**: 85-96

- Hogan CM, Hammer SM (2001) Host determinants in HIV infection and disease part 1: Cellular and humoral immune responses. *Annals of Internal Medicine* **134**: 761-776
- Hwang ML, Lukens JR, Bullock TNJ (2007) Cognate memory CD4(+) T cells generated with dendritic cell priming influence the expansion, of secondary CD8(+) T cells and trafficking, and differentiation enhance tumor control. *Journal of Immunology* **179**: 5829-5838
- Ishioka GY, Fikes J, Hermanson G, Livingston B, Crimi C, Qin MS, del Guercio MF, Oseroff C, Dahlberg C, Alexander J, Chesnut RW, Sette A (1999) Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes. *Journal of Immunology* **162**: 3915-3925
- Iwai LK, Yoshida M, Sadahiro A, da Silva WR, Marin ML, Goldberg AC, Juliano MA, Juliano L, Shikanai-Yasuda MA, Kalil J, Cunha-Neto E, Travassos LR (2007) T-cell recognition of *Paracoccidioides brasiliensis* gp43-derived peptides in patients with paracoccidioidomycosis and healthy individuals. *Clinical and Vaccine Immunology* **14**: 474-476
- Johnston MI, Fauci AS (2007) Current concepts: An HIV vaccine - Evolving concepts. *New England Journal of Medicine* **356**: 2073-2081
- Kalams SA, Buchbinder SP, Rosenberg ES, Billingsley JM, Colbert DS, Jones NG, Shea AK, Trocha AK, Walker BD (1999) Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology* **73**: 6715-6720
- Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E, Reddy S, de Pierres C, Mncube Z, Mkhwanazi N, Bishop K, van der Stok M, Nair K, Khan N, Crawford H, Payne R, Leslie A, Prado J, Prendergast A, Frater J, McCarthy N, Brander C, Learn GH, Nickle D, Rousseau C, Coovadia H, Mullins JI, Heckerman D, Walker BD, Goulder P (2007) CD8(+) T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nature Medicine* **13**: 46-53
- Klasse PJ, Sattentau QJ (2002) Occupancy and mechanism in anti body-mediated neutralization of animal viruses. *Journal of General Virology* **83**: 2091-2108
- Klimas N, Koneru AO, Fletcher MA (2008) Overview of HIV. *Psychosomatic Medicine* **70**: 523-530
- Kong WP, Huang Y, Yang ZY, Chakrabarti BK, Moodie Z, Nabel GJ (2003) Immunogenicity of multiple gene and clade human immunodeficiency virus type 1 DNA Vaccines. *Journal of Virology* **77**: 12764-12772
- Kryworuchko M, Pasquier V, Theze J (2003) Human immunodeficiency virus-1 envelope glycoproteins and anti-CD4 antibodies inhibit interleukin-2-induced Jak/STAT signalling in human CD4 T lymphocytes. *Clinical and Experimental Immunology* **131**: 422-427

- Kumaraguru U, Banerjee K, Rouse BT (2005) In vivo rescue of defective memory CD8(+) T cells by cognate helper T cells. *Journal of Leukocyte Biology* **78**: 879-887
- Lai SK, Hida K, Shukair S, Wang YY, Figueiredo A, Cone R, Hope TJ, Hanes J (2009) Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Trapped by Acidic but Not by Neutralized Human Cervicovaginal Mucus. *Journal of Virology* **83**: 11196-11200
- Learmont JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ, Dyer WB, McIntyre L, Oelrichs RB, Rhodes DI, Deacon NJ, Sullivan JS, Sydney Blood Bank Cohort Res G (1999) Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1 - A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *New England Journal of Medicine* **340**: 1715-1722
- Letourneau S, Im EJ, Mashishi T, Brereton C, Bridgeman A, Yang HB, Dorrell L, Dong T, Korber B, McMichael AJ, Hanke T (2007) Design and Pre-Clinical Evaluation of a Universal HIV-1 Vaccine. *Plos One* **2**
- Letvin NL (2006) Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nature Reviews Immunology* **6**: 930-939
- Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM (1984) ISOLATION OF LYMPHOCYTOPATHIC RETROVIRUSES FROM SAN-FRANCISCO PATIENTS WITH AIDS. *Science* **225**: 840-842
- Li QS, Estes JD, Schlievert PM, Duan LJ, Brosnahan AJ, Southern PJ, Reilly CS, Peterson ML, Schultz-Darken N, Brunner KG, Nephew KR, Pambuccian S, Lifson JD, Carlis JV, Haase AT (2009) Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature* **458**: 1034-U1113
- Liu JY, Kjekken R, Mathiesen L, Barouch DH (2008) Recruitment of antigen-presenting cells to the site of inoculation and augmentation of human immunodeficiency virus type 1 DNA vaccine immunogenicity by in vivo Electroporation. *Journal of Virology* **82**: 5643-5649
- Liu JY, O'Brien KL, Lynch DM, Simmons NL, La Porte A, Riggs AM, Abbink P, Coffey RT, Grandpre LE, Seaman MS, Landucci G, Forthal DN, Montefiori DC, Carville A, Mansfield KG, Havenga MJ, Pau MG, Goudsmit J, Barouch DH (2009) Immune control of an SIV challenge by a T-cell-based vaccine in rhesus monkeys. *Nature* **457**: 87-91
- Liu ZY, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV (1997) Elevated CD38 antigen expression on CD8(+) T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the multicenter AIDS cohort study than CD4(+) cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* **16**: 83-92
- Livingston B, Crimi C, Newman M, Higashimoto Y, Appella E, Sidney J, Sette A (2002) A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple th lymphocyte epitopes. *Journal of Immunology* **168**: 5499-5506

- Malm M, Rollman E, Ustav M, Hinkula J, Krohn K, Wahren B, Blazevic V (2005) Cross-clade protection induced by human immunodeficiency virus-1 DNA immunogens expressing consensus sequences of multiple genes and epitopes from subtypes A, B, C, and FGH. *Viral Immunology* **18**: 678-688
- Markosyan RM, Cohen FS, Melikyan GB (2003) HIV-1 envelope proteins complete their folding into six-helix bundles immediately after fusion pore formation. *Molecular Biology of the Cell* **14**: 926-938
- Martinelli E, Cicala C, Van Ryk D, Goode DJ, Macleod K, Arthos J, Fauci AS (2007) HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 3396-3401
- Martins MA, Wilson NA, Reed JS, Ahn CD, Klimentidis YC, Allison DB, Watkins DI (2010) T-Cell Correlates of Vaccine Efficacy after a Heterologous Simian Immunodeficiency Virus Challenge. *Journal of Virology* **84**: 4352-4365
- Masci AM, Galgani M, Cassano S, De Simone S, Gallo A, De Rosa V, Zappacosta S, Racioppi L (2003) HIV-1 gp120 induces anergy in naive T lymphocytes through CD4-independent protein kinase-A-mediated signaling. *Journal of Leukocyte Biology* **74**: 1117-1124
- Masemola A, Mashishi T, Khoury G, Mohube P, Mokgotho P, Vardas E, Colvin M, Zijenah L, Katzenstein D, Musonda R, Allen S, Kumwenda N, Taha T, Gray G, McIntyre J, Karim SA, Sheppard HW, Gray CM, Team HS (2004) Hierarchical targeting of subtype C human immunodeficiency virus type 1 proteins by CD8(+) T cells: Correlation with viral load. *Journal of Virology* **78**: 3233-3243
- McElrath MJ (2010) Immune Responses to HIV Vaccines and Potential Impact on Control of Acute HIV-1 Infection. *Journal of Infectious Diseases* **202**: S323-S326
- McElrath MJ, De Rosa SC, Moodie Z, Dubey S, Kierstead L, Janes H, Defawe OD, Carter DK, Hural J, Akondy R, Buchbinder SP, Robertson MN, Mehrotra DV, Self SG, Corey L, Shiver JW, Casimiro DR, Step Study Protocol T (2008) HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet* **372**: 1894-1905
- McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF (2010) The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Reviews Immunology* **10**: 11-23
- Melikyan GB, Markosyan RM, Hemmati H, Delmedico MK, Lambert DM, Cohen FS (2000) Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *Journal of Cell Biology* **151**: 413-423
- Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR (2010) Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology* **7**

- Moir S, Malaspina A, Li YX, Chun TW, Lowe T, Adelsberger J, Baseler M, Ehler LA, Liu SY, Davey RT, Mican JAM, Fauci AS (2000) B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. *Journal of Experimental Medicine* **192**: 637-645
- Mok H, Lee S, Wright DW, Crowe JE (2008) Enhancement of the CD8(+) T cell response to a subdominant epitope of respiratory syncytial virus by deletion of an immunodominant epitope. *Vaccine* **26**: 4775-4782
- Morgado MG, Guimaraes ML, Galvao-Castro B (2002) HIV-1 polymorphism: A challenge for vaccine development - A review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **97**: 143-150
- Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes MDC, Castilho EA, Galvaocastro B, Mullins JI, Hendry RM, Mayer A (1994) V3 REGION POLYMORPHISMS IN HIV-1 FROM BRAZIL - PREVALENCE OF SUBTYPE-B STRAINS DIVERGENT FROM NORTH-AMERICAN EUROPEAN PROTOTYPE AND DETECTION OF SUBTYPE-F. *Aids Research and Human Retroviruses* **10**: 569-576
- Najera R, Delgado E, Perez-Alvarez L, Thomson MM (2002) Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *Aids* **16**: S3-S16
- Nchinda G, Amadu D, Trumpfheller C, Mizenina O, Uberla K, Steinman RM (2010) Dendritic cell targeted HIV gag protein vaccine provides help to a DNA vaccine including mobilization of protective CD8(+) T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 4281-4286
- Ngumbela KC, Day CL, Mncube Z, Nair K, Ramduth D, Thobakgale C, Moodley E, Reddy S, de Pierres C, Mkhwanazi N, Bishop K, van der Stok M, Ismail N, Honeyborne I, Crawford H, Kavanagh DG, Rousseau C, Nickle D, Mullins J, Heckerman D, Korber B, Coovadia H, Kiepiela P, Goulder PJR, Walker BD (2008) Targeting of a CD8 T cell Env epitope presented by HLA-B*5802 is associated with markers of HIV disease progression and lack of selection pressure. *Aids Research and Human Retroviruses* **24**: 72-82
- Norris PJ, Moffett HF, Yang OO, Kaufmann DE, Clark MJ, Addo MM, Rosenberg ES (2004) Beyond help: Direct effector functions of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4(+) T cells. *Journal of Virology* **78**: 8844-8851
- Opravil M, Fierz W, Matter L, Blaser J, Luthy R (1991) POOR ANTIBODY-RESPONSE AFTER TETANUS AND PNEUMOCOCCAL VACCINATION IN IMMUNOCOMPROMISED, HIV-INFECTED PATIENTS. *Clinical and Experimental Immunology* **84**: 185-189
- Owen RE, Heitman JW, Hirschhorn DF, Lanteri MC, Biswas HH, Martin JN, Krone MR, Deeks SG, Norris PJ, Immunol NCHAV (2010) HIV+ elite controllers have low HIV-specific T-cell activation yet maintain strong, polyfunctional T-cell responses. *Aids* **24**: 1095-1105
- Peut V, Kent SJ (2007) Utility of human immunodeficiency virus type 1 envelope as a T-cell immunogen. *Journal of Virology* **81**: 13125-13134

- Peut V, Kent SJ (2009) Substantial envelope-specific CD8 T-cell immunity fails to control siv disease. *Virology* **384**: 21-27
- Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, Heyward W, Martin M, van Griensven F, Hu D, Tappero JW, Choopanya K, Bangkok Vaccine E (2006) Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *Journal of Infectious Diseases* **194**: 1661-1671
- Precopio ML, Betts MR, Parrino J, Price DA, Gostick E, Ambrozak DR, Asher TE, Douek DC, Harari A, Pantaleo G, Bailer R, Graham BS, Roederer M, Koup RA (2007) Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *Journal of Experimental Medicine* **204**: 1405-1416
- Price DA, Goulder PJR, Klenerman P, Sewell AK, Easterbrook PJ, Troop M, Bangham CRM, Phillips RE (1997) Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 1890-1895
- Quinn TC (2008) HIV epidemiology and the effects of antiviral therapy on long-term consequences. *Aids* **22**: S7-S12
- Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li CJ, Wabwire-Mangen F, Meehan MO, Lutalo T, Gray RH, Rakai Project Study G (2000) Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *New England Journal of Medicine* **342**: 921-929
- Ramduth D, Day CL, Thobakgale CF, Mkhwanazi NP, de Pierres C, Reddy S, van der Stok M, Mncube Z, Nair K, Moodley ES, Kaufmann DE, Streeck H, Coovadia HM, Kiepiela P, Goulder PJR, Walker BD (2009) Immunodominant HIV-1 Cd4+T Cell Epitopes in Chronic Untreated Clade C HIV-1 Infection. *Plos One* **4**
- Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Premisri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil JG, Francis DP, Stablein D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb ML, Michael NL, Kunasol P, Kim JH, Investigators M-T (2009) Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *New England Journal of Medicine* **361**: 2209-2220
- Reynolds MR, Weiler AM, Weisgrau KL, Piaskowski SM, Furlott JR, Weinfurter JT, Kaizu M, Soma T, Leon EJ, MacNair C, Leaman DP, Zwick MB, Gostick E, Musani SK, Price DA, Friedrich TC, Rakasz EG, Wilson NA, McDermott AB, Boyle R, Allison DB, Burton DR, Koff WC, Watkins DI (2008) Macaques vaccinated with live-attenuated SIV control replication of heterologous virus. *Journal of Experimental Medicine* **205**: 2537-2550
- Ribeiro SP, Rosa DS, Fonseca SG, Mairena EC, Postol E, Oliveira SC, Guilherme L, Kalil J, Cunha-Neto E (2010) A Vaccine Encoding Conserved Promiscuous HIV CD4 Epitopes Induces Broad T Cell Responses in Mice Transgenic to Multiple Common HLA Class II Molecules. *Plos One* **5**

- Rodriguez B, Lederman MM, Jiang W, Bazdar DA, Garate K, Harding CV, Sieg SF (2006) Interferon-alpha differentially rescues CD4 and CD8 T cells from apoptosis in HIV infection. *Aids* **20**: 1379-1389
- Rolland M, Nickle DC, Mullins JI (2007) HIV-1 group M conserved elements vaccine. *Plos Pathogens* **3**: 1551-1555
- Rolland M, Tovanabutra S, Gilbert PB, Sanders-Buell E, Heath L, Decamp AC, Magaret CC, Bose M, Bradfield A, O'Sullivan A, Crossler J, Deng W, Zhao H, Wong K, Raugi DN, Hural J, Dubey S, Frahm N, Michael NL, Shiver J, Corey L, Li F, Self SG, Kim J, Buchbinder S, Casimiro DR, Robertson MN, McElrath MJ, McCutchan FE, Mullins JI (2009) Evidence of vaccine-induced changes in breakthrough HIV-1 strains from the Step trial. *Retrovirology* **6**
- Rosa DS, Iwai LK, Tzelepis F, Bargieri DY, Medeiros MA, Soares IS, Sidney J, Sette A, Kalil J, Mello LE, Cunha E, Rodrigues MM (2006) Immunogenicity of a recombinant protein containing the Plasmodium vivax vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4(+) T-cell epitopes administered to non-human primates (Callithrix jacchus jacchus). *Microbes and Infection* **8**: 2130-2137
- Rosa DS, Ribeiro SP, Almeida RR, Mairena EC, Postol E, Kalil J, Cunha-Neto E (2011) A DNA Vaccine Encoding Multiple HIV CD4 Epitopes Elicits Vigorous Polyfunctional, Long-Lived CD4(+) and CD8(+) T Cell Responses. *Plos One* **6**
- Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, Walker BD (1997) Vigorous HIV-1-specific CD4(+) T cell responses associated with control of viremia. *Science* **278**: 1447-1450
- Ryu SJ, Jung KM, Yoo HS, Kim TW, Kim S, Chang J, Choi EY (2009) Cognate CD4 help is essential for the reactivation and expansion of CD8 memory T cells directed against the hematopoietic cell-specific dominant minor histocompatibility antigen, H60. *Blood* **113**: 4273-4280
- Sacha JB, Giraldo-Vela JP, Buechler MB, Martins MA, Maness NJ, Chung C, Wallace LT, Leon EJ, Friedrich TC, Wilson NA, Hiraoka A, Watkins DI (2009) Gag- and Nef-specific CD4(+) T cells recognize and inhibit SIV replication in infected macrophages early after infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 9791-9796
- Saez-Cirion A, Pancino G, Sinet M, Venet A, Lambotte O, Gr AEHCS (2007) HIV controllers: how do they tame the virus? *Trends in Immunology* **28**: 532-540
- Salemi M, Strimmer K, Hall WW, Duffy M, Delaporte E, Mboup S, Peeters M, Vandamme AM (2001) Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. *Faseb Journal* **15**: 276-278
- Santra S, Korber BT, Muldoon M, Barouch DH, Nabel GJ, Gao F, Hahn BH, Haynes BF, Letvin NL (2008) A centralized gene-based HIV-1 vaccine elicits broad cross-clade cellular immune responses in rhesus monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 10489-10494

- Santra S, Liao HX, Zhang RJ, Muldoon M, Watson S, Fischer W, Theiler J, Szinger J, Balachandran H, Buzby A, Quinn D, Parks RJ, Tsao CY, Carville A, Mansfield KG, Pavlakis GN, Felber BK, Haynes BF, Korber BT, Letvin NL (2010) Mosaic vaccines elicit CD8(+) T lymphocyte responses that confer enhanced immune coverage of diverse HIV strains in monkeys. *Nature Medicine* **16**: 324-U122
- Schacker TW, Hughes JP, Shea T, Coombs RW, Corey L (1998) Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Annals of Internal Medicine* **128**: 613-+
- Schroers R, Huang XF, Hammer J, Zhang JW, Chen SY (2002) Identification of HLA DR7-restricted epitopes from human telomerase reverse transcriptase recognized by CD4+T-helper cells. *Cancer Research* **62**: 2600-2605
- Scorza T, Grubb K, Smooker P, Rainczuk A, Proll D, Spithill TW (2005) Induction of strain-transcending immunity against *Plasmodium chabaudi* adami malaria with a multiepitope DNA vaccine. *Infection and Immunity* **73**: 2974-2985
- Seaman MS, Xu L, Beaudry K, Martin KL, Beddall MH, Miura A, Sambor A, Chakrabarti BK, Huang Y, Bailer R, Koup RA, Mascola JR, Nabel GJ, Letvin NL (2005) Multiclade human immunodeficiency virus type 1 envelope immunogens elicit broad cellular and humoral immunity in rhesus monkeys. *Journal of Virology* **79**: 2956-2963
- Seder RA, Darrah PA, Roederer M (2008) T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nature Reviews Immunology* **8**: 247-258
- Sercarz EE, Lehmann PV, Ametani A, Benichou G, Miller A, Moudgil K (1993) DOMINANCE AND CRYPTICITY OF T-CELL ANTIGENIC DETERMINANTS. *Annual Review of Immunology* **11**: 729-766
- Simon V, Ho DD, Karim QA (2006) HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet* **368**: 489-504
- Smith CM, Wilson NS, Waithman J, Villadangos JA, Carbone FR, Heath WR, Belz GT (2004) Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nature Immunology* **5**: 1143-1148
- Song XT, Evel-Kabler K, Rollins L, Aldrich M, Gao F, Huang XF, Chen SY (2006) An alternative and effective HIV vaccination approach based on inhibition of antigen presentation attenuators in dendritic cells. *Plos Medicine* **3**: 76-93
- Stacey AR, Norris PJ, Qin L, Haygreen EA, Taylor E, Heitman J, Lebedeva M, DeCamp A, Li DF, Grove D, Self SG, Borrow P (2009) Induction of a Striking Systemic Cytokine Cascade prior to Peak Viremia in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection, in Contrast to More Modest and Delayed Responses in Acute Hepatitis B and C Virus Infections. *Journal of Virology* **83**: 3719-3733
- Staprans SI, Barry AP, Silvestri G, Safritz JT, Kozyr N, Sumpter B, Nguyen H, McClure H, Montefiori D, Cohen JI, Feinberg MB (2004) Enhanced SIV replication and accelerated progression to AIDS in macaques primed to mount a CD4 T cell response to the SIV envelope protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 13026-13031

- Streeck H, Jolin JS, Qi Y, Yassine-Diab B, Johnson RC, Kwon DS, Addo MM, Brumme C, Routy JP, Little S, Jessen HK, Kelleher AD, Hecht FM, Sekaly RP, Rosenberg ES, Walker BD, Carrington M, Altfield M (2009) Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific CD8(+) T-Cell Responses during Primary Infection Are Major Determinants of the Viral Set Point and Loss of CD4(+) T Cells. *Journal of Virology* **83**: 7641-7648
- Sturniolo T, Bono E, Ding JY, Radrizzani L, Tuereci O, Sahin U, Braxenthaler M, Gallazzi F, Protti MP, Sinigaglia F, Hammer J (1999) Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nature Biotechnology* **17**: 555-561
- Sun CJ, Zhang L, Zhang MC, Liu YC, Zhong M, Ma X, Chen L (2010) Induction of balance and breadth in the immune response is beneficial for the control of SIVmac239 replication in rhesus monkeys. *Journal of Infection* **60**: 371-381
- Surls J, Nazarov-Stoica C, Kehl M, Casares S, Brumeanu TD (2010) Differential effect of CD4(+)Foxp3(+) T-regulatory cells on the B and T helper cell responses to influenza virus vaccination. *Vaccine* **28**: 7319-7330
- Takebe Y, Kusagawa S, Motomura K (2004) Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS pandemic. *Pediatrics International* **46**: 236-244
- Taylor BS, Hammer SM (2008) The challenge of HIV-1 subtype diversity (vol 358, pg 1590, 2008). *New England Journal of Medicine* **359**: 1965-1966
- Tenzer S, Wee E, Burgevin A, Stewart-Jones G, Friis L, Lamberth K, Chang CH, Harndahl M, Weimershaus M, Gerstoft J, Akkad N, Klennerman P, Fugger L, Jones EY, McMichael AJ, Buus S, Schild H, van Ender P, Iversen AKN (2009) Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance. *Nature Immunology* **10**: 636-U109
- Thomson MM, Perez-Alvarez L, Najera R (2002) Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infectious Diseases* **2**: 461-471
- Toes REM, Hoeben RC, van der Voort EIH, Rensing ME, van der Eb AJ, Melief CJM, Offringa R (1997) Protective anti-tumor immunity induced by vaccination with recombinant adenoviruses encoding multiple tumor-associated cytotoxic T lymphocyte epitopes in a string-of-beads fashion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 14660-14665
- Tomescu C, Chehimi J, Maino VC, Montaner LJ (2007) NK cell lysis of HIV-1-infected autologous CD4 primary T cells: Requirement for IFN-mediated NK activation by plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Immunology* **179**: 2097-2104
- Turnbull EL, Wong M, Wang SY, Wei XP, Jones NA, Conrod KE, Aldam D, Turner J, Pellegrino P, Keele BF, Williams I, Shaw GM, Borrow P (2009) Kinetics of Expansion of Epitope-Specific T Cell Responses during Primary HIV-1 Infection. *Journal of Immunology* **182**: 7131-7145
- UNAIDS. (2009) AIDS Epidemic update.

- Vaccari M, Mattapallil J, Song K, Tsai WP, Hryniewicz A, Venzon D, Zanetti M, Reimann KA, Roederer M, Franchini G (2008) Reduced protection from simian immunodeficiency virus SIVmac251 infection afforded by memory CD8(+) T cells induced by vaccination during CD4(+) T-cell deficiency. *Journal of Virology* **82**: 9629-9638
- Wainberg MA (2004) HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *Aids* **18**: S63-S68
- Wang H, Nishanian P, Fahey JL (1995) CHARACTERIZATION OF IMMUNE SUPPRESSION BY A SYNTHETIC HIV GP41 PEPTIDE. *Cellular Immunology* **161**: 236-243
- Watkins DI (2008) The hope for an HIV vaccine based on induction of CD8(+) T lymphocytes - A review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **103**: 119-129
- Watkins DI, Burton DR, Kallas EG, Moore JP, Koff WC (2008) Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nature Medicine* **14**: 617-621
- Wawer MJ, Gray RH, Sewankambo NK, Serwadda D, Li XB, Laeyendecker O, Kiwanuka N, Kigozi G, Kiddugavu M, Lutalo T, Nalugoda F, Wabwire-Mangen F, Meehan MP, Quinn TC (2005) Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. *Journal of Infectious Diseases* **191**: 1403-1409
- Weaver EA, Lu ZJ, Camacho ZT, Moukdar F, Liao HX, Ma BJ, Muldoon M, Theiler J, Nabel GJ, Letvin NL, Korber BT, Hahn BH, Haynes BF, Gao F (2006) Cross-subtype T-cell immune responses induced by a human immunodeficiency virus type 1 group M consensus env immunogen. *Journal of Virology* **80**: 6745-6756
- Weber B (2006) Screening of HIV infection: role of molecular and immunological assays. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **6**: 399-411
- Weiss RA (2001) Gulliver's travels in HIVland. *Nature* **410**: 963-967
- Who. (2008) World Health Organization. Towards universal access: scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector.
- Wilson DB, Wilson DH, Schroder K, Pinilla C, Blondelle S, Houghten RA, Garcia KC (2004) Specificity and degeneracy of T cells. *Molecular Immunology* **40**: 1047-1055
- Wilson NA, Keele BF, Reed JS, Piaskowski SM, MacNair CE, Bett AJ, Liang XP, Wang FB, Thoryk E, Heidecker GJ, Citron MP, Huang LY, Lin J, Vitelli S, Ahn CD, Kaizu M, Maness NJ, Reynolds MR, Friedrich TC, Loffredo JT, Rakasz EG, Erickson S, Allison DB, Piatak M, Lifson JD, Shiver JW, Casimiro DR, Shaw GM, Hahn BH, Watkins DI (2009) Vaccine-Induced Cellular Responses Control Simian Immunodeficiency Virus Replication after Heterologous Challenge. *Journal of Virology* **83**: 6508-6521

- Wilson SE, Habeshaw JA, Addawe MA, Hounsell EF, Oxford JS (1997) HIV type 1 envelope glycoprotein 120 carboxy-terminal peptide-induced human T cell lines selectively suppress heterogeneous proliferative T cell responses to soluble antigens. *Aids Research and Human Retroviruses* **13**: 1313-1324
- Wyand MS, Manson K, Montefiori DC, Lifson JD, Johnson RP, Desrosiers RC (1999) Protection by live, attenuated simian immunodeficiency virus against heterologous challenge. *Journal of Virology* **73**: 8356-8363
- Wyand MS, Manson KH, GarciaMoll M, Montefiori D, Desrosiers RC (1996) Vaccine protection by a triple deletion mutant of simian immunodeficiency virus. *Journal of Virology* **70**: 3724-3733
- Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H, Tsukamoto T, Kuwano T, Takeda A, Kawada M, Tsunetsugu-Yokota Y, Matano T (2009) Polyfunctional CD4(+) T-Cell Induction in Neutralizing Antibody-Triggered Control of Simian Immunodeficiency Virus Infection. *Journal of Virology* **83**: 5514-5524
- Yant LJ, Friedrich TC, Johnson RC, May GE, Maness NJ, Enz AM, Lifson JD, O'Connor DH, Carrington M, Watkins DI (2006) The high-frequency major histocompatibility complex class I allele Mamu-B*17 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *Journal of Virology* **80**: 5074-5077
- Zhang GL, Srinivasan KN, Veeramani A, August JT, Brusic V (2005) PREDBALB/c: a system for the prediction of peptide binding to H2(d) molecules, a haplotype of the BALB/c mouse. *Nucleic Acids Research* **33**: W180-W183
- Zhu TF, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, Ho DD (1998) An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**: 594-597

A DNA Vaccine Encoding Multiple HIV CD4 Epitopes Elicits Vigorous Polyfunctional, Long-Lived CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Responses

Daniela Santoro Rosa^{1,3,4*}, Susan Pereira Ribeiro^{1,3*}, Rafael Ribeiro Almeida¹, Eliane Conti Mairena^{2,3}, Edilberto Postól^{2,3}, Jorge Kalil^{1,2,3}, Edecio Cunha-Neto^{1,2,3*}

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

Abstract

T-cell based vaccines against HIV have the goal of limiting both transmission and disease progression by inducing broad and functionally relevant T cell responses. Moreover, polyfunctional and long-lived specific memory T cells have been associated to vaccine-induced protection. CD4⁺ T cells are important for the generation and maintenance of functional CD8⁺ cytotoxic T cells. We have recently developed a DNA vaccine encoding 18 conserved multiple HLA-DR-binding HIV-1 CD4 epitopes (HIVBr18), capable of eliciting broad CD4⁺ T cell responses in multiple HLA class II transgenic mice. Here, we evaluated the breadth and functional profile of HIVBr18-induced immune responses in BALB/c mice. Immunized mice displayed high-magnitude, broad CD4⁺/CD8⁺ T cell responses, and 8/18 vaccine-encoded peptides were recognized. In addition, HIVBr18 immunization was able to induce polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells that proliferate and produce any two cytokines (IFN γ /TNF α , IFN γ /IL-2 or TNF α /IL-2) simultaneously in response to HIV-1 peptides. For CD4⁺ T cells exclusively, we also detected cells that proliferate and produce all three tested cytokines simultaneously (IFN γ /TNF α /IL-2). The vaccine also generated long-lived central and effector memory CD4⁺ T cells, a desirable feature for T-cell based vaccines. By virtue of inducing broad, polyfunctional and long-lived T cell responses against conserved CD4⁺ T cell epitopes, combined administration of this vaccine concept may provide sustained help for CD8⁺ T cells and antibody responses- elicited by other HIV immunogens.

Citation: Rosa DS, Ribeiro SP, Almeida RR, Mairena EC, Postól E, et al. (2011) A DNA Vaccine Encoding Multiple HIV CD4 Epitopes Elicits Vigorous Polyfunctional, Long-Lived CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Responses. PLoS ONE 6(2): e16921. doi:10.1371/journal.pone.0016921

Editor: Lishomwa Ndhlovu, University of California San Francisco, United States of America

Received: October 1, 2010; **Accepted:** January 5, 2011; **Published:** February 11, 2011

Copyright: © 2011 Rosa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

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

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

* E-mail: edecunha@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Despite the success of antiretroviral treatment, a safe and effective HIV vaccine is the most promising strategy for controlling the AIDS pandemic, especially in developing countries. HIV vaccine strategies that focus on the generation of virus-specific T-cell responses have the goal of limiting both transmission and disease progression by controlling HIV viral loads [1].

To date, two efficacy trials assessed HIV-specific cellular mediated immunity. The STEP vaccine trial developed by Merck used a replication-defective Ad5 vector, expressing Gag, Pol and Nef proteins from HIV-1 [2]. The results from this trial demonstrated that it neither prevented HIV-1 infection nor reduced viral load in subsequently infected subjects [3,4]. Immunological analyses revealed that each vaccinated individual recognized an average of only three epitopes [5]. The narrowness of the induced

immune responses may have been an important factor in the lack of vaccine efficacy [3]. Indeed, non-human primate studies have shown that vaccines that induced broad CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses can control peak SIV viremia [6]. In the recently reported RV144 HIV-1 vaccine trial conducted in Thailand, an immunization strategy based on recombinant canarypox priming followed by a protein boosting generated modest protection against the acquisition of HIV infection. Immunological analysis of samples from the study showed that the vaccine-induced immune response was essentially composed of CD4⁺ T cells and binding antibodies; no IFN γ or IL-2 secreting HIV-specific CD8⁺ T cells were detected [7]. However, the same immunogens induced cytotoxic immune responses in a minority of vaccinees in previous studies [8]. At any event, data from the RV 144 trial supported the notion that CD4⁺ T cells could play a protective role in HIV vaccine-induced immunity.

CD4⁺ T cells can contribute to protection against viral infection by both indirect and direct manners [9–11]. CD4⁺ T cell can help induce and maintain CD8⁺ and B cell responses. The main contribution of CD4⁺ T cells is to provide help to full differentiation and maintenance of cytotoxic CD8⁺ T cells and B cells. They promote the generation of CD8⁺ cytotoxic T cell response (CTL) able to control viral replication [12–14] as well as mobilization of CTLs to peripheral sites of infection [15]. Furthermore, CD4⁺ T cells can promote B cell differentiation into plasma cells to produce neutralizing antibodies and assist memory B cells responses to re-infection [16]. CD4⁺ T cells can also exert direct and indirect antiviral effects in retroviral infection. The outcome of retroviral infection depends on the magnitude and duration of virus-specific CD4⁺ T cell responses [17]. A direct antiviral effect of CD4⁺ T cells was also observed in SIV infection. CD4⁺ T cells induce apoptosis of SIV-infected macrophages [18]. The presence of SIV-specific CD4⁺ T cell responses with a cytotoxic phenotype was associated with the control of rebounding viremia in CD8⁺ depleted SIV-infected macaques [19]. Further in support of a protective role for CD4⁺ T cell responses, it has been shown that elite controller SIV-infected macaques mount broad CD4⁺-specific T cell responses, and that certain macaque class II alleles are associated with significantly decreased viral loads [20].

Vaccination strategies that induced broad, polyfunctional and long-lasting SIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses were able to lower viral load after repeated mucosal challenge in the absence of antibodies [6,21]. Recently, the impact of CD4⁺ T cell help on the generation of adaptive CD8⁺ T cell responses in SIV infection of nonhuman primates was evaluated. Indeed, vaccination in the absence of CD4⁺ T cells reduced protection mediated by CD8⁺ T cells after SIV infection [22]. Moreover, passive immunization with a SIV-specific neutralizing antibody led to a significant increase in polyfunctional SIV-Gag specific CD4⁺ T cells, and the frequency of these cells was inversely correlated with the plasma viral load during chronic infection [23]. Although a major concern is that CD4⁺ T cells induced by vaccination can serve as immediate HIV-1 targets, to date no evidence exists that CD4⁺ T cell activation or vaccine-induced CD4⁺ T cells results in heightened HIV-1 acquisition or viremia after infection [5,7]. Indeed, in SIV-challenged rhesus macaques, data suggest that CD8⁺ T cell function has a greater impact on viremia than the activation status of CD4⁺ target cells [24]. In addition, Ad5-based SIV vaccine regimens induce powerful CD4⁺ T cell responses in animals that control viremia [6]. It could thus be hypothesized that a vaccine inducing potent CD4⁺ T cell responses might have a protective effect in HIV/SIV infection, possibly due to cognate help, leading to induction, maintenance and differentiation of CD8⁺ cytotoxic and/or B cell responses. It is thus clear that a successful HIV vaccine should also induce a strong CD4⁺ T cell response [25]. Our group has recently identified conserved CD4 epitopes from HIV that were able to bind to multiple HLA-DR molecules. Peptides encoding such epitopes were recognized by PBMC from over 90% of HIV-1 infected individuals [26]. We recently reported that a DNA vaccine encoding such promiscuous epitopes (HIVBr18) was able to induce broad specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses in mice transgenic to common HLA class II alleles (HLA-DR2, -DR4, -DQ6, -DQ8) [27]. Significantly, 16 out of the 18 encoded epitopes were recognized. However, the functional profile induced by the vaccine was not evaluated in the HLA class II transgenic mice.

Several lines of evidence suggest an important role for specific polyfunctional T cell responses in immune control of different pathogens [28]. In HIV infection, the presence of polyfunctional T cell responses has been associated with both the control of virus replication [29] and protection from disease progression [14,30–32]. Moreover, polyfunctional HIV-specific CD4⁺ T cells were

found in the rectal mucosa of infected individuals that spontaneously control HIV replication, named elite controllers. The proportion of such cells directly correlated with the total magnitude of the mucosal specific CD8⁺ T cell responses [14]. The maturation status of T cells is also an important issue. Central memory T cells are thought to ensure the long-term maintenance of antiviral responses due to their long half-life and self-renewal capacity [33]. HIV controllers have a preserved central memory CD4⁺ T cell compartment and sustain an effector memory CD4⁺ T cell population [34]. A vaccine able to induce SIV-specific effector memory CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses, in the absence of neutralizing antibodies, was able to prevent establishment of progressive systemic infection after mucosal challenge with a highly pathogenic SIV [21]. Indeed, memory T cells have been associated with long-term vaccine induced protection [35].

In the current study, we have evaluated the polyfunctionality, longevity and memory phenotype of the HIV- specific T cell responses induced by HIVBr18, a DNA vaccine encoding promiscuous CD4 epitopes, in BALB/c mice. We found that HIVBr18 was able to induce high magnitude, broad and polyfunctional CD4⁺/CD8⁺ T cell responses, and 8/18 vaccine-encoded peptides were recognized. Moreover, the vaccine also generated long-lived central and effector memory CD4⁺ T cells, a desirable feature for T cell-based vaccines.

Results

Broad specific T cell responses following immunization with a DNA vaccine encoding promiscuous HIV-1 epitopes

To analyze whether the HIVBr18 vaccine could be immunogenic in BALB/c mice, we first performed an *in silico* analysis. For this purpose, we evaluated the ability of the HIV peptides to bind to BALB/c MHC molecules, using the PRED^{BALB/c} algorithm, a prediction algorithm specific for the H-2 Dd, Kd, I-Ad, and I-Ed molecules [30]. All HIV-1 peptides encoded by the vaccine were predicted to bind to BALB/c H-2^d class II molecules; most peptides were predicted to bind to at least one H-2^d class I molecule as well (Table S1).

To analyze whether immunization with HIVBr18 could induce specific T cell immune responses, BALB/c mice were immunized with HIVBr18 or the empty vector pVAX1. Fifteen days after the last dose, splenocytes from immunized mice were incubated with each of the 18 HIV-1 peptides encoded by the DNA vaccine, and specific IFN γ and IL-2 secretion was measured by ELISPOT assay. We detected IFN γ and IL-2 secreting cells against eight (Figure 1A) HIVBr18- encoded peptides; all peptides that induced IFN γ secretion were also capable to elicit IL-2 secretion. The recognized peptides p17 (73–89), p6 (32–46), pol (785–799), gp160 (188–201), rev (11027), vpr (58–65), vif (144–158) and nef (180–194) consistently presented positive responses over multiple independent immunization experiments. In contrast, T cells from pVAX1 immunized mice presented negligible numbers of IFN γ and IL-2 secreting cells after incubation with HIVBr18 peptides, in all performed experiments.

To identify CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses, we performed a CFSE-based proliferation assay. Taking into account multiple independent experiments, we detected consistent CD4⁺ T cell proliferative responses (Figure 2B, upper panels) against five peptides (p6 (32–46), pol (785–799), gp160 (188–201), vif (144–158) and nef (180–194)) and CD8⁺ T cell proliferative responses (Figure 2B, lower panels) against two peptides (gp160 (188–201) and nef (180–194)). Interestingly, all peptides that elicited proliferative CD4⁺ and/or CD8⁺ T cell responses were also able

Figure 1. Immunization with HIVBr18 induces IFN γ and IL-2 secretion and proliferation against multiple HIV-1 epitopes. Two weeks after the last immunization with HIVBr18 or the empty pVAX1 vector, pooled spleen cells from 6 BALB/c mice were cultured in the presence of HIV-1 peptides (5 μ M) or medium only. (A) Frequencies of HIV peptide-specific IFN γ (left pie chart) and IL-2 (right pie chart) secreting cells were measured by ELISPOT assay. The responses are shown by displaying each the number of SFU/10⁶ cells for each positive peptide as a proportion of the sum of SFU/10⁶ cells for all positive peptides. (B) Proliferative T cell responses were assessed by CFSE dilution assay. Splenocytes were labeled with CFSE (1.25 μ M) and cultured for 5 days. After staining with fluorochrome-labeled anti-CD3, -CD4 and -CD8 monoclonal antibodies, cells were analyzed by flow cytometry. CFSE dilution on gated CD3⁺CD4⁺ or CD3⁺CD8⁺ cells was used as a readout for antigen-specific proliferation. Representative dot plots of CD4⁺ (upper panels) and CD8⁺ (lower panels) T cell proliferation (values in boxes represent % CFSE^{low} cells) of splenocytes from HIVBr18 immunized mice; Data are representative of nine independent immunization experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0016921.g001

to elicit cytokine (IFN γ and IL-2) secretion. Thus, vaccination of BALB/c mice with HIVBr18 was able to induce broad specific immune responses against eight epitopes encoded by the vaccine.

Magnitude of T cell responses

To assess the magnitude of vaccine-induced T cell responses, we evaluated the cellular immune responses of splenocytes from

HIVBr18 or pVAX1 immunized BALB/c mice against pooled HIV-1 peptides. We observed that over 10% of both CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ splenic T cells from HIVBr18 immunized mice displayed specific proliferation against the HIV-1 peptides encoded by HIVBr18 (Figure 2A and B). In addition, BALB/c mice immunized with HIVBr18 displayed a significant number of peptide-specific IFN γ and IL-2 secreting cells (Figure 2C). In

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

Figure 2. Immunization with HIVBr18 induces CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation and type 1 cytokine production in response to pooled HIV-1 peptides. Two weeks after the last immunization with HIVBr18 or the empty pVAX1 vector, pooled spleen cells from 6 BALB/c mice were cultured in the presence of 5 μ M of pooled HIV-1 peptides or medium only. (A and B) Splenocytes were labeled with CFSE (1.25 μ M) and cultured for 5 days. After staining with fluorochrome-labeled anti-CD3, -CD4 and -CD8 monoclonal antibodies, cells were analyzed by flow cytometry and CFSE dilution on gated CD3⁺CD4⁺ or CD3⁺CD8⁺ cells was used as a readout for antigen-specific proliferation. (A) Representative dot plots of CD4⁺ (left) and CD8⁺ (right) T cell proliferation (% CFSE^{low} cells) of splenocytes stimulated with medium only or pooled peptides from HIVBr18 immunized mice. (B) Quantitative analysis of proliferating CD4⁺ and CD8⁺ CFSE^{low} T cells (values in boxes represent % CFSE^{low} cells). The percentage of proliferating T cells was calculated subtracting the values of peptide-stimulated from non-stimulated cultures; (C) Frequencies of IFN γ and IL-2 secreting cells measured by ELISPOT; (D) Splenocytes from immunized BALB/c mice were cultured in the presence of pooled HIV-1 peptides. After 48 and 120 hours, levels of IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4 and IL-5 in culture supernatants were measured using the mouse Th1/Th2 cytokine cytometric bead array (CBA) by flow cytometry and analyzed using CBA software. Values of cytokine production by peptide-stimulated splenocytes from pVAX1 immunized group were always below the detection limit. Bars represent the mean + 3 SD from nine independent immunization experiments. doi:10.1371/journal.pone.0016921.g002

contrast, splenocytes from pVAX1 immunized mice presented negligible levels of proliferation and cytokine secreting cells to the same pooled HIV-1 peptides (Figures S1, 2B and C).

The results showed above indicate that immunization with HIVBr18 is able to induce Th1 cytokines. In order to analyze the vaccine induced cytokine secretion profile of BALB/c splenocytes incubated with the pooled HIV-1 peptides, we used the cytometric bead array (CBA) for assessment of Th1 and Th2 cytokine secretion. After 48 hours of culture, we found that splenocytes from HIVBr18 immunized mice produced higher levels of type I cytokines like IFN γ , IL-2 and TNF α and negligible levels of IL-5 and IL-4. After 120 hours of culture, the levels of IFN γ and TNF α increased substantially (Figure 2D and S2). Of note, IL-10 production was undetectable (data not shown). Splenocytes from pVAX1 immunized mice failed to secrete cytokines above the detection limit. Taken together, these results indicated that the HIVBr18 DNA vaccine induced potent, specific type 1 cytokine T cell responses.

Functional profile of cellular immune response after HIVBr18 immunization

Since the quality of the immune responses has been associated with vaccine-mediated protection against certain pathogens, we subsequently characterized the phenotype and functional profile of the induced T cells. Using multiparameter flow cytometry, we sought to characterize antigen-specific T cells (CD4⁺ and CD8⁺) based on their ability to proliferate (CFSE dilution assay) and produce the effector cytokines IFN γ , TNF α and IL-2 at a single cell level. As shown in Figure 3A, immunization with HIVBr18 induced HIV-1 peptide-specific production of IFN γ , IL-2 and TNF α by CD4⁺ and to a lesser extent by CD8⁺ T cells. We also observed that both T cell subsets showed a higher proportion of IFN γ ⁺ and TNF α ⁺ cells than IL-2⁺ cells. A simultaneous analysis of proliferation and intracellular cytokine production demonstrated that 2.3% of CD4⁺ and 1.0% of CD8⁺ T cells proliferated (CFSE^{low}) and produced any cytokine tested in response to pooled HIV-1 peptides (Figure 3B). Boolean combinations of proliferating (CFSE^{low}) and cytokine-positive populations indicated that HIVBr18 immunization induced polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells, i.e., that proliferate (CFSE^{low}) and produce IFN γ /TNF α simultaneously (Figure 3C). We also observed high proportions of CFSE^{low}/IFN γ or CFSE^{low}/TNF α in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from mice that received HIVBr18. For CD4⁺ T cells exclusively, we also detected CFSE^{low} cells that simultaneously produced all three tested cytokines (IFN γ /TNF α /IL-2). Splenocytes from the pVAX1 immunized group produced negligible levels of cytokines. Furthermore, triple-cytokine producing cells produced more IFN γ and TNF α than single-cytokine producing cells, as determined by median fluorescent intensity (MFI) (Figure S3). In contrast, there was no difference in the MFI for IL-2 in the triple-cytokine producing cells when compared to cells producing IL-2 alone.

We next examined whether antigen-specific proliferating T cells were the major cytokine producers. As shown in Figures 4A and B, the vast majority (ca. 80%) of CD4⁺ and CD8⁺ T cells that produced the effector cytokines IFN γ and TNF α are within the proliferating (CFSE^{low}) population. In contrast, 50% of IL-2 producing T cells also proliferated (Figure 4B). These experiments also showed that mice immunized with HIVBr18 displayed 2.31, 0.37 and 2.80% of HIV-specific CD4⁺ T cells that proliferated (CFSE^{low}) and produced either IFN γ , IL-2 or TNF α , respectively. A similar response was observed in CD8⁺ T cells, showing that 0.60, 0.22 and 0.64% of CD8⁺ T cells proliferated and produced either IFN γ , IL-2 or TNF α , respectively. In contrast, splenocytes from mice immunized with the control pVAX1 displayed a negligible percentage of specific proliferating/cytokine producing T cells (Figure S4).

Proliferating (CFSE^{low}) and non-proliferating (CFSE^{hi}) CD4⁺ and CD8⁺ T cells were also evaluated by their ability to produce cytokines. Figure 4C summarizes the percentage of proliferating T cells that produced each of the tested cytokines. Significantly, 20% of the specific proliferating CD4⁺ T cells produced IFN γ , 5% produced IL-2 and 30% produced TNF α . A similar profile, albeit with lower values, was observed for proliferating CD8⁺ T cells. In contrast, less than 0.5% of non-proliferating (CFSE^{hi}) T cells showed cytokine production, either on CD4⁺ or CD8⁺ compartment. Overall, these data showed that immunization with the DNA vaccine, HIVBr18, successfully induced polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells that proliferated and produced effector cytokines to epitopes encoded by the vaccine.

Induction of long-lasting HIV-1-specific T cells after vaccination with HIVBr18

To assess whether immunization with HIVBr18 induced long-lasting T cells in BALB/c mice, we measured vaccine-induced CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation and cytokine secretion 2, 4, 12 and 24 weeks after the last DNA immunization. A measurable response was observed at all time points. At 2 and 4 weeks post-immunization, a similar proportion of CD4⁺ T cells (11–12%) proliferated against the pooled HIV-1 peptides (Figure 5A). Twelve weeks after the last dose, a statistically significant decrease in the magnitude of the CD4⁺ T cell proliferative response was observed (4.76% CFSE^{low} cells, versus 11.62% in early time points, $p < 0.01$). This response continued to decline down to 1% of specific proliferating CD4⁺ T cells, 24 weeks after the last dose. Of note, this response was several-fold higher than the values measured in the pVAX1 immunized group. For CD8⁺ T cells (Figure 5B), only the 24 week time point showed a statistically significant decrease in proliferation, as compared to the 2 week time point. Splenic T cells from mice immunized with pVAX1 showed negligible levels of proliferation at all time points for both CD4⁺ and CD8⁺ populations (values in the legend of Figure 5A and B). Of note, 24 weeks after the last immunization, total

A)

B)

C)

Figure 3. Immunization with HIVBr18 induces proliferating T cells with a polyfunctional type 1 cytokine profile. Two weeks after the last immunization with HIVBr18 or the empty vector pVAX1, spleen cells from 6 BALB/c mice were collected, labeled with CFSE (1.25 μ M) and cultured for 4 days in the presence of pooled HIV-1 peptides or medium only. On day 4, cells were pulsed for 12 hours with pooled peptides in the presence of costimulatory antibody and Brefeldin A. Cells were then surface stained with antibodies to CD4 and CD8, permeabilized and stained for intracellular cytokines (IFN γ , TNF α and IL-2) and CD3. (A) Multiparameter flow cytometry was used to determine the frequency of IFN γ , IL-2 or TNF α CD4⁺ and CD8⁺ T cells. (B) Total frequencies of proliferating (CFSE^{low}) and cytokine-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells; (C) After gating on proliferating (CFSE^{low}) and cytokine-producing cells, Boolean combinations were then created using FlowJo software to determine the frequency of each response based on all possible combinations of cytokine expression. Background responses detected in negative control tubes were subtracted from those detected in stimulated samples for every specific functional combination. Negative control tubes include cells stimulated with medium and cells from pVAX1 immunized mice stimulated with pooled peptides. For each sample 500,000 events were collected in the live lymphocyte gate. Results are representative of two to three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0016921.g003

frequencies of proliferating CD4⁺ and CD8⁺ T cells were ca. 1% above baseline, as well as above the values from the pVAX1 immunized group. The ability of T cells from HIVBr18 immunized mice to secrete cytokines was also evaluated by ELISPOT (Figure 5C) and CBA (Figure 5D) assays at different time points. As observed for proliferative responses, there was no significant difference in IFN γ secretion to pooled HIV-1 peptides at 2 or 4 weeks after the last HIVBr18 immunization. IFN γ secretion decreased significantly ($p < 0.01$) 12 weeks after the last dose and was sustained until the 24 week time point (Figure 5C). Similar results were observed when we measured IL-2 secretion (Figure 5C). Splenocytes from HIVBr18 immunized mice were able to secrete type I cytokines like IFN γ , IL-2 and TNF α , which declined over time, as evaluated by the CBA assay, but were still detectable and above pVAX1 immunized group, even 24 weeks after the last dose (Figure 5D). Therefore, long-term proliferative CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses as well as cytokine-secreting responses were detectable up to 24 weeks after the last immunization with HIVBr18.

HIVBr18 immunization induces long-term memory T cells

In order to characterize memory T cell responses induced by immunization, we assessed the expression of memory markers (CD44 and CD62L) among proliferating (CFSE^{low}) CD4⁺ and CD8⁺ T cell populations. We evaluated responses against pooled HIV-1 peptides, 2 weeks after the last immunization with HIVBr18. The candidate vaccine HIVBr18 elicited higher levels of specific effector (T_{EM}) than central (T_{CM}) memory T cells. Among proliferating CFSE^{low} CD4⁺ T cells (8% of total CD4⁺ T cells), ca. 70% and 24% had effector and central memory phenotypes, respectively (data not shown). Similarly, 57% and 39% of proliferating CD8⁺ T cells (7% of total CD8⁺ T cells) had effector and central memory phenotypes, respectively (data not shown).

We also investigated the phenotype of specific cytokine-producing CD4⁺ T cells at two time points. Two weeks after the last immunization, the most abundant population was T_{EM} cells in which more than half produced IFN γ /IL-2 simultaneously (Figure 6A). CD4⁺ T_{CM} predominantly produced IL-2 alone. The kinetic of CD4⁺ T cells demonstrated that the frequency of cytokine-producing CD4⁺ T_{EM} declined over time (2.5% at 2 weeks versus 0.65% at 24 weeks, IFN γ and/or IL-2 cells) (Figure 6A). On the other hand, cytokine-producing CD4⁺ T_{CM}, especially the IL-2 component, showed an increase over time (0.8% at 2 weeks versus 1.52% at 24 weeks, IFN γ and/or IL-2 cells). Collectively, these data indicated that the DNA vaccine HIVBr18 was able to induce specific long-lasting effector and central memory, CD4⁺ and CD8⁺ T cells that produced type 1 cytokines.

Discussion

In this paper, we showed that immunization with HIVBr18 induced strong, broad, polyfunctional and long-lasting HIV-

specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses in BALB/c mice. Moreover, the vaccine induced central and effector memory CD4⁺ T cells.

In our study, all the 18 TEPITOPE-selected promiscuous epitopes were also predicted by the algorithm PRED^{BALB/c} [36] to bind to at least one BALB/c (H-2^d) mouse MHC class II molecule, and 17 were predicted to bind to H-2^d MHC class I molecules. The cross-species recognition of epitopes selected to bind to human MHC molecules is actually expected. The TEPITOPE algorithm has previously identified peptides that can be recognized across species barriers, including H-2^d mice [37]. This may be due to the fact that the identification of multiple HLA-DR binding peptides by TEPITOPE may select for promiscuous peptides that share MHC class II binding motifs similar to many other human and non-human MHC class II molecules [38–40]. Indeed, we also tested this concept in non-human primates. TEPITOPE selection for promiscuous peptides allowed the identification of a similar set of conserved SIV peptides that were frequently recognized by PBMC from SIV-infected elite controller rhesus macaques (unpublished data). Here, we have shown that BALB/c mice immunized with HIVBr18 presented a broad T cell response, directed to 8 out of the 18 epitopes encoded by the vaccine. The induction of broad T cell responses towards conserved epitopes appears to be an essential pre-requisite for protection, in light of recent efficacy trials of T cell-based HIV vaccines [1,4,5]. Indeed, an Adenovirus 5-based SIV vaccine encoding 8 SIV proteins was able to elicit broad CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses and reduced viral load after heterologous challenge [6]. In addition, broad vaccine-induced pre-challenge T cell responses were correlated with lower viral loads and higher CD4⁺ T lymphocyte counts [41]. The breadth of HIV-specific responses in infected individuals has also been associated with viral control [42].

We also evaluated the functional profile of the vaccine-induced specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The ability of the HIVBr18 vaccine to induce IFN γ , TNF α and IL-2, with little or no IL-4, IL-5 or IL-10, indicated a type 1 cytokine response. We extended the functional analysis of splenocytes from HIVBr18 immunized mice and observed that immunization induced CD4⁺ and CD8⁺ T cells with a polyfunctional repertoire. It has become increasingly evident that rather than the magnitude, the quality of the immune response is a crucial factor in defining a protective response [28]. Recent data from immunization studies using the efficacious smallpox and yellow fever vaccines have shown that induction of specific polyfunctional CD4⁺ or CD8⁺ T cells may play a role in protective immunity [43–45]. Furthermore, vaccine-induced polyfunctional (IFN γ ⁺IL-2⁺TNF α ⁺) CD4⁺ T cell populations were shown to provide protection against *Leishmania major* [46] and *M. tuberculosis* [47] challenge. Polyfunctional HIV-1-specific CD4⁺ T cells were present among HIV-1 infected individuals with non-progressive disease [24,25]. Long-term nonprogressor (LTNP) HIV-1 infected patients displayed higher number of polyfunctional CD8⁺ T cells when compared to progressor patients [48].

A)

B)

C)

Figure 4. Immunization with HIVBr18 induces specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells that proliferate and produce type 1 cytokines simultaneously. Two weeks after the last immunization with HIVBr18 or the empty vector pVAX1, spleen cells from 6 BALB/c mice were labeled with CFSE (1.25 μ M) and cultured for 4 days in the presence of pooled HIV-1 peptides or medium only. On day 4, cells were pulsed for 12 hours with pooled peptides or medium, in the presence of costimulatory antibody and Brefeldin A. (A) CFSE and intracellular cytokine staining were used to simultaneously assess proliferation and IFN γ , TNF α or IL2 production. Frequencies of antigen-specific cytokine-producing T cells in proliferating (CFSE^{low}) and non-proliferating (CFSE^{hi}) gates are displayed; (B) Proportion of proliferating cells (CFSE^{low}) in the total cytokine gate (sum of % of cytokine producing cells in gated CFSE^{hi} and CFSE^{low} cells); (C) Percentage of cytokine producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in proliferating cells (CFSE^{low}) (values of cytokine producing cells in CFSE^{low} population $\times$ 100 divided by total CFSE^{low} population). doi:10.1371/journal.pone.0016921.g004

Moreover, HIV elite controllers presented strong polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses in blood and rectal mucosa [14,32]. CD4⁺ T cells from HIV-2 infected subjects, who display a longer time of progression to AIDS than HIV-1 infected patients,

were more polyfunctional than those found in viral load and CD4⁺ T cell-matched HIV-1 infected subjects [49]. Our data thus suggest that HIVBr18, like some validated efficacious vaccines, can elicit polyfunctional T cells, a putative correlate of protection.

Figure 5. Longevity of the antigen specific cellular immune response induced by HIVBr18. BALB/c mice immunized with HIVBr18 were euthanized at the indicated time points after the last immunization. Splenocytes were cultured in the presence of pooled HIV-1 peptides. Percentage of proliferating CD3⁺CD4⁺ (A) and CD3⁺CD8⁺ (B) T cells, 2 (white bar), four (dark gray bar), twelve (black bar) and 24 weeks (striped bar) after last injection. Values of proliferating (CFSE^{low}) CD3⁺CD4⁺ T cells from the pVAX1 group after background subtraction were 0.11%; 0.24%; 0% and 0.03% at 2, 4, 12 and 24 weeks respectively. Values of CD3⁺CD8⁺ CFSE^{low} cells were always below 0.1%; (C) Frequencies of IFN γ and IL-2 secreting cells as measured by ELISPOT assay. Values from the pVAX1 immunized group were always below 5 SFU/10⁶ cells; (D) After 48 hours of incubation with pooled HIV-1 peptides, culture supernatants were analyzed for the presence of IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4 and IL-5 using the mouse Th1/Th2 cytokine cytometric bead array (CBA). NT = not tested; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0016921.g005

Memory T cells may be critical to generate long-term immunity and to effect vaccine-induced viral control. We found that after HIVBr18 immunization, HIV-1-specific proliferating CD4⁺ T cells exhibited mainly a T_{EM} phenotype, with simultaneous IFN γ and IL-2 production, while T_{CM} cells produced mainly IL-2 alone. Specific proliferative, intracellular cytokine, and ELISPOT responses peaked 2–4 weeks after the last dose and then contracted, establishing a long-lived memory cell pool detectable until 24 weeks after the last immunization, a necessary step for protective immunity [50]. We observed that cytokine-producing HIV-1-specific CD4⁺ T_{EM} were abundant at 2 weeks but declined over time, while CD4⁺ T_{CM} increased, indicating that HIV-1-specific CD4⁺ T_{CM} induced by HIVBr18 are especially long-lived and may be able to provide sustained help to CD8⁺ T cells. Taken together, our experiments demonstrated that immunization with HIVBr18 induced long-lived CD4⁺ T cell responses with a significant T_{CM} component. Central memory T cells are thought to ensure the long-term maintenance of antiviral responses due to their long half-life and self-renewal capacity [33]. Immunization with the effective vaccinia virus is able to generate specific long-

lived memory CD4⁺ T cells for more than 30 years [35]. Among HIV-1 infected LTNP individuals, there is a preserved CD4⁺ T_{CM} compartment and signs of potent functional activation in the T_{EM} CD4⁺ T cell compartment [34]. Vaccination that preserved memory CD4⁺ T cells in primates challenged with SIV [51] led to an increased survival [52,53]. This reinforced the importance of memory CD4⁺ T cells in protection against AIDS progression. Further in support of this concept, vaccine-induced SIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T_{EM} cell responses, in the absence of neutralizing antibodies, was able to prevent the establishment of progressive systemic infection after mucosal challenge with a highly pathogenic SIV [21].

We hereby demonstrated that immunization with HIVBr18, a DNA plasmid encoding a string of conserved multiple HLA class II-binding HIV-1 CD4⁺ T cell epitopes, can induce broad, polyfunctional, long-lived CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses. Moreover, these CD4⁺ T cell responses had significant central and effector memory components. We believe the combined administration of this vaccine concept may provide sustained help for CD8⁺ T cell –as well as antibody responses– elicited by other AIDS vaccines.

Figure 6. Memory T cell kinetics after immunization with HIVBr18. Two and 24 weeks after the last immunization with HIVBr18 or the empty vector pVAX1, spleen cells from 6 BALB/c mice were cultured in the presence of pooled HIV-1 peptides. Simultaneous assessment of antigen-specific cytokine production and T cell memory phenotype was performed in gated CD3⁺CD4⁺ cells. Analysis of CD44 and CD62L expression was determined on gated CD3⁺CD4⁺ cells. IFN-γ and/or IL-2 producing effector (CD44^{hi} CD62L^{low}) and central memory (CD44^{hi} CD62L^{hi}) CD4⁺ T cells are depicted.
doi:10.1371/journal.pone.0016921.g006

Methods

Construction of DNA plasmid encoding multiple HIV-1 epitopes

We designed a multi-epitope construct containing the mammalian codon optimized nucleotide sequences of the 18 HIV-1 CD4 epitopes described previously by Fonseca *et al.* [26]: p17(73–89), p24 (33–45), p24 (131–150), p6 (32–46), pol (63–77), pol (136–150), pol (785–799), gp41(261–276), gp160 (19–31), gp160 (174–185), gp160 (188–201), gp160 (481–498), rev (11–27), vpr (58–72), vpr (65–82), vif (144–158), vpu (6–20) and nef (180–194). Epitope sequences, assembled *in tandem* in the above mentioned order, had GPGPG spacers at C and N termini, to avoid the creation of junctional epitopes and interference with processing and presentation [54]. The artificial gene (EZBioLab) was cloned into the HindIII/XhoI restriction site of the pVAX1 vector (Invitrogen) to generate the HIVBr18 plasmid, as previously described [27]. DNA vaccine was purified using the EndoFree Plasmid Giga Kit from Qiagen according to manufacturer's instructions.

Ethics Statement

Mice were housed and manipulated under SPF conditions in the animal care facilities of the Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo (IMT/FMUSP). Experiments were performed in accordance to the guidelines of the Ethics committee of University of São Paulo (CAPPesq- HCFMUSP) and approved under protocol number 775-06.

Mice and Immunizations

Six to eight week-old female BALB/c mice were used in this study. Mice were housed and manipulated under SPF conditions in the animal care facilities of the Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo (IMT/FMUSP). Six mice per group were injected with 10 mM cardiotoxin (Sigma) five days before immunization. At weeks 0, 2 and 4, plasmid DNA HIVBr18 or empty vector pVAX1 was administered intramuscularly. Each quadriceps was injected with 50 μL of DNA at a concentration of 1 μg/μL in saline such that each animal received a total of 100 μg of plasmid DNA. Two weeks after the last DNA injection, mice were euthanized with CO₂.

Peptides

The eighteen multiple HLA-DR binding, frequently recognized peptides, derived from the conserved regions of HIV-1 B subtype consensus and selected from the whole proteome [26] were synthesized in house by solid phase technology using the 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy, with the C-terminal carboxyl group in amide form [55]. Peptide purity and quality were assessed by reverse-phase high performance liquid chromatography and mass spectrometry and was routinely above 90%.

Spleen cell isolation for immune assays

Two weeks after the last immunization, mice were euthanized and spleens were removed aseptically. After obtaining single cell suspensions, cells were washed in 10 mL of RPMI 1640. Cells were then resuspended in R-10 (RPMI supplemented with 10% of fetal bovine serum (GIBCO), 2 mM L-glutamine (Sigma), 10 mM Hepes (Sigma), 1 mM sodium pyruvate, 1% vol/vol non-essential amino acid solution, 40 μg/mL of Gentamicin, 20 μg/mL of Penicillin and 5 × 10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol (SIGMA). The viability of cells was evaluated using 0.2% Trypan Blue exclusion dye to discriminate between live and dead cells. Cell concentration was estimated with the aid of a Neubauer chamber and adjusted in cell culture medium.

Detection of IFN-γ or IL-2 producing cells by ELISPOT assay

Splenocytes from HIVBr18 or pVAX1 immunized mice were assayed for their ability to secrete IFN-γ or IL-2 after *in vitro* stimulation with 5 μM of individual or pooled HIV-1 peptides using an ELISPOT assay. The ELISPOT assay was performed using Becton Dickinson murine IFN-γ and IL-2 ELISPOT kits according to manufacturer's instructions. Spots were counted using an automated stereomicroscope (KS ELISPOT, Zeiss, Oberkochen, Germany). The number of antigen-specific T cells, expressed as spot-forming units (SFU)/10⁶ splenocytes, was calculated after subtracting negative control values (medium only). The positivity cutoff was calculated as the mean + 3 SD of splenocytes from pVAX1 immunized mice, stimulated with all peptides. The cutoff for IFN-γ and IL-2 was 15 SFU/10⁶ splenocytes.

Cytometric Bead array

One million splenocytes were added to each well of 96 well round-bottomed plates and incubated at indicated time points in the presence 5 μM of pooled HIV-1 peptides. Supernatants harvested from cultures at the indicated times were stored at -20°C until cytokine analysis was performed. IL-2, IL-4, IL-5, TNF-α and IFN-γ were detected simultaneously using the mouse Th1/Th2 cytokine cytometric bead array (CBA) kit (BD PharMingen), according to the manufacturer's instructions. The range of detection was 20–5000 pg/mL for each cytokine.

CFSE-based proliferation assay

To monitor the expansion and proliferation of HIV-specific T cells, splenocytes from HIVBr18 or pVAX1 immunized mice were labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) [56]. Briefly, freshly isolated splenocytes were resuspended (50 × 10⁶/mL) in PBS and labeled with 1.25 μM of CFSE (Molecular Probes) at 37°C for 10 minutes. The reaction was quenched with RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and cells were washed before resuspending in RPMI 1640 at a density of 1.5 × 10⁶/mL. Cells were cultured in 96 well round-bottomed plates (3 × 10⁵/well in triplicate) for 5 days at 37°C and 5% CO₂ with medium only or

5 μ M of HIV peptides. Positive controls were stimulated with 2.5 μ g/mL of Concanavalin A (Sigma). Cells were then harvested, washed with 100 μ L of FACS buffer (PBS with 0.5% BSA and 2 mM EDTA) and stained with anti-mouse CD3 phycoerythrin (PE), anti-mouse CD4 peridinin chlorophyll protein (PerCP) and anti-mouse CD8 allophycocyanin (APC) monoclonal antibodies (BD Pharmingen, San Jose, CA) for 45 minutes at 4°C. To analyze the memory phenotype of proliferating cells we stained the cells with anti-CD3 APCCy7, anti-CD4 PerCP, anti-CD8 PECy7, anti-CD44 PE and anti-CD62L APC monoclonal antibodies (BD Pharmingen). Cells were then washed twice with FACS buffer, fixed with 4% paraformaldehyde, and resuspended in FACS buffer. Samples were acquired on a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences) and then analyzed using FlowJo software (version 9.0.2, Tree Star, San Carlo, CA). Fifty thousand events (proliferation evaluation) and 100,000 events (memory phenotype) were acquired in a live lymphocyte gate. The percent of proliferating CD4⁺ and CD8⁺ CFSE^{low} cells was determined in the CD3⁺ cell population. The criteria for scoring as positive the proliferating cell cultures included CFSE^{low} cells > cutoff. The cutoff of unspecific proliferative response was determined based on the median percentage of proliferating cells (% of CD3⁺CD4⁺ or CD3⁺CD8⁺ CFSE^{low} cells) on splenocytes from pVAX1 immunized groups after stimulating with individual peptides +3 standard deviation (SD).

Analysis of polyfunctional HIV-specific T cell responses

Splenocytes from immunized mice were labeled with CFSE as described above. CFSE-labeled cells were incubated at a density of 2.5×10^6 cells/mL and cultured in 96 well round-bottomed plates (5×10^5 /well in triplicate) for 4 days at 37°C and 5% CO₂ with medium only or pooled HIV peptides (5 μ M). After 4 days of incubation, cells were restimulated in the presence of 2 μ g/mL anti-CD28 (BD Pharmingen), 5 μ M of pooled HIV peptides and Brefeldin A- GolgiPlugTM (BD Pharmingen) for the last 12 hours. After the incubation period, cells were washed with FACS buffer and surface stained using monoclonal antibodies to CD8-Alexa700 and CD4-PerCP for 30 minutes at 4°C. Cells were fixed and permeabilized using the Cytofix/CytopermTM kit (BD Pharmingen). Permeabilized cells were washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences) and stained with monoclonal antibodies to CD3-APCCy7, IL-2-PE, TNF α -PECy7 and IFN γ -APC for 30 minutes at 4°C. Following staining, cells were washed twice and resuspended in FACS buffer. All antibodies were from BD Pharmingen. Samples were acquired on a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences) and then analyzed using FlowJo software (version 9.0.2, Tree Star, San Carlo, CA). Each analysis was gated on forward (FSC)/side scatter (SSC) lymphocytes (500,000 events) and CD3⁺ T cells followed by a subsequent gate on CD4⁺ or CD8⁺ populations. After identification of CD4⁺ and CD8⁺ populations, a gate was done in each positive population for IFN γ , TNF α and IL-2 expression. In addition, we used the Boolean gate (FlowJo software (version 9.0.2, Tree Star, San Carlo, CA)) platform to create several combinations of the three cytokine (IL-2, TNF α and IFN γ) within CFSE^{low} population resulting in seven distinct patterns. The percentages of cytokine-producing cells were calculated by subtracting background values. For each flow cytometry experiment performed in this paper, unstained and all single-color controls were processed to allow proper compensation.

Data Analysis

Statistical significance (p-values) was calculated by using One-way ANOVA and Tukey's honestly significantly different (HSD).

Statistical analysis and graphical representation of data was performed using GraphPad Prism version 5.0 software.

Supporting Information

Figure S1 Proliferative responses of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from pVAX1 immunized mice against pooled HIV-1 peptides. BALB/c mice were immunized with the empty vector pVAX1. Two weeks after the last dose, pooled spleen cells from 6 mice were labeled with CFSE (1.25 μ M) and cultured for 5 days in the presence of 5 μ M of pooled HIV-1 peptides. Cells were analyzed by flow cytometry and CFSE dilution on gated CD3⁺CD4⁺ or CD3⁺CD8⁺ cells was used as a readout for antigen-specific proliferation. Representative dot plots of CD4⁺ (left) and CD8⁺ (right) T cell proliferation (% CFSE^{low} cells) from splenocytes stimulated with medium or pooled HIV-1 peptides. Data are representative of nine independent immunization experiments.

(TIF)

Figure S2 Immunization with HIVBr18 induces a HIV-1 peptide-specific type 1 cytokine response. Splenocytes from immunized BALB/c mice were cultured in the presence of pooled HIV-1 peptides. After 48 hours, levels of IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4 and IL-5 in culture supernatants were measured using the mouse Th1/Th2 cytokine cytometric bead array (CBA) by flow cytometry. Representative dot plot profiles of the 6-plex Th1/Th2 cytokine CBA assay for culture supernatants from pVAX1 (left) and HIVBr18 (right) immunized mice after stimulation with pooled HIV-1 peptides.

(TIF)

Figure S3 Polyfunctional CD4⁺ T cells produce higher cytokine levels on a per cell basis than single cytokine-producing CD4⁺ T cells. Two weeks after the last immunization with HIVBr18, spleen cells from 6 BALB/c mice were labeled with CFSE and cultured in the presence of pooled HIV-1 peptides or medium only for 4 days. On day 4, cells were pulsed for 12 hours with pooled HIV-1 peptides or medium in the presence of costimulatory antibody and Brefeldin. Multiparameter flow cytometry was used to identify polyfunctional and single cytokine-producing CD3⁺CD4⁺ T cells. Intracellular cytokine levels expressed as MFI values are compared for CFSE^{low} cells producing all 3 tested cytokines (polyfunctional cells) and CFSE^{low} cells producing a single cytokine. MFI values for IFN γ (left), TNF α (middle) and IL-2 (right).

(TIF)

Figure S4 Proliferative responses and cytokine production in splenocytes from pVAX1 immunized mice. Two weeks after the last immunization with the empty vector pVAX1, spleen cells from 6 BALB/c mice were labeled with CFSE and cultured in the presence of pooled HIV-1 peptides or medium only for 4 days. On day 4, cells were pulsed for 12 hours with pooled HIV-1 peptides or medium in the presence of costimulatory antibody and Brefeldin A. CFSE and intracellular cytokine staining were used to simultaneously assess proliferation and IFN γ , TNF α or IL-2 production. Frequencies of antigen-specific cytokine-producing T cells in proliferating (CFSE^{low}) and non proliferating (CFSE^{hi}) gates are displayed.

(TIF)

Table S1 Peptide binding predictions for H-2d MHC class I and class II.

(PDF)

Acknowledgments

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

References

- Watkins DI, Burton DR, Kallas EG, Moore JP, Koff WC (2008) Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat Med* 14: 617–621.
- Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, Fitzgerald DW, Mogg R, et al. (2008) Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* 372: 1881–1893.
- Corey L, McElrath MJ, Kublin JG (2009) Post-step modifications for research on HIV vaccines. *AIDS* 23: 3–8.
- Sekaly RP (2008) The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med* 205: 7–12.
- McElrath MJ, De Rosa SC, Moodie Z, Dubey S, Kierstead L, et al. (2008) HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet* 372: 1894–1905.
- Wilson NA, Keele BF, Reed JS, Piaskowski SM, MacNair CE, et al. (2009) Vaccine-induced cellular responses control simian immunodeficiency virus replication after heterologous challenge. *J Virol* 83: 6508–6521.
- Reks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, et al. (2009) Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 361: 2209–2220.
- Nitayaphan S, Pitisuttithum P, Karnasuta C, Eamsila C, de Souza M, et al. (2004) Safety and immunogenicity of an HIV subtype B and E prime-boost vaccine combination in HIV-negative Thai adults. *J Infect Dis* 190: 702–706.
- Khanolkar A, Fuller MJ, Zajac AJ (2004) CD4 T cell-dependent CD8 T cell maturation. *J Immunol* 172: 2834–2844.
- Novy P, Quigley M, Huang X, Yang Y (2007) CD4 T cells are required for CD8 T cell survival during both primary and memory recall responses. *J Immunol* 179: 8243–8251.
- Rajasagi NK, Kassim SH, Kollias CM, Zhao X, Chervenak R, et al. (2009) CD4⁺ T cells are required for the priming of CD8⁺ T cells following infection with herpes simplex virus type 1. *J Virol* 83: 5256–5268.
- Martinez V, Costagliola D, Bonduelle O, N'go N, Schnuriger A, et al. (2005) Combination of HIV-1-specific CD4 Th1 cell responses and IgG2 antibodies is the best predictor for persistence of long-term nonprogression. *J Infect Dis* 191: 2053–2063.
- Pancr V, Delhem N, Yazdanpanah Y, Delanoye A, Delacre M, et al. (2007) Presence of HIV-1 Nef specific CD4 T cell response is associated with non-progression in HIV-1 infection. *Vaccine* 25: 5927–5937.
- Ferre AL, Hunt PW, McConnell DH, Morris MM, Garcia JC, et al. (2010) HIV Controllers HLA-DRB1*13 and HLA-DQB1*06 Have Strong, Polyfunctional Mucosal CD4⁺ T-cell Responses. *J Virol*.
- Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A (2009) CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature* 462: 510–513.
- Yang X, Yu X (2009) An introduction to epitope prediction methods and software. *Rev Med Virol* 19: 77–96.
- Pike R, Filby A, Ploquin MJ, Eksmond U, Marques R, et al. (2009) Race between retroviral spread and CD4⁺ T-cell response determines the outcome of acute Friend virus infection. *J Virol* 83: 11211–11222.
- Sacha JB, Giraldo-Vela JP, Buechler MB, Martins MA, Maness NJ, et al. (2009) Gag- and Nef-specific CD4⁺ T cells recognize and inhibit SIV replication in infected macrophages early after infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 9791–9796.
- von Gegerfelt A, Valentin A, Alicea C, Van Rompay KK, Marthas ML, et al. (2010) Emergence of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic CD4⁺ T cells and increased humoral responses correlate with control of rebounding viremia in CD8-depleted macaques infected with Rev-independent live-attenuated simian immunodeficiency virus. *J Immunol* 185: 3348–3358.
- Giraldo-Vela JP, Rudersdorf R, Chung C, Qi Y, Wallace LT, et al. (2008) The major histocompatibility complex class II alleles Mamu-DRB1*1003 and -DRB1*0306 are enriched in a cohort of simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaque elite controllers. *J Virol* 82: 859–870.
- Hansen SG, Vieville C, Whizin N, Coyne-Johnson L, Siess DC, et al. (2009) Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nat Med* 15: 293–299.
- Vaccari M, Mattapallil J, Song K, Tsai WP, Hryniewicz A, et al. (2008) Reduced protection from simian immunodeficiency virus SIVmac251 infection afforded by memory CD8⁺ T cells induced by vaccination during CD4⁺ T-cell deficiency. *J Virol* 82: 9629–9638.
- Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H, Tsukamoto T, Kuwano T, et al. (2009) Polyfunctional CD4⁺ T-cell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 83: 5514–5524.
- Okoye A, Park H, Rohankhedkar M, Coyne-Johnson L, Lum R, et al. (2009) Profound CD4⁺/CCR5⁺ T cell expansion is induced by CD8⁺ lymphocyte depletion but does not account for accelerated SIV pathogenesis. *J Exp Med* 206: 1575–1588.
- Virgin HW, Walker BD (2010) Immunology and the elusive AIDS vaccine. *Nature* 464: 224–231.
- Fonseca SG, Coutinho-Silva A, Fonseca LA, Segurado AC, Moraes SL, et al. (2006) Identification of novel consensus CD4 T-cell epitopes from clade B HIV-1 whole genome that are frequently recognized by HIV-1 infected patients. *AIDS* 20: 2263–2273.
- Ribeiro SP, Rosa DS, Fonseca SG, Mairena EC, Postol E, et al. (2010) A vaccine encoding conserved promiscuous HIV CD4 epitopes induces broad T cell responses in mice transgenic to multiple common HLA class II molecules. *PLoS One* 5: e11072.
- Seder RA, Darrah PA, Roederer M (2008) T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 8: 247–258.
- Kannanganat S, Kapogiannis BG, Ibegbu C, Chennareddi L, Goepfert P, et al. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines. *J Virol* 81: 12071–12076.
- Harari A, Petitpierre S, Vallerian F, Pantaleo G (2004) Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood* 103: 966–972.
- Emu B, Sinclair E, Hatano H, Ferre A, Shacklett B, et al. (2008) HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *J Virol* 82: 5398–5407.
- Ferre AL, Hunt PW, Critchfield JW, Young DH, Morris MM, et al. (2009) Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood* 113: 3978–3989.
- Lanzavecchia A, Sallusto F (2005) Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 17: 326–332.
- Potter SJ, Lacabartz C, Lambotte O, Perez-Patrigone S, Vingert B, et al. (2007) Preserved central memory and activated effector memory CD4⁺ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. *J Virol* 81: 13904–13915.
- Wang M, Tang ST, Lund O, Dziegiel MH, Buus S, et al. (2009) High-affinity human leucocyte antigen class I binding variola-derived peptides induce CD4⁺ T cell responses more than 30 years post-vaccinia virus vaccination. *Clin Exp Immunol* 155: 441–446.
- Zhang GL, Srinivasan KN, Veeramani A, August JT, Brusic V (2005) PREDBALB/c: a system for the prediction of peptide binding to H2d molecules, a haplotype of the BALB/c mouse. *Nucleic Acids Res* 33: W180–183.
- BenMohamed L, Bertrand G, McNamara CD, Gras-Masse H, Hammer J, et al. (2003) Identification of novel immunodominant CD4⁺ Th1-type T-cell peptide epitopes from herpes simplex virus glycoprotein D that confer protective immunity. *J Virol* 77: 9463–9473.
- Iwai LK, Yoshida M, Sidney J, Shikanai-Yasuda MA, Goldberg AC, et al. (2003) In silico prediction of peptides binding to multiple HLA-DR molecules accurately identifies immunodominant epitopes from gp43 of Paracoccidioides brasiliensis frequently recognized in primary peripheral blood mononuclear cell responses from sensitized individuals. *Mol Med* 9: 209–219.
- Rosa DS, Iwai LK, Tzelepis F, Bargieri DY, Medeiros MA, et al. (2006) Immunogenicity of a recombinant protein containing the Plasmodium vivax vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4⁺ T-cell epitopes administered to non-human primates (Callithrix jacchus jacchus). *Microbes Infect* 8: 2130–2137.
- Rosa DS, Ribeiro SP, Cunha-Neto E (2010) CD4⁺ T cell epitope discovery and rational vaccine design. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58: 121–130.
- Martins MA, Wilson NA, Reed JS, Ahn CD, Klimentidis YC, et al. (2010) T-cell correlates of vaccine efficacy after a heterologous simian immunodeficiency virus challenge. *J Virol* 84: 4352–4365.
- Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, et al. (2007) CD8⁺ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* 13: 46–53.
- Precopio ML, Betts MR, Parrino J, Price DA, Gostick E, et al. (2007) Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med* 204: 1405–1416.
- Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, et al. (2008) Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med* 205: 3119–3131.
- Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, et al. (2009) The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8⁺ T cell response. *J Immunol* 183: 7919–7930.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DSR SPR EC-N. Performed the experiments: DSR SPR RRA ECM EP. Analyzed the data: DSR SPR RRA JK EC-N. Contributed reagents/materials/analysis tools: JK EC-N. Wrote the paper: DSR SPR RRA EC-N.

46. Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, et al. (2007) Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med* 13: 843–850.
47. Lindenstrom T, Agger EM, Korsholm KS, Darrah PA, Aagaard C, et al. (2009) Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells. *J Immunol* 182: 8047–8055.
48. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, et al. (2006) HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood* 107: 4781–4789.
49. Duvall MG, Precopio ML, Ambrozak DA, Jaye A, McMichael AJ, et al. (2008) Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. *Eur J Immunol* 38: 350–363.
50. Shedlock DJ, Shen H (2003) Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300: 337–339.
51. Mattapallil JJ, Douek DC, Buckler-White A, Montefiori D, Letvin NL, et al. (2006) Vaccination preserves CD4 memory T cells during acute simian immunodeficiency virus challenge. *J Exp Med* 203: 1533–1541.
52. Liu J, O'Brien KL, Lynch DM, Simmons NL, La Porte A, et al. (2009) Immune control of an SIV challenge by a T-cell-based vaccine in rhesus monkeys. *Nature* 457: 87–91.
53. Letvin NL, Mascola JR, Sun Y, Gorgone DA, Buzby AP, et al. (2006) Preserved CD4⁺ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. *Science* 312: 1530–1533.
54. Livingston B, Crimi C, Newman M, Higashimoto Y, Appella E, et al. (2002) A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *J Immunol* 168: 5499–5506.
55. Atherton ND (1989) HPLC measurement of phenylalanine by direct injection of plasma onto an internal-surface reversed-phase silica support. *Clin Chem* 35: 975–978.
56. Quah BJ, Warren HS, Parish CR (2007) Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc* 2: 2049–2056.