FRANCISCO ANDRÉ MARQUES DE OLIVEIRA CARIRI

Construção e caracterização imunológica de formulação vacinal com propriedades profiláticas voltada para o controle do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e do vírus herpes (HSV)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

São Paulo
2014

FRANCISCO ANDRÉ MARQUES DE OLIVEIRA CARIRI

Construção e caracterização imunológica de formulação vacinal com propriedades profiláticas voltada para o controle do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e do vírus herpes (HSV)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração:
Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Cariri, Francisco André Marques de Oliveira.

Construção e caracterização imunológica de formulação vacinal com propriedades profiláticas voltadas para o controle do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e do vírus herpes (HSV) / Francisco André Marques de Oliveira Cariri. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Pesquisa de novas vacinas de DNA multivalentes voltadas para o controle de infecções entéricas e sistêmicas.

Versão do título para o inglês: Construction and immunological characterization of a vaccine formulation with prophylactic properties aiming to control the human immunodeficiency virus (HIV) and herpes virus (HSV).

1. Vacinas 2. HIV 3. p24 4. Glicoproteína D 5. Vacinas de DNA 6. HSV-1 I. Ferreira, Prof. Dr. Luís Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0100/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Francisco André Marques de Oliveira Cariri.

Título da Tese: Construção e caracterização imunológica de formulação vacinal com propriedades profiláticas voltadas para o controle do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e do vírus herpes (HSV).

Orientador(a): Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

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

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.070.12

WTL/mcgn

São Paulo, 19 de setembro de 2012.

REF.: Protocolo nº 017/09.

"Construção e caracterização imunológica de formulação vacinal com propriedades profiláticas e terapêuticas voltada para o controle do vírus da imunodeficiência humana(HIV) e do vírus herpes (HSV)"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 20.02.2015.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilmo.Sr.

Prof. Dr. LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA
Departamento de Microbiologia-ICB/USP

Aos meus pais,
Abidias e Maria,
E à minha esposa
Carolina
Obrigado pelo Apoio Incondicional,
Amor e Companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela realização deste projeto, por toda caminhada tortuosa, pelos desafios, tropeços e vitórias. Obrigado por me dar forças para levantar a cabeça e seguir em frente. Os ensinamentos adquiridos nesta trajetória são para a vida toda;

Ao Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira pela oportunidade dada. Agradeço pela sua dedicação e contribuição ao desenvolvimento deste trabalho, pelos ensinamentos compartilhados que extrapolam a área científica, pelo incentivo e, sobretudo, pela paciência.

À Dra. Rita de Cássia Café Ferreira por suas sugestões profissionais. Agradeço pelo seu alto astral que contagia todo o laboratório.

Aos amigos do “grupo HPV”, Mariana, Vinicius, Bruna, Marcia, Luana, Luana, Natiely, Jamile, Domingos e Otto, que ajudaram nas discussões desta linha de pesquisa. Agradeço especialmente à Mariana e ao Vinicius pelos ensinamentos e grande paciência, por toda a ajuda nos ensaios celulares, no delineamento experimental e pelas discussões científicas. Agradeço à Márcia pela grande ajuda na fase final do doutorado.

Ao Dr. Célio Silva e Dra. Wendy, pela colaboração durante a execução desse projeto.

À Dra. Maria Elizabete Sbrogio de Almeida pelos ensinamentos no manuseio dos camundongos e pelo imenso carinho dado a todos do laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Liliana, Wilson, Juliano, Eduardo, Cristiane, Domingos, Otto, Rafael, Juliana, Catarina, Bruna, Camila Santos, Carolina Salcedo, Carolina, Luana, Jamile, Natiely, Aline, Renata, Milene, Bruno, Priscila, Vinicius, Jaime, Roberto, Dani, Débora, Karine, Alexandre, Márcia, Deni, Raiza, Rúbens, Lenon, Sara, Mônica, Naina, Everton, Elisa, Pietro, Hugo,

Robert, Sabrina, Naomi, Mariana Cintra, a todos que tive a oportunidade de conhecer no laboratório, pela amizade, colaborações no trabalho e troca de ideias.

Ao grupo do VTNC (Renata, Rafael e Milene), pelos momentos de descontração e risadas; e pela amizade.

Ao Eduardo, Loren, Camila Calderon e Carol, pelo suporte técnico e grande ajuda na organização do laboratório, contribuindo para o bom andamento do nosso trabalho.

À Sandra Alexandre, Juliane e Luis, que cuidam do biotério da parasitologia e ao Carlos, do biotério da microbiologia, pela competência e carinho com os camundongos e pela valiosa ajuda durante esses anos,

Aos amigos dos laboratórios vizinhos do CEVAT-GENE pela troca de experiência, o empréstimo de equipamentos e pelos momentos de descontração durante os cafés.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, aos funcionários da biblioteca do ICB e do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, pela ajuda, pelo apoio dado e pelas dúvidas esclarecidas.

À Carol pela ajuda e paciência durante esses anos, sobretudo nessa reta final. O seu companheirismo e amor me deu o conforto necessário para a finalização da tese.

Aos meus pais e meus sogros pelo apoio incondicional e pelas orações.

A agência de fomento FAPESP pelo suporte financeiro da bolsa de doutorado, sem o qual seria impossível realizar este trabalho.

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE 4), no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

"O jovem que quer ser cientista e à ciência dedicar todo o seu tempo e amor tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como pouca gente)".

Newton Freire-Maia

RESUMO

CARIRI, F. A. M. O. **Construção e caracterização imunológica de formulação vacinal com propriedades profiláticas voltada para o controle do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e do vírus herpes (HSV).** 2014. 97 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Este projeto propõe a avaliação de respostas imunológicas induzidas por uma vacina de DNA bivalente para o controle de infecções por HIV e HSV. A vacina genética codifica a proteína gD do vírus HSV-1 geneticamente fusionada à proteína Gag (p24) do HIV, rica em epítomos reconhecidos por células T CD8⁺. A vacina de DNA pRE4p24 codifica a proteína p24 inserida em região próxima à porção C-terminal da proteína gD-1, permitindo que a proteína recombinante seja expressa na superfície da célula transfectada. A localização da proteína recombinante foi confirmada na superfície das células HEK-293T transfectadas por ensaios de imunofluorescência. Camundongos imunizados com a vacina foram capazes de gerar respostas de anticorpos específicos após três doses administradas pelas vias intramuscular (i.m.), intradérmica com seringa (i.d.) ou intradérmico por biobalística (gg). Foram analisadas as respostas imunológicas mediadas por linfócitos T CD8⁺ p24-específicas e a via i.m. foi escolhida como a mais promissora para os ensaios subsequentes. Na tentativa de aumentar a imunogenicidade da vacina, particularmente, para respostas celulares, foi avaliado o efeito da co-administração da formulação vacinal com outros plasmídeos que expressam citocinas (pIL-2, pIL-12 ou pGM-CSF), o teste de um vetor vacinal baseado no plasmídeo multicópia pVAX (pgDp24) e o emprego de um gene sintético para promover o aumento da expressão da proteína gD em células de mamíferos (pgDhp24). Por fim, desenvolvemos um modelo murino para a avaliação funcional de respostas citotóxicas antígeno-específicas a partir de uma linhagem tumoral capaz de expressar a proteína p24 do HIV. Camundongos Balb/c imunizados com o pgDp24 apresentaram um retardo no crescimento tumoral em relação aos animais não imunizados além de proteção parcial a desafios letais com HSV-1.

Palavras-chave: Vacinas. HIV. p24. Glicoproteína D. Vacinas de DNA. HSV-1.

ABSTRACT

CARIRI, F. A. M. O. **Construction and immunological characterization of a vaccine formulation with prophylactic properties aiming to control the human immunodeficiency virus (HIV) and herpes virus (HSV).** 2014. 97 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

This thesis aims to evaluate the immunological responses induced by a bivalent DNA vaccine to the control HIV and HSV infectious. This genetic vaccine codes the gD protein from the HSV-1 virus envelope genetically fused with HIV Gag (p24) protein, which has various epitopes recognized by human and murine T CD8⁺ cells. The DNA vaccine, named pRE4p24, codes for p24 protein, inserted close to the C-terminal region of gD-1 protein, leading to the expression of the recombinant protein on the surface of the transfected cells. The location of the recombinant protein was confirmed with transfected HEK-293 cells by immunofluorescence assays. Mice immunized with the vaccine generated antigen-specific antibody responses after three doses administered intramuscularly (i.m), intradermally with a syringe (i.d) or intradermally by gene gun (bioballistic) (gg). The immunological responses mediated by specific-T CD8⁺ p24 lymphocytes were evaluated and, according to the data obtained, the i.m administration was chosen for the next assays. Aiming the improvement of the vaccine immunogenicity, particularly for cellular responses, the effect of co-administration with other plasmids was assessed with: plasmids that express cytokines (pIL-2, pIL-12 or pGM-CSF); a vaccine vector based on pVAX (pgDp24); and a vector encoding a synthetic gene capable to increase the expression of gD protein in mammalian cells (pgDhp24). Finally, we developed a murine model for the functional evaluation of antigen-specific cytotoxic responses using a tumor cell line which expresses the p24 protein. Balb/c mice, immunized with pgDp24 had a reduced tumor growth when compared to non-immunized mice. In addition, vaccinated mice showed partial protection to a lethal challenge with HSV-1.

Keywords: Vaccines. HIV. p24. glycoprotein D. DNA vaccines. HSV-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do HIV-1 e do seu genoma.....	20
Figura 2 – Estrutura dos Complexos BTLA/HVEM (esquerda) e gD/HVEM (direita) obtida por cristalografia.	28
Figura 3 – Esquema representativo das proteínas codificadas pelas vacinas de DNA construídas.....	47
Figura 4 – Construção dos vetores pRE4p24 e pΔgDp24.....	49
Figura 5 – Expressão das proteínas codificadas pelos plasmídeos construídos.....	50
Figura 6 – Resposta de anticorpos em animais imunizados com os vetores pRE4p24, pΔgD24, e pp24.....	51
Figura 7 – Ativação de linfócitos CD8 ⁺ T citotóxicos em animais imunizados com os vetores pRE4p24, pΔgD24, e pp24.....	52
Figura 8 – Títulos de IgG total p24-específicos obtidos em camundongos após imunização pelas diferentes vias de administração da formulação vacinal (intramuscular, intradérmica com seringa e biobalística)..	54
Figura 9 – Resposta celular p24-específica em camundongos imunizados com a formulação pRE4p24 pelas vias intramuscular, intradérmica com seringa e biobalística..	56
Figura 10 – Ativação de linfócitos T CD8 ⁺ medida em ensaios de ELISPOT em animais imunizados com diferentes números de doses da vacina PRE4p24..	58
Figura 11 – Ativação de linfócitos T CD8 ⁺ medida em ensaios de citotoxicidade in vivo em animais imunizados com diferentes números de doses da vacina PRE4p24.....	61
Figura 12 – Efeito da coadministração do pRE4p24 e plasmídeos que codificam as citocinas IL-2, IL-12 ou GM-CSF na ativação de linfócitos T CD8 ⁺ 24-específicos.. .	62
Figura 13 – Esquema representativo das formulações vacinais que codificam a proteína híbrida gDp24.....	63
Figura 14 – Confirmação da clonagem pgDp24, inserindo o gene híbrido gDp24 no vetor pVAX..	64
Figura 15 – Perfil de digestão do vetor pBSKgDE7h e dos clones pBSKgDhp24.	65

Figura 16 – Expressão da proteína gDp24 por células HEK-293T transfectadas com diferentes vetores vacinais.....	66
Figura 17 – Análise dos títulos de IgG total obtidos com as novas formulações pgDp24 e pgDhp24.	66
Figura 18 – Resposta celular p24-específica obtidos em camundongos imunizados com as formulações vacinais pgDp24 e pgDhp24.	68
Figura 19 – Resposta de imunidade celular obtidas em camundongos imunizados com a formulação pgDp24 e pIL-2..	70
Figura 20 - Teste de sensibilidade da linhagem 4T1 a diferentes concentrações do antibiótico G418..	72
Figura 21 - Clonagem do gene que codifica a proteína p24 do HIV-1 no vetor pcDNA3.....	73
Figura 22 – Expressão da p24 em células 4T1 transfectadas com o vetor pcDNA3::p24.....	74
Figura 23 – Expressão da proteína p24 após a seleção clonal da linhagem FC-24. Os diferentes clones da linhagem FC24 foram cultivados por dois meses na ausência do antibiótico G418..	75
Figura 24 – Volume tumoral dos camundongos imunizados com três doses de 100 µg de pgDp24 ou pgD (pVAXgD) pela via intramuscular e desafiados com 1x10 ⁴ células tumorais FC-24 por animal.....	76
Figura 25 – Análise do percentual de células produtoras de IFN-γ p24- específicas em camundongos imunizados e desafiados com a célula FC24.....	77
Figura 26 – Análise dos títulos de IgG total gD-específico obtidos com as formulações vacinais.....	78
Figura 27 – Efeito de proteção profilática antiviral dos vetores vacinais pgD e pgDp24 em animais desafiados com uma cepa letal de HSV-1.....	79
Figura 28 – Percentual de perda de peso dos camundongos Balb/C desafiados com a cepa viral EK uma (Figura A) e duas semanas (Figura B) após o desafio.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista dos iniciadores específicos utilizados para amplificação do gene p24 do HIV e para confirmação da clonagem.....	36
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-ME – *β -mercaptoethanol* – Beta mercaptoetanol
°C – Graus Celsius
APC – Antigen presenting cells – Células apresentadoras de antígeno
BTLA – B and T lymphocyte attenuator – Atenuador de linfócito B e T
CD4 – *cluster of differentiation 4* - Grupamento de diferenciação 4
CD8 – *cluster of differentiation 8* - Grupamento de diferenciação 8
CRD – domínios ricos em cisteína
CFSE – *Carboxyfluorescein succinimidyl ester* - carboxifluoresceína succinimidil éster
CMV – Citomegalovírus
CTL – *Cytotoxic T lymphocyte* – linfócito T citotóxico
DC – *Dendritic cells* – células dendríticas
DNA – *deoxyribonucleic acid* - Ácido desoxirribonucleico
E. coli – *Escherichia coli*
ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT – Enzyme-Linked Immunosorbent Spot
FITC – Fluoresceína Isotiocianato
g – Gramas
G – aceleração da gravidade
gD – Glicoproteína D
gDE7 – Glicoproteína D fusionada geneticamente à proteína E7
gDp24 – Glicoproteína D fusionada geneticamente à proteína p24
GM-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
HIV – *human immunodeficiency virus* - Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV-1 – Herpes Simplex Vírus 1
HVEM – *Herpesvirus entry mediator* - Mediador da entrada de herpesvirus
Ig – Imunoglobulina
IgG – Imunoglobulina de classe G
IL – Interleukin – Interleucina
IFN- γ – Interferon gamma
kD – Quilodaltons
LB – Luria Bertani
mg – Miligramas
MHC – Major Histocompatibility Complex - Complexo principal de histocompatibilidade

mL – Mililitros
mM – Milimolar
MPL – Monofosforil lipídeo A
m/v – Massa sobre volume
NaOH – Hidróxido de sódio
OPD – Ortho-Phenylenediamine
pb – Pares de bases
PBS – Phosphatase buffered saline – Tampão salina fosfato
PBST – Tampão salina fosfato acrescido de 0,05% de tween 20
PCR – *Polymerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase
PE – Ficoeritrina
PEG – Polietilenoglicol
PFU – Plaque forming units – Unidades formadoras de placas
RNA – *Ribonucleic acid* – ácido ribonucléico
RPM – Rotações por minuto
RPMI – Meio de cultura cuja sigla é acrônima do *Roswell Park Memorial Institute*
RSV – Vírus do Sarcoma de Rous;
SBF – Serum Bovine Fetal – Soro Fetal Bovino
SDS – Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
SHIV – Vírus da Imunodeficiência de Símia (SIV), expressando as glicoproteínas do HIV-1
SIV – *Simian Immunodeficiency Virus* – Vírus da Imunodeficiência Símia
Th T helper
TNFR – receptor do fator de necrose tumoral
U/mL – Unidades por mililitros
V – volume
v/v – volume sobre volume
µg – Microgramas
µL – Microlitros
µM – Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 O vírus HIV	19
1.2 Antígenos do HIV utilizados em vacinas	21
1.3 Vacinas profiláticas anti-HIV	22
1.4 O vírus HSV	25
1.5 Vacinas anti-HSV	26
1.6 A Glicoproteína D e seu efeito imunoestimulador	27
1.7 Vacina de DNA	29
1.8 Aumento da imunogenicidade da vacina de DNA	30
1.9 A plataforma vacinal utilizando a gD fusionada ao antígeno de interesse	31
2 OBJETIVO GERAL	34
2.1 Objetivos específicos	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Amplificação de sequência gênica por PCR	35
3.2 Reações de digestão enzimática	35
3.2.1 Digestão do vetor <i>pRE4</i> e dos insertos <i>p24 PA</i> e <i>p24 AA</i>	36
3.2.2 Digestão do vetor <i>pVAX</i> e do inserto <i>NheI-gDp24-EcoRI</i>	37
3.2.3 Digestão dos vetores <i>pBSKgDE7h</i> e <i>pVAX</i> e do inserto <i>Apal-p24-XbaI</i>	37
3.2.4 Digestão dos vetores <i>pcDNA3</i> e do inserto <i>XbaI-p24-BamHI</i>	38
3.3 Seleção de clones de novas formulações vacinais	38
3.3.1 Construção dos vetores <i>pΔgDp24</i> e <i>pgDp24</i> e <i>pcDNA3p24</i>	38
3.3.2 Seleção dos clones <i>pgDp24</i> e <i>pgDhp24</i>	39
3.3.3 Seleção dos clones <i>pcDNA3p24</i>	39
3.4 Sequenciamento dos vetores clonados	40
3.5 Detecção das proteínas recombinantes expressas em células eucarióticas transfectadas com as formulações vacinais	40
3.6 Imunização de camundongos e avaliação de respostas imunológicas	41
3.6.1 Animais utilizados	41
3.6.2 Imunização de camundongos com as construções vacinais	41
3.6.3 Coleta e processamento das amostras	41

3.6.4	<i>Respostas de anticorpos séricos anti-p24 em animais imunizados com as vacinas de DNA</i>	42
3.6.5	<i>Ensaio de ELISPOT (Enzyme-linked immunosorbent spot)</i>	43
3.6.6	<i>Ensaio de citotoxicidade in vivo</i>	43
3.7	Construção da linhagem celular FC-24	44
3.8	Transplante de células tumorais FC-24 para avaliação do efeito anti-tumoral das vacinas	45
3.9	Avaliação da imunidade protetora frente a desafio com o HSV-1	46
3.10	Análises Estatísticas	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Construção das Vacinas de DNA pRE4p24 e pΔgDp24 que codificam a proteína p24 do HIV geneticamente fusionadas à proteína gD-1 do HSV	47
4.2	Deteção das proteínas recombinantes expressas pelas vacinas de DNA em células transfectadas in vitro	48
4.3	Efeito adjuvante promovido pela proteína gD nas respostas imunológicas induzidas pelas vacinas de DNA	50
4.4	Otimização do regime vacinal com o vetor pRE4p24	53
4.5	Efeito do número de doses da vacina pRE4p24 sobre as respostas imunológicas induzidas	57
4.6	Tentativas de aumento da imunogenicidade da vacina pRE4p24.....	60
4.6.1	<i>Coadministração do vetor vacinal pRE4p24 com vetores que expressam IL-2, GM-CSF e IL-12</i>	60
4.6.2	<i>Otimização da imunogenicidade da vacina pelo aumento da expressão do antígeno alvo</i>	63
4.6.3	<i>Coadministração dos vetores pgDp24 e pIL-2</i>	69
4.7	Avaliação da funcionalidade da vacina em modelo tumoral	71
4.8	Avaliação da funcionalidade da vacina frente a desafio com HSV-1	78
5	DISCUSSÃO	80
6	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS.....	87
	APÊNDICE A – Representação esquemática das construções vacinais	98
	APÊNDICE B – Atividades complementares durante o doutorado.....	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 O vírus HIV

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV - *Human Immunodeficiency Virus*) é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), tendo o tipo HIV-1 como mais prevalente na pandemia. O número de pessoas portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a taxa de mortalidade da AIDS continuam a crescer. No ano de 2011, foram registradas no mundo 34 milhões de pessoas infectadas com o vírus HIV. A pandemia está concentrada em países em desenvolvimento, sobretudo nos países localizados na África subsaariana, em que um a cada 20 adultos (4,9%) vivem com AIDS e onde foram registrados 69% dos casos notificados da doença (UNAIDS, 2012). O Brasil está inserido neste cenário, sendo registrados 718 mil portadores do vírus HIV (BRASIL, 2013).

O vírus HIV é um retrovírus pertencente ao gênero Lentivírus. Este vírus envelopado apresenta uma simetria icosaédrica e possui um genoma de 9,8 kb constituído por duas fitas simples de RNA, que codificam três genes essenciais para a replicação viral (*env*, *pol* e *gag*) e outros genes acessórios (*Vif*, *Vpr* e *Vpu*) e reguladores (*Tat*, *Rev* e *Nef*) com funções sobretudo no seu ciclo reprodutivo (Figura 1) (BURGER; POLES, 2003). O gene *env* codifica as glicoproteínas gp120 – proteína de superfície (SU) e gp41 – proteína transmembrana (TM) presentes na superfície do envelope, fundamentais para a adesão viral e entrada do vírus na célula hospedeira; e o gene *pol*, as proteínas não-estruturais necessárias à replicação do vírus, incluindo as enzimas transcriptase reversa (RT), protease (PR) e integrase (IN). Por sua vez, o gene *gag* codifica as proteínas estruturais do capsídeo viral, sendo inicialmente traduzida uma poliproteína Gag de 55kDa (p55) que será proteoliticamente clivada durante a maturação do vírus originando as proteínas p17 (matriz - MA), p24 (capsídeo - CA), p7/p9 (nucleocapsídeo - NC) e outros produtos de baixo peso molecular (p1, p2 e p6) (SLEASMAN; GOOGENOW, 2003).

Figura 1 – Representação esquemática do HIV-1 e do seu genoma. A – O envelope viral apresenta complexos triméricos gp120–gp41 embebidos na membrana; A proteína transmembrana gp41 interage com a matriz (formada pela proteína p17 – em azul claro); O capsídeo (formada pela proteína p24 – em azul escuro) compõe um núcleo no formato de cone que abriga o genoma do HIV-1, que é composto por duas moléculas de RNA fita positiva; O genoma está envolvido pelas proteínas p7/p6 do nucleocapsídeo (em amarelo). B – O genoma do HIV-1 é composto pelos nove genes: *gag*, *env*, *pol*, *tat*, *rev*, *vpu*, *vif*, *vpr* e *nef*. Os genes essenciais *gag*, *env* e *pol* originam várias proteínas: Gag – Matriz (p17, MA), Capsídeo (p24, CA) e Nucleocapsídeo (p7, NC); Pol – Protease (p11, PR), Reverse transcriptase (p66/p51, RT) e Integrase (p31, IN); e Env – Proteína do envelope de superfície (gp120, SU) e proteína do envelope transmembrana (gp41, TM). Fonte: Modificado de Robinson (2002); Karlsson Hedestam et al. (2008).

1.2 Antígenos do HIV utilizados em vacinas

A enorme variabilidade do vírus HIV-1 é um dos principais obstáculos a serem superados no desenvolvimento de uma vacina eficaz anti-HIV. A alta taxa de mutação no gene *env*, por exemplo, é importante na classificação do HIV-1 em diferentes grupos (M, N e O) e subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J, K). O gene *env* pode variar até 35% numa análise de sequências de diferentes subtipos e 20% numa análise de sequências do mesmo subtipo (GASCHEN et al., 2002). Tal plasticidade desse gene fez com que muitos projetos que pretendem desenvolver vacinas que induzam resposta em células T CD8⁺ abandonassem o uso da proteína Env como antígeno, se concentrando em proteínas mais conservadas.

Assim, os genes *gag*, *nef* e *pol* vêm sendo considerados relevantes em estudos relacionados ao desenvolvimento de vacinas, uma vez que tais proteínas, além de apresentarem epítomos reconhecidos por células T CD8⁺ (BOLESTA et al., 2005; GAHÉRY-SÉGARD et al., 2003; PRIDDY et al., 2008), são proteínas que mantêm conservados tais epítomos entre diferentes linhagens do vírus HIV-1 (GUDMUNDSDOTTER et al., 2008; LAL et al., 2005). No entanto, pequenas mutações nestas proteínas podem ter graves implicações na eficácia da vacina, permitindo que o vírus HIV escape da resposta celular induzida pela vacina (VALENTINE et al. 2008; BENNETT et al., 2008). A análise nas sequências desses genes sugere que existe uma pressão imune seletiva positiva para que algumas substituições de aminoácidos ocorram nos epítomos imunodominantes reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos, podendo, assim, afetar a eficácia das vacinas que estimulam o reconhecimento de tal epítopo (ALLEN et al., 2005; O'CONNOR et al., 2004).

O gene *gag*, particularmente o componente p24, é amplamente utilizado como antígeno em diferentes estratégias vacinais anti-HIV, como, por exemplo, em vacinas de DNA (KULKARNI et al., 2013; LEWIS et al., 2014) e em estratégias com células dendríticas (DC) (IDOYAGA et al., 2011; TRUMPFHELLER et al., 2006). Evidências sugerem que células T CD8⁺ gag-específicas possuem um papel essencial para conter as infecções dos vírus SIV/HIV, conferindo uma resposta celular potente e duradoura (ALTFELD et al., 2011; KIEPIELA et al., 2007; LIU et al., 2009). Entretanto é importante citar relatos onde a indução da resposta celular anti-

Gag foi decepcionante, sobretudo em testes clínicos e pré-clínicos (CHEN et al., 2008; FITZGERALD et al., 2011; RERKS-NGARM et al., 2009; VASAN et al., 2010). A capacidade de ativar várias células T CD8⁺ anti-Gag é considerada uma característica crítica para a vacina gerar uma resposta celular efetiva, suprimindo e contendo as infecções virais SIV/HIV e facilitando a eliminação do reservatório viral latente (FERRARI et al., 2011; Revisado em KOUP; DOUEK, 2011; LIU et al., 2009).

O gene p24, que é uma porção do gene *gag*, é frequentemente escolhido como antígeno vacinal, pois possui um alto grau de conservação e possui, ao longo da sua sequência, importantes epítomos de reconhecimento de células B e células T (CD4⁺ e CD8⁺), fazendo com que seja explorado em várias formulações vacinais anti-HIV (VIRAJ KULKARNI et al., 2013). Ao analisar as sequências do gene p24 em linhagens do vírus HIV-1 grupo M foi observado que 99% das sequências eram conservadas (ROLLAND et al., 2007). Isso é uma informação relevante frente ao fato de que um dos principais mecanismos de escape do HIV frente ao sistema imunológico do hospedeiro é a plasticidade genética (FISCHER et al., 2007).

1.3 Vacinas profiláticas anti-HIV

A vacina com propriedades profiláticas para a AIDS representa uma expectativa para a classe médica e uma esperança para a humanidade. Uma vacina eficaz contra o HIV-1, portanto, continua a ser uma das prioridades na luta contra o vírus. Nas últimas três décadas, pesquisas voltadas para o desenvolvimento de uma vacina contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) demonstraram que a proteção contra a doença depende da ativação de respostas celulares específicas responsáveis pela destruição de células infectadas pelo vírus (MAKEDONAS; BETTS, 2011; VIRGIN; WALKER, 2010) e não apenas da produção de anticorpos neutralizantes direcionados a proteínas do envoltório viral.

O HIV é capaz de escapar por vários mecanismos da resposta imune humoral e mediada por células. Um desses mecanismos é a mudança conformacional da proteína gp120. Essa proteína expõe em sua superfície as regiões variáveis, induzindo o organismo infectado a gerar anticorpos contra essa região. No momento de interação proteína gp120 com o receptor CD4 e o coreceptores CCR5 ou CXCR4, há uma modificação conformacional em que são expostas as porções

conservadas dessa proteína, permitindo sua ligação com as moléculas da célula hospedeira e assim ocorrendo a infecção viral.

Vários esforços foram feitos no sentido de identificar anticorpos neutralizantes contra o HIV-1, que reconhecem regiões específicas da proteína gp120 e gp41. O anticorpo b12, que reconhece o sítio de ligação com o receptor CD4; o anticorpo 2G12, que reconhece glicanos virais; e os anticorpos 4E10, 2F5 e Z13e1, que reconhecem a região externa da membrana da gp41 destacam-se por terem sido potentes na neutralização viral *in vitro* (PEJCHAL et al., 2009; WEST JR. et al., 2013). Além disso, a transferência passiva dos anticorpos b12, 2G12, 2F5 e 4E10 protege macacos resos (Rhesus - *Macaca mulatta*) contra a infecção do vírus SHIV, Vírus da Imunodeficiência de Símia (SIV), que expressa as glicoproteínas do envelope do HIV-1 (HESSELL et al., 2009; KLEIN et al., 2012; WATKINS et al., 2013). Os anticorpos neutralizantes PG9 e PG16 reconhecem resíduos conservados da porção variável V1, V2 e V3 da proteína gp120. Estes anticorpos são capazes de neutralizar diferentes linhagens do vírus HIV-1 com concentrações de 10 a 100 vezes menores do que os anticorpos neutralizantes anteriores (KWONG et al., 2009; WALKER et al., 2011). Apesar desses resultados, as vacinas contra HIV-1 que foram baseadas em antígenos do envelope falharam durante os testes clínicos. Desta forma, centraram-se os esforços no desenvolvimento de vacinas anti-HIV capazes de induzir uma resposta mediada por células T CD8⁺. De fato, durante a infecção natural do HIV-1, a indução de respostas mediadas por células T CD8⁺ se correlaciona com a diminuição da carga viral (BORROW et al., 1994).

A ativação de linfócitos citotóxicos específicos representa uma característica fundamental para uma vacina eficaz contra o HIV, como demonstrado experimentalmente em estudos com o Vírus da Imunodeficiência Símia (*Simian Immunodeficiency Virus* – SIV) e em pessoas resistentes à infecção com o HIV (BOLESTA et al., 2005; McMICHAEL, 2006; MENDOZA et al., 2013). De fato, pesquisas demonstram que uma vacina eficaz contra o HIV deve induzir preferencialmente respostas mediadas por células T CD8⁺ capazes de reconhecer e destruir células infectadas pelo vírus (BOLESTA et al., 2005; EXCLER, 2005; GAHERY-SÉGARD et al., 2003).

O estudo STEP avaliou em testes clínicos a eficácia da vacina MRKAd5 gag/pol/nef desenvolvida pela Merck®, que era baseada no vetor adenoviral Ad5

não replicativo que expressava as proteínas Gag, Pol e Nef do HIV-1. O teste clínico fase IIb dessa vacina candidata foi encerrado precocemente, pois essa vacina não foi capaz de impedir a infecção do vírus HIV-1 nem reduziu a carga viral dos pacientes infectados posteriormente. A vacina foi capaz de induzir uma resposta mediada por células contra as proteínas Gag, Pol e Nef do HIV-1 nos testes de segurança e imunogenicidade (PRIDDY et al., 2008). No entanto, a resposta observada nos indivíduos vacinados, em média, foi relativamente fraca, onde 10% dos indivíduos infectados com HIV-1 controlaram a replicação viral. Além disso, as células T dos indivíduos vacinados reconheceram apenas três epítomos dos antígenos Gag, Pol e Nef, o que não é adequado para uma resposta protetora anti-HIV, pelo fato da plasticidade do seu genoma ser um dos principais mecanismos de evasão do sistema imunológico. Baseado nos resultados da fase IIb, essa vacina não foi capaz de proteger os indivíduos vacinados (APPAY, 2009; GRAY et al., 2014; WATKINS et al., 2008). Análises posteriores sugerem que o fracasso desse estudo pode estar associado à pequena amplitude da resposta gerada pela vacina, talvez associada a uma imunidade prévia ao vetor adenoviral (COREY et al., 1999).

O teste clínico fase III da vacina RV144, também conhecido como estudo Thai, foi realizado na Tailândia e merece destaque por ter apresentado eficácia na proteção contra a infecção do HIV. A vacina RV144 é baseada na combinação da vacina ALVAC-HIVvCP1521 (Sanofi Pasteur®, Paris, França) - vetor viral *Canarypox* recombinante com inserções dos genes *gag*, *pro* e *env* (gp41 e gp120); e do reforço da vacina AIDSVAX®gp120 B/E (VaxGen) - proteína gp120 recombinante e Alúmen, administradas em uma estratégia de *prime-boost* (BANSAL et al., 2010; RERKS-NGARM et al., 2009). Ao analisar os resultados do estudo Thai, foram observados nos indivíduos que receberam a vacina RV144 uma redução de 31% no risco de infecção com o HIV, que foi correlacionado com a presença de anticorpos que reconhecem a região variável V1/V2 da proteína gp120 (HAYNES et al., 2012; RERKS-NGARM et al., 2009; ZOLLA-PAZNER et al., 2014), sendo um estímulo para o desenvolvimento de novos candidatos vacinais baseados na ativação da resposta humoral. O estudo Thai com a vacina RV144 foi o primeiro teste clínico que apresentou eficácia de uma vacina anti-HIV e esta utilizava uma proteína do envelope (gp120) do HIV-1 (MONTEFIORI et al., 2012).

Os resultados de ensaios pré-clínicos e clínicos demonstram claramente que são necessárias abordagens vacinais inovadoras, capazes de estimular a produção de anticorpos neutralizantes e de assegurar uma maior ativação de células T citotóxicas em humanos. O direcionamento do antígeno do HIV para células do sistema imunológico é uma dessas abordagens, que é amplamente empregada em vacinas de DNA (LEWIS et al., 2014; SANTANA et al., 2013) e em estratégias com células dendríticas (DC) (IDOYAGA et al., 2011).

1.4 O vírus HSV

O Herpes Simples Vírus (HSV) pertence à família Herpesviridae e é dividido em dois sorotipos (HSV-1 e HSV-2), que são os agentes etiológicos responsáveis pelo Herpes simples. É interessante destacar que cada sorotipo possui um tropismo diferente no hospedeiro. Assim, o HSV-1 é o agente etiológico da herpes orolabial e cutânea (incluindo as do sistema respiratório) e lesões oftálmicas. O HSV-2 predomina nas infecções genitais e perigenitais. Estima-se que aproximadamente 70% da população mundial teve contato com o vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) (DAVISON et al., 2009; WALD et al., 2004).

As Herpesviroses são conhecidas por seu período de latência e pelo fenômeno de recorrência. O HSV-1 pode ficar latente nos gânglios do trigêmeo, reativando sob condições de estresse, podendo causar novamente a doença (ROIZMAN et al., 2007). A infecção primária ocorre na mucosa oral, depois o vírus se replica nas células epiteliais e, em seguida, infecta o terminal neuronal, onde o vírus atinge os gânglios nervosos. Os gânglios trigêmios abriga o DNA do vírus, que está na sua forma latente. As recidivas ocorrem quando o vírus sai do estado de latência e é transportado para o local da infecção primária (ARDUINO et al., 2008; CUNNINGHAM et al., 2006)

O HSV-1 é um vírus envelopado grande, com diâmetro de 200 nm. Esse vírus é composto por quatro componentes: o cerne, que contém o DNA viral; o capsídeo icosadeltaédrico; o tegumento, que é uma camada amorfa de proteínas que separa o capsídeo da camada mais externa; e o envelope, que é constituído por uma bicamada lipídica contendo 11 glicoproteínas (RESKE et al., 2007; ROIZMAN et al., 2007). O genoma HSV é composto de DNA linear e dupla fita, contendo 152 kpb,

distribuídos em dois segmentos covalentemente ligados: o segmento L (longo) e o segmento S (curto). O seu genoma codifica 84 proteínas, entre estas várias glicoproteínas (ROIZMAN et al., 2007).

1.5 Vacinas anti-HSV

Das 11 glicoproteínas presentes no envelope do HSV, sete são importante na infectividade do vírus. As glicoproteínas B, C e D (gB, gC e gD) participam da adsorção e penetração na célula e da liberação de novos vírions. A gE e a gI são os receptores para fração Fc da IgG anti-HSV e participam do neurotropismo. A gG permite a distinção antígenoica entre os dois sorogrupos e participa do epidermotropismo. E a gH é o receptor para o fragmento C3b do complemento (AKHTAR; SHUKLA, 2009; RESKE et al., 2007). Pode-se perceber que algumas glicoproteínas de superfície possuem uma importante participação no mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro. As glicoproteínas gE, gI e gH, quando atuam em conjunto, permitem que a célula infectada não tenha uma citólise mediada por anticorpo, justificando o fato de que a presença de anticorpos anti-HSV nem sempre seja um correlato efetivo de proteção contra a Herpes. Já as glicoproteínas gB, gC e gD, por serem indispensáveis para adsorção e penetração viral e para a replicação viral nas células infectadas, são antígenos imunogênicos utilizados em formulações vacinas anti-herpéticas (AKHTAR; SHUKLA, 2009; BYARS et al. 1994).

Diferentes estratégias vacinais têm sido testadas contra o HSV-1 e HSV-2, entre estas a utilização de vírus HSV inativado, vírus vivos geneticamente atenuados, vacinas de subunidades, vacinas de DNA e vetores virais não replicativos (CASANOVA et al., 2002; KOELLE; COREY, 2006; STANBERRY et al., 2002). No ensaio clínico fase III da vacina composta pela proteína gD-2 e pelos adjuvantes alumínio e monofosforil lipídeo A (MPL), foi observado que esta vacina foi capaz de reduzir em 70% a infecção primária do vírus HSV-1 em mulheres, desde que as mesmas não tivessem tido contato prévio com os vírus HSV-1 e HSV-2 (BERNSTEIN, 2005; KOELLE, 2006). As glicoproteínas D (gD) do HSV-1 e HSV-2 têm alto nível de similaridade e podem gerar proteção contra ambos os tipos virais (LONG et al., 1984).

No Ensaio clínico Herpevac, a imunização com a gD2 foi capaz de proteger mulheres contra a herpes genital. Neste estudo, ao invés da resposta de células T CD8⁺ e CD4⁺ estarem diretamente relacionados com a proteção, foram os títulos de anticorpos anti-gD2 que estavam associados com as baixas taxas de infecções do HSV e da doença, sugerindo que a participação de anticorpos é importante para a eficácia de uma vacina profilática. Ainda não se sabe se os anticorpos anti-gD-2 foram neutralizantes ou contribuíram para uma resposta celular citotóxica dependente de anticorpo (BELSHE et al., 2014). Apesar dos resultados obtidos, continua sendo recomendada o desenvolvimento de vacinas profiláticas anti-HSV que desencadeiem uma resposta humoral e celular. Neste contexto, as vacinas de DNA podem ser uma alternativa interessante no combate à infecção pelo HSV.

1.6 A Glicoproteína D e seu efeito imunoestimulador

A glicoproteína gD do envelope do HSV é constituída por 394 aminoácidos. Esta possui uma região transmembrana definida pelos aminoácidos 340 a 364 e vários sítios de glicosilação (WATSON et al., 1982). As glicoproteínas do HSV são componentes estruturais do envelope do *virion* e são expressas na membrana plasmática de células infectadas, agindo como principal estímulo antigênico para a resposta imune celular e humoral, sobretudo do tipo Th 2. A glicoproteína D (gD) está envolvida no processo de ligação ao receptor, fusão e invasão de células nervosas, representando o alvo principal da resposta imunológica contra o HSV (COHEN, 1988; FULLER; LEE, 1992).

Uma particularidade da gD é a sua capacidade de interagir com o receptor HVEM (mediador de entrada do herpesvírus), uma molécula presente na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs), podendo favorecer a apresentação de antígenos fusionados à gD. Tal característica confere à gD um potencial imunomodulador. Esse efeito é potencializado pelo fato da proteína gD competir com o atenuador de linfócitos B e T (BTLA), que se ligam no mesmo sítio do receptor HVEM, interagindo com os resíduos de aminoácidos prolina (P17), tirosina (Y23) e valina (V36), conforme pode ser visto na Figura 2 (CHEUNG et al., 2005; KOJIMA et al., 2011). Aparentemente a expressão da gD na superfície de uma célula e sua interação com o HVEM ancorado na superfície de outra célula, impede

por competição a ligação do BTLA, um repressor da ativação de linfócitos (Revisado em PASERO et al., 2012; WATANABE et al., 2003). Uma vez que o BTLA não se liga ao HVEM, pois o sítio está ocupado pela gD, não há a liberação de sinais coinibitórios do BTLA. Assim, a ligação da gD ao HVEM favorece, a apresentação mais efetiva de peptídeos associados a moléculas de MHC tipo I ou tipo II para linfócitos B e T e APCs (CHEUNG et al., 2005; STILES et al., 2010).

Figura 2 – Estrutura dos Complexos BTLA/HVEM (esquerda) e gD/HVEM (direita) obtida por cristalografia. Representação da superfície do BTLA (em verde – lado esquerdo) e da gD (em marrom – lado direito). A figura mostra o modelo do HVEM (em azul) evidenciando os três resíduos de aminoácidos P17, Y23 e V36 que participam da formação desses complexos. Fonte: adaptado de Kojima et al. (2011).

O HVEM pertence à família de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) e está expresso na superfície de diversas células do sistema imunológico, como células dendríticas, linfócitos T e B e monócitos. Sua função é transmitir sinais coestimulatórios ou coinibitórios ao sistema imune através da interação com diversas moléculas, como LIGHT, as linfotoxinas α , BTLA e CD160 (CAI; FREEMAN, 2009; Revisado em PASERO et al., 2012). Para isso, a molécula HVEM apresenta quatro domínios ricos em cisteína, denominados CRD. O sítio de interação da gD no HVEM é o domínio 1 (CRD 1), o mesmo domínio em que a molécula BTLA e CD160 se ligam ao HVEM (CAI et al., 2008; CONNOLLY et al, 2002; STILES et al., 2010). Já o domínio CRD 3 participa da sua interação com moléculas estimuladoras, como linfotoxina α e LIGHT (GONZALEZ et al., 2005; STILES et al., 2010). A molécula LIGHT tem um importante papel na estimulação de processos inflamatórios e na estimulação de células T (CAI et al., 2009; MURPHY et al, 2006). Assim, vacinas de

DNA baseadas na expressão de antígenos geneticamente fusionados à gD podem representar uma plataforma para a montagem de diferentes formulações vacinais, com potencial profilático, contra infecções virais e doenças degenerativas que exijam uma ativação eficiente de respostas mediadas por células T CD8⁺.

1.7 Vacina de DNA

As vacinas de DNA se enquadram como uma estratégia muito interessante na indução de resposta humoral e celular antígeno-específica por causa de sua simplicidade, estabilidade, segurança e possibilidade de administrações repetidas (FIORETTI et al., 2010; KHAN, 2009; MONIZ, 2003). A produção em larga escala é mais barata, a manutenção do controle de qualidade é mais fácil e a comercialização não necessita de uma rede de refrigeração, pois estas vacinas são estáveis à temperatura ambiente, facilitando o transporte e a distribuição e viabilizando a transferência dessa tecnologia para países em desenvolvimento (KHAN, 2009). Estas vacinas não se integram ao genoma do hospedeiro e não se replicam no hospedeiro final. Além disso, não há evidências de mutagênese ou respostas autoimunes induzidas em indivíduos vacinados com estas vacinas (MOR et al., 1997; NICHOLS et al., 1995; SUN et al., 2010). Outra vantagem associada às vacinas de DNA é a possibilidade de criação de formulações multivalentes por meio da inserção em um único plasmídeo de vários genes que codifiquem para antígenos distintos, derivados de um mesmo patógeno ou de patógenos diferentes (DAVIS; McCLUSKIE, 1999; KHAN, 2009; SMOOKER et al., 2004).

Essa estratégia consiste basicamente na criação de plasmídeos bacterianos capazes de codificar antígenos sob o controle de promotores eucarióticos fortes (LÁSARO; FERREIRA, 2000; LUCKAY et al., 2007). Células transfectadas pelos vetores plasmidiais tornam-se capazes de expressar a proteína codificada e desencadeiam respostas imunológicas específicas (ROBINSON; PERTMER, 2000; WEINER; KENNEDY, 1999). As vacinas gênicas são mais frequentemente administradas por injeção direta do DNA em solução salina no músculo do animal, ou por biobalística utilizando-se o *gene gun* (HASSETT; WHITTON, 1996; WANG; LU, 2013). Os vetores plasmidiais, quando injetados nos animais, entram nas células próximas aos locais da administração, incluindo algumas células

apresentadoras de antígeno (LÁSARO; ERTL, 2004). No método da biobalística, microesferas de ouro são impregnadas com o DNA plasmidial e administradas através do *gene gun*, que direciona partículas diretamente a células da pele, incluindo células de Langerhans, que atuam como células apresentadoras de antígeno (SMAHEL et al., 2014; WANG; LU, 2013). Apesar de todas essas vantagens, as vacinas de DNA tendem a gerar baixos níveis de resposta imunológica celular e humoral (KIM et al., 2010). Dessa forma, há a necessidade de utilizar outras estratégias para aumentar a imunogenicidade de tais formulações vacinais.

1.8 Aumento da imunogenicidade da vacina de DNA

Para melhorar a imunogenicidade das vacinas de DNA, várias estratégias podem ser adotadas. Uma dessas estratégias é a coadministração de plasmídeos que codificam citocinas que são potentes adjuvantes capazes de aumentar a resposta imune humoral e celular. A interleucina-2 (IL-2), por exemplo, é uma citocina produzida por células T ativadas capaz de promover a sua proliferação clonal (WALDMANN, 2006). Moore e colaboradores (2002) obtiveram um aumento significativo na resposta imunológica anti-HIV ao utilizar plasmídeo que codificava a IL-2. A coadministração da pIL-2 também foi empregada em vacinas de DNA que codificam a glicoproteína D (gD) do HSV-1, resultando em aumento nas respostas imunológicas gD-específicas (LI et al., 2006).

A IL-12, por sua vez, é capaz de induzir resposta imune antígeno-específica, polarizando as respostas imunológicas para um padrão Th1 (TSUNG et al., 1997). Além disso, promove maturação células T citotóxicas e células Natural Killer e facilita a apresentação de antígenos, aumentando a expressão de moléculas de MHC I e MHC II (KALAMS et al., 2013; WATFORD et al., 2003; WEISS et al., 2007). Já a citocina GM-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos) é capaz de estimular a proliferação, a diferenciação e a ativação de macrófagos, neutrófilos e outras células apresentadoras de antígenos (APCs) (DISIS et al., 1996). Quando coadministrado com vacinas, a citocina GM-CSF é capaz de potencializar a apresentação antigênica ao atrair células dendríticas (DC) para o local da vacinação (TOUBAJI et al., 2007).

Outra estratégia utilizada na busca de uma maior imunogenicidade de vacinas de DNA tem sido o uso preferencial de vetores que tenham uma origem de replicação de alto número de cópias e um promotor forte que permita o alto nível de expressão do antígeno em células eucarióticas. A otimização da sequência de nucleotídeos privilegiando códons frequentes em células eucarióticas também contribui para o aumento da imunogenicidade da vacina de DNA, pois aumentará o nível de expressão da proteína codificada e das respostas imunológicas específicas (CHEUNG et al., 2004; YAN et al., 2007).

1.9 A plataforma vacinal utilizando a gD fusionada ao antígeno de interesse

O Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV) no ICB II - USP dedica-se a pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novas estratégias vacinais, incluindo novos vetores bacterianos, vacinas e adjuvantes de mucosa e as vacinas de DNA. Entre as pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de vacinas em curso no LDV está o estudo das propriedades imunológicas de uma vacina de DNA baseada na expressão da proteína gD do envoltório celular do HSV tipo 1. Resultados publicados pelo grupo demonstraram que proteínas geneticamente fusionadas à proteína gD resultam em um dramático aumento da imunogenicidade desses antígenos com interesse vacinal (ALVES et al., 1998; ALVES et al., 1999; ALVES et al., 2001; LÁSARO et al., 2005). A construção de uma vacina de DNA capaz de levar à expressão de uma proteína híbrida constituída pela gD do HSV geneticamente fusionada à proteína CfaB de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) resultou em aumento na intensidade e na longevidade da resposta de anticorpos em camundongos imunizados (ALVES et al., 2001). Além disso, as propriedades adjuvantes advindas da expressão de proteínas heterólogas geneticamente fusionadas à proteína gD refletem na resposta mediada por células T CD8⁺ antígeno-específicas, como demonstrado em ensaios realizados com camundongos imunizados com uma vacina de DNA que codificava a oncoproteína E7 do HPV-16 fusionada à gD (LÁSARO et al., 2005). O efeito imuno-estimulador da proteína gD fusionada às oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 resultou em uma proteção profilática de 100% a camundongos desafiados com células tumorais TC-1 e em proteção terapêutica em 40% dos animais pré-inoculados com as células

tumorais, confirmando o aumento na ativação de células T CD8⁺ específicas (LÁSARO et al., 2005).

Ao caracterizar a resposta imunológica da formulação pgDE7E6E5, foi observado uma proteção terapêutica de 70% dos camundongos desafiados com 5×10^5 células TC-1 e imunizados posteriormente com três doses da vacina pgDE7E6E5. Além disso, a co-administração da vacina pgDE7E6E5 com vetores que codificam as citocinas GM-CSF e IL-12 potencializaram o efeito antitumoral terapêutico, conferindo 100% de proteção nos camundongos desafiados com as células TC-1, para o regime vacinal de três doses pela via intramuscular (DINIZ et al., 2010; DINIZ; FERREIRA, 2011).

A combinação da co-administração da formulação vacinal com o plasmídeo que codifica a IL-2, da otimização da sequência de nucleotídeos para expressão em células de mamíferos e do uso de diferentes vias de inoculação resultou numa potente resposta de células T CD8⁺ citotóxicas E7-específicas. Os camundongos desafiados com células TC-1 e imunizados com uma única dose da vacina pgDE7h combinada com o plasmídeo pIL-2 pela via *gene gun* apresentaram 100% de proteção terapêutica, ficando livre do desenvolvimento tumoral (DINIZ et al., 2013). Essa é a vacina de DNA mais eficaz que confere 100% de proteção terapêutica aos camundongos desafiados com as células TC-1.

Tais resultados nos levaram a avaliar a possibilidade de utilizar essa abordagem como uma plataforma vacinal para outros antígenos. Esta plataforma vacinal foi testada utilizando a gD geneticamente fusionada a nucleoproteína (NP) do vírus influenza A (gDNP) (DiMENNA et al., 2010), em que camundongos Balb/c imunizados com o vetor adenoviral não-replicativo expressando esta proteína híbrida (AdC68gDNP) foram capazes de induzir uma resposta de células T CD8⁺ NP-específicas significativamente mais elevada que os animais imunizados com o vetor AdC68NP, que codificava apenas a Nucleoproteína. A construção de vacinas de DNA que codificam antígenos fusionados à proteína gD-1 representa uma alternativa promissora para o aumento da imunogenicidade dessas formulações, particularmente para a ativação antígeno-específica de linfócito T CD8⁺. Assim, a presente proposta tem como principal objetivo avaliar os efeitos imunomoduladores de uma nova formulação vacinal, desenvolvida no CEVAT-Gene/USP, constituída

por uma vacina de DNA que codifica a proteína gD do HSV tipo 1 geneticamente fusionada à proteína p24 do HIV.

2 OBJETIVO GERAL

A presente tese de doutorado tem como objetivo avaliar as propriedades imunológicas de uma vacina de DNA baseada na codificação da proteína gD do HSV-1 geneticamente fusionada à proteína p24 do HIV em modelo experimental murino.

2.1 Objetivos específicos

A presente tese envolveu quatro objetivos específicos: (i) Construção de uma vacina de DNA que codifique a proteína gD do HSV-1 geneticamente fusionada à proteína p24 do HIV e determinação da expressão e da localização da proteína híbrida em células de mamífero; (ii) Avaliação das respostas imunológicas específicas (produção de anticorpos anti-gD e anti-p24 e ativação de células T CD8⁺) induzidas em camundongos imunizados com a vacina de DNA anti-HIV/HSV; (iii) Definição de um regime vacinal, incluindo número de doses e vias de inoculação, e modificações outras capazes de conferir respostas imunológicas específicas mais elevadas; (iv) Avaliação da funcionalidade das respostas imunológicas induzidas pelas vacinas, usando modelos experimentais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amplificação de sequência gênica por PCR

Para amplificar o gene que codifica a proteína p24 do HIV foram utilizados como DNA molde o plasmídeo pHXB2, que contém o genoma da cepa HXB2 – HIV-1 subtipo B (cedido gentilmente pelo Prof. Armando Ventura, Departamento de Microbiologia, USP). Os iniciadores específicos apresentados abaixo (Tabela 1) foram utilizados nas reações de amplificações descritas no presente trabalho. Todas as reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 100 µL, compreendendo 0.1 µM dos iniciadores *forward* e *reverse*, 40 ng de DNA molde, dNTPs (0,2 mM cada), tampão (1X), MgCl₂ 1,5 mM e três unidades da enzima *Pfu* (Thermo Scientific®, Vilnius, Lituânia). As amplificações de PCR foram realizadas em um Termociclador utilizando o programa com a etapa inicial de desnaturação a 94 °C por cinco minutos, seguido de 24 ciclos térmicos de 94 °C por um minuto (desnaturação), 57 °C por um minuto (pareamento) e 72 °C por dois minutos (extensão), finalizando com um passo final de extensão de 10 minutos a 72 °C. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v), corados com brometo de etídeo 0,1% (v/v) e purificados utilizando-se o Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®, Madison, WI, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

3.2 Reações de digestão enzimática

As reações de digestão com enzimas de endonucleases foram realizadas utilizando 10 unidades da enzima de interesse (Thermo Scientific®, Vilnius, Lituânia) para digerir uma alíquota 5 µg do DNA plasmidial durante duas horas, de acordo com as instruções do fabricante. Após a digestão, os produtos de reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®). Para evitar que o vetor digerido apenas com uma enzima se religasse sem o fragmento de interesse, durante os últimos 10 minutos de digestão, foi acrescentado a reação 50 unidades da enzima FastAP (Thermo Scientific®) a 37 °C.

Tabela 1 – Lista dos iniciadores específicos utilizados para amplificação do gene p24 do HIV e para confirmação da clonagem.

Iniciador	Sequências
<i>PvuII</i> p24 fw	5' GTCGGACCAGCTGCAGAACATCCAGGG 3'
<i>Apal</i> p24 fw	5' TAAAGGGGCCCCAGAACATCCAGGGG 3'
<i>Apal</i> p24 rv	5' TACCGGGGCCCCAGCCAAAACCTCTTGC 3'
<i>Apal</i> gD fw seq	5' CATCCCCGAGAACCAGCG 3'
gD fw seq	5' GTCGGACCAGCTGCAGAACATCCAGGG 3'
gD rv seq	5' TAAAGGGGCCCCAGAACATCCAGGGG 3'
<i>XbaI</i> p24 rv	5' TACCTCTAGAAGCCAAAACCTCTTGCA 3'
<i>Bam</i> HI p24 rv	5' CAGAACATCCAGGGCATCCCCGAGAAAGCG 3'
<i>Apal</i> gD rv seq	5' TGC GTGGCGTTCAGAACATCCAGGGGGTCTC 3'
<i>XbaI</i> p24 fw	5' TAAATCTAGACAGAACATCCAGGGG 3'
<i>NheI</i> p24 fw	5' TAAAGGGGCCCCAGAACATCCAGGGG 3'
<i>NheI</i> gD fw	5' GTCGGACCAGCTGCAGAACATCCAGGG 3'
<i>EcoRI</i> p24 rv	5' AAGAATTCTACCGAGCCAAAACCTCTTGC 3'
<i>EcoRI</i> gD rv	5' AAGAATTCAAACCAGAACATCCAGGGG 3'

3.2.1 Digestão do vetor *pRE4* e dos insertos *p24 PA* e *p24 AA*

O plasmídeo *pRE4*, descrito por Cohen e colaboradores (1988), alberga em sua sequência o gene da glicoproteína D (gD) do Vírus Herpes Humano tipo-1 (HSV-1). Nessa sequência há sítios únicos de restrição para as enzimas *PvuII* e *Apal*, locais no qual foi clonado o gene da p24. Tais sítios permitiram que duas construções vacinais fossem formuladas. A primeira, *pRE4p24*, em que a sequência gênica da p24 (*p24 AA*) foi amplificada por PCR adicionando dois sítios de *Apal* em suas extremidades permitindo a sua clonagem na gD; e a segunda, *pΔgDp24*, vetor

controle, em que a sequência gênica da p24 (p24 PA) foi clonada entre os sítios *PvuII* e *Apal*, removendo 189 aminoácidos da porção central da gD, permitindo, assim, avaliar os efeitos imunomoduladores da gD. A representação esquemática de todas as construções está disponível no Apêndice A. A reação de digestão do vetor pRE4 e dos insertos (p24 AA e p24 PA) seguiu as recomendações descritas acima.

3.2.2 Digestão do vetor pVAX e do inserto *NheI*-gDp24-*EcoRI*

Para a construção vacinal pgDp24, foi adotada a estratégia de amplificar por PCR o fragmento gênico *NheI*-gDp24-*EcoRI*, inserindo neste inserto os sítios permissivos de restrição para clonagem no vetor pVAX (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA). A reação de amplificação foi realizada conforme já foi descrito anteriormente, utilizando os iniciadores *NheI* gD fw e *EcoRI* gD rv (Tabela 1 e Apêndice A). Tal produto de PCR e o vetor pVAX foi submetido à reação de restrição com as enzimas *NheI* e *EcoRI* (Thermo Scientific®).

3.2.3 Digestão dos vetores pBSKgDE7h e pVAX e do inserto *Apal*-p24-*XbaI*

Para a construção vacinal pgDhp24 foi utilizado o plasmídeo pBSKgDE7h, um derivado do pBlueScript que alberga o gene sintético gDE7 (pBSKgDE7h) cuja sequência codificadora foi otimizada para um uso de códons mais eficientes em células de mamíferos visando maior expressão do antígeno nestas células. O vetor pBSKgDE7h foi submetido à digestão com as endonucleases *Apal* e *XbaI* (Thermo Scientific®) para a remoção do fragmento de aproximadamente 300pb referente à sequência E7. O fragmento maior (pBSKgDh) foi utilizado na clonagem do componente p24. O gene responsável pela síntese da p24 foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores *Apal* p24 fw e *XbaI* p24 rv, ambos descritos na tabela 1. O fragmento amplificado de aproximadamente 700pb foi submetido a uma reação de digestão com as mesmas enzimas supracitadas e os produtos da reação foram submetidos à ligação com o vetor linear pBSKgDh. Posteriormente, os produtos desta ligação foram transformados em células DH5α e os clones que albergavam o vetor pBSKgDhp24 foram selecionados ao digerir tal DNA plasmidial com as enzimas *NheI* e *EcoRV* (Thermo Scientific®), confirmando a liberação do fragmento de 1,9kb referente ao inserto gDhp24. Os vetores pBSKgDhp24 e o pVAX (Life

Technologies®, Carlsbad, CA, USA) foram digeridos com as enzimas *NheI* e *EcoRV* (Thermo Scientific®). O inserto *NheI*-gDhp24-*EcoRV* foi subclonado no vetor pVAX e os clones selecionados foram submetidos à reação de sequenciamento para confirmação da integridade da sua sequência.

3.2.4 Digestão dos vetores *pcDNA3* e do inserto *XbaI*-p24-*BamHI*

Para a construção do vetor pcDNA3::p24, amplificamos o fragmento gênico *XbaI*-p24-*BamHI* utilizando como DNA molde o plasmídeo pRE4p24 e os iniciadores específicos *XbaI* p24 fw e *BamHI* p24 rv (tabela 1 e Apêndice A). O vetor pcDNA3 (Life Technologies®) e os produtos de PCR foram submetidos a uma reação de restrição com as enzimas *XbaI* e *BamHI* (Thermo Scientific®). O vetor linearizado e o inserto foram purificados e submetidos à reação de ligação e o produto da reação foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes preparadas pelo método de choque térmico.

3.3 Seleção de clones de novas formulações vacinais

3.3.1 Construção dos vetores *pΔgDp24* e *pgDp24* e *pcDNA3p24*

Foram escolhidas aleatoriamente oito colônias transformadas com o plasmídeo, que recebera o inserto p24 PA. Os plasmídeos destas colônias foram extraídos pelo método de lise alcalina e submetidos ao tratamento com as endonucleases de restrição *PvuII* e *Apal* (Thermo Scientific®), de acordo com as orientações já descritas, no intuito de confirmar se o perfil de restrição destes plasmídeos estavam condizentes com o esperado. Estes plasmídeos recombinantes contendo os genes da gD parcialmente deletada e da p24 foram denominados pΔgDp24.

Foram escolhidas 10 colônias transformadas com o plasmídeo pgDp24, que receberam o inserto p24 AA. Os plasmídeos destas colônias também foram extraídos pelo método de lise alcalina e submetidos à reação de PCR, usando as mesmas condições de amplificação já descritas. Para verificar a presença do gene da p24 AA, cada plasmídeo das dez colônias escolhidas foi submetido a uma reação

de PCR utilizando os oligonucleotídeos *Apal* p24 fw e *Apal* p24 rv (Tabela 1). No entanto, ainda era necessário confirmar se o fragmento p24 AA entrou no sentido correto ao ser clonado no sítio *Apal* da gD, problema que é inerente da estratégia de clonagem com um único sítio de restrição. Nesse caso, os mesmos 10 plasmídeos foram submetidos à outra reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos *Apal* gD fw seq (Tabela 1), que hibridiza dentro da gD próximo ao sítio *Apal*; e *Apal* p24 rv, que hibridiza no final do inserto. Desta forma, a amplificação só ocorrerá se o inserto p24 AA estiver na posição correta. Sendo assim, foram selecionados os clones promissores de cada uma dessas formulações e a integridade da sequência foi confirmada por sequenciamento.

3.3.2 Seleção dos clones *pgDp24* e *pgDhp24*

Dez colônias de cada construção vacinal foram cultivadas em meio LB sob pressão seletiva da canamicina por aproximadamente 18 h a 37 °C em agitador orbital. Uma alíquota de um mililitro deste inóculo foi utilizada para a extração de DNA plasmidial por lise alcalina e tal material foi submetido a uma reação de restrição com as enzimas *NheI* e *EcoRI*, para selecionar os clones promissores *pgDp24* e outra reação de restrição com as enzimas *NheI* e *EcoRV*, para selecionar os clones promissores *pgDhp24*. Estes clones foram sequenciados no sequenciador de capilar automático ABI 3100 (Life Technologies®) e foi confirmada a integridade das sequências de nucleotídeos desta construção vacinal com o programa LASERGENE (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA).

3.3.3 Seleção dos clones *pcDNA3p24*

Dez colônias bacterianas foram inoculadas em 5 mL de meio LB sob pressão seletiva da ampicilina por aproximadamente 18 h a 37 °C. Foi realizada a extração plasmidial por lise alcalina destes inóculos e estes plasmídeos foram digeridos pelas enzimas *XbaI* e *BamHI* (Thermo Scientific®), para confirmação dos clones *pcDNA3::p24*. Os clones promissores foram sequenciados para confirmação da integridade das sequências de nucleotídeos desta construção vacinal.

3.4 Sequenciamento dos vetores clonados

A integridade das sequências das formulações vacinais foi analisada pela técnica de interrupção de síntese com dideoxinucleotídeos marcados com fluorocromos. Utilizou-se o sequenciador de capilar automático ABI 3100 (“Automated capillary DNA sequencer” ABI 3100, Life Technologies®) disponível no Instituto de Química da USP. Foram utilizados iniciadores que reconheciam os genes que codificam a proteína gD e a proteína p24, permitindo sequenciar todas as construções (tabela 1). As reações de sequenciamento foram montadas para um volume final de 10 µL e continham 3 µL (aproximadamente 150 ng) dos vetores purificados, 3,2 pmoles de iniciador, 1 µL de tampão de reação “Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Life Technologies®), 2 µL de tampão de reação “Save Money” (1 mL de Tris 2M; 30 µL de MgCl₂ 1M, água milli-Q q.s.p. 10 mL) e 3 µL de água milli-Q esterilizada. As sequências de nucleotídeos obtidas foram editadas e montadas em uma sequência contígua com o programa LASERGENE (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA).

3.5 Detecção das proteínas recombinantes expressas em células eucarióticas transfectadas com as formulações vacinais

Para verificar a expressão da proteína híbrida gDp24 em células eucarióticas, células HEK-293T foram transfectadas com os plasmídeos vacinais com o auxílio de lipofectamina (Life Technologies®), em condições sugeridas pelo fabricante. Após 24 horas de cultivo, as células foram coletadas e os extratos protéicos foram processados conforme, descrito por Alves e colaboradores (1999). As amostras obtidas foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), posteriormente foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45 µM (Merck Millipore®, Darmstadt, Alemanha) e em seguida foi feito um *Western blot* com anticorpos específicos para detecção das proteínas gD e p24.

Também foram preparadas lâminas com estas células transfectadas para detecção das proteínas recombinantes por imunofluorescência. Após 24 horas de cultivo, as células transfectadas com lipofectamina (Life Technologies®) foram fixadas com paraformaldeído e tratadas com anticorpos p24-específicos de coelho e

gD-específicos de camundongo. Posteriormente, foram tratadas com anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados à FITC e anti-IgG de coelho conjugado à Texas-Red, respectivamente, e analisadas em microscópio de imunofluorescência (Asiovert S100, Zeiss®, Oberkochen, Alemanha). Estas células tiveram, ainda, seus núcleos corados com DAPI.

3.6 Imunização de camundongos e avaliação de respostas imunológicas

3.6.1 Animais utilizados

Camundongos da linhagem BALB/c com idade entre 6 a 8 semanas foram adquiridos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições padronizadas, recebendo ração balanceada autoclavada, com regime alimentar “*ad libidum*”. Os protocolos de experimentação foram aprovados pela comissão de ética em experimentação animal (CEEa) sob número 17/09, seguindo rigorosamente os princípios éticos propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.6.2 Imunização de camundongos com as construções vacinais

As construções vacinais foram administradas em regimes de duas, três e quatro doses com intervalos de 15 dias pelas vias intramuscular (nos músculos tibiais anteriores) com 100 µg de DNA/dose (im), intradérmica com seringa com doses de 50 µg de DNA (id) e intradérmica por biobalística com 2 µg de DNA por dose (Gene gun - gg).

3.6.3 Coleta e processamento das amostras

A sangria dos camundongos foi realizada com punção de 0,3 mL de sangue periférico pela veia submandibular, seguindo as recomendações de Golde e colaboradores (2005). Essas amostras de sangue foram incubadas inicialmente a 4 °C por 15 minutos e incubadas a 37 °C pelo mesmo período. Posteriormente, tais

amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4000 rpm e o soro (sobrenadante) separado para um novo microtubo, para que os títulos de anticorpos séricos anti-p24 e anti-gD fossem dosados por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

Ao terminar o protocolo de imunização, os animais imunizados foram eutanasiados por CO₂ e os seus baços foram retirados em condições assépticas, macerados e lavados com solução de ACK Lising Buffer (BioSource International) para lise de hemácias. Após três lavagens com meio de cultura RPMI (Gibco® - Life Technologies®) com 1% de soro fetal bovino (SBF), os esplenócitos foram ressuspendidos em meio de cultura RPMI suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), 2-ME (50 µM), L-glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM) e 10% SBF inativado pelo calor. O número de células na suspensão de esplenócitos foi determinado por contagem em câmara de Neubauer em Azul de Tripán (1:4).

3.6.4 Respostas de anticorpos séricos anti-p24 em animais imunizados com as vacinas de DNA

Os títulos de anticorpos anti-p24 e anti-gD dos animais imunizados foram medidos em ensaios de ELISA feitos com a proteína p24 e gD recombinante produzida no laboratório. Os ensaios de ELISA foram realizados com 250 ng da proteína recombinante p24 disposta em placas MaxiSorp (Nunc Nalgene Thermo Scientific®, Rochester, NY, USA). Após incubação de 12 horas a 4 °C, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05% e bloqueadas com 5% de leite desnatado (NESTLÉ®, Três Corações, MG, Brasil) dissolvido em PBS-Tween 0,05%. Em seguida, as placas com soros provenientes dos animais imunizados na diluição inicial foi 1:200 foram incubadas por 1 hora a 37 °C. Anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase foram diluídos em leite desnatado 5% na concentração de 1:3000 e incubados nas placas previamente lavadas com PBS-Tween 0,05%. A presença de anticorpos ligados aos antígenos foi visualizada com a solução de revelação (12,5 mL de tampão Citrato-Fosfato 33 mM, pH 5.0; 5 mg de O-Fenilenodiaminadihidroclorato (OPD); e 5 µL de H₂O₂ (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) por 20 minutos no escuro a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 µL por poço de H₂SO₄ 9N. As densidades óticas das reações foram determinadas a 492 nm em leitor de ELISA modelo MultiScan EX

(Labsystems, Inc, Virginia, USA). Para calcular os títulos de anticorpos p24 e gD-específicos, foi realizada associando os valores das diluições de cada amostra por análise de regressão linear ($R^2 > 0,96$) (Korhonen et al., 1999).

3.6.5 Ensaio de ELISPOT (*Enzyme-linked immunosorbent spot*)

O ensaio ELISPOT foi realizado para detecção de células T produtoras de IFN- γ específicas para peptídeos T CD8⁺ restritos derivados das proteínas Gag (p24). Esse ensaio detecta citocinas secretadas em resposta a estímulos específicos, após estimulação *in vitro*, em nível de uma única célula e foi realizado segundo metodologia descrita pelo fabricante. Quinze dias após a última dose do esquema de imunização, os animais foram submetidos à eutanásia, seus baços retirados e as células utilizadas para o ensaio. Alíquotas de 5×10^5 células derivadas de baço de camundongos imunizados foram adicionadas em placas de 96 poços (Millipore) previamente sensibilizadas com anticorpo monoclonal de captura anti-IFN- γ de camundongo (BD Biosciences®, San Jose, CA, USA) a concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$. Essas células foram incubadas por 24 h a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ na ausência ou presença de 300 ng de estímulos específicos (peptídeo derivado da p24) ou estímulos inespecíficos - concanavalina A (Controle positivo do ensaio). Após 24h as células foram desprezadas, a placa foi lavada com PBS e novamente incubada com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ de camundongo biotilado (BD Biosciences®) na concentração final de 2 $\mu\text{g/mL}$ por uma noite a 4 °C. Novamente a placa foi lavada e adicionada estreptoavidina peroxidase (Sigma-Aldrich®). Após 2 h de incubação a temperatura ambiente a placa foi novamente lavada e submetida à revelação por meio da adição de uma solução contendo diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio. Os “pontos” foram contados com auxílio do equipamento ImmunoSpot (Cellular Technology, Ltda., Shaker Heights, OH, USA).

3.6.6 Ensaio de citotoxicidade *in vivo*

O ensaio foi realizado para avaliação da eficácia de formulações voltadas para o controle do HIV e permitiu determinar a habilidade dos linfócitos T citotóxicos

Gag-específicos reconhecerem e destruírem *in vivo* as células marcadas com o peptídeo AMQMLKETI derivado da p24. Sete dias após a imunização, cerca de 10-20 animais não imunizados foram submetidos à eutanásia, seus baços retirados e as células utilizadas como alvos para células T citotóxicas. Cerca de 2×10^8 células foram incubadas com 0,5 μM ou 5 μM de CFSE em PBS, por 15 minutos a 37 °C. Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI acrescido de 1% de soro fetal bovino (RPMI-1%). Ao tubo contendo a população de células marcadas com 5 μM de CFSE foi adicionado 25 μM do peptídeo AMQMLKETI, e incubado por 40 minutos a 37 °C. Após este período as células foram lavadas com meio RPMI, acrescido de 1% de SFB e contadas. Quantidades iguais das duas populações de células marcadas foram misturadas em um tubo e centrifugadas a 1.500 rpm. O precipitado de células foi ressuspendido em meio RPMI (sem soro fetal bovino) de modo a conter $2 - 4 \times 10^7$ células/ 200 μL e injetado, pela via intravenosa (plexo retro orbital), em todos os animais que receberam as vacinas e no grupo que recebeu apenas PBS. Após 20 h, todos os animais foram submetidos à eutanásia, as células dos baços tratadas, ressuspensas em PBS acrescido de 2% de SFB e examinadas por citometria de fluxo para detecção de fluorescência emitida pelas duas populações celulares utilizando o aparelho FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Foram contados 10.000 eventos da população marcada com 0,5 μM e a partir dessa população celular foi contada a população de 5 μM de CFSE remanescente. Os dados foram analisados pelo programa FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) para a determinação das porcentagens de células marcadas com 0,5 μM ou 5 μM de CFSE.

3.7 Construção da linhagem celular FC-24

A linhagem 4T1 são células tumorais da glândula mamária de camundongos Balb/c (Aslakson; Miller, 1992), que foi gentilmente cedida pelo Dra. Elaine G. Rodrigues (Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP). As células 4T1 foram cultivadas com meio de cultura RPMI-1640 (Gibco® – Life Technologies®) (0,1% de penicilina/Estreptomicina e 10% de soro fetal bovino) em incubadora úmida a 37 °C com 5% de CO_2 .

Em duas placas de seis poços (TPP®, Trasadingen, Suíça) foram plaqueadas 5×10^5 células 4T1/poço para a formação de uma monocamada, sendo adicionado em cada poço 3 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Gibco® - Life Technologies) suplementado de 10% de soro fetal bovino. Essas placas foram acondicionadas em incubadora úmida à 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Visando saber qual a resistência natural da linhagem 4T1 ao antibiótico G418 (Sigma-Aldrich®), foram adicionadas diferentes concentrações do antibiótico geneticina: 50, 100, 200, 400 e 800 µg/mL. Como controle, um dos poços permaneceu sem antibiótico. Uma das placas permaneceu na incubadora por 48 h e a outra, por 72 h, sendo as células posteriormente fixadas com 4% de paraformaldeído e coradas com cristal de violeta.

Uma garrafa cultura de célula de 75 cm² (TPP®) com 80% de confluência da célula 4T1 foi transfectada com 300 µg do vetor pcDNA3::p24 linearizado complexado a 80 µL de lipofectamina (Life Technologies®). As células ficaram em contato com o complexo lipofectamina-DNA por 6 horas na ausência de soro fetal bovino, quando foram lavadas e receberam 15 mL de meio de cultura RPMI-1640 suplementado de 10% de soro fetal bovino. Ao atingir 95% de confluência, as células 4T1 transfectadas foram tripsinizadas e distribuídas em 3 garrafas cultura de célula de 75 cm² (TPP®). Passados 72 horas após a transfecção, foi adicionado ao meio 300 µg/mL do antibiótico G418. O meio de cultura foi trocado após 48 horas da adição do antibiótico ao meio, sendo mantida a concentração de 300µg/mL do G418. As próximas trocas de meios foram realizadas de 72 em 72 horas com a concentração de 100 µg/mL do G418. Esse procedimento permitiu selecionar clones 4T1 (FC-24) resistentes ao G418.

3.8 Transplante de células tumorais FC-24 para avaliação do efeito anti-tumoral das vacinas

A inoculação das células tumorais FC-24, células tumorais da linhagem 4T1 transfectadas com o vetor pcDNA3::p24, foi feita por via subcutânea em camundongos das linhagens Balb/C. As células FC-24 foram utilizadas na concentração de 1×10^4 /animal. As células foram ressuspensas em 100 µL de meio sem soro e inoculadas em uma região dorso-lateral do animal duas semanas após a última imunização. O acompanhamento da evolução dos tumores nos ensaios de proteção assim como nos ensaios de regressão tumoral foi feito a cada dois dias

durante 40 dias. Os tumores quando presentes foram medidos com o auxílio de um paquímetro e os animais que apresentaram tumores maiores que 1,5 cm de diâmetro foram sacrificados.

3.9 Avaliação da imunidade protetora frente a desafio com o HSV-1

Visando explorar o componente gD da nossa formulação vacinal, foi realizado o desafio com o vírus HSV-1, cepa EK, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Marco Antônio da Silva Campo da Fundação Oswaldo Cruz – MG e pela Prof. Dr. Erna Kroon da Universidade Federal de Minas Gerais. Este desafio foi realizado pela via intranasal com 10^4 UFP. Os camundongos da linhagem Balb/C foram imunizados com três doses das formulações vacinais pgDp24 e pgD e quinze dias depois da última dose foram desafiados com o vírus HSV-1, cepa EK. Os animais foram monitorados quanto à sobrevivência por 30 dias após o desafio.

3.10 Análises Estatísticas

Todos os dados foram analisados com o auxílio do programa estatístico *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows, San Diego, CA. As análises estatísticas foram realizadas com o teste *t* de Student para comparações de médias entre dois grupos. O teste One-Way ANOVA, seguido pela correção de Bonferroni, foi utilizado para comparação de médias quando mais de dois grupos foram avaliados.

4 RESULTADOS

4.1 Construção das Vacinas de DNA pRE4p24 e pΔgDp24 que codificam a proteína p24 do HIV geneticamente fusionadas à proteína gD-1 do HSV

Visando entender o efeito imunomodulador da gD e consolidar uma possível plataforma vacinal, foi construído o vetor pRE4p24 que codifica a gD geneticamente fusionada à proteína p24 do HIV-1. Para tal avaliação, além da construção pRE4p24, foram construídos os controles vacinais pp24 e pΔgDp24, que codificam respectivamente a proteína p24 não fusionada à proteína gD e uma proteína híbrida em que a porção central da gD foi deletada (deleção do aminoácido 52 ao 242 da proteína gD, totalizando 189 aminoácidos deletados). Na figura 3, apresentamos uma representação esquemática das formulações vacinais utilizadas na primeira etapa do presente trabalho.

Figura 3 – Esquema representativo das proteínas codificadas pelas vacinas de DNA construídas. O tamanho das proteínas em número de resíduos de aminoácidos está indicado nos esquemas. PS – Peptídeo sinal; HVEM – Região de ligação com HVEM; p24 – proteína do HIV fusionada à glicoproteína D do HSV; TM – região transmembrana; RF – Região funcional.

Na Figura 4 estão apresentadas as etapas de construção dos vetores pRE4p24 e pΔgDp24. Para confirmação da clonagem do fragmento p24 PA (*PvuII*-p24-*Apal*), no plasmídeo pRE4 foram escolhidas oito colônias e os plasmídeos submetidos à análise de restrição com as endonucleases *PvuII* e *Apal*. Todos os plasmídeos liberaram um fragmento de tamanho de 700pb, indicando a presença do inserto p24 PA (Figura 4b).

Para confirmação da clonagem também foi feita por reação de PCR utilizando um iniciador que pareia no vetor pRE4 (gD *forward Apal* - Tabela 1) e outro iniciador que pareia no inserto p24 (p24 *reverse Apal* - Tabela 1). De dez clones testados, 7 clones amplificaram o fragmento esperado, sugerindo a presença do gene que codifica a p24. Todos os vetores apresentados foram sequenciados e a integridade das sequências dos seus insertos foi confirmada. Um clone foi escolhido e o vetor denominado pRE4p24 que codifica a proteína gD fusionada com a proteína p24 (Figura 4c).

4.2 Detecção das proteínas recombinantes expressas pelas vacinas de DNA em células transfectadas *in vitro*

Para verificar se as construções vacinais pRE4, pRE4p24 ou pΔgDp24 expressam as proteínas de interesse em células eucarióticas, células HEK 293T foram transfectadas com os plasmídeos vacinais e as proteínas recombinantes codificadas por estes foram detectadas em ensaios de imunofluorescência. Na figura 5, é possível observar células HEK 293T tranfectadas com os vetores pRE4, pRE4p24 ou pΔgDp24 e posteriormente marcadas com anticorpos anti-p24 e anti-gD na ausência de tratamento permeabilizante. Foi observada uma maior intensidade da marcação no contorno das células transfectadas. As células transfectadas com o vetor pgD não reagiram com anticorpos p24-específicos, conforme esperado. Assim, foi verificado que tais vetores vacinais expressam as proteínas de interesse em células eucarióticas, em parte acumuladas na membrana citoplasmática.

Figura 4 – Construção dos vetores pRE4p24 e pΔgDp24. A - Fragmentos de DNA que codificam a proteína p24 (p24 PA e p24 AA) amplificados por PCR. M - Marcador de peso molecular Ladder 1Kb (Thermo Scientific); 1 - Fragmento p24 PA (711pb); 2 - Fragmento p24 AA (709pb). B – Confirmação dos clones obtidos. Plasmídeos de oito clones selecionados quando digeridos com as enzimas *PvuII* e *Apal* liberam o fragmento p24 (701pb), indicando a presença do inserto de interesse nestes clones. M - Marcador de peso molecular Ladder 1Kb (Invitrogen); 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 - plasmídeos pΔgDp24 1 a 8 não digeridos; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 - plasmídeos pΔgDp24 1 a 8 digeridos, banda liberada entre 506 e 1018pb (banda esperada de 701pb). C – Eletroforese em gel de agarose 0,8%, evidenciando a amplificação do fragmento de 700pb, indicando que o inserto p24 AA está na direção correta em 6 dos dez plasmídeos. M - Marcador de peso molecular Ladder 1Kb (Invitrogen); 1 a 10 – Clones testados quanto a correta direção dos insertos, destacando os clones 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 que amplificaram a banda esperada de 700pb e, portanto, apresentam o inserto na direção esperada; 11 – Controle negativo da reação de PCR.

Figura 5 – Expressão das proteínas codificadas pelos plasmídeos construídos. Células HEK 293T transfectadas com as construções vacinais pRE4p24, pΔgDp24 e pRE4 utilizando lipofectamina. As células transfectadas foram fixadas com paraformaldeído e tratadas com anticorpos p24-específicos e gD-específicos e anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados ao FITC e anticorpos de coelho conjugados ao Texas-Red. Na primeira linha é possível visualizar a marcação das células transfectadas com anticorpos anti-gD (verde). Na segunda linha estão as células marcadas com anticorpos anti-p24 (vermelho). Na última linha, as mesmas células evidenciando a imagem sobreposta das duas primeiras marcações e os núcleos das células corados com DAPI.

4.3 Efeito adjuvante promovido pela proteína gD nas respostas imunológicas induzidas pelas vacinas de DNA

Para avaliar as respostas imunológicas induzidas pelas vacinas foi adotado um regime vacinal de três doses administradas pela via intramuscular (i.m.) (100 µg de DNA por dose). A análise dos títulos de anticorpos IgG total p24-específico mostra que os animais imunizados com a formulação pRE4p24 e pΔgDp24 tiveram uma resposta humoral maior do que os animais imunizados com o pp24 (Figura 6). A resposta de anticorpos anti-p24 gerada em animais imunizados com o pRE4p24 mostrou-se superior àquela observada em animais imunizados com o vetor (pp24) que codifica apenas para a proteína p24 (Figura 6). O grupo imunizado com a formulação pRE4p24 apresentou diferença estatisticamente significativa do grupo imunizado com a pp24, porém não apresentou diferença com o grupo imunizado com o vetor pΔgDp24. Esses dados confirmam o papel adjuvante do componente gD

na imunogenicidade da vacina pRE4p24 em relação às respostas de anticorpos mas indica que a deleção da região interna da gD não altera o efeito adjuvante frente a este tipo de resposta imunológica.

Figura 6 – Resposta de anticorpos em animais imunizados com os vetores pRE4p24, pΔgD24, e pp24. Análise dos títulos de anticorpos IgG p24-específicos em camundongos BALB/c imunizados com três doses de 100 µg das construções vacinais pp24, pRE4p24 e pΔgDp24 pela via intramuscular. Foram utilizados seis animais por grupo. *Diferença estatisticamente significativa entre o grupo pRE4p24 ou pp24 ($P = 0,0311$).

Ao analisar a capacidade de ativação de linfócitos T CD8⁺ p24-específicos pelas três formulações vacinais testadas observamos que a vacina pRE4p24 foi mais efetiva para indução de respostas celulares, apresentando diferença estatisticamente significativa no percentual de células T CD8⁺ produtoras de INFγ (Figura 7a) e no percentual de lise celular (Figura 7b) em relação aos animais imunizados com o vetor pp24 ou pΔgDp24. Esse resultado indica que o efeito adjuvante do componente gD sobre a resposta de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específica requer a preservação da região central da gD envolvida na interação com o HVEM.

Figura 7 – Ativação de linfócitos CD8⁺ T citotóxicos em animais imunizados com os vetores pRE4p24, pΔgDp24, e pp24. A – Percentual de células produtoras de IFN-γ mediante estímulo *in vitro* com peptídeo específico de p24. B - Resposta de citotoxicidade *in vivo* medida em camundongos Balb/c imunizados com três doses de 100μg das vacinas pΔgDp24, pRE4p24 ou pp24 pela via intramuscular. Quinze dias após a imunização, os camundongos imunizados receberam pela via intravenosa uma população de esplenócitos marcada com 5 μM de CFSE e estimulados com o peptídeo imunodominante (AMQMLKETI) T CD8⁺ derivado da proteína p24 e outra população controle apenas marcada com 0,5 μM de CFSE. Após 20 horas, os esplenócitos dos animais imunizados foram processados e monitorados por citometria de fluxo. Os valores indicam o percentual de lise específica determinada em cada animal. * e ** O grupo imunizado com pRE4p24 apresentou diferença estatisticamente significativa ao compará-lo com os demais grupos vacinais (p < 0,05).

4.4 Otimização do regime vacinal com o vetor pRE4p24

Avaliamos o impacto da via de administração na ativação de linfócitos T CD8+ específicos. Para tal finalidade empregamos a via intramuscular e a via intradérmica seja por injeção com seringa ou por biobalística. Como visto na figura 8, camundongos BALB/c imunizados com o pRE4p24 pelas vias de inoculação intramuscular (i.m.), intradérmica com seringa (intradérmico - id) ou intradérmica por biobalística (*Gene gun* - gg) apresentaram níveis de anticorpos séricos IgG anti-24 diferentes (Figura 8a e 8b). Animais imunizados pela via i.m. apresentaram menores títulos de anticorpos quando comparados com os animais imunizados pelas demais vias. Percebe-se que os títulos de IgG p24-específico continuaram em ascensão passados 105 dias após a terceira dose para as três vias de inoculação testadas. As respostas de anticorpos anti-p24 não apresentaram diferenças significativas entre os grupos imunizados pela mesma via de administração com as vacinas pΔgDp24 e pRE4p24.

Figura 8 – Títulos de IgG total p24-específicos obtidos em camundongos após imunização pelas diferentes vias de administração da formulação vacinal (intramuscular, intradérmica com seringa e biobalística). Análise dos títulos de IgG p24-específico em camundongos imunizados com a formulação pRE4p24 (Figura A) e pΔgDp24 (Figura B) pelas nas vias i.m. e i.d. com seringa (Id) e biobalística (gg). Nos gráficos são apresentados resultados do *pool* de cada grupo imunizado. Os títulos de anticorpos foram monitorados ao longo de 105 dias com sangrias a cada 15 dias. As setas na figura representam as doses dadas do protocolo de imunização.

Na análise da resposta celular foi observado que os animais imunizados com o vetor pRE4p24 apresentaram um aumento no número médio de células T CD8⁺ p24-específicas produtoras de INF γ após a estimulação com o peptídeo AMQMLKETI derivado da proteína (Figura 9a), merecendo destaque as vias intramuscular (i.m.) e intradérmica (i.d.). A partir dos resultados apresentados na Figura 9a também foi possível escolher as vias de inoculação mais promissoras. Enquanto os animais imunizados pela via intradérmica por biobalística (*Gene gun* – g.g.) com o vetor pRE4p24 apresentaram menores valores de ativação de células T após estimulação específica, as vias intramuscular (i.m.) e intradérmica por seringa (i.d.) apresentaram valores maiores, porém sem diferença significativa entre as mesmas. A dispersão no número médio de células T CD8⁺ p24-específicas produtoras de INF- γ foi atribuída ao regime vacinal com apenas duas doses, sendo, portanto, insuficiente para ativação de uma resposta celular em todos os indivíduos do grupo.

Também determinamos a indução de respostas citotóxicas *in vivo* utilizando animais imunizados com as formulações vacinais pRE4 e pRE4p24 pelas vias i.m. ou i.d. (Figura 9b). Os resultados indicam que animais imunizados com o vetor pRE4p24 pelas vias i.m. e i.d. apresentaram valores maiores de lise específica em relação ao grupo imunizado pela via gg. Não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos com animais imunizados por essas duas vias de inoculação (Figura 9b).

Figura 9 – Resposta celular p24-específica em camundongos imunizados com a formulação pRE4p24 pelas vias intramuscular, intradérmica com seringa e biobalística. A - Ensaio de IFN- γ -ELISPOT com esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com duas doses dos vetores pRE4 ou pRE4p24 por três vias de inoculação (intradérmica por biobalística – g.g., intramuscular – i.m. e intradérmica por seringa – i.d.). Quinze dias após a última dose, os camundongos imunizados foram sacrificados e os esplenócitos de cada indivíduo foram processados. Um total de 5×10^6 esplenócitos de cada animal imunizado foi estimulado com peptídeo T CD8⁺ da proteína p24 (AMQMLKETI). * e ** Os grupos imunizados com pRE4p24 pelas vias i.m e i.d apresentam diferença estatisticamente significativa ao compará-los com o grupo imunizado pela via g.g. ($p < 0,05$). B - Resposta de citotoxicidade *in vivo* medida em camundongos Balb/c imunizados com duas doses da vacina pRE4 ou pRE4p24 por diferentes vias (intramuscular i.m., intradérmica i.d. e biobalística g.g.). Quinze dias após a imunização, os camundongos imunizados receberam pela via intravenosa uma população de esplenócitos marcada com 5 μ M de CFSE e estimulados com peptídeo da p24 específicos para células T CD8⁺ e outra população controle apenas marcada com 0,5 μ M de CFSE. Após 20 horas, os esplenócitos dos animais imunizados foram processados e monitorados por citometria de fluxo. Os valores indicam o percentual de lise específica determinada em cada animal.

4.5 Efeito do número de doses da vacina pRE4p24 sobre as respostas imunológicas induzidas

Dentro da perspectiva de otimizar o regime vacinal permitindo uma melhor ativação de células T CD8⁺ p24-específicas produtoras de INF γ , foi feita uma avaliação do número de doses do pRE4p24 pelas vias de administração i.m. ou i.d.. Desta forma, avaliamos as respostas celulares induzidas após a administração dos vetores pRE4 (controle) e pRE4p24 pelas vias i.m. (100 μ g/dose) e i.d. (50 μ g/dose) em um regime vacinal de 2, 3 e 4 doses com um intervalo de 15 dias entre cada dose. A análise inicial foi feita baseado nos resultados do ensaio de ELISPOT, em que foram detectadas células T produtoras de IFN- γ específicas para o peptídeo p24 (AMQMLKETI) T CD8⁺. Os grupos de animais imunizados com a construção vacinal pRE4p24, tanto pela via i.m. como i.d., apresentaram aumento no número médio de células T CD8⁺ p24-específicas produtoras de INF γ após a estimulação com o peptídeo. Ao analisar o grupo de animais imunizados pela via i.m. (Figura 10a), percebe-se um aumento no número médio de células T CD8⁺ p24-específicas produtoras de INF γ no grupo vacinado com três doses da vacina pRE4p24 e uma ativação da resposta mais homogênea em relação ao grupo vacinado com duas doses em que dois animais não responderam aos estímulos com o peptídeo. Nos animais que receberam quatro doses houve diferença significativa entre o número médio de células T CD8⁺ p24-específicas produtoras de INF γ do grupo imunizado com a vacina pRE4p24 em relação aos animais imunizados com duas doses (Figura 10a).

Figura 10 – Ativação de linfócitos T CD8^+ medida em ensaios de ELISPOT em animais imunizados com diferentes números de doses da vacina PRE4p24. Ensaio de INF_γ -ELISPOT com esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com duas, três e quatro doses da vacina pRE4 ou pRE4p24 pela via i.m. (100 $\mu\text{g}/\text{dose}$) (Figura A) e pela via intradérmica (50 $\mu\text{g}/\text{dose}$, administração com seringa) (Figura B). Quinze dias após a última dose, os camundongos imunizados foram sacrificados e os esplenócitos de cada indivíduo foram processados. Um total de 5×10^6 esplenócitos de cada animal imunizado foi estimulado com peptídeo T CD8^+ específico da p24 (AMQMLKETI). *Ao comparar os grupos pRE4p24 4 doses com o grupo que recebeu 2 doses houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Ao analisar o grupo de animais imunizados pela via i.d. foi observado um aumento no número médio de células T CD8⁺ p24-específicas produtoras de INF γ do grupo vacinado proporcional ao número de doses recebidas embora a ativação da resposta celular tenha sido mais dispersa (Figura 10b). O grupo de animais vacinados com pRE4p24 que recebeu três doses apresentou dois animais que praticamente não responderam após estímulos com o peptídeo. Os resultados indicam que mesmo com quatro doses ainda foi observada variação significativa no número total de células T CD8⁺ p24-específicas produtoras de INF γ . Foi possível concluir que o aumento do número de doses utilizando a via i.d. não contribuiu para melhorar a resposta celular p24-específica. Analisando os efeitos dose-dependentes observados na construção vacinal pRE4p24 observa-se que não houve diferença significativa entre as vias de inoculação testadas, embora a administração de três e quatro doses pela via i.m. evidencie uma resposta crescente de acordo com o número de doses (Figuras 10a).

Ainda no intuito de escolher a via de inoculação mais promissora foram feitos testes de citotoxicidade *in vivo* nos grupos experimentais. Analisando os percentuais de lise celular p24-específica obtidos para os grupos experimentais submetidos à imunização com pRE4p24 pela via i.m. foi possível demonstrar que os grupos que receberam três ou quatro doses da vacina responderam de forma mais homogênea quando comparado com o grupo que recebeu duas doses, em que um animal do grupo não apresentou lise celular p24-específica (Figura 11a). Ao analisar os percentuais de lise celular p24-específica nos grupos experimentais imunizados pela via i.d. foi observada também uma maior homogeneidade da resposta nos grupos que receberam três ou quatro doses (Figura 11b), se comparado com o grupo vacinado com duas doses.

Levando em consideração que o grupo de camundongos imunizado pela via i.m. apresentou uma resposta celular mais robusta (Figuras 10a e 10b) que o grupo imunizado pela via i.d., esta via de administração foi escolhida para os próximos experimentos. Em relação ao número de doses, adotamos o regime vacinal composto de três doses, pois os grupos experimentais submetidos à imunização com 3 e 4 doses da formulação pRE4p24 pela via i.m. não apresentaram diferença estatística quanto às respostas induzidas.

4.6 Tentativas de aumento da imunogenicidade da vacina pRE4p24

No intuito de promover uma melhor ativação de respostas celulares específicas, particularmente as respostas citotóxicas mediadas por linfócitos T CD8⁺, avaliamos duas estratégias experimentais: a coadministração de vetores que codificam citocinas e o aumento da expressão do antígeno alvo.

4.6.1 Coadministração do vetor vacinal pRE4p24 com vetores que expressam IL-2, GM-CSF e IL-12

Visando aumentar a imunogenicidade da formulação vacinal, foram testadas diferentes formulações contendo o vetor pRE4p24 e um vetor codificando uma de três citocinas (IL-2, GM-CSF e IL-12). A Figura 12a mostra que os animais imunizados com o vetor pRE4p24 coadministrado separadamente com os vetores que codificam para IL-2, GM-CSF ou IL-12 não aumentaram as respostas mediadas por linfócitos T CD8⁺ p24-específicos. No entanto, observamos que a formulação pRE4p24 combinada com pIL-2 induziu uma resposta citotóxica p24-específica maior do que aquela observada nos outros grupos vacinais, inclusive no grupo pRE4p24 (Figura 12b).

Figura 11 – Ativação de linfócitos T CD8⁺ medida em ensaios de citotoxicidade *in vivo* em animais imunizados com diferentes números de doses da vacina PRE4p24. Resposta de citotoxicidade *in vivo* medida por linfócitos T CD8⁺ em camundongos Balb/c imunizados com duas, três e quatro doses da vacina pgDp24 pela via i.m. (100 µg/dose) (Figura A) e . pela via i.d. (50 mg/dose, administração com seringa) (Figura B). Quinze dias após a imunização, os camundongos imunizados receberam pela via intravenosa uma população de esplenócitos marcada com 5 µM de CFSE e estimulados com o peptídeo imunodominante (AMQMLKETI) T CD8⁺ derivado da proteína p24 e outra população controle apenas marcada com 0,5 µM de CFSE. Após 20 horas, os esplenócitos dos animais imunizados foram processados e monitorados por citometria de fluxo. Os valores indicam o percentual de lise específica determinada em cada animal.

Figura 12 – Efeito da coadministração do pRE4p24 e plasmídeos que codificam as citocinas IL-2, IL-12 ou GM-CSF na ativação de linfócitos T CD8^+ 24-específicos. A - Ensaio de $\text{INF-}\gamma$ -ELISPOT com esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com três doses dos vetores pRE4p24; pRE4p24 + pIL-2; pRE4p24 + pIL-12; e pRE4p24 + pGM-CSF pela via intramuscular (100 μg /dose). Quinze dias após a última dose, os camundongos imunizados foram sacrificados e os esplenócitos de cada indivíduo foram processados. Um total de 5×10^6 esplenócitos de cada animal imunizado foi estimulado com peptídeo T CD8^+ específico da p24 (AMQMLKETI). B - Citotoxicidade *in vivo* medida por linfócitos T CD8^+ em camundongos Balb/c imunizados com três doses dos vetores pRE4p24; pRE4p24 + pIL-2; pRE4p24 + pIL-12; e pRE4p24 + pGM-CSF pela via intramuscular (100 μg /dose). Os valores indicam o percentual de lise específica determinada em cada animal. * O grupo imunizado com pRE4p24 + pIL-2 apresentou um percentual de lise p24-específica com diferença estatisticamente significativa do grupo pRE4p24.

4.6.2 Otimização da imunogenicidade da vacina pelo aumento da expressão do antígeno alvo

Visando aumentar a imunogenicidade da vacina bivalente pRE4p24, foi construída uma nova formulação vacinal, cujo inserto gDp24 foi subclonado em outro vetor de DNA (pVAX) que possui o promotor do citomegalovírus (pCMV). Esta construção foi denominada pgDp24 (Figura 13).

Figura 13 – Esquema representativo das formulações vacinais que codificam a proteína híbrida gDp24. Entre estas, pode-se destacar diferenças nos vetores assim como na presença do gene sintético da gD, cujo emprego de códons foi otimizado para a expressão em células eucarióticas (gDh em vermelho). PS – Região que codifica o peptídeo sinal; HVEM – Região que codifica o sítio de ligação com HVEM; p24 – sequência do gene do HIV fusionada à sequência que codifica à gD; TM – região transmembrana; RF – Região funcional. A região promotora de cada construção assim como os sítios de restrição utilizados em cada uma destas formulações estão indicados na figura.

Para a construção vacinal pgDp24, foi adotada a estratégia de amplificar por PCR o fragmento gênico gDp24 (1,9 kb), inserindo neste inserto os sítios permissivos de restrição *NheI* e *EcoRI* para clonagem no vetor pVAX. Tais produtos de PCR, após serem submetidos a uma reação de restrição, foram ligados no vetor pVAX linearizados com as mesmas enzimas. Os clones promissores pgDp24 foram sequenciados para confirmar a integridade das sequências de nucleotídeos desta construção vacinal (Figura 14).

Figura 14 – Confirmação da clonagem pgDp24, inserindo o gene híbrido gDp24 no vetor pVAX. Eletroforese em gel de agarose 0,8% evidenciando a digestão do vetor pVAX com as enzimas *NheI* e *EcoRI*. 1 – Marcador de peso molecular Ladder 1Kb (Fermentas); 2 – pgDp24 não digerido; 3 – pVAXgDp24 digerido com *NheI* e *EcoRI*, liberando o fragmento correspondente ao gene híbrido gDp24 (1,9kb) e o vetor linearizado (3,0kb).

Para a construção vacinal pgDhp24, foi realizada uma digestão com as enzimas *Apal* e *XbaI* do plasmídeo pBSKgDE7h, removendo o componente E7 e posteriormente foi clonado o fragmento *Apal*-p24-*XbaI* (Figura 15a). Por fim, os clones que albergavam o vetor pBSKgDhp24 foram digeridos com as enzimas *NheI* e *EcoRV*, liberando o fragmento de 1,9kb referente ao inserto gDhp24 (Figura 15b). O inserto gDhp24 e o vetor pVAX linearizado com as endonucleases *NheI* e *EcoRV* foram submetidos à ligação obtendo-se assim os clones de interesse (pgDhp24).

Figura 15 – Perfil de digestão do vetor pBSKgDE7h e dos clones pBSKgDhp24.

A) Eletroforese em gel de agarose 0,8%, evidenciando o vetor pBSKgDE7h. 1 e 5- Marcador de peso molecular Ladder 1Kb (Invitrogen); 2 - vetor pBSKgDE7h; e 3 - vetor pBSKgDE7h digerido com as enzimas Apal e Xbal, liberando o fragmento de 300pb referente ao componente E7h. B) Eletroforese em gel de agarose 0,8%, evidenciando que os plasmídeos dos cinco clones pBSKgDhp24 selecionados quando digeridos com as enzimas Apal e Xbal liberam o fragmento p24 (689pb) e quando digeridos com as enzimas NheI e EcoRV, liberam um fragmento de 1,9kb referente ao inserto gDhp24. 1 - Marcador de peso molecular Ladder 1Kb (Invitrogen); 2, 5, 8, 11 e 14 - Plasmídeos pBSKgDhp24 não digeridos; 3, 6, 9, 12 e 15 - Plasmídeos pBSKgDhp24 digeridos com as enzimas Apal e Xbal; 4, 7, 10, 13 e 16 - Plasmídeos pBSKgDhp24 digeridos com as enzimas NheI e EcoRV.

Células HEK-293T foram transfectadas com os plasmídeos vacinais pRE4p24, pgDp24 ou pgDhp24 e os extratos protéicos foram analisados por *Western blot* utilizando um anticorpo anti-gD específico. Como indicado na Figura 16b, proteínas reativas com anticorpos anti-gD foram detectadas nas células transfectadas com os vetores pRE4p24, pgDp24 e pgDhp24 (linhas 3, 4 e 5, respectivamente), mostrando que as duas formulações pgDp24 e pgDhp24 expressam o antígeno gDp24 em células eucarióticas.

Figura 16 – Expressão da proteína gDp24 por células HEK-293T transfectadas com diferentes vetores vacinais. (A) Gel SDS-PAGE evidenciando a fração protéica solúvel das células transfectadas com as formulações vacinais. (B) Detecção de proteínas reativas frente ao pool de anticorpos policlonais anti-gD específico. Amostras: 1 e 6 – Proteínas recombinantes p24 (~20kDa) e gD (~50kDa), ambas purificadas no nosso laboratório; 2 – células transfectadas com o vetor pVAX (controle); 3 – células transfectadas com o vetor pRE4p24; 4 – células transfectadas com o vetor pgDp24; 5 – células transfectadas com o vetor pgDhp24; 7 – Prestained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific).

Animais imunizados com as formulações vacinais pRE4p24, pgDp24 e pgDhp24 apresentaram maiores títulos de anticorpos anti-p24 quando comparados com os animais imunizados com a formulação vacinal pp24 (Figura 17).

Figura 17 – Análise dos títulos de IgG total obtidos com as novas formulações pgDp24 e pgDhp24. Títulos de anticorpos IgG p24-específicos em amostras de soro recolhidas quinze dias após o regime vacinal. Camundongos BALB/c foram imunizados com as construções vacinais pRE4p24 ou pgDp24 pela via de inoculação i.m. após três doses das respectivas vacinas. Foram utilizados oito animais por grupo.

Visando escolher qual a formulação vacinal seria mais imunogênica para a ativação de linfócitos T CD8⁺ p24-específico foi testado um regime vacinal realizado um protocolo de imunização com as vacinas pRE4p24, pgDp24 ou pgDhp24 pela via i.m. (100 µg/dose), adotando um regime vacinal de três doses com um intervalo de 15 dias entre cada dose. Foram detectadas pelo ensaio de ELISPOT células T produtoras de IFN-γ específicas para o peptídeo (AMQMLKETI) T CD8⁺ específico derivado da proteína p24. Não houve diferença significativa entre os grupos imunizados com pRE4p24, pgDp24 e pgDhp24 (Figura 18a). Também foram feitos testes de citotoxicidade *in vivo* nos animais imunizados com os vetores pRE4p24, pgDp24 ou pgDhp24. Analisando os percentuais de lise celular p24-específica obtidos para os grupos experimentais foi possível verificar que os animais imunizados com o vetor pgDp24 respondem de forma mais homogênea para o efeito citotóxico *in vivo* (Figura 18b). Além disto, os percentuais de lise celular p24-específica no grupo imunizado com a formulação pgDp24 foi o dobro dos percentuais observados no grupo imunizado com pRE4p24, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos. Os animais imunizados com a formulação vacinal pgDhp24, cuja gD é otimizada para expressão em eucariotos, não apresentou diferença significativa no efeito citotóxico p24-específico quando comparado com o grupo imunizado com a formulação pRE4p24. Assim, baseado nos resultados de lise celular p24 específica, a formulação vacinal baseada no vetor pVAX (pgDp24) promoveu um incremento na resposta celular p24-específica sendo, portanto, a construção mais imunogênica.

Figura 18 – Resposta celular p24-específica obtidos em camundongos imunizados com as formulações vacinais pgDp24 e pgDhp24. A - Resposta de linfócitos T CD8^+ p24-específica em camundongos imunizados com as diferentes vacinas de DNA pRE4p24 e pgDp24. Ensaio de $\text{INF-}\gamma$ -ELISPOT com esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com os vetores pRE4p24 ou pgDp24 pela via i.m. (100 $\mu\text{g/dose}$) com um regime vacinal de 3 doses. B - Citotoxicidade in vivo medida por linfócitos T CD8^+ em camundongos Balb/c imunizados com três doses dos vetores pRE4p24 ou pgDp24 pela via intramuscular (100 $\mu\text{g/dose}$). Os valores indicam o percentual de lise específica determinada em cada animal.

4.6.3 Coadministração dos vetores *pgDp24* e *pIL-2*

Visando aumentar a imunogenicidade da construção vacinal, foi testado uma nova formulação em que o vetor *pgDp24* foi coadministrado com o plasmídeo que codifica a citocina IL-2 (*pIL-2*), reunindo nesse protocolo de imunização as duas formulações mais promissoras. O grupo experimental imunizado com *pgDp24* + *pIL-2* apresentou em média um maior número de células T CD8⁺ p24-específicas produtoras e secretoras de INF- γ com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo imunizado com *pRE4p24*, mas não com o grupo imunizado com o vetor *pgDp24* (Figura 19a).

Ao analisar os resultados de citotoxicidade *in vivo* nos animais imunizados com o *pgDp24* ou *pgDp24* + *pIL-2*, não foi observada diferenças significativa entre estes grupos (Figura 19b). Visto que não houve um incremento significativo nas respostas celulares p24-específica obtidas pelas formulações *pgDp24* e *pgDp24* combinadas com *pIL-2*, escolhemos utilizar a formulação baseada apenas no vetor *pgDp24* nas próximas etapas do trabalho.

Figura 19 – Resposta de imunidade celular obtidas em camundongos imunizados com a formulação pgDp24 e pIL-2. A - Ensaio de IFN- γ -ELISPOT com esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com três doses dos vetores pRE4p24; pgDp24; e pgDp24 + pIL-2 pela via intramuscular (100 μ g/dose). * Ao comparar os grupos pRE4p24 + pIL-2 com o grupo pRE4p24 houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0001$). B - Citotoxicidade in vivo medida por linfócitos T CD8+ em camundongos Balb/c imunizados com três doses dos vetores pRE4p24; pgDp24; e pgDp24 + pIL-2 pela via intramuscular (100 μ g/dose). Os valores indicam o percentual de lise específica determinada em cada animal.

4.7 Avaliação da funcionalidade da vacina em modelo tumoral

Visando avaliar a funcionalidade da resposta citotóxica induzida nos animais imunizados com a vacina desenvolvemos um modelo experimental baseado na linhagem tumoral 4T1 capaz de expressar a proteína p24. Antes de transfectar as células 4T1 com o vetor pcDNA3::p24 foi preciso determinar se as células 4T1 eram capazes de gerar tumores subcutâneos em camundongos Balb/c, bem como a concentração de células a ser inoculada nos animais para que tumores palpáveis fossem observados após 15 dias. Assim, foi realizado um teste piloto com três grupos de camundongos onde foram inoculadas quatro diferentes quantidades de células 4T1 (1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 e 1×10^6). Em todas as concentrações foram observadas a formação de tumores palpáveis. O grupo de animais que recebeu 10^4 células desenvolveu tumores em 15 dias e tal condição foi empregada nos experimentos subsequentes. A linhagem 4T1 também se mostrou sensível ao antibiótico G418, como demonstrado pelo acompanhamento do crescimento celular e dosagem de LDH no meio de cultura (Figura 20). Nos ensaios subsequentes de seleção de clones transfectados com o vetor pcDNA3::p24 foi utilizada a concentração de 400 $\mu\text{g/ml}$ de G418. Assim foi determinada a quantidade de células a serem transplantadas durante o desafio e a concentração de G418 na seleção.

Figura 20 - Teste de sensibilidade da linhagem 4T1 a diferentes concentrações do antibiótico G418. A - Células 4T1 incubadas com G418 por 48 horas. B - Células 4T1 incubadas com G418 por 72 horas. Um total de 5×10^5 células foram plaqueadas por poço e passado o período de incubação, tais células foram fixadas com 4% de paraformaldeído e coradas com cristal de violeta. C - Avaliação da atividade da Lactato Desidrogenase nos sobrenadantes das células 4T1 incubadas com diferentes concentrações do antibiótico G418. Quanto maior a atividade da LDH, maior é o efeito citotóxico provocado pelo antibiótico.

Na figura 21 é evidenciado as etapas da construção pcDNA3::p24, desde da preparação do vetor pcDNA3 linearizado e do inserto p24 até a confirmação de clones obtidos que liberaram o fragmento de 700pb correspondente ao gene da p24 após serem digeridos com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI. O vetor pcDNA3::p24 linearizado com enzima *Bgl*II foi utilizado para transfectar a linhagem 4T1. As células foram cultivadas na presença do antibiótico G418, selecionando as células FC-24 cuja transfecção foi bem sucedida. A proteína p24 expressa nestas células foi detectada por imunofluorescência, onde avaliamos células permeabilizadas e não permeabilizadas, permitindo confirmar que as células FC-24 expressam a proteína p24 (Figura 22).

Figura 21 - Clonagem do gene que codifica a proteína p24 do HIV-1 no vetor pcDNA3. A) Eletroforese em gel de agarose 0,8%, evidenciando o vetor linearizado pcDNA3 (5,5kb) e o inserto *Xba*I-p24-*Bam*HI (700pb), ambos digeridos com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI. Tais produtos foram purificados e utilizados na reação de ligação com T4 DNA ligase; B) Confirmação dos clones pcDNA3::p24. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, evidenciando a digestão dos clones pcDNA3::p24 com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI.

Figura 22 – Expressão da p24 em células 4T1 transfectadas com o vetor pCDNA3::p24. As células transfectadas foram fixadas com paraformaldeído, algumas permeabilizadas e tratadas com anticorpos p24-específicos e anticorpos anti-IgG de coelho conjugados à Texas-Red.

Antes de utilizar a célula tumoral FC-24 (4T1::p24r) como correlato de proteção para a formulação vacinal pgDp24, foi feita uma seleção clonal da célula FC-24, avaliamos a estabilidade da expressão da proteína p24 nos clones das células tumorais FC-24 durante 15 repiques na ausência do antibiótico G418. Na figura 23, mostramos que os clones das células FC-24, no último repique da avaliação de estabilidade, estavam expressando a proteína p24 cuja detecção foi realizada por imunofluorescência (Figura 23). Isso sugere que a proteína p24 está sendo expressa de forma estável e que o gene da p24 foi integrado no genoma da célula FC-24

Figura 23 – Expressão da proteína p24 após a seleção clonal da linhagem FC-24. Os diferentes clones da linhagem FC24 foram cultivados por dois meses na ausência do antibiótico G418. Posteriormente, as células FC24 foram fixadas com paraformaldeído e permeabilizadas com saponina e tratadas com anticorpos p24-específicos e anticorpos anti-IgG de mouse conjugados à FITC. A imagem em verde mostra a detecção da proteína p24 expressa pela célula FC-24 e a imagem em cinza mostra as células FC-24 visualizadas em luz branca.

Camundongos Balb/C foram imunizados com três doses da vacina pgDp24 (i.m.) e quinze dias depois da última dose, foram desafiados pela via subcutânea com 10^4 células da linhagem tumoral FC-24. Embora não tinha sido observada uma proteção, pois todos os camundongos desenvolveram tumor, observou-se um retardo no crescimento tumoral dos animais imunizados com a formulação pgDp24 (Figura 24).

Figura 24 – Volume tumoral dos camundongos imunizados com três doses de 100 µg de pgDp24 ou pgD (pVAXgD) pela via intramuscular e desafiados com 1x10⁴ células tumorais FC24 por animal. Volume tumoral (mm³) da célula FC-24 foi medido a cada três dias durante 40 dias após o desafio.

A ativação de células T CD8⁺ pode ser associada à produção de IFN-γ por estas células. A detecção da capacidade de ativação de células T CD8⁺ pela formulação vacinal pgDp24 no modelo de desafio de proteção profilático foi confirmada por marcação intracelular de IFN-γ após estímulo *in vitro* com peptídeo de p24 MHC-I restrito de células do sangue dos camundongos imunizados e desafiados (Figura 25). Os animais que retardaram o desenvolvimento do tumor foram os mesmos que apresentaram significativos percentuais de células produtoras de IFN-γ mediante estímulo *in vitro* com peptídeo específico de p24 (Figura 25). Assim, concluímos que a formulação pgDp24 é capaz de gerar uma resposta citotóxica p24 específica nos camundongos imunizados, conferindo uma proteção parcial contra o modelo de desafio tumoral FC-24.

Figura 25 – Análise do percentual de células produtoras de IFN- γ p24-específicas em camundongos imunizados e desafiados com a célula FC24. A – Percentual de células produtoras de IFN- γ mediante estímulo *in vitro* com peptídeo específico de p24. B – Frequência de células T CD8+ p24-específicas em camundongos imunizados detectados duas semanas após o desafios com as células 4T1. Camundongos Balb/C foram imunizados com três doses de 100 μ g de pgDp24 ou pgD (pVAXgD) pela via intramuscular e foram desafiados com 1×10^4 células tumorais FC24 por animal. A análise de produção de IFN- γ foi feita 14 dias após o desafio em células de sangue por citometria de fluxo.

4.8 Avaliação da funcionalidade da vacina frente a desafio com HSV-1

Avaliamos também as respostas imunológicas geradas nos animais imunizados com a vacina pgDp24 em relação ao componente gD codificado. Na Figura 26 mostramos os títulos de anticorpos séricos (IgG) contra a proteína gD nos animais imunizados com as vacinas pgD e pgDp24. Pode-se observar que não houve diferenças significativas entre os títulos obtidos.

Figura 26 – Análise dos títulos de IgG total gD-específico obtidos com as formulações vacinais. Títulos de anticorpos IgG gD-específicos em amostras de soro recolhidas quinze dias após o regime vacinal. Camundongos BALB/c foram imunizados com as construções vacinais pgD ou pgDp24 pela via de inoculação i.m. após três doses das respectivas vacinas.

Para a avaliação da funcionalidade da resposta anti-gD induzida nos animais imunizados com vacina pgDp24, camundongos Balb/C vacinados foram desafiados com uma linhagem letal EK de HSV-1. Os animais foram monitorados por 15 dias após o desafio. A Figura 27 mostra a curva de sobrevivência após 14 dias do desafio. O grupo não imunizado apresentou 40% de sobrevivência ao desafio enquanto que os animais imunizados com os pgD e pgDp24 apresentaram 100% de proteção. Como correlato de morbidade dos animais desafiados, acompanhamos a perda de peso dos animais desafiados (Figura 28). A formulação gDp24 mostra-se eficiente ao gerar uma resposta protetora nos camundongos imunizados que sobreviveram ao desafio com o vírus HSV-1.

Figura 27 – Efeito de proteção profilática antiviral dos vetores vacinais pgD e pgDp24 em animais desafiados com uma cepa letal de HSV-1. Camundongos Balb/C desafiados com 5×10^4 UFP de HSV-1 (cepa EK) pela via intranasal, 14 dias após receberam os plasmídeos vacinais foram monitorados por 15 dias.

Figura 28 – Percentual de perda de peso dos camundongos Balb/C desafiados com a cepa viral EK uma (Figura A) e duas semanas (Figura B) após o desafio. Na Figura A foi observada uma perda significativa de peso em todos os grupos. * O grupo PBS nesta figura apresentou diferença significativa nos percentuais de peso quando comparados com os demais grupos.

5 DISCUSSÃO

Na presente tese de doutorado, apresentamos a evolução de um conceito no desenvolvimento de uma estratégia vacinal utilizando um vetor que codifica a proteína p24 do HIV-1 geneticamente fusionadas à gD do HSV-1. Os resultados apresentados englobam a concepção da formulação vacinal, prova de conceito desta plataforma vacinal, a avaliação das propriedades imunológicas em modelo murino e o uso de diferentes estratégias visando o aumento da imunogenicidade da formulação vacinal.

Neste trabalho foi escolhido o antígeno p24 como prova de conceito para avaliar as propriedades imunomoduladoras advindas da expressão de proteínas heterólogas geneticamente fusionadas à proteína gD, que possui a capacidade de incrementar sobretudo a resposta mediada por células T CD8⁺ antígeno-específicas (DINIZ et al., 2013; LÁSARO et al., 2008). O uso do antígeno p24 é pertinente nessa prova de conceito inicial, nos permitindo inclusive ampliar o repertório de genes do HIV-1 em futuras construções. O antígeno p24, além de possuir um alto grau de conservação, possui importantes epítomos de reconhecimento de células B e células T (CD4⁺ e CD8⁺) da proteína Gag, fazendo com que seja utilizado em várias formulações vacinais anti-HIV, inclusive em vacinas de DNA (KULKARNI et al., 2013; LEWIS et al., 2014). O gene *gag*, particularmente a região correspondente à proteína p24, é amplamente utilizado como antígeno em diferentes estratégias vacinais promissoras contra o HIV (IDOYAGA et al., 2011; TRUMPFHELLER et al., 2006). Evidências sugerem que células T CD8⁺ gag-específicas possuem um papel essencial para conter as infecções dos vírus SIV/HIV, conferindo uma resposta celular potente e duradoura (ALTFELD et al., 2011; KIEPIELA et al., 2007; LIU et al., 2009). Assim, foi construído o vetor vacinal que codifica o gene da p24 do HIV-1 geneticamente fusionada à gD de HSV-1.

As glicoproteínas do HSV são expressas na membrana plasmática de células infectadas, agindo como principal estímulo antigênico para a resposta imune celular e humoral (WATANABE et al., 2003; WATSON et al., 1982). A sequência da gD utilizada em nossas formulações manteve íntegra a região do peptídeo sinal e a região transmembrana dessa proteína, assim é esperado que as células eucarióticas transfectadas pelos vetores vacinais, além de expressarem as proteínas híbridas,

apresentem essas proteínas ancoradas na membrana citoplasmática (LASARO et al., 2005; LASARO et al., 2008). Ao transfectar os vetores vacinais pRE4, pRE4p24 e pΔgDp24 em células eucarióticas não permeabilizadas e fazer as marcações com anticorpos específicos, observamos uma marcação mais intensa na superfície das células HEK293T transfectadas. Esses achados confirmam que as proteínas recombinantes codificadas por esses vetores fiquem ancoradas na membrana das células transfectadas. Tal ancoramento na membrana das células transfectadas expõe a proteína p24 a diferentes células do sistema imune, como linfócitos e APCs (CHEUNG et al., 2009). É pertinente destacar que esta localização celular permite a interação com receptores celulares da gD, como HVEM e nectina-1, favorecendo a apresentação mais efetiva de peptídeos associados a moléculas de MHC tipo I ou tipo II para linfócitos B e T e APCs (STILES et al., 2010; LASARO et al., 2008; CHEUNG et al., 2005).

A inserção de sequências heterólogas na região C-terminal da gD é importante para potencializar a imunogenicidade do antígeno, pois essa região inserida causa alterações conformacionais permitindo uma ligação mais eficiente da gD com o HVEM (ALVES et al., 1999; DiMENNA et al., 2010; DINIZ et al., 2013; LASARO et al., 2008; LASARO et al., 2005; SANTANA et al., 2013). Esse papel adjuvante da gD quando fusionada a antígenos está associada à ligação desta glicoproteína ao receptor HVEM. No presente trabalho, incluímos como controle, além do vetor pp24 que codifica apenas a proteína p24, o vetor pΔgDp24 que codifica a proteína gD com uma porção central deletada, abrangendo o sítio de interação com o HVEM, geneticamente fusionada à proteína p24, assim foi possível avaliar o efeito adjuvante promovido pela proteína gD nas respostas imunológicas induzidas pelas vacinas de DNA. Ao analisar a capacidade de ativação de linfócitos T CD8⁺ p24-específicos pelas três formulações vacinais testadas (pp24, pRE4p24 e pΔgDp24) observamos que a vacina pRE4p24 foi mais efetiva na indução de respostas celulares mediada por linfócitos T CD8⁺, comprovando que o componente gD exerce efeitos imunomoduladores sobre as respostas celulares antígeno-específica e, sobretudo, que a região da gD envolvida na interação com o HVEM está relacionada com tais efeitos imunomoduladores. A formulação pΔgDp24, cuja porção central da gD estava deletada, comportou-se tal qual a formulação pp24, não apresentando o efeito imunomodulador para respostas mediadas para linfócitos T

CD8⁺. Esses resultados corroboram com achados de análise estrutural da interação entre gD e HVEM (CHEUNG et al., 2005; KOJIMA et al., 2011).

Na análise dos títulos de anticorpos IgG total p24-específico foi observado que os animais imunizados com a formulação pRE4p24 foram capazes de desencadear uma resposta humoral maior do que os animais imunizados com a formulação controle pp24. É pertinente destacar que os títulos de anticorpos IgG total p24-específico gerados pela formulação pΔgDp24 não apresentaram diferença significativa com os títulos gerados pela formulação pRE4p24. Esses resultados sugerem que a gD possa possuir outras regiões, além do sítio de interação com o HVEM, com capacidade de influenciar a geração de anticorpos. O fato das duas formulações codificarem proteínas que ficam ancoradas na membrana citoplasmática das células transfectadas, poderia privilegiar a apresentação dos antígenos fusionados na gD, contribuindo também para incrementar a resposta humoral. Tal resultado sugere que outros mecanismos ainda não elucidados, além da interação gD-HVEM e HVEM-BTLA, possam estar interferindo na ativação de linfócitos B.

As vacinas de DNA são capazes de expressar a proteína codificada pelos vetores plasmidiais, ativando respostas humorais e celulares antígeno-específicas (KHAN, 2009; ROBINSON & PERTMER, 2000). As vacinas de DNA convencionais, embora sejam atraentes para direcionar o antígeno de interesse para diferentes tipos de células e tecidos, tendem a gerar baixos níveis de respostas imunológicas celulares e humorais (KIM et al., 2010; CAI et al., 2009; BAROUCH, 2008). Assim, várias abordagens têm sido exploradas para melhorar a imunogenicidade e a qualidade das respostas geradas por vacinas de DNA, incluindo o uso de diferentes vias de inoculação, a otimização da sequência que codifica o antígeno visando aumentar a sua expressão, a utilização de novos mecanismos de entrega, a co-administração com adjuvante e a estratégia *prime-boost* (GARMORY et al., 2003; IVORY & CHADEE, 2004; LUCKAY et al., 2007; RADCLIFFE et al., 2006). Assim, no decorrer desse trabalho fizemos várias tentativas de aumentar a imunogenicidade do vetor vacinal pRE4p24, como a otimização do protocolo de vacinação (número de doses e via de administração); mudança do vetor vacinal, otimização de códon e co-administração com vetores que codificam citocinas.

A via de administração da vacina de DNA pode contribuir para o aumento da imunogenicidade, fazendo com que a vacina seja mais eficaz na ativação de células T CD8⁺ ao utilizar determinado método de entrega (FULLER et al., 2006; LU et al., 2008). É de fundamental importância realizar testes iniciais para otimizar o regime vacinal, incluindo a escolha da melhor via de administração. São várias as estratégias disponíveis, tais como via parenteral com seringa pela via intramuscular, intradérmica e subcutânea, *gene gun* (biobalística) e eletroporação (KUTZLER; WEINER, 2008). No presente trabalho, observamos que a via de administração por *gene gun* privilegiou um aumento na resposta humoral p24-específica, enquanto que as vias intramuscular e intradérmica privilegiaram uma resposta mediada por células T CD8⁺ p24-específica. Escolhemos a via intramuscular, sobretudo, pelos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*. É pertinente destacar que tecidos musculares possuem poucas células APC, que terão um importante papel na apresentação dos antígenos codificados por vacinas de DNA (BLAZEVIC et al., 2006; KUTZLER; WEINER, 2008; MANN et al., 2014). A via intramuscular também foi utilizada em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa (DINIZ et al., 2010; SANTANA et al., 2013).

O vetor de expressão pRE4, que codifica a proteína gD e possui o promotor RSV, foi substituído pelo vetor pVAX. O vetor pVAX atende às regulamentações de instituições governamentais, como o FDA, e possui o promotor do CMV, que contribui para aumentar a expressão dos genes clonados. Vários genes do HIV-1 (*gag*, *vif* e *nef*) já foram clonados no vetor pVAX e utilizados como vacina de DNA, sendo capazes de induzir fortes respostas celulares e humorais HIV-específicas em camundongos Balb/c (RIBEIRO et al., 2010). O uso deste promotor contribuiu para aumentar o nível de expressão do gene gDp24 codificado pelo vetor e, por conseguinte, promover a expressão de uma maior quantidade de proteína híbrida e, consequentemente, aumentar a ativação de linfócitos T CD8⁺ p24-específico.

A formulação vacinal pgDp24 foi capaz de conferir maior resposta citotóxica *in vivo* quando comparado com as demais formulações testadas. A ativação de células T CD8⁺ citotóxicas representa um importante correlato de proteção para as vacinas voltadas para o controle de infecções crônicas, como é o caso do HIV e HSV (APPAY et al., 2008; BUCKHEIT et al., 2012; ORR et al., 2007). Os resultados de lise celular p24-específica obtidos estão de acordo com os dados da literatura

(SANTANA et al., 2013), demonstrando que a vacina de DNA pgDp24 melhora a indução de respostas de células T CD8⁺ citotóxicas p24-específicas, sendo esse um importante correlato de proteção dessa formulação vacinal.

Um dos grandes entraves no desenvolvimento de estratégias vacinais contra o HIV é a falta de bons correlatos de proteção para avaliar o efeito da vacina em desenvolvimento, sobretudo quando testada em animais de pequeno porte. Durante o presente trabalho buscamos estabelecer um novo modelo experimental baseado em células tumorais capazes de expressar a proteína p24 do HIV-1, em semelhança ao modelo de desafio baseado em células TC-1, capazes de expressar as oncoproteínas E7 e E6 do HPV-16, que também foi utilizado para avaliar a funcionalidade da resposta celular induzida pela plataforma vacinal com a gD (DINIZ et al., 2013; SANTANA et al., 2013). É pertinente destacar que várias formulações vacinais que utilizaram a plataforma vacinal da gD realizaram o desafio com as células tumorais TC-1. Assim, visando avaliar a funcionalidade da resposta imunológica contra a p24 do HIV em modelo murino, foi estabelecida a linhagem tumoral FC-24 que possui o gene que codifica a proteína p24 do HIV-1 integrado ao seu genoma. As células FC-24 foram transplantadas em camundongos Balb/c imunizados com a pgDp24 e observou-se um retardo no crescimento tumoral quando comparado com os demais grupos. É pertinente destacar que a linhagem tumoral 4T1 de carcinoma de mama de camundongos Balb/c, utilizada nesse modelo de desafio, é bastante agressiva (ASLAKSON; MILLER, 1992), podendo justificar o motivo pelo qual não foi observado um efeito anti-tumoral mais expressivo. No entanto, o modelo de desafio desenvolvido durante esta tese pode representar uma ferramenta útil para futuros estudos voltados para avaliação da funcionalidade de respostas celulares p24-específicas.

Também foi explorado se a formulação pgDp24 seria capaz de gerar uma resposta protetora contra o Herpes vírus. Nós avaliamos a produção de anticorpos anti-gD nos camundongos imunizados com pgDp24 e pgD e não foi identificado diferença significativa entre os grupos. Também avaliamos a funcionalidade da resposta anti-gD induzida nos animais imunizados com vacina pgDp24 e desafiados com a linhagem letal EK de HSV-1, verificando que tal formulação apresentou uma proteção de 100%, mesmo percentual observado no grupo imunizado com pgD. Tal resultado observado está de acordo com a literatura

(SANTANA et al., 2013). Uma vacina efetiva contra o HSV deve desencadear uma resposta humoral e celular (BELSHE et al., 2013). Esses resultados sugerem que além potencializar a resposta imunológica de antígenos fusionados à gD, tal plataforma vacinal ainda gera uma resposta protetora anti-HSV.

6 CONCLUSÕES

- A gD geneticamente fusionada à proteína p24 do HIV-1 promoveu um aumento significativo na ativação de linfócitos T CD8⁺ p24-específico;
- Foram definidas as condições ótimas para a indução de respostas citotóxicas específicas envolvendo número de doses e via de administração;
- Novas construções foram feitas no vetor pVAX, permitindo aumentos adicionais na indução de células T CD8⁺ p24-específicas produtoras de INF γ e maiores percentuais de lise celular p24-específica;
- Foi descrito a construção de uma nova linhagem celular FC-24 empregada como modelo para avaliarmos a funcionalidade das respostas citotóxicas p24-específicas geradas nos animais imunizados;
- A formulação gDp24 mostra-se eficiente ao gerar uma resposta protetora nos camundongos imunizados que sobreviveram ao desafio com o vírus HSV-1;
- Assim, o uso de vacinas de DNA baseadas na expressão de antígenos geneticamente fusionados à gD é uma promissora plataforma para a montagem de diferentes formulações vacinas contra infecções virais e doenças degenerativas que exijam uma ativação eficiente de respostas mediadas por células T CD8⁺.

REFERÊNCIAS¹

AKHTAR, J.; SHUKLA, D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. **FEBS Journal**, v. 276, n. 24, p. 7228-7236, 2009.

ALLEN, T. M. et al. Selective escape from CD8+ T cell responses represents a major driving force of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) sequence diversity and reveals constraints on HIV-1 evolution. **Journal of Virology**, v. 79, p. 13239–13249, 2005.

ALTFELD, M.; GOULDER, P. J. The STEP study provides a hint that vaccine induction of the right CD8+ T cell responses can facilitate immune control of HIV. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 6, p. 753–755, 2011.

ALVES, A. M. B. et al. DNA immunization against the CFA/I fimbriae of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). **Vaccine**, v. 19, p. 788-795, 2001.

_____. Antibody response in mice immunized with a plasmid DNA encoding the colonization factor antigen I of enterotoxigenic. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 23, p. 321-330, 1999.

_____. Immunoglobulin G subclass response in mice immunized with plasmid DNA encoding the CFA/I fimbriae of enterotoxigenic Escherichia coli. **Immunology Letters**, v. 62, p. 145-149, 1998.

APPAY, V. et al. CD8(+) T cell efficacy in vaccination and disease. **Nature Medicine**, v. 14, p. 623–628, 2008.

APPAY, V. 25 years of HIV research! ... and what about a vaccine? **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 8, p. 1999-2003, 2009.

ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Herpes simplex virus type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 37, p. 107–121, 2008.

ASLAKSON, C. J.; MILLER, F. R. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. **Cancer Research**, v. 52, n. 6, p. 1399-1405, 1992.

BANSAL, A. et al. CD8 T cell response and evolutionary pressure to HIV-1 cryptic epitopes derived from antisense transcription. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 1, p. 51-59, 2010.

BAROUCH D. H. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. **Nature**, v. 455, p. 613–619, 2008.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BELSHE, R. B. et al. Correlate of immune protection against HSV-1 genital disease in vaccinated women. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 6, p. 828-836, 2014.

BENNETT, M. S. et al. Cross-clade detection of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes does not reflect cross-clade antiviral activity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, p. 390-397, 2008.

BERNSTEIN, D. Glycoprotein D adjuvant herpes simplex virus vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 4, n. 5, p. 615-627, 2005.

BLAZEVIC, V. et al. Induction of human immunodeficiency virus type-1-specific immunity with a novel gene transport unit (GTU)-MultiHIV DNA vaccine. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 22, p. 667-677, 2006.

BOLESTA, E. et al. Clustered epitopes within the Gag-Pol fusion protein DNA vaccine enhance immune responses and protection against challenge with recombinant vaccinia viruses expressing HIV-1 Gag and Pol antigens. **Virology**, v. 332, p. 467-479, 2005.

BORROW, P. et al. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. **Journal of Virology**, v. 68, n. 9, p. 6103-6110, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico - Aids e DST**, v. 2, n. 1, p. 5-10, 2013. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55559/_p_boletim_2013_internet_pdf_p__51315.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2014.

BUCKHEIT, R. W. III et al. Inhibitory Potential of Subpopulations of CD8(+) T Cells in HIV-1-Infected Elite Suppressors. **Journal of Virology**, v. 86, p. 13679-13688, 2012.

BURGER, S.; POLES, M. A. Natural history and pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **Seminars in Liver Disease**, v. 23, n. 2, p. 115-124, 2003.

BYARS, N. E. et al. Vaccinating guinea pigs with recombinant glycoprotein D of HSV in an efficacious adjuvant formulation elicits protection against vaginal infection. **Vaccine**, v. 12, n. 3, p. 200-209, 1994.

CAI, Y. et al. DNA vaccine manufacture: scale and quality. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, p. 1277-1291, 2009.

CAI, G. et al. CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. **Nature Immunology**, v. 9, p. 176-185, 2008.

CAI, G.; FREEMAN, G. J. The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. **Immunological Reviews**, v. 229, p. 244-258, 2009.

CASANOVA, G. et al. A double-blind study of the efficacy and safety of the ICP10deltaPK vaccine against recurrent genital HSV-2 infections. **Cutis**, v. 70, p. 235-239, 2002.

CHEN, Z. et al. Design, construction, and characterization of a multigenic modified vaccinia Ankara candidate vaccine against human immunodeficiency virus type 1 subtype C/B'. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 47, n. 4, p. 412–421, 2008.

CHEUNG, T. et al. T cell intrinsic heterodimeric complexes between HVEM and BTLA determine receptivity to the surrounding microenvironment. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 11, p. 7286-7296, 2009.

CHEUNG, T. C. et al. Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 37, p. 13218-13223, 2005.

CHEUNG, Y. K. et al. Plasmid encoding papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA constructed with codon optimization improved the immunogenicity against HPV infection. **Vaccine**, v. 23, p. 629–638, 2004.

COHEN, G. H. et al. Expression of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D deletion mutants in mammalian cells. **Journal of Virology**, v. 62, n. 6, p.1932-1940, 1988.

CONNOLLY, S. A. et al. Structure-based analysis of the herpes simplex virus glycoprotein D binding site present on herpesvirus entry mediator HveA (HVEM). **Journal of Virology**, v. 76, n. 21, p. 10894-10904, 2002.

COREY, L. et al. Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection. **Journal of the American Medical Association**, v. 28294, p. 331-340, 1999.

CUNNINGHAM, A. L. et al. The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. **Journal of Infectious Diseases**, v. 194, p. S11–S18, 2006.

DAVIS, H. L.; McCLUSKIE, M. J. DNA vaccines for viral diseases. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 1, p. 7-21, 1999.

DAVISON, A. J. et al. The order Herpesvirales. **Archives of Virology**, v. 154, p. 171–177, 2009.

DIMENNA, L. et al. Augmentation of primary influenza A virus-specific CD8+ T cell responses in aged mice through blockade of an immunoinhibitory pathway. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5475-5484, 2010.

DINIZ, M. O. et al. Enhanced therapeutic effects conferred by an experimental DNA vaccine targeting human papillomavirus-induced tumors. **Human Gene Therapy**, v. 24, p. 861-870, 2013.

_____. Immune Responses and Therapeutic Antitumor Effects of an Experimental DNA Vaccine Encoding Human Papillomavirus Type 16 Oncoproteins Genetically Fused to Herpesvirus Glycoprotein D. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, p. 1576-1583, 2010.

DINIZ, Mariana de Oliveira; FERREIRA, Luís Carlos de Souza. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. *Estudos Avançados*, v. 24, n. 70, 2010. disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142010000300003&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 11 Jul. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142010000300003>.

DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. S. Enhanced anti-tumor effect of a gene gun-delivered DNA vaccine encoding the human papillomavirus type 16 oncoproteins genetically fused to the herpes simplex virus glycoprotein D. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 421-427, 2011.

DISIS, M. L. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines. **Blood**, v. 88, p. 202-210, 1996.

EXCLER, J. L. AIDS vaccine development: perspectives, challenges & hopes. **Indian Journal of Medical Research**, v. 121, n. 4, p. 568-581, 2005.

FERRARI, G. et al. Relationship between functional profile of HIV-1 specific CD8 T cells and epitope variability with the selection of escape mutants in acute HIV-1 infection. **PLOS Pathogen**, v. 7, n. 2, p. e1001273, 2011.

FIORETTI, D. et al. DNA vaccines: developing new strategies against cancer. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010. doi: 10.1155/2010/174378.

FISCHER, W. et al. Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. **Nature Medicine**, v. 13, p. 100-106, 2007.

FITZGERALD, D. W. et al. An Ad5-vectored HIV-1 vaccine elicits cell-mediated immunity but does not affect disease progression in HIV-1-infected male subjects: results from a randomized placebo-controlled trial (the Step study). **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 6, p. 765-772, 2011.

FULLER, D. H. et al. Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. **Methods**, v. 40, p. 86-97, 2006.

FULLER, A. O.; LEE, W. C. Herpes simplex virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration. **Journal of Virology**, v. 66, n. 8, p. 5002-5012, 1992.

GAHÉRY-SÉGARD, H. et al. Long-term specific immune responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine: characterization of CD8+-T-cell epitopes recognized. **Journal of Virology**, v. 77, n. 20, p. 11220-11231, 2003.

GARMORY, H. S. et al. DNA vaccines: improving expression of antigens. **Genetic Vaccines and Therapy**, v. 1, p. 2, 2003.

GASCHEN, B. et al. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. **Science**, v. 296, p. 2354–2360, 2002.

GOLDE, W. T. et al. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. **Laboratory Animals**, v. 34, n. 9, p. 39-43, 2005

GONZALEZ, L. C. et al. A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 4, p. 1116-1121, 2005.

GRAY, G. E. et al. Recombinant adenovirus type 5 HIV gag/pol/nef vaccine in South Africa: unblinded, long-term follow-up of the phase 2b HVTN 503/Phambili study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14 n. 5, p. 388-396, 2014.

GUDMUNDSDOTTER, L. et al. Cross-clade immune responses to Gag p24 in patients infected with different HIV-1 subtypes and correlation with HLA class I and II alleles. **Vaccine**, v. 26, n. 40, p. 5182-5187, 2008.

HASSETT, D. E.; WHITTON, J. L. DNA immunization. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 8, p. 307-312, 1996.

HAYNES, B. F. et al. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 14, p. 1275-1286, 2012.

IDOYAGA, J. et al. Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 6, p. 2384–2389, 2011.

IVORY C., CHADEE K. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. **Genetic Vaccines and Therapy**, v. 2, p. 17, 2004.

KALAMS, S. A. et al. Safety and comparative immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine in combination with plasmid interleukin 12 and impact of intramuscular electroporation for delivery. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 5, p. 818-829, 2013.

KARLSSON HEDESTAM, G. B. et al. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 143-155, 2008.

KHAN F. A. Vaccines. In:_____. **The elements of immunology**. New Delhi: Chennai Microprint, 2009. cap. 16, p. 343-359. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=beY2SZL5R_oC&pg=PA345&lpg=PA345&dq=KHAN.+The+elements+of+immunology.+Vaccines&source=bl&ots=1qwEcuJ20x&sig=N7MJaoa3vNoPcFCYR7WhkzrzPNg&hl=pt-BR&sa=X&ei=Xi2PU7qKG_Dp8AH3uYCoCA&ved=0CDQQ6AEwAg#v=onepage&q=KHAN.%20The%20elements%20of%20immunology.%20Vaccines&f=false> Acesso em: 02 jun. 2014.

KIEPIELA, P. et al. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. **Nature Medicine**, v. 13, n. 1, p. 46–53, 2007.

KIM, D. et al. DNA vaccine with α -galactosylceramide at prime phase enhances anti-tumor immunity after boosting with antigen-expressing dendritic cells. **Vaccine**, v. 28, n. 45, p. 7297-7305, 2010.

KLEIN, F. et al. HIV therapy by a combination of broadly neutralizing antibodies in humanized mice. **Nature** v. 492, p. 118–122, 2012.

KOELLE, D. M. Vaccines for herpes simplex virus infections. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 7, n. 2, p. 136-141, 2006.

KOJIMA, R. et al. Molecular basis for herpesvirus entry mediator recognition by the human immune inhibitory receptor CD160 and its relationship to the cosignaling molecules BTLA and LIGHT. **Journal of Molecular Biology**, v. 413, n. 4, p. 762-772, 2011.

KORHONEN, M. H. et al. A new method with general diagnostic utility for the calculation of immunoglobulin G avidity. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, p. 725-728, 1999.

KOUP, R. A.; DOUEK, D. C. Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, p. a007252, 2011.

KULKARNI, V. et al. HIV-1 p24gag Derived Conserved Element DNA Vaccine Increases the Breadth of Immune Response in Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e60245, 2013.

KUTZLER, M. A.; WEINER D. B. DNA vaccines: ready for prime time? **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 776–788, 2008.

KWONG, P. D. et al. Mining the B cell repertoire for broadly neutralizing monoclonal antibodies to HIV-1. **Cell Host Microbe**, v. 6, p. 292-294, 2009.

LAL, R. B. et al. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. **Indian Journal of Medical Research**, v. 121, n. 4, p. 287-314, 2005.

LASARO, M. O. et al. Genetic diversity of heat-labile toxin expressed by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 2400-2410, 2008.

_____. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from human herpes virus-1. **Microbial Pathogenesis**, v. 7, p. 1541-1550, 2005.

_____. Prime-boost vaccine regimen confers protective immunity to human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Vaccine**, v. 23, p. 2430-2438, 2005.

_____. Combined vaccine regimen based on parenteral priming with a DNA vaccine and administration of an oral booster consisting of a recombinant *Salmonella enterica* Seroovar Thyphimurium vaccine strain for immunization against infection with human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Infection and Immunity**, v. 72, n.11, p. 6480-6491, 2004.

_____. Antibody-inducing properties of a prototype bivalent herpes simplex virus/enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA vaccine. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 35, p. 25-31, 2003.

LASARO, M. O.; ERTL, H. C. J. Human papillomavirus-associated cervical cancer: Prophylactic and therapeutic vaccines. **Gene Therapy & Molecular Biology**, v. 8, p. 291-306, 2004.

LASARO, M. O.; FERREIRA, L. C. S. Vacinas contra diarreia: Novas perspectivas baseadas em vacinas de DNA. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 14, p. 28-32, 2000.

LEWIS, B. et al. Nedd4-mediated increase in HIV-1 Gag and Env proteins and immunity following DNA-vaccination of BALB/c mice. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91267, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0091267.

LI, W. R. et al. Coexpression of interleukin-2 enhances the immunization effect of a DNA vaccine expressing herpes simplex 1 glycoprotein D. **Acta Virologica**, v. 50, p. 251-256, 2006.

LIU, J. et al. Immune control of an SIV challenge by a T-cell-based vaccine in rhesus monkeys. **Nature**, v. 457, n. 7225, p. 87–91, 2009.

LU, S. et al. Current progress of DNA vaccine studies in humans. **Expert Review of Vaccines** v. 7, p. 175–191, 2008.

LUCKAY, A. et al. Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. **Journal of Virology**, v. 81, p. 5257–5269, 2007.

MAKEDONAS, G.; BETTS, M. R. Living in a house of cards: re-evaluating CD8+ T-cell immune correlates against HIV. **Immunological Reviews**, v. 239, n. 1, p. 109–124, 2011.

McMICHAEL, A. J. HIV vaccines. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 227–255, 2006.

MENDOZA, D. et al. Cytotoxic capacity of SIV-Specific CD8+ T cells against primary autologous targets correlates with immune control in SIV-infected rhesus macaques. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 2, p. e1003195, 2013.

MONIZ, M. et al. HPV DNA vaccines. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. d55-68, 2003.

MONTEFIORI, D. C. et al. Magnitude and breadth of the neutralizing antibody response in the RV144 and Vax003 HIV-1 vaccine efficacy trials. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 3, p. 431-441, 2012.

MOORE, A. C. et al. Effects of antigen and genetic adjuvants on immune responses to human immunodeficiency virus DNA vaccines in mice. **Journal of Virology**, v. 76, p. 243-250, 2002.

MOR, G. et al. Do DNA vaccines induce autoimmune disease? **Human Gene Therapy**, v. 8, n. 3, p. 293-300, 1997.

MURPHY, K. M. et al. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 9, p. 671-681, 2006.

NICHOLS, W. W. et al. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. **The New York Academy of Sciences**, v. 772, p. 30-39, 1995.

O'CONNOR, D. H. et al. A dominant role for CD8+ T lymphocyte selection in simian immunodeficiency virus sequence variation. **Journal of Virology**, v. 78, p. 14012–14022, 2004.

ORR, M. T. et al. CD8 T cell control of HSV reactivation from latency is abrogated by viral inhibition of MHC class I. **Cell Host Microbe**, v. 2, n. 3, p. 172-180, 2007.

PASERO, C. et al. The HVEM network: new directions in targeting novel costimulatory/co-inhibitory molecules for cancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, n. 4, p. 478-485, 2012. doi: 10.1016/j.coph.2012.03.001.

PEJCHAL, R. et al. A conformational switch in human immunodeficiency virus gp41 revealed by the structures of overlapping epitopes recognized by neutralizing antibodies. **Journal of Virology**, v. 83, n. 17, p. 8451-8462, 2009.

PRIDDY, F. H. et al. Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 1769–1781, 2008.

RADCLIFFE, J. N. et al. Prime-boost with alternating DNA vaccines designed to engage different antigen presentation pathways generates high frequencies of peptide-specific CD8 T cells. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 6626–6633, 2006.

RERKS-NGARM, S. et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 23, p. 2209–2220, 2009.

RESKE, A. et al. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, p. 205-215, 2007.

RIBEIRO, S. P. et al. A vaccine encoding conserved promiscuous HIV CD4 epitopes induces broad T cell responses in mice transgenic to multiple common HLA class II molecules. **PLoS One**, v. 5, p. e11072, 2010.

ROBINSON, H. L.; PERTMER, T. M. DNA vaccines for viral infections: basic studies and applications. **Advances in Virus Research**, v. 55, n. 1, p. 74, 2000.

ROBINSON, H. L. New hope for an AIDS vaccine. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 4, p. 239-250, 2002.

ROLLAND, M. et al. HIV-1 group M conserved elements vaccine. **PLOS Pathogens**, v. 3, p. e157, 2007.

SANTANA, V. C. et al. Bicistronic DNA Vaccines Simultaneously Encoding HIV, HSV and HPV Antigens Promote CD8+ T Cell Responses and Protective Immunity. **Plos One**, v. 8, p. e71322, 2013.

SLEASMAN, J. W.; GOODENOW, M. M. HIV-1 infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. S582-S592, 2003.

SMAHEL, M. et al. The effect of helper epitopes and cellular localization of an antigen on the outcome of gene gun DNA immunization. **Gene Therapy**, v. 21, n. 2, p. 225-232, 2014. doi: 10.1038/gt.2013.81.

SMOOKER, P. M. et al. DNA vaccines and their application against parasites--promise, limitations and potential solutions. **Biotechnology Annual Review**, v. 10, p. 189-236, 2004.

STANBERRY, L. R. et al. Glycoprotein-D adjuvant vaccine to prevent genital herpes. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 21, p. 1652-61, 2002.

STILES, K. M. et al., Herpes simplex virus glycoprotein D interferes with binding of herpesvirus entry mediator to its ligands through downregulation and direct competition. **Journal of Virology**, v. 84, n. 22, p. 11646-11660, 2010. doi: 10.1128/JVI.01550-10.

SUN, Y. et al. Construction and analysis of an experimental *Streptococcus iniae* DNA vaccine. **Vaccine**, v. 28, n. 23, p. 3905-3912, 2010.

TOUBAJI, A. et al. The combination of GM-CSF and IL-2 as local adjuvant shows synergy in enhancing peptide vaccines and provides long term tumor protection. **Vaccine**, v. 25, p. 5882–5891, 2007.

TRUMPFHELLER, C. et al. Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 3, p. 607–617, 2006.

TSUNG, K. et al. IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. **The Journal of Immunology**, v. 158, p. 3359–3365, 1997.

UNAIDS. World Health Organization. **Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva. 2013. Disponível em: <http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2014.

VALENTINE, L. E. et al. Recognition of escape variants in ELISPOT does not always predict CD8+ T cell recognition of simian immunodeficiency virus–infected cells expressing the same variant sequences. **Journal of Virology**, v. 82, p. 575–581, 2008.

VASAN, S. et al. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of ADVAX, a multigenic, DNA-based clade C/B' HIV-1 candidate vaccine. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8617, 2010.

VIRGIN, H. W.; WALKER B. D. Immunology and the elusive AIDS vaccine. **Nature**, v. 464, n. 7286, p. 224–231, 2010.

WALD, M. et al. Oral shedding of herpes simplex virus type 2. **Sexually Transmitted Infections**, v. 80, n. 4, p. 272–276, 2004. doi: 10.1136/sti.2003.007823.

WALDMANN, T. A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 595–601, 2006.

WALKER, L. M. et al. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. **Nature**, v. 477, p. 466–470, 2011.

WANG, S.; LU, S. DNA immunization. **Current Protocols in Microbiology**, v. 31, n. 18, p. 1–24, 2013.

WATANABE, N. et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. **Nature Immunology**, v. 4, n. 7, p. 670–679, 2003.

WATFORD, W. T. et al. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, p. 361–368, 2003.

WATKINS, D. I. et al. Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. **Nature Medicine**, v. 14, n. 6, p. 617–621, 2008.

WATKINS, J. D. et al. Anti-HIV IgA isotypes: differential virion capture and inhibition of transcytosis are linked to prevention of mucosal R5 SHIV transmission. **AIDS**, v. 27, p. F13–F20, 2013.

WATSON, R. J. et al. Herpes simplex virus type-1 glycoprotein D gene: nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli*. **Science**, v. 218, n. 4570, p. 381-384, 1982.

WEINER, D. B.; KENNEDY, R. C. Genetic vaccines. **Scientific American**, v. 281, n. 1, p. 50-57, 1999.

WEISS, J. M. et al. Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 7, p. 1705-1721, 2007.

YAN, J. et al. Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. **Molecular Therapy**, v. 15, p. 411-421, 2007.

ZOLLA-PAZNER, S. et al. Vaccine-induced IgG antibodies to V1V2 regions of multiple HIV-1 subtypes correlate with decreased risk of HIV-1 infection. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e87572, 2014.

APÊNDICE A – Representação esquemática das construções vacinais

Construções vacinais no vetor pRE4

Construções vacinais no vetor pVAX

Construção no vetor pcDNA3

APÊNDICE B – Atividades complementares durante o doutorado

1. Participação em artigos

Santana, V. C.; Diniz, M. O.; **Cariri, F. A. M. O.**; Ventura, A. M.; Cunha-Neto, E.; Almeida, R. R.; Campos, M. A.; Lima, G. K.; Ferreira, L. C. Bicistronic DNA vaccines simultaneously encoding HIV, HSV and HPV antigens promote CD8⁺ T cell responses and protective immunity. PLoS One. 8(8):e71322. 2013

Diniz, M. O; **Cariri, F. A. M. O.**; Aps, L. R.; Ferreira, L. C. Enhanced therapeutic effects conferred by an experimental DNA vaccine targeting human papillomavirus-induced tumors. Hum Gene Ther. 24(10):861-70. 2013

Amorim, Jaime Henrique; Diniz, Mariana Oliveira; **CARIRI, F. A. M. O.**; Rodrigues, Juliana Falcão; Bizerra, Raíza Sales Pereira; Gonçalves, Antônio J.S.; de Barcelos Alves, Ada Maria; de Souza Ferreira, Luís Carlos. Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. Vaccine (Guildford), v. 30, p. 837-845, 2012.

Porchia, Bruna F. M. M.; Diniz, Mariana O.; **Cariri, Francisco A. M. O.**; Santana, Vinícius C. ; Amorim, Jaime H. ; Balan, Andrea ; Braga, Catarina J. M. ; Ferreira, Luís Carlos S. Purified Herpes Simplex Type 1 Glycoprotein D (gD) Genetically Fused with the Type 16 Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Enhances Antigen-Specific CD8 T Cell Responses and Confers Protective Antitumor Immunity. Molecular Pharmaceutics, v. 8, p. 2320-2330, 2011.

2. Participação em patente

Porchia, Bruna F.M.M.; DINIZ, M. O.; **CARIRI, F.A.M.O.**; SANTANA, V.C.; FERREIRA, L. C. S.. PROTEÍNA HÍBRIDA, SEQUÊNCIA DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS RECOMBINANTE, VETORES/PLASMÍDEOS, FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E/OU VETERINÁRIAS E SEUS USOS NO CONTROLE DE TUMORES INDUZIDOS PELO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO E/OU DOENÇAS INFECCIOSAS OU DEGENERATIVAS. 2010 (depositada no banco de dados do INPI).

3. Palestras e Aulas

Curso: Graduação em Farmácia.

Instituição: Universidade de São Paulo.

Disciplina: Microbiologia Básica. Período: Agosto - Novembro 2010.

Participação: aulas teóricas e práticas.

Bolsista: PAE - Programa de Aperfeiçoamento do Ensino.

Supervisor: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira.