VINICIUS CANATO SANTANA

Formulação vacinal trivalente voltada para o controle
profilático/terapêutico de tumores induzidos pelo vírus do
papiloma humano tipo 16 (HPV-16) e infecções pelos vírus da
imunodeficiência adquirida (HIV) e herpes vírus humano (HSV)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2011

VINICIUS CANATO SANTANA

Formulação vacinal trivalente voltada para o controle
profilático/terapêutico de tumores induzidos pelo vírus do
papiloma humano tipo 16 (HPV-16) e infecções pelos vírus da
imunodeficiência adquirida (HIV) e herpes vírus humano (HSV)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia
Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos de Souza
Ferreira

Versão Original

São Paulo
2011

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

Santana, Vinicius Canato.

Formulação vacinal trivalente voltada para o controle profilático/terapêutico de tumores induzidos pelo vírus do papiloma humano tipo 16 (HPV-16) e infecções pelos vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e herpes vírus humano (HSV) / Vinicius Canato Santana. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Luis Carlos de Souza Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Microbiologia.

Versão do título para o inglês: Trivalent vaccine formulation focused on the prophylactic/therapeutic control of tumors induced by human papillomavirus type 16 (HPV-16) and infection by human immunodeficiency virus (HIV) and human herpes virus (HSV).

Descritores: 1. Vacina de DNA 2. HPV-16 3. HIV 4. HSV 5. Vacinas terapêuticas 6. Vetor bicistrônico I. Ferreira, Luis 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/SBIB052/2011

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

Candidato(a): Vinicius Canato Santana.

Título da Dissertação: Formulação vacinal trivalente voltada para o controle profilático/terapêutico de tumores induzidos pelo vírus do papiloma humano tipo 16 (HPV-16) e infecções pelos vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e herpes vírus humano (HSV).

Orientador(a): Luís Carlos de Souza Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **007** nas fls. **82** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Luis Carlos de Souza Ferreira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Formulação vacinal trivalente voltada para o controle profilático/terapêutico de tumores induzidos pelo vírus papiloma humano tipo 16(HPV-16) e infecções pelos vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e herpesvirus humano(HSV)** do qual participou(aram) o(s) **Vinicius Canato Santana**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **12.05.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 14 de maio de 2010.

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

Prof. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

Dedico esta dissertação

Aos meus pais,
Osvaldo e Laura

A minha irmã,
Vanessa

As pessoas mais importantes
Da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre investiram em minha educação e nunca pouparam esforços para que eu me tornasse sempre uma pessoa melhor, e que acreditaram sempre em mim.

Às minhas avós por suas orações incansáveis e a minha irmã por estar sempre ao meu lado.

Ao Prof. Luís Carlos de Souza Ferreira que sempre me orientou com paciência, por sua dedicação e pelo conhecimento compartilhado durante os três últimos anos.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Beth, Wilson, Juliano, Cristiane, Otto, Rafael, Juliana, Catarina, Bruna, Camila Santos, Carolina, Aline, Renata, Milene, Loren, Priscila, Jaime, e a todos que tive a oportunidade de conhecer no laboratório, pelo companheirismo e momentos que nunca esquecerei.

Aos amigos que contribuíram com o “grupo HPV/HIV/HSV”, Cariri e Mariana, que diariamente me ajudaram e tiveram especial importância na realização deste trabalho.

Aos amigos-irmãos Diogo e Ana Raquel, pelas conversas e pela convivência.

À Profa. Rita e a todos os integrantes do Laboratório de Fisiologia Bacteriana, Elisa, Karine, Sabrina, Roberto, Daniela, Robert e Débora.

À Loren e Eduardo, pelo suporte técnico e ajuda na organização do laboratório que tanto contribuem para o andamento do nosso trabalho.

Aos colegas dos laboratórios do CEVAT-GENE pela troca de experiência e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, por sua ajuda com preparo de materiais e resolvendo problemas burocráticos.

À Deus, por me permitir ter vivido tudo isso.

Obrigado!

RESUMO

SANTANA, Vinicius Canato. **Formulação vacinal trivalente voltada para o controle profilático/terapêutico de tumores induzidos pelo vírus do papiloma humano tipo 16 (HPV-16) e infecções pelos vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e herpes vírus humano (HSV)**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

As proteínas E7 (HPV), p24 (HIV) e gD (HSV) são exclusivamente expressas por células infectadas ou tumorais e, por isso, são utilizadas como alvos para vacinas com características terapêuticas. Foram desenvolvidas duas vacinas de DNA capazes de expressar as três proteínas virais por meio de um vetor de expressão bicistrônico baseado na sequência IRES. As vacinas, denominadas pIRES I e pIRES II, diferem entre si por transportarem os genes que codificam as proteínas E7 do HPV-16 e p24 do HIV fusionadas à proteína gD do HSV-1 em ordem inversa. Células COS-7 transfectadas com os plasmídeos vacinais expressaram as proteínas alvo, como determinado por imunofluorescência com anticorpos específicos para as proteínas gD, p24 e E7. As vacinas foram testadas em modelo murino quanto à capacidade de gerar anticorpos e células T CD8⁺ específicas. Observamos que animais vacinados desenvolveram baixas taxas de anticorpos contra gD, p24 e E7. Em contrapartida, demonstramos a indução de células T CD8⁺ específicas para os três antígenos testados. Os plasmídeos vacinais foram capazes de proteger camundongos inoculados com células tumorais TC-1 (que expressam a proteína E7 do HPV-16), embora apresentando diferentes níveis de proteção em ensaios profiláticos e terapêuticos. As formulações foram testadas em relação à capacidade de proteger animais frente a desafio com o HSV-1 sendo que apenas um deles gerou efeito protetor. Em conclusão, os resultados demonstram que vacinas voltadas para o controle terapêutico de infecções ou processos tumorais associados aos vírus HPV, HIV e HSV representam uma meta viável e promissora.

Palavras-chave: Vacina de DNA. HPV-16. HIV. HSV. Vacinas Terapêuticas. Vetor Bicistrônico.

ABSTRACT

SANTANA, Vinicius Canato. **Trivalent vaccine formulation focused on the prophylactic / therapeutic control of tumors induced by human papillomavirus type 16 (HPV-16) and infection by human immunodeficiency virus (HIV) and human herpes virus (HSV).** 2011. 68 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The proteins E7 (HPV), p24 (HIV) and gD (HSV) are exclusively expressed by infected cells or tumors and therefore are used as targets for vaccines with therapeutic characteristics. We developed two DNA vaccines capable of expressing these three viral proteins using a bicistronic expression vector based on IRES sequence. The plasmid vaccines, named pIRES I and pIRES II, differ by carrying the genes that encode proteins of HPV-16 E7 and p24 fused to the HIV protein gD of HSV-1 in reverse order. Transfected COS-7 cells expressed the target proteins, as determined by immunofluorescence with specific antibodies for gD, p24 and E7. The vaccines were tested in mice for their ability to generate antibodies and specific CD8⁺ T cells. We observed that vaccinated animals developed low levels of antibodies against gD, E7 and p24. In contrast, we demonstrate the induction of specific CD8⁺ T cells for the three antigens. The plasmid vaccines were able to protect mice inoculated with TC-1 tumor cells (which express the E7 protein of HPV-16), although with different levels of protection in prophylactic and therapeutic trials. The formulations were tested for ability to protect animals against challenge with HSV-1 and only one of them generated a protective effect. In conclusion, the results show that vaccines directed to therapeutic control of infections or tumor process associated with HPV, HSV or HIV represents a promising and viable goal.

Keywords: DNA vaccine. HPV-16. HIV. HSV. Therapeutic Vaccine. Bicistronic Vector.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMP	Ampicilina
APC	<i>Antigen presenting cell</i> (célula apresentadora de antígeno)
BTLA	<i>B and T lymphocyte attenuator</i> (atenuador de linfócitos B e T)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CMV	Citomegalovírus
CRT	Calreticulina
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i> (linfócito T citotóxico)
DCs	<i>Dendritic cells</i> (células dendríticas)
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
DSTs	Doenças sexualmente transmissíveis
E	<i>Early protein</i> (proteína de expressão precoce)
ELISPOT	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Spot</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FITC	Fluoresceína
FRC	Formas recombinantes circulantes
gD	Glicoproteína D
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (antígeno leucocitário humano)
HPV	<i>Human papilloma virus</i> (vírus do papiloma humano)
HSP	<i>Heat shock protein</i> (proteína de choque térmico)
HSV	<i>Herpes simplex virus</i> (Herpes vírus humano)
HVEM	<i>Herpes virus entry mediator</i>
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRES	<i>Internal Ribosome entry site</i>
Kpb	Kilo pares de base
L	<i>Late protein</i> (proteína de expressão tardia)
LB	Meio Luria-Bertani
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (complexo principal de histocompatibilidade)
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i> (Fator nuclear kappa B)
NK	<i>Natural killer cells</i>
PBS	<i>Phosphatase buffered saline</i> (tampão salina fosfato)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação de Polimerase em cadeia)
PE	Ficoeritrina
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico)
SFB	Soro fetal bovino
Th	<i>T helper</i>
VLP	<i>Virus Like Particles</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Vírus da imunodeficiência humana	12
1.2	Vírus do Papiloma Humano	14
1.3	Herpes vírus humano	16
1.4	Co-infecções virais	18
1.5	Vacinas profiláticas e terapêuticas anti-HIV, -HPV e -HSV	19
1.6	Vacinas de DNA multivalentes	22
1.7	Proteína gD e a modulação do sistema imunológico.....	23
2	OBJETIVOS	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Plasmídeos vacinais	26
3.2	Linhagens celulares	27
3.3	Avaliação <i>in vitro</i> da expressão da proteína híbrida gDE7 e gDp24.....	27
3.4	Imunização dos camundongos	27
3.5	Desafio com células tumorais	28
3.6	Ensaio de marcação intracelular de IFN- γ expresso por células CD8 ⁺	28
3.7	Ensaio de ELISPOT.....	29
3.8	Ensaio de ELISA para titulação de anticorpos contra gD, E7 e p24	30
3.9	Citotoxicidade in-vivo.....	30
3.10	Desafio com HSV-1	31
3.11	Análise estatística	31
4	RESULTADOS.....	32
4.1	Obtenção das sequências gênicas gDp24 e gDE7 e clonagem no vetor pIRES	32
4.2	Clonagem das sequências gênicas gDp24 e gDE7 no vetor pIRES e obtenção dos plasmídeos vacinais pIRES I e pIRES II	33

4.3 Expressão das proteínas híbridas gDp24 e gDE7 em células COS-7 transfectadas com os plasmídeos pIRES I e pIRES II	35
4.4 Resposta imunológica de anticorpos anti-gD, anti-p24 e anti-E7 induzida em camundongos após imunização com os plasmídeos vacinais pIRES I e pIRES II	36
4.5 Ativação de linfócitos T CD8 ⁺ E7-específicos induzidas em camundongos após administração dos plasmídeos vacinais	38
4.6 Respostas imunológicas mediadas por linfócitos T CD8 ⁺ E7-específicos induzidas em camundongos após administração dos plasmídeos vacinais e desafio com células tumorais TC-1	40
4.7 Proteção antitumoral profilática e terapêutica induzida pelos plasmídeos vacinais em camundongos desafiados com células TC-1.....	41
4.8 Ativação de linfócitos T CD8 ⁺ p24-específicos induzidas em camundongos após imunização com os plasmídeos vacinais	41
4.9 Atividade citotóxica específica induzida em camundongos imunizados com os plasmídeos vacinais	44
4.10 Ativação de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ gD-específicos induzidas em camundongos C57BL/6 e Balb/C após administração dos plasmídeos vacinais.....	46
4.11 Proteção antiviral profilática induzida pelos plasmídeos vacinais em camundongos desafiados com HSV-1	48
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

As doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) representam um grave problema de saúde pública em todo o mundo, e em especial nos países em desenvolvimento. Dados epidemiológicos revelam que anualmente ocorram 10 a 12 milhões de novos casos de DST somente no Brasil e 340 milhões de novos casos de DSTs em todo o mundo. Elas podem ser causadas por vírus, bactérias ou protozoários. Aquelas causadas por vírus são as mais difundidas mundialmente, causam o maior número de mortes e geram os gastos mais elevados com saúde pública. Três patógenos virais causadores de DSTs possuem relevância epidemiológica devido a seu grau de morbidade e mortalidade dos indivíduos infectados: HIV (vírus da imunodeficiência humana), HPV (vírus do papiloma humano) e HSV-1 2 -2 (herpes simples vírus tipo 1 e tipo 2).

1.1 Vírus da imunodeficiência humana

O Vírus da Imunodeficiência humana (HIV) é o causador da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). Existem dois tipos de HIV, o HIV-1 e o HIV-2, sendo o primeiro, o grande responsável pela pandemia. O HIV-1 é um retrovírus da família lentiviridae e seu genoma, com cerca de 9,9 Kpb, é constituído de duas moléculas de RNA (ácido ribonucleico) que codificam as proteínas: Gag, Env, Pol (estruturais); Vif, Vpr, Vpu (acessórias) e Rev, Nef e Tat (reguladoras) (BURGER; POLES, 2003). Uma das proteínas estruturais do HIV é a p24, proteína essencial para a formação do capsídeo viral do HIV. O gene Gag após ser traduzido gera um produto protéico que é processado dando origem à p24 (FRANKEL; YOUNG, 1998). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 33,3 milhões de pessoas vivem infectadas pelo HIV, sendo que apenas em 2009, houve 2,9 milhões de novos casos e 1,8 milhões de mortes foram totalizadas. De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil foram notificados 544.846 casos de infecção pelo HIV-1 e 183 mil óbitos como consequência da AIDS até junho de 2009.

O HIV infecta células que expressam em sua superfície a molécula CD4, a qual está presente em aproximadamente 60% dos linfócitos T circulantes, assim como em outras células do sistema imunológico como precursores de células T na medula óssea e timo, em monócitos/macrófagos, eosinófilos, células dendríticas e de outros sistemas como células da microglia no sistema nervoso central (FANALES-BELASIO et al., 2010). O envelope viral possui em sua estrutura um complexo trimérico, composto do heterodímero das proteínas gp120 e gp41, que é de extrema importância no processo de infecção pelo HIV. (BERGER; MURPHY; FARBER, 1999; FANALES-BELASIO et al., 2010). Após a fusão das membranas e transcrição do material genético do vírus pela enzima transcriptase reversa, o DNA dupla fita recém-sintetizado é incorporado ao genoma da célula do hospedeiro com auxílio da integrase (SMITH; DANIEL, 2006), dando origem aos provírus. Monócitos/macrófagos, células da microglia e células CD4⁺ quiescentes que contém o DNA proviral integrado ao seu genoma, constituem importantes reservatórios virais de longa vida (CHUN et al., 1997). Análises filogenéticas do HIV-1 subdividem-nos em 3 grupos: M (major), O (outlier) e N (non major e non outlier) (KEELE et al., 2006; KORBER et al., 2000). O grupo M é a forma circulante predominante, sendo dividido em vários subtipos ou clados, denominados por letras (A, B, C, D, F, G, H, J e K) (HEMELAAR et al., 2006), além de formas recombinantes circulantes (FRC) (MCCUTCHAN et al., 2000). Com relação à prevalência dos subtipos virais no Brasil, a estimativa mais recente identificou os subtipos B (77.2%), C (3.3%), D (0.5%) e F (6.4%), bem como formas recombinantes B/F e B/C em diferentes posições (GUIMARAES et al., 2002).

A replicação viral é elevada nos primeiros estágios da infecção e existem poucas variantes virais. As células infectadas podem ser lisadas ou estabelecem uma infecção latente, particularmente em macrófagos e células T CD4⁺ quiescentes, que se tornam reservatórios permanentes (ALEXAKI et al., 2008). As células T CD4⁺ têm um papel central na resposta imune, sinalizando para o funcionamento de outras células, como células T CD8⁺ citotóxicas e linfócitos B (FAHEY et al., 1990). A destruição desse subtipo celular na infecção pelo HIV-1 propicia o aparecimento de doenças oportunistas e cânceres que caracterizam a AIDS, o estágio final da infecção pelo HIV-1.

Entre 10-12 dias após a infecção pelo HIV-1, o RNA viral pode ser detectado no sangue. Rapidamente a viremia atinge um pico acima de 100 milhões de cópias/mm³ e

coincide com a fase de soroconversão (presença de anticorpos HIV-espeíficos) (FIEBIG et al., 2003). Poucas semanas após o início da fase aguda, a maioria dos indivíduos infectados, entra numa fase assintomática, geralmente associada com a queda da viremia do HIV e ausência de sintomas. Esses eventos refletem a ação antiviral exercida tanto pela imunidade inata como adaptativa (FORD et al., 2009). Em particular, os anticorpos se ligam a antígenos do HIV, culminando na prevenção da auto-infecção celular (STAMATATOS et al., 2009) ou favorecendo a eliminação das células infectadas por um mecanismo conhecido como citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), mediada por linfócitos T e células natural killer (NK) (CHUNG et al., 2008). Além disso, linfócitos T HIV-específicos reconhecem antígenos virais na superfície das células infectadas, e promovem a eliminação das mesmas, por mecanismos citotóxicos antígenos-específicos (BANGHAM, 2009).

1.2 Vírus do Papiloma Humano

O vírus do papiloma humano (HPV) é um vírus não envelopado com DNA dupla fita circular e que apresenta tropismo pelo epitélio estratificado. O HPV possui um genoma de cerca de 8.000 pares de bases, o qual é composto por dois genes de expressão tardia, que codificam as proteínas L1 e L2 (L, do inglês *late*), e seis genes de expressão precoce, que codificam as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (E, do inglês *early*). As proteínas L1 e L2 são proteínas estruturais que compõe o capsídeo viral. As proteínas codificadas por genes de expressão precoce exercem papel na regulação do ciclo viral e celular. E1 e E2 controlam a replicação do DNA e transcrição do RNA viral, E4 controla a montagem das partículas virais, e E5 E6 e E7 controlam o ciclo celular das células infectadas (MC MURRAY et al., 2001).

Mais de 120 tipos de HPV foram descritos e cerca de 40 apresentam tropismo para infectar a mucosa do trato anogenital (PAAVONEN, 2007) sendo classificados em HPVs de alto ou baixo risco de acordo com seu potencial oncogênico. Entre os genótipos de baixo risco os mais prevalentes são HPV-6 e -11 sendo que os HPVs deste tipo podem causar verrugas genitais e lesões benignas de baixo grau (DE VILLIERS et al., 2004). Os genótipos do HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 e HPV- 45 são os mais

frequentemente associados a lesões de alto grau e tumores malignos, pertencendo ao grupo dos genótipos de alto risco (MUNOZ et al., 2003). O HPV é o causador de mais de 99% dos casos de câncer cervical invasivo (PARKIN; BRAY, 2006), e a infecção por vírus HPV de alto risco é frequente entre mulheres sexualmente ativas, com uma incidência que pode chegar a 40% (BOSCH, 2003). Os tipos 16 e 18 (HPV-16 e HPV-18) estão associados a quase 75% destes casos de câncer de colo de útero (SMITH et al., 2007). Este tipo de câncer apresenta relevância epidemiológica significativa, correspondendo à segunda causa de morte por câncer em mulheres de todo no mundo, causando 200.000 mortes por ano, e aproximadamente 500.000 novos casos de câncer cervical são diagnosticados por ano, atingindo mundialmente cerca de 1% das mulheres (ZUR HAUSEN, 2006). Dados epidemiológicos divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) revelam que, no Brasil, a cada 100 mil mulheres, cerca de 20 apresentam casos positivos de câncer de colo do útero e, a cada ano, são diagnosticados 20 mil novos casos e, entre essas, aproximadamente 9.000 vão a óbito.

O HPV infecta células do epitélio cervical e durante sua replicação expressa proteínas capazes de interferir no ciclo celular dos queratinócitos, tornando-os células cancerosas (BURD, 2003). Duas proteínas codificadas pelo HPV estão envolvidas no processo de malignização das células e aparecimento do câncer cervical. E6 e E7 são codificadas pelo vírus e produzidas pelas células, essas proteínas se associam a produtos de genes supressores de tumor p53 e pRb (WERNESSE et al., 1990; DYSON et al., 1989) o que garante a manutenção das células no estado transformado. Apesar de a maioria das infecções por HPV ser transiente com resolução espontânea de cerca de 90% dos casos (MOSCICKI et al., 2004), algumas infecções persistem e iniciam uma série de eventos capazes de levar ao câncer. Entre a infecção e o desenvolvimento de lesões, podem se passar algumas décadas. A faixa etária de maior prevalência de infecção é de 20 e 30 anos de idade e esses índices reduzem drasticamente a partir desta faixa etária (BROWN et al., 2005). Já o câncer cervical, é mais frequentemente detectado em mulheres a partir de 40 anos de idade. A progressão de lesões benignas para tumores invasivos está relacionada com a integração do genoma de HPV ao do hospedeiro, perdendo sua forma episomal. Para que isso ocorra deve haver uma quebra no gene E2, o qual perde seu potencial de regulador negativo da expressão de E6 e E7, que passam, então, a ser expressas em níveis constitutivos causando malignização

celular e desenvolvimento de lesões de baixo grau, que podem evoluir para câncer (HOWLEY, 1991). Sem dúvida a prevenção e o diagnóstico precoce são as armas mais poderosas contra este tipo de câncer. O amplo aumento da prática do exame papanicolau em países desenvolvidos, durante os últimos 50 anos, foi capaz de gerar um declínio de 75% no número de mortes por câncer cervical (FRANCO, 2006). Entretanto este teste ainda é muito oneroso e sua prática foge a realidade de países em desenvolvimento e subdesenvolvidos.

1.3 Herpes vírus humano

Os herpes simples vírus tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) são os causadores da herpes humana e estima-se que doenças associadas ao HSVs afetam 60-95% dos adultos (OHANA et al., 2000). O HSV-2 é o responsável por causar a maioria dos casos de ulcerações genitais em todo mundo (LAFFERTY, 2002) e o HSV-1 o mais comumente associado a infecções não genitais (RIBES et al., 2001). O HSV tem um tamanho aproximado de 200 nm de diâmetro, possui DNA linear de fita dupla como 150 Kpb, protegido por cápside protéica coberta por tegumento e envolta por envelope glicoprotéico. A replicação viral inicial é localizada no sitio da infecção. Os vírus então migram através dos neurônios sensores ate os gânglios trigêmeos, cervicais, lombo-sacrais e também para os gânglios autônomos do sistema nervoso central (WHITLEY; ROIZMAN, 2001; STOOPLER et al., 2003). Nestes locais a infecção permanece latente, passível de ser reativada, sendo o gânglio trigêmio e o gânglio lombo-sacral os mais comumente infectados por HSV-1 e HSV-2 respectivamente (SCOTT et al., 1997). Uma vez reativados os vírus viajam através dos neurônios para as regiões mucocutâneas por eles inervadas, se replicam e causam a formação de feridas geralmente no local da infecção inicial através de um ciclo lítico de replicação (SIMMONS, 2002). Inúmeros fatores podem levar a reativação viral, como estresse psicológico, fadiga física, exposição ao frio ou calor, luz solar em excesso, menstruação e imunossupressão (HALFORD; GEBHARDT; CARR, 1996). Embora anticorpos contra HSV apareçam em poucas semanas não protegem contra a reativação da doença (GLICK, 2002).

A principal forma de contágio é através do contato direto da membrana mucosa ou da pele lesionada com a secreção de lesões de um indivíduo com infecção produtiva, seja ela primária ou recorrente (NAHMIAS; ROIZMAN, 1973). Nas pessoas que possuem herpes labial é possível detectar em 67% delas HSV-1 em suas mãos, indicando transmissão horizontal (TURNER et al., 1982). As infecções por HSV podem ser divididas em primárias e não primárias. Uma infecção não primária se refere àquelas infecções de pessoas que já possuem HSV-1 ou 2 e se infectam pelo outro tipo que não possuem, essas infecções são geralmente mais brandas, e possuem a característica de apresentar altos títulos de IgG. Anticorpos contra um tipo de HSV, por exemplo, HSV-1, apresentam reação cruzada contra HSV-2 e vice versa (WALD et al., 1997).

Como dito anteriormente as glicoproteínas do HSV são componentes estruturais do envelope do vírion e são expressas na membrana plasmática de células infectadas, agindo como principal estímulo antigênico para a resposta imune celular e humoral (NORRILD et al., 1980). Das 12 proteínas do envelope viral, 4 possuem papel crucial durante a infecção: gD, gB, gH e gL. O processo de adesão da partícula viral a superfície celular se inicia através da interação de gC e gB com proteoglicanos de heparan-sulfato (SHIEH et al., 1992; LAQUERRE et al., 1998). Logo após ocorre a ligação da gD com seus possíveis receptores: HVEM, nectin-1 e heparan sulfato 3-O-sulfatado (SPEAR, 2004). Esta ligação ativa a maquinaria de fusão a membrana composta por gB e pelo heterodímero formado por gH/gL dando início o processo de invasão. As proteínas de superfície mais importantes gD, gB, gH/gL, tem o importante papel na geração de resposta imune inata contra o HSV além de servirem de alvo a linfócitos T e B durante a geração de resposta imune adaptativa. A glicoproteína D (gD) está envolvida no processo de ligação ao receptor e conseqüente fusão e invasão de células, representando o alvo principal da resposta imunológica contra o HSV (FULLER; LEE, 1992; COHEN et al., 1988). A gD do HSV-1 e do HSV-2 têm alto nível de similaridade e podem gerar anticorpos neutralizantes contra ambos os vírus entretanto, a resposta baseada em linfócitos T CD8⁺ é a mais importante sendo a gD um alvos para estas células (CHAN; LUKIG; LIEW, 1985; ZARLING, 1986).

1.4 Co-infecções virais

Uma grande quantidade de indivíduos portadores de DSTs pertence a grupos de risco que muitas vezes não fazem uso de métodos que lhes garantam uma relação sexual segura. Neste sentido a co-infecção por outros patógenos causadores de DSTs nestes indivíduos é comum. Portadores de HIV apresentam co-infecções causadas por HPV e HSV, sendo as infecções causadas por HSV-2 uma das mais comuns entre os indivíduos HIV positivos, atingindo 50%-90% destes (WEISS, 2004). Um grande problema associado ao HSV é que ele causa ulcerações nas regiões acometidas. De fato as doenças sexualmente transmissíveis que causam ulcerações genitais como sífilis, cancro e herpes se relacionam com a facilitação da transmissão do HIV e outras DSTs, isto se deve ao fato de que nestas regiões a liberação de partículas virais de HIV é maior e ainda proporciona uma porta de entrada mais fácil para novas infecções aumentando tanto o risco de transmissão para outras pessoas quanto o de contrair o vírus (AUGENBRAUN et al., 1995; SCHACKER et al., 1998). Estima-se que DSTs ulcerativas aumentam o risco de transmissão do HIV em 3 – 5 vezes (WASSERHEIT, 1992). As úlceras genitais causadas pelo HSV podem facilitar a transmissão do HIV através da redução da barreira epitelial e pela infiltração de linfócitos CD4⁺ que são alvos da infecção do HIV (CUNNINGHAM et al., 1985). Além disso, a infecção aguda ou a reativação do HSV podem estimular a replicação do HIV, levando a uma progressão mais rápida a AIDS (HENG; HENG; ALLEN, 1994). A infecção aguda por HSV ou sua reativação pode levar a um aumento da replicação do HIV. As proteínas produzidas por seus genes imediatos ICP0, ICP4 e ICP27 são capazes de estimular *in vitro* a replicação do HIV (MOSCA et al., 1987). O HSV ainda pode estimular a replicação do HIV através de um processo mediado por NF-kB (MORIUCHI et al., 2000). Por outro lado a imunossupressão induzida pelo HIV altera o ciclo do HSV tornando as recidivas mais severas, persistentes e freqüentes em pacientes co-infectados com HIV e HSV comparado aos HIV negativos (BAGDADES et al., 1992; AUGENBRAUN et al., 1995). Durante uma infecção ativa pelo HSV os níveis plasmáticos do RNA viral do HIV no plasma pode aumentar em quase 4 vezes (MOLE et al., 1997).

A co-infecção de HIV e HPV aparentemente se relaciona ao quadro de imunossupressão causado pelo HIV (STRICKLER et al., 2005). Mulheres HIV positivas apresentam uma prevalência maior de infecções cervicais e anais por HPV (DUERR et al., 2001; PALEFSKY et al., 2001) do que aquelas que não são HIV positivas. O HPV-16 é também o mais prevalente entre mulheres HIV positivo, além disso, as lesões escamosas de alto grau são frequentemente causadas por HPV não 16 e por infecções por múltiplos tipos virais nesta população (CLIFFORD et al., 2006). Há uma clara associação entre a AIDS e o desenvolvimento de câncer cervical invasivo, tanto que em 1993 o CDC definiu oficialmente sua relação. Em estudo realizado no Brasil, o DNA do HPV mostrou-se presente em 98% dos indivíduos HIV positivos avaliados, sendo o HPV-16 detectado em 22,5% deles, e múltiplos genótipos detectados na maioria dos casos (LEVI et al., 2002). Além disso, algumas proteínas produzidas pelo HIV podem co-ativar as lesões produzidas pelo HPV. A proteína tat do HIV, por exemplo, pode aumentar a expressão das oncoproteínas E6 e E7 envolvidas na progressão do processo neoplásico induzido pelo HPV (TORNESELLO et al., 1993). No contexto das lesões associadas ao HPV, durante uma infecção por HIV, a expressão de algumas moléculas regulatórias está alterada. O fator estimulador de angiogênese VEGF e a proteína reguladora de ciclo celular p27 estão alterados em pacientes HIV positivos que apresentam neoplasias intra-epiteliais cervicais. A angiogênese e o descontrole do ciclo celular são importantes fatores na progressão de lesões neoplásicas para câncer invasivo (NICOL et al., 2008).

1.5 Vacinas profiláticas e terapêuticas anti-HIV, -HPV e -HSV

Atualmente não existem vacinas profiláticas contra HIV e HSV. Já contra HPV existem duas vacinas disponíveis no mercado. Ambas são baseadas em VLPs (Virus like particles) formados por proteínas L1 de HPV-6, -11, -16 e 18 (Gardasil) ou HPV-16 e -18 (Cervarix) estão disponíveis no mercado. Ambas as vacinas demonstraram ser altamente imunogênicas em ensaios clínicos, resultando em 100% de soroconversão nas diferentes populações estudadas (HARPER et al., 2004; VILLA et al., 2006). Entretanto vacinas com características terapêuticas contra infecções por HIV e HSV e tumores

associados ao HPV-16 ainda não existem. Utilizando vacinas terapêuticas, em especial vacinas gênicas (vacinas de DNA), pode-se estimular o sistema imune, gerando uma resposta imunológica eficiente mediada por linfócitos T citotóxicos (CTLs) contra antígenos intracitoplasmáticos que estão sendo expressos na superfície da célula (STEVENSON et al., 2004). Tanto a E7 (HPV-16), como a gD (HSV-1 e -2) e a p24 (HIV) podem servir de alvos na imuno-terapia antígeno-específica mediada por CTLs pois são exclusivamente expressas por células infectadas. Uma vacina efetiva deve apresentar uma estratégia que estimule as células apresentadoras de antígeno (APCs) a ativar células T antígeno-específicas. Vacinas terapêuticas para tumores gerados por HPV e infecções crônicas devem gerar boa resposta de células T CD8⁺ e células T CD4⁺ *helper* para que sejam eficazes (WU, 2007; AUTTRAN et al., 2004).

Muitos grupos de pesquisa visam o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra estas doenças. No caso do HIV as vacinas direcionadas para indução de uma resposta imune celular poderiam levar a um controle da progressão para AIDS assim como da transmissão do HIV-1 naqueles pacientes já infectados (WAWER et al., 2005). Para tal, proteínas estruturais do vírus como a p24 codificada pelo gene Gag e expressas por células infectadas poderiam ser um excelente alvo para este tipo de resposta.

Dois testes clínicos visando o desenvolvimento de uma formulação deste tipo tiveram maior destaque. Um deles foi o estudo de fase IIb, STEP, conduzido pela Merck, no qual uma vacina baseada em uma mistura de adenovírus recombinantes codificando 3 proteínas inteiras do HIV-1: Gag, Pol e Nef não foi capaz de proteger contra infecção e nem de reduzir a viremia nos indivíduos vacinados que se infectaram (APPAY, 2009). O outro estudo conduzido na Tailândia foi o ensaio RV144, que consistiu em um ensaio de fase III que visava induzir tanto imunidade celular quanto imunidade humoral. O esquema de imunização consistiu em 4 doses iniciais com Canarypox recombinante codificando a proteína gp120, Gag e Protease, seguido de 2 doses auxiliares com a proteína gp120 (RERKS-NGARM et al., 2009). Os resultados revelaram uma redução das taxas de infecção em vacinados, mas não houve efeito sobre a carga viral daqueles que contraíram o vírus (BANSAL; MALASPINA; FLORES, 2009).

Se tratando de tumores induzidos por HPV-16 vacinas terapêuticas que possuem como alvo as proteínas E6 e E7 são amplamente estudadas, pois essas proteínas são

expressas constitutivamente nas células do carcinoma cervical e são necessárias para a manutenção das células no estado transformado (VON KNEBEL DOEBERITZ et al., 1994). Estratégias baseadas em vacinas peptídicas, proteínas purificadas, vacinas de DNA, utilização de vetores virais e bacterianos recombinantes e terapias que utilizam células dendríticas estão sendo desenvolvidas. Uma estratégia vacinal baseada em peptídeos longos que cobrem toda a extensão das proteínas E6 e E7 do HPV-16, combinados com o adjuvante Montanide ISA 51 se mostrou promissora. Essa vacina foi testada em diversos ensaios clínicos em pacientes com grau avançado de tumores induzidos por HPV-16 (MELIEF et al., 2007; KENTER et al., 2008) e mostrou a indução tanto de resposta imune celular, como regressão de lesões. Em outra estratégia a proteína E7 fusionada a HSP-65 de M. Bovis mostrou ser bem tolerada em ensaios clínicos de fase I e II, e capaz de induzir algum grau de regressão em vários tipos de lesões associadas ao HPV-16 (GOLDSTONE et al., 2002; ROMAN et al., 2007). A vacina de DNA que está em estágio mais avançado em ensaios clínicos utiliza o método de entrega de DNA micro-encapsulados. A vacina ZYC101, que codifica um epítipo de E7 HLA-A2 restrito (aminoácidos de 83 a 95), passou por dois ensaios clínicos de fase I, em pacientes com câncer cervical de alto grau (SHEETS et al., 2003) e com neoplasias intra-epiteliais anais de alto grau (KLENCKE et al., 2002). Em ambos os ensaios, a imunização via intramuscular mostrou-se segura e, em alguns pacientes, resultou em regressão histológica de lesões, bem como geração de células T CD8⁺ E7-específicas produtoras de IFN- γ . Uma nova versão dessa vacina foi desenvolvida, ZYC-101a, e codifica as proteínas E6 e E7 de HPV-16 e HPV-18. Essa vacina tem sido utilizada em ensaio clínico de fase II em pacientes com câncer cervical de alto grau e demonstrou promover a resolução das lesões da maioria (70%) dos pacientes com menos de 25 anos (GARCIA et al., 2004).

As vacinas contra HSV-1 e -2 vêm sendo amplamente estudadas nos últimos 90 anos, e várias estratégias utilizando vírus vivos geneticamente atenuados, partículas virais inativadas, proteínas recombinantes, vetores replicativos não patogênicos e vacinas de DNA vem sendo testadas (RAJCANI; DURMANOVA, 2006; KOELLE; COREY, 2006; JONES; CUNNINGHAM, 2004). Vários testes em humanos foram feitos com as vacinas de subunidade. Uma vacina recombinante composta por gB-2 (proteína gB do HSV-2) e gD-2 (proteína gD do HSV-2) em conjunto com o adjuvante

MF-59 induziu anticorpos neutralizantes específicos e respostas linfoproliferativas de células T em estudo de fase I. Entretanto, em dois estudos de fase III que avaliou a prevenção de infecção pelo HSV-2, a eficácia geral foi de 9% e a vacinação não teve efeito significativo sobre o período de aparecimento do primeiro episódio clínico de infecção por HSV-2 ou na frequência das subseqüentes recidivas (MERTZ et al., 1990; BURKE, 1993). Uma vacina da GlaxoSmithKline (GSK) é a vacina de subunidades mais recentemente estudada. Ela é composta pela gD-2 formulado com uma mistura de sulfato de alumínio e monofosforil 3 deacylated lipídio A (3-DMPL) como adjuvantes. Em dois ensaios clínicos de fase III, esta vacina reduziu os sintomas clínicos da infecção primária por HSV-2 (aproximadamente 70% de eficácia), mas apenas em mulheres, e somente se fossem inicialmente HSV-1 e HSV-2 soronegativos (STANBERRY et al., 2002). Um estudo que utilizou um vírus não deletado na proteína ICP10 (ICP10deltaPK) apresentou bons resultados como uma vacina terapêutica. Durante o período de acompanhamento de seis meses apenas 37,5% dos pacientes apresentaram recidivas enquanto que o grupo placebo que atingiu 100% (CASANOVA et al., 2002).

1.6 Vacinas de DNA multivalentes

As vacinas de DNA ou vacinas gênicas surgem como uma estratégia muito interessante na geração de resposta imune antígeno-específica por causa de sua simplicidade, estabilidade, segurança e possibilidade de administrações repetidas (DONNELLY et al., 1997; MONIZ et al., 2003; SHEDLOCK; WEINER, 2000). As vacinas de DNA não se integram ao genoma do hospedeiro e não se replicam no hospedeiro final e não há evidências de mutagênese ou respostas auto-imunes induzidas em indivíduos vacinados com vacinas de DNA (KLINMAN et al., 1997). 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). Uma forma de se construir um vetor multivalente é utilizando um IRES (do inglês *Internal Ribosome Entry Site*) na

composição do plasmídeo vacinal. O RNA genômico do vírus da encefalomiocardite (EMCV) possui uma região não codificadora na porção 5' que contém a sequência IRES. Esta estrutura possibilita que o mRNA seja traduzido por uma via cap-independente, sendo que a via cap-dependente ocorre quando o eIF4F se liga a porção 5' do mRNA ocorrendo assim o recrutamento da maquinaria ribossômica (BEDARD; SEMLER, 2004). O IRES promove a ligação da sub-unidade 40S a uma porção interna do mRNA sem a presença do capping (MERRICK, 2004). Esta estratégia de utilizar um IRES tem sido amplamente utilizada na construção de vetores bicistrônicos para as mais diversas aplicações (MOUNTFORD; SMITH, 1995), como por exemplo, para a co-expressão de epítopos virais com interleucinas (ZHANG et al., 2008) e expressão de epítopos de diferentes tipos de patógeno (LIANG et al., 2007).

1.7 Proteína gD e a modulação do sistema imunológico

A fusão de antígenos virais a outros tipos de moléculas que atuem como potencializadores da resposta tem sido usada de forma promissora nas vacinas de DNA. Pesquisas com oncoproteínas do HPV fusionadas a CRT, HSP-70 e LAMP mostram dados interessantes como: boa ativação de células T e proteção contra tumores que expressam proteínas do HPV (CHENG et al., 2001; CHEN et al., 2000; JI et al., 1999). Ainda, o gene Gag do HIV quando fusionado a LAMP consegue também induzir boa resposta de células T CD4⁺ e CD8⁺ (DE ARRUDA et al., 2004). A fusão da gD do HSV a antígenos virais vêm sendo utilizada no LDV-USP como ferramenta para indução de resposta imunológica como estratégia terapêutica. A gD associada a E7 do HPV-16 foi capaz de gerar ativação de resposta celular contra a E7 e proteger camundongos desafiados com células tumorais que expressam oncoproteínas de HPV-16 (LASARO et al., 2005). A gD quando fusionada a p24 do HIV também demonstra capacidade estimuladora de células T CD8⁺ p24 específicas (dados ainda não publicados).

Para a geração de uma boa resposta imunológica um fino controle de estímulos regulatórios deve ocorrer. O ligante da gD que faz com que o HSV entre nas células, chamado HVEM (do inglês, *herpes virus entry mediator*), está envolvido nessa regulação. O HVEM é expresso em muitas células imunológicas inclusive células T

(MONTGOMERRY et al., 1996). HVEM interage com BTLA (do inglês, *B and T lymphocyte attenuator*), promovendo um efeito co-inibidor (SEDY et al., 2005), e com LIGHT, promovendo um efeito co-estimulador (MARSTERS et al., 1997). A gD se liga ao HVEM no mesmo local que o BTLA (porém em sítios diferentes) em uma face contrária do sítio de ligação do LIGHT (LASARO et al., 2008). Portanto, promovendo a ligação da gD ao HVEM, o BTLA não consegue se ligar, evitando assim os efeitos inibitórios desta ligação. Além disso, a gD quando interage com HVEM, leva a ativação de NF- κ B e este leva a produção de IFN do tipo I, liberação de IL-12 e maturação de células dendríticas, gerando uma resposta Th1 mais efetiva (KASSIM et al., 2006). Por isso a gD possui, além de um potencial imunogênico, um potencial adjuvante na resposta a antígenos virais quando a estes fusionada.

2 OBJETIVOS

A presente dissertação de mestrado teve como objetivo demonstrar a viabilidade de vacinas voltadas para o controle terapêutico simultâneo de infecções associadas aos vírus HPV, HIV e HSV. Para tal foram construídas duas vacinas de DNA que codificam proteínas híbridas derivadas dos vírus alvo e suas propriedades imunogênicas demonstradas em modelo experimental. Para alcançar tal objetivo algumas etapas experimentais foram seguidas:

- I – Construção de duas vacinas de DNA que contenham seqüências codificadoras de antígenos dos vírus HSV-1, HIV e HPV-16;
- II – Expressão e a localização das proteínas codificadas pelas vacinas em células eucariotas transfectadas;
- III – Avaliação da imunogenicidade humoral (anticorpos) e celular (células T CD8⁺) das vacinas por meio de ensaios imunológicos após imunização de camundongos;
- IV – Teste do potencial protetor das vacinas em modelo murino frente a desafio com células tumorais que expressam proteínas do HPV-16 e infecções pelo HSV-1.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Plasmídeos vacinais

A amplificação das fusões gênicas gDE7 e gDp24 foi feita por PCR na qual foram utilizados como DNA molde os plasmídeos pgDE7 e pgDp24. Na reação de PCR foram utilizados os seguintes iniciadores: gDFwXbaI (TAGTCTAGAATGGG GGGGGCTGCCGCCAGG), ou gDFwNheI (TAGGCTAGCA TGGGGGGGGCTGCCGCCAGG) e gDRvNotI (TAGGCGGCCGCGCA CCCATTAAGGGGGGGTATC) ou gDRvEcoRI (TAGGAATTCGCACCCATT AAGGGGGGGTATC). As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 50 µL, compreendendo 0,1 mM dos iniciadores *forward* e *reverse*, 60 ng de DNA molde, dNTPs (0,2 mM cada), tampão (1X), MgCl₂ 1,5 mM e três unidades da enzima Taq DNA Polimerase High Fidelity. Foi utilizada uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por cinco minutos, seguido de 30 ciclos térmicos de 95 °C por um minuto (desnaturação), 58 °C por um minuto (anelamento) e 72 °C por um minuto (extensão), finalizando com um passo final de extensão por 10 minutos a 72 °C. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v), corados com brometo de etídeo 0,1% (v/v) e purificados. Os amplicons puderam então ser clonados em vetor de clonagem pGEM e depois digeridos utilizando as enzimas de restrição NheI/EcoRI ou XbaI/NotI (Invitrogen, Carlsbad, CA) segundo especificação do fabricante e inseridos no vetor comercial pIRES (Clontech, Mountain View, CA). Os vetores foram propagados em *Escherichia coli* DH5α em meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e purificados utilizando QIAGEN Plasmid Mega Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). O conteúdo de DNA das amostras foi determinado em espectrofotômetro a 260 nm e confirmado por inspeção visual em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo usando fragmentos de DNA com concentrações conhecidas (Invitrogen). Os plasmídeos foram mantidos a -20 °C até o momento de uso, quando a concentração foi ajustada para 1 µg/µL em PBS.

3.2 Linhagens celulares

A linhagem celular tumoral TC-1 é derivada de células primárias do epitélio pulmonar de C57Bl/6 transformadas com v-Has-ras e os genes de E6 e E7 do HPV-16 (gentilmente cedida pelo Dr. T.C. Wu, Universidade Johns Hopkins, EUA). As células TC-1 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 2 mM aminoácidos não essenciais, 10 mM tampão HEPES, 50 U/mL penicilina/estreptomicina, 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂. No dia do desafio tumoral as células foram tratadas com tripsina, lavadas duas vezes, e ressuspendidas em meio sem soro a concentrações apropriadas para a inoculação.

3.3 Avaliação *in vitro* da expressão da proteína híbrida gDE7 e gDp24

Para a verificação *in vitro* da expressão da proteína híbrida gDE7 e gDp24 pelos vetores, células COS-7 foram transfectadas com o auxílio de lipofectamina (Invitrogen) em condições sugeridas pelo fabricante. Ensaios de imunofluorescência foram realizados utilizando anticorpos específicos contra gD, E7 e p24. Anticorpo monoclonal contra gD (cedido gentilmente pelo Drs. Gary Cohen e Rosenlyn Eisenberg, Universidade da Pensilvânia, EUA) e anticorpos contra E7 e p24 gerados em coelho utilizando a proteína purificada (10 µg/dose) com adição do adjuvante de Freud completo (primeira dose) e incompleto (doses subseqüentes) (cedidos pela Drs. A. Balan e M. Sbrogio-Almeida, Universidade de São Paulo). As amostras foram analisadas em microscópio invertido de fluorescência (Axiovert S100, ZEISS) acoplado a uma câmera digital (Hamamatsu C5810, Sanyo Denki).

3.4 Imunização dos camundongos

Os experimentos de imunização foram realizados com camundongos machos C57BL/6 (H-2b) e BALB/c (H-2d) com idade entre 6-8 semanas adquiridos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia da USP, manuseados segundo as normas estabelecidas pela comissão de ética do ICB-USP. Grupos de 5-10 animais foram vacinados com três doses de vacinas de DNA com intervalo de uma semana entre as doses por via intramuscular. Cada dose contendo 100 µg de DNA diluído em 100µl de PBS e foi inoculada no músculo tibial anterior de cada pata (50 µl por pata). Cada animal recebeu três doses com intervalo de uma semana entre elas.

3.5 Desafio com células tumorais

A inoculação das células tumorais TC-1 foi feita por via subcutânea em camundongos das linhagens C57BL/6. As células TC-1 foram inicialmente utilizadas na concentração de $7,5 \times 10^4$ /animal. As células foram ressuspensas em 100 µL de meio sem soro e inoculadas em uma região dorso-lateral do animal inicialmente duas semanas após a última imunização. Para determinar o efeito de regressão de tumores já estabelecidos, os camundongos foram desafiados com as células TC-1 um dia após ser iniciada a imunização. O acompanhamento da evolução dos tumores nos ensaios de proteção assim como nos ensaios de regressão tumoral foi feito três vezes a cada semana por um período mínimo de 30 dias. Os tumores quando presentes foram medidos com o auxílio de um paquímetro e os animais que apresentaram tumores maiores que 1,5cm de diâmetro foram sacrificados.

3.6 Ensaio de marcação intracelular de IFN-γ expresso por células CD8⁺

A marcação de IFN-γ foi realizada com esplenócitos ou células mononucleares do sangue periférico (PBMC). As células foram tratadas por 5 minutos no gelo com Ack

Lising Buffer até ruptura das hemácias e então centrifugadas a 1500 r.p.m por 5 minutos. As células foram incubadas a uma concentração de 10^6 células por 5 horas a 37 °C 5% CO₂ na presença de Brefeldin A (BD PharMingen, San Jose, CA) e peptídeo específico de E7 (RAHYNIVTF) ou p24 (AMQMLKETI). Após este período as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C com anticorpo anti-CB8 conjugado com fluoresceína (FITC) (BD PharMingen) e fixadas com paraformaldeído a 4% por 20 minutos na geladeira. Após a permeabilização com Cytofix/Cytoperm (BD PharMingen) por 20 minutos a 4 °C, as células foram tratadas com anticorpo anti-IFN- γ conjugado a ficoeritrina (PE) (BD PharMingen) por 30 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em PBS e examinadas por citometria de fluxo de duas cores utilizando o aparelho FACScalibur™ (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Os dados foram analisados pelos programas WinMDi ou FlowJo para a determinação das porcentagens de células INF- γ^+ /CD8⁺ sobre o total de células CD8⁺.

3.7 Ensaios de ELISPOT

Os ensaios de ELISPOT para detecção de células secretoras de IFN- γ em baços dos animais imunizados foram feitos após incubação em meio RPMI suplementado com penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 μ g/ml), 2-ME (50 μ M), L-glutamina (2 mM), piruvato de sódio (1 mM) e 10% SFB inativado pelo calor. Para a dosagem por ELISPOT das células T produtoras de IFN- γ , células de esplenócitos (10^6) foram semeadas e estimulados com peptídeo específico de E7, p24 ou a proteína gD recombinante em placas com fundo de nitrocelulose pré-sensibilizadas com anticorpo anti-IFN- γ e mantidas por 24 horas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂. A revelação das células secretoras de IFN- γ foi feita com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ biotilado durante uma noite a 4 °C. Os pontos revelados foram revelados e contados.

3.8 Ensaio de ELISA para titulação de anticorpos contra gD, E7 e p24

Os ensaios de ELISA utilizados para titulação de anticorpos IgG totais contra as proteínas gD, E7 e p24, foram conduzidos utilizando proteínas recombinantes produzidas no próprio laboratório. A placa foi sensibilizada com 200 ng/poço de cada uma das proteínas, e em seguida incubadas com soro obtido dos camundongos imunizados em uma diluição inicial de 1:50 e diluídos em série 1:2. Um anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase foi utilizado para quantificar a reação.

3.9 Citotoxicidade in-vivo

Duas semanas após a imunização, animais não imunizados serão 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 1 μ M ou 10 μ M 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 10 μ M de CFSE foi adicionado 25 μ M do peptídeo de interesse (E7 ou p24), 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 1.700 r.p.m. O precipitado de células foi ressuspensão em RPMI (sem soro fetal bovino) de modo a conter $2 - 4 \times 10^7$ células/ 200 μ L e injetado, pela via do plexo retro orbital, em todos os animais que receberam as vacinas e no grupo que recebeu apenas PBS. Após 24 horas, todos os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, as células dos baços coletadas, ressuspensas em PBS e examinadas por citometria de fluxo para detecção de fluorescência emitida pelas duas populações celulares utilizando o aparelho FACScalibur™ (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Foram contados 10.000 eventos da população marcada com 1 μ M e a partir dessa população celular foi contada a população de 10 μ M de CFSE remanescente. Os dados foram

analisados pelo programa “FlowJo” para a determinação das porcentagens de células marcadas com 1 μ M ou 10 μ M de CFSE.

3.10 Desafio com HSV-1

Camundongos da linhagem Balb/C foram imunizados seguindo o protocolo vacinal, e 10 dias após a última dose foram desafiados pela via intranasal com 10^4 UFP de 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. Os animais foram monitorados diariamente quanto a sobrevivência por 30 dias após o desafio.

3.11 Análise estatística

Todos os dados foram analisados com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA. One-way ANOVA seguida da comparação múltipla de Tukey para avaliar a diferença entre os grupos. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção das sequências gênicas gDp24 e gDE7 e clonagem no vetor pIRES

Realizamos reações de PCR utilizando dois conjuntos de iniciadores que codificam sítios de restrição nas extremidades das sequências gênicas gDp24 e gDE7. Os amplicons obtidos, como se pode observar na **Figura 1A**, foram: gDp24A (~1,9 kb) e gDE7A (~1,5 kb) adicionadas dos sítios das enzimas NheI (na porção 5') e EcoRI (na porção 3') e gDp24B (~1,9 kb) e gDE7B (~1,5 kb) adicionadas dos sítios das enzimas XbaI (na porção 5') e NotI (na porção 3'). Os amplicons de interesse obtidos foram excisados e purificados do gel e submetidos à ligação com um vetor intermediário (pGEM T-easy), dando origem a quatro vetores, que quando submetidos à ação de enzimas de restrição liberaram os fragmentos contendo as sequências gênicas gDp24 ou gDE7 capazes de serem clonadas no vetor pIRES, como podemos observar na **Figura 1B**. Os vetores pGEMgDp24A e pGEMgDE7A abrigam os amplicons gDp24A e gDE7A, respectivamente, e quando digeridos liberam fragmentos contendo as sequências gênicas gDp24 e gDE7 capazes de serem clonadas no MCS A do vetor pIRES. Os vetores pGEMgDp24B e pGEMgDE7B abrigam os amplicons gDp24B e gDE7B, respectivamente, e quando digeridos liberam fragmentos contendo as sequências gênicas gDp24 e gDE7 capazes de serem clonadas no MCS B do vetor pIRES.

Figura 1: Obtenção das sequências gênicas gDp24 e gDE7 para clonagem no vetor pIRES. (A): Amplicons gerados a partir das sequências gênicas gDp24 e gDE7. M – marcador de peso molecular; 1 - gDp24A (~1,9 kb); 2 – gDp24B (~1,9 kb); 3 – gDE7A (~1,5 kb); 4 – gDE7B (~1,5 kb). (B): Fragmentos liberados pelos vetores intermediários, contendo as sequências gênicas gDp24 (~1,9 kb) ou gDE7 (~1,5 kb), após clivagem com enzimas de restrição. M – marcador de peso molecular; 1 – vetor pGEMgDp24A digerido com as enzimas de restrição NheI e EcoRI; 2 – vetor pGEMgDp24B digerido com as enzimas de restrição XbaI e NotI; 3 – vetor pGEMgDE7A digerido com as enzimas de restrição NheI e EcoRI; 4 – vetor pGEMgDE7B digerido com as enzimas de restrição XbaI e NotI.

4.2 Clonagem das sequências gênicas gDp24 e gDE7 no vetor pIRES e obtenção dos plasmídeos vacinais pIRES I e pIRES II

O vetor pIRES I foi construído de forma que a sequência gênica gDp24 estivesse clonada no MCS A e a sequência gênica gDE7 clonada no MCS B. Já o vetor pIRES II foi construído de forma inversa, abrigando no seu MCS A gDE7 e no seu MCS B gDp24. Uma representação esquemática dos vetores finais diferenciando graficamente a ordem de clonagem das sequências pode ser observada na **Figura 2**.

Figura 2: Representação esquemática dos vetores pIRES Ø, pIRES I e pIRES II utilizados como plasmídeos vacinais. As regiões numeradas no vetor pIRES Ø delimitam a região ocupada pela sequência IRES, flanqueada pelos dois sítios múltiplos de clonagem. As regiões numeradas nos vetores pIRES I e pIRES II indicam as regiões ocupadas pelas sequências gênicas gDp24 ou gDE7 flanqueadas pela região de reconhecimento das enzimas de restrição utilizadas nas clonagens.

A construção dos vetores pIRES I e pIRES II foi feita em duas etapas e geraram dois vetores iniciais: pIRESgDp24 e pIRESgDE7. O primeiro possui apenas a sequência gênica de gDp24 clonada no MCS A, já o segundo possui gDE7. Esses vetores, quando submetidos à digestão com as mesmas enzimas utilizadas para a clonagem, foram capazes de liberar fragmentos com os tamanhos esperados (~1,9 kb para gDp24 e ~1,5 kb para gDE7), como podemos observar na **Figura 3** (amostras 2 e 3). O vetor pIRESgDp24 foi utilizado para clonagem da sequência gênica gDE7 e o vetor pIRESgDE7 para a clonagem da sequência gênica gDp24, ambas no MCS B, dando origem aos plasmídeos vacinas pIRES I e pIRES II, respectivamente, como visto na **Figura 3**. As clonagens dos fragmentos foram confirmadas após digestão com as enzimas utilizadas. Todos os vetores foram confirmados por sequenciamento.

Figura 3: Análise por restrição dos vetores pIRES I e pIRES II. Notar que os fragmentos liberados por cada um dos vetores condiz com o tamanho do fragmento clonado (~1,9 kb para gDp24 e ~1,5 kb para gDE7). M – marcador de peso molecular; 1 – vetor pIRES Ø em sua forma linear (~6,1 kb) digerido com EcoRI; 2 – vetor pIRESgDp24 liberando o fragmento de gDp24 após ser digerido com NheI e EcoRI; 3 – vetor pIRESgDE7 liberando o fragmento de gDE7 após ser digerido com NheI e EcoRI; 4 – vetor pIRES II liberando o fragmento de gDp24 após ser digerido com XbaI e NotI; 5 – vetor pIRES I liberando o fragmento de gDE7 após ser digerido com XbaI e NotI.

4.3 Expressão das proteínas híbridas gDp24 e gDE7 em células COS-7 transfectadas com os plasmídeos pIRES I e pIRES II

Após as etapas de clonagem avaliamos a capacidade dos vetores pIRES I e pIRES II expressarem as proteínas gDp24 e gDE7 quando introduzidos em células eucarióticas. Para tanto fizemos a transfecção de células da linhagem COS-7 com os plasmídeos em questão e avaliamos por imunofluorescência a co-expressão de gD/p24 ou gD/E7 na superfície das células transfectadas. Pudemos observar que ambos os vetores, pIRES I e pIRES II, foram capazes de expressar tanto gDp24 como gDE7 na superfície de células transfectadas. Tal resultado indica que a sequência IRES possibilita a tradução das

sequências contidas no MCS B dos vetores. Como este experimento foi realizado sem permeabilização das células podemos inferir que as proteínas híbridas estão localizadas na superfície celular. Em células transfectadas com vetor pIRES Ø não foi detectada a expressão das proteínas recombinantes, como pode ser observado na **Figura 4**. Metodologias como ELISA e Western-bloot foram utilizadas sem sucesso para tentar quantificar as proteínas *in vitro*.

4.4 Resposta imunológica de anticorpos anti-gD, anti-p24 e anti-E7 induzida em camundongos após imunização com os plasmídeos vacinais pIRES I e pIRES II

Anticorpos séricos anti-gD, anti-p24 e anti-E7 foram quantificados em camundongos Balb/C que receberam três doses dos plasmídeos vacinais 14 dias após a última dose (conforme o protocolo vacinal descrito nos materiais e métodos). Observamos que os títulos de anticorpos específicos gerados foram baixos, sendo que o vetor pIRES I foi capaz de gerar tanto maior quantidade de IgG total anti-p24 quanto de IgG total anti-gD se comparado com o vetor pIRES II como podemos observar na **Figura 5**. Os níveis de anticorpos anti-E7 se apresentaram desprezíveis.

Figura 4: Expressão das proteínas híbridas gDp24 e gDE7 na superfície de células COS-7 transfectadas com os plasmídeos pIRES I e pIRES II. Após 24 horas da transfecção as células foram incubadas com anticorpos específicos contra gD (gerados em camundongo) e contra p24 ou E7 (gerados em coelho). Para a reação de imunofluorescência foram utilizados anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugado à FITC (em verde) e anti-IgG de coelho conjugado ao Texas Red (em vermelho). Em azul, a marcação pelo corante nuclear DAPI.

Figura 5: Níveis séricos de IgG total anti-gD, anti-p24 e anti-E7 gerados após a administração dos plasmídeos vacinais pIRES Ø, pIRES I e pIRES II. Cada grupo de camundongos Balb/C. (n=5) foi imunizado com três doses com intervalo de uma semana entre elas e sangrados duas semanas após a última dose. Volumes iguais de soro de cada indivíduo foram misturados e em seguida diluídos 1:100.

4.5 Ativação de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos induzidas em camundongos após administração dos plasmídeos vacinais

A capacidade dos plasmídeos vacinas induzirem uma resposta mediada por células T CD8⁺ E7-específicas foi determinada em camundongos C57BL/6 14 dias após a última dose dos plasmídeos vacinais (conforme o protocolo vacinal descrito nos materiais e métodos). Em análise de marcação intracelular de citocinas (ICS) verificou-se que animais imunizados com o plasmídeo vacinal pIRES II possuem um maior percentual de células T CD8⁺ / IFN- γ ⁺ quando comparados ao grupo controle, pIRES Ø, ao grupo imunizado com pIRES I como podemos observar na **Figura 6**.

Figura 6: Resposta de células T CD8⁺ E7-específicas produtoras de IFN- γ em camundongos que receberam os plasmídeos vacinais pIRES I e pIRES II e o plasmídeo controle pIRES Ø. Eplênócitos de camundongos C57BL/6 (n=5) vacinados foram submetidos a ensaio de marcação intracelular de IFN- γ em células CD8⁺ E7-específicas e analisadas por citometria de fluxo 14 dias após a última dose. *Diferença significativa com $p < 0.05$ após teste de comparação múltipla de Tukey.

[illegible]

Figura 7: Resposta de células secretoras de IFN- γ em camundongos que receberam os plasmídeos vacinais pIRES I e pIRES II. Esplenócitos de camundongos C57BL/6 (n=8) vacinados foram submetidos a ensaio de ELISPOT, 14 dias após a última dose, para avaliar sua capacidade de secretar IFN- γ quando na presença do peptídeo E7-CD8-específico. *Diferença significativa com $p<0.05$ após teste de comparação múltipla de Tukey.

Figura 8: Resposta de células secretoras de IFN- γ em camundongos que receberam os plasmídeos vacinais pIRES I e pIRES II. Esplenócitos de camundongos C57BL/6 (n=6) vacinados foram submetidos a ensaio de ELISPOT, 14 dias após o desafio tumoral, para avaliar sua capacidade de secretar IFN- γ quando na presença do peptídeo E7-CD8-específico. *Diferença significativa com $p<0.05$ após teste de comparação múltipla de Tukey.

4.7 Proteção antitumoral profilática e terapêutica induzida pelos plasmídeos vacinais em camundongos desafiados com células TC-1

Os plasmídeos vacinais pIRES I e pIRES II foram testados quanto ao efeito profilático e terapêutico frente a um desafio com células tumorais TC-1. No modelo terapêutico, camundongos C57BL/6 receberam células da linhagem tumoral TC-1, e um dia após o desafio, iniciamos o protocolo vacinal. Já no modelo profilático os animais foram vacinados semanalmente e 14 dias após a última dose foram desafiados com TC-1. Os animais foram acompanhados por 30 dias e monitorados quanto à presença ou não de tumores subcutâneos palpáveis na região da inoculação das células. Como podemos observar os plasmídeos vacinais desencadearam tanto um efeito profilático como terapêutico (**Figura 9A e 9B** respectivamente) nos animais imunizados, ao contrário do plasmídeo controle pIRES Ø. O grupo que recebeu o plasmídeo vacinal pIRES II apresentou os melhores níveis de proteção antitumoral sendo de 60% no modelo terapêutico e de 100% no modelo profilático.

4.8 Ativação de linfócitos T CD8⁺ p24-específicos induzidas em camundongos após imunização com os plasmídeos vacinais

A capacidade dos plasmídeos vacinas induzirem uma resposta mediada por células T CD8⁺ p24-específicas foi determinada em camundongos Balb/C 14 dias após a última dose dos plasmídeos vacinais (conforme o protocolo vacinal descrito nos materiais e métodos). Em análise de marcação intracelular de citocinas (ICS) verificou-se que

animais imunizados com o plasmídeo vacinal pIRES I possuem um maior percentual de células T CD8⁺ / IFN- γ ⁺ quando comparados ao grupo controle pIRES Ø, a ao grupo imunizado com pIRES II, como pode ser observado na **Figura 10**.

Figura 9: Efeito profilático e terapêutico antitumoral induzido pelos vetores vacinais pIRES I e pIRES II em animais desafiados com células tumorais TC-1. **(A)** Camundongos C57BL/6 (n=10) desafiados 14 dias após a última dose com $7,5 \times 10^4$ células da linhagem tumoral TC-1 pela via subcutânea. **(B)** Camundongos C57BL/6 (n=10) desafiados um dia antes do início do protocolo vacinal com $7,5 \times 10^4$ células da linhagem tumoral TC-1 pela via subcutânea. Os animais foram monitorados quanto à presença ou não de tumores palpáveis.

Figura 10: Resposta de células T CD8⁺ p24-específicas produtoras de IFN-γ em camundongos que receberam os plasmídeos vacinais pIRES I e pIRES II e o plasmídeo controle pIRES Ø. Eplenócitos de camundongos Balb/C (n=8) vacinados foram submetidos a ensaio de marcação intracelular de IFN-γ em células CD8⁺ p24-específicas e analisadas por citometria de fluxo 14 dias após a última dose. *Diferença significativa com $p < 0.05$ após teste de comparação múltipla de Tukey.

Por meio de ensaios de ELISPOT seguindo o mesmo protocolo vacinal e obedecendo ao mesmo tempo para análise, verificou-se que esplenócitos de animais imunizados com o plasmídeo vacinal pIRES I produzem um número médio de células produtoras de IFN-γ p24-específico estatisticamente maior quando comparados ao grupo controle pIRES Ø como pode ser observado na **Figura 11**.

Figura 11: Resposta de células secretoras de IFN- γ em camundongos que receberam os plasmídeos vacinais pIRES I e pIRES II. Esplenócitos de camundongos Balb/C (n=8) vacinados foram submetidos a ensaio de ELISPOT, 14 dias após a última dose, para avaliar sua capacidade de secretar IFN- γ quando na presença do peptídeo p24-CD8-específico. *Diferença significativa com $p<0.05$ após teste de comparação múltipla de Tukey.

4.9 Atividade citotóxica específica induzida em camundongos imunizados com os plasmídeos vacinais

A capacidade dos animais destruírem células pulsadas com peptídeos CD8-específicos de E7 e p24 foi medida após a imunização dos animais. Como podemos observar na **Figura 12A** camundongos Balb/C vacinados com o plasmídeo pIRES I obtiveram a melhor taxa de lise p24-específica sendo que tanto este grupo como o grupo imunizado com pIRES II apresentaram diferenças estatística em relação ao grupo dos animais vacinados com pIRES Ø. Em contrapartida o plasmídeo vacinal pIRES II foi capaz de gerar uma melhor atividade citotóxica E7-específica em camundongos

A

4.10 Ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ gD-específicos induzidas em camundongos C57BL/6 e Balb/C após administração dos plasmídeos vacinais

A capacidade dos plasmídeos vacinas induzirem uma resposta mediada por células T gD-específicas foi determinada em camundongos C57BL/6 e Balb/C 14 dias após a última dose dos plasmídeos vacinais, através de ensaios de ELISPOT, e verificou-se que esplenócitos de animais imunizados com os plasmídeos vacinais pIRES I e pIRES II produzem um número médio de SPOTs de IFN- γ gD-específicos maior quando comparados ao grupo controle pIRES $\emptyset$ como pode ser observado na **Figura 13**. A partir deste resultado buscamos diferenciar a população produtora de IFN- γ em CD4⁺ e CD8⁺ para isto realizamos as marcações fenotípicas de superfície e intracelular para esta citocina. E como podemos observar na **Tabela 1** tanto linfócitos T CD4⁺ quanto CD8⁺ são capazes de produzir IFN- γ quando re-estimulados *in vitro* com a proteína gD recombinante.

Figura 13: Resposta de células secretoras de IFN- γ em camundongos que receberam os plasmídeos vacinais. Esplenócitos de camundongos C57BL/6 (N=4) vacinados foram submetidos a ensaio de ELISPOT, 14 dias após a última dose, para avaliar sua capacidade de secretar IFN- γ quando re-estimulados *in vitro* com a proteína gD recombinante. *Diferença significativa com $p < 0.05$ após teste de comparação múltipla de Tukey.

Tabela 1 - Percentual de linfócitos T (CD4⁺ ou CD8⁺) produtores de INF- γ .

	Plasmídeos vacinais empregados na imunização					
	pIRES Ø		pIRES I		pIRES II	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
BALB/C ^a	0,05 $\pm$ 0,05	0,05 $\pm$ 0,05	0,62 $\pm$ 0,28*	0,4 $\pm$ 0,24*	0,37 $\pm$ 0,17	0,27 $\pm$ 0,09
C57BL/6 ^b	0,1 $\pm$ 0,08	0,1 $\pm$ 0,08	1,45 $\pm$ 0,71*	1,09 $\pm$ 0,54*	1,15 $\pm$ 0,17*	0,78 $\pm$ 0,26

^aEplenócitos de camundongos Balb/C (n=4) vacinados foram submetidos a ensaio de marcação intracelular de INF- γ em células CD8⁺ /CD4⁺ gD-específicas e analisadas por citometria de fluxo 14 dias após a última dose. Os dados expressam o percentual de linfócitos T produtores de INF- γ ($\pm$ desvio padrão).

^b Eplenócitos de camundongos C57BL/6 (n=4) vacinados foram submetidos a ensaio de marcação intracelular de INF- γ em células CD8⁺ /CD4⁺ gD-específicas e analisadas por citometria de fluxo 14 dias após a última dose. Os dados expressam o percentual de linfócitos T produtores de INF- γ ($\pm$ desvio padrão). *Diferença significativa com $p < 0.05$ após teste de comparação múltipla de Tukey em relação ao plasmídeo controle pIRES Ø.

4.11 Proteção antiviral profilática induzida pelos plasmídeos vacinais em camundongos desafiados com HSV-1

Os plasmídeos vacinais pIRES I e pIRES II foram testados quanto à capacidade de gerar resposta protetora profilática a desafio letal com HSV-1 em modelo murino. Camundongos Balb/C foram desafiados com uma cepa letal de HSV-1 após terem recebido os plasmídeos vacinais. Como podemos observar na **Figura 14**, o grupo que recebeu o plasmídeo vacinal pIRES II apresentou o maior nível de proteção atingindo 50%.

Figura 14: Efeito de proteção profilática antiviral dos vetores vacinais pIRES I e pIRES II em animais desafiados com uma cepa letal de HSV-1. Camundongos Balb/C (N=5) desafiados com 5×10^4 UFP de HSV-1 (cepa EK) pela via intranasal, 14 dias após receberam os plasmídeos vacinais foram monitorados por 30 dias.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo descrevemos a construção de duas vacinas de DNA com características bicistrônicas que permitiram a expressão simultânea da proteína E7 do HPV-16 e da proteína p24 do HIV, ambas fusionadas em um ponto interno da porção C-terminal da proteína gD do HSV-1. Os resultados encontrados demonstraram que células transfectadas com os plasmídeos vacinais foram capazes de expressar os antígenos codificados e camundongos imunizados desencadearam respostas imunológicas específicas para os diferentes antígenos expressos. Animais imunizados pela via i.m. ativaram respostas dependentes de células T CD8⁺ específicas frente aos antígenos virais. Os resultados representam, portanto, uma prova importante da viabilidade de vacinas multivalentes com características profiláticas e, sobretudo, terapêuticas voltadas para o controle de infecções virais crônicas e processos tumorais. A estratégia de desenvolvimento de uma formulação terapêutica que emprega uma vacina de DNA contra HIV, HPV-16 e HSV é inédita e pode representar um passo importante para o desenvolvimento de formulações vacinais sem precedentes.

Por meio dos ensaios de imunofluorescência demonstramos que as proteínas híbridas foram expressas na superfície das células transfectadas já que as mesmas não foram permeabilizadas durante o processo de incubação com anticorpos específicos. Essa característica provavelmente reflete a ancoragem da proteína gD na membrana plasmática pela porção C-terminal (CHITNIS; MILLER, 1994). A localização na superfície celular favorece a interação com os receptores celulares da gD, como HVEM e nectina-1, aparentemente promove aumento dos efeitos imunológicos antígeno-específicos (LASARO et al., 2008). No entanto, os dados disponíveis até o momento

não nos permite avaliar a contribuição da localização celular sobre a imunogenicidade das vacinas.

A resposta de anticorpos foi avaliada como parâmetro de desenvolvimento da resposta imunológica, sendo que as respostas celulares tiveram maior foco neste trabalho, sendo estas de fato, as de maior relevância na proteção contra os patógenos virais em questão quando pensamos em uma abordagem imuno-terapêutica (APPAY et al., 2008; SEDER; HILL, 2000). O monitoramento de ativação de células T CD8⁺ anti-p24 induzidas após vacinação pela via i.m foi realizado em camundongos Balb/C, visto que o peptídeo utilizado como estímulo *in vitro* de esplenócitos é restrito ao haplótipo H-2kd. Os animais imunizados com o plasmídeo vacinal pIRES I apresentaram maior ativação de células T CD8⁺ p24-específica e maior atividade citotóxica *in vivo*. A detecção do efeito citotóxico mediado por células T CD8⁺ é indicativo do potencial terapêutico da estratégia vacinal frente ao HIV que em estágios mais avançados depende da destruição de células infectadas para a erradicação do patógeno no hospedeiro infectado. A geração desse tipo de resposta imune está de acordo com outras estratégias que utilizam vacinas de DNA para desencadear respostas contra HIV (ARRODE et al., 2007; MARQUES et al., 2003). Já a resposta imunológica celular E7-específica foi mais pronunciada nos animais imunizados com o vetor pIRES II. O estudo da ativação de células T CD8⁺ contra E7 foi realizado em camundongos C57BL/6, pois o peptídeo utilizado como estímulo *in vitro* é restrito ao haplótipo H-2kb. Além disto, a linhagem tumoral TC-1 é proveniente de células do epitélio pulmonar dessa linhagem de camundongo. A ativação de células T CD8⁺ foi maior quando imunizamos os animais utilizando o plasmídeo vacinal pIRES II. Esse plasmídeo foi capaz de conferir maior resposta citotóxica *in vivo* e gerou maior efeito antitumoral, tanto em condições

preventivas como terapêuticas. Esses resultados estão de acordo com dados da literatura que demonstram o envolvimento de linfócitos T CD8⁺ E7-específicos na proteção a desafios com células TC-1 (CHENG et al., 2001; CHEN et al., 2000; JI et al., 1999; LASARO et al., 2005; DINIZ et al., 2010).

Os dois vetores construídos foram capazes de expressar as fusões gênicas gDE7 e gDp24, mas induziram nos animais imunizados diferentes níveis de ativação de células T CD8⁺ E7- e p24-específicas. Apesar de não ter sido possível medir *in vitro* o quanto de p24 ou de E7 cada um dos plasmídeos está produzindo, os resultados *in vivo* sugerem que a proteína traduzida após a sequência IRES (C' terminal) pode ter sua expressão diminuída em relação à proteína codificada pelo códon localizado à montante (N' terminal). Esse fenômeno foi observado em outros trabalhos (MIZUGUCHI et al., 2000). Desta forma atribuímos, pelo menos em parte, a diferença de imunogenicidade observada para as proteínas codificadas à montante ou à jusante da sequência IRES, à diferença na expressão dos antígenos codificados. Este fenômeno explicaria o efeito imunogênico diferencial do pIRES I frente à proteína p24, traduzida a partir do primeiro códon deste vetor. Resultados semelhantes foram descritos por outros grupos em trabalhos envolvendo vacinas de DNA multivalentes que empregaram sistemas de expressão idênticos ao utilizado no presente estudo (LIANG et al., 2007; MANOJ et al., 2003). A estratégia de utilização de um vetor bicistônico que expressa antígenos dos três patógenos virais em questão demonstrou-se promissora e melhorias nessa formulação podem e devem ser testadas no futuro. De acordo com o que apontam os resultados, o plasmídeo pIRES I se mostra melhor na geração de resposta imune contra p24, já o plasmídeo II apresenta melhor proteção frente a infecções por HSV e gera melhor respostas contra tumores induzidos por HPV-16. A co-administração de

plasmídeos monocistrônicos que codifiquem apenas gDE7 ou apenas gDp24 ou ainda um plasmídeo monocistrônico que expresse a fusão dos três genes gDp24E7 *in tandem* pode representar alternativas interessantes que aumentem a imunogenicidade da vacina frente aos três patógenos de interesse.

Embora expressa em quantidades equivalentes pelos dois vetores construídos, as respostas imunológicas contra a proteína gD variou em animais imunizados com o pIRES I ou o pIRES II. Camundongos Balb/C imunizados com cada um dos plasmídeos vacinais apresentam níveis semelhantes de células secretoras de INF- γ . Entretanto, animais imunizados com o vetor pIRES II apresentaram menores títulos de anticorpos gD específicos e maior grau de proteção frente ao desafio com HSV-1. Outros trabalhos relatam que a produção de anticorpos específicos seria suficiente para gerar uma proteção anti-HSV sendo a resposta do tipo Th1 aquela que poderia conferir tanto uma proteção profilática como diminuir a periodicidade e gravidade das recidivas em modelo murino (SIN et al., 1999; SIN et al., 2000). Em nosso estudo, os desafios com HSV-1 foram feitos em camundongos Balb/c, pois a linhagem C57BL/6 se mostra naturalmente resistente a infecção pela via intranasal com o HSV-1. Um melhor entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na proteção ao desafio com HSV-1 nos animais imunizados deve considerar, portanto, uma modulação do padrão Th1/Th2 e o monitoramento de sub-populações de linfócitos T ativados em cada caso.

A inserção de sequências heterólogas na região C-terminal da gD é importante para o aumento da imunogenicidade do antígeno em função de alterações conformacionais que afastam uma alça formada por essa região do sítio de interação com HVEM, localizado na porção N-terminal, e tornando a ligação com esse receptor mais eficiente (LASARO et al., 2008). No entanto, alterações conformacionais ou que alterem padrões

de dominância imunológica podem afetar a imunogenicidade da gD. Por exemplo, a apresentação de epítomos oriundos da proteína gD pode ser alterada em função de diferenças de imunogenicidade frente a epítomos provenientes de sequências nela inseridas. Os dados disponíveis não nos permite avaliar, no momento, como a inserção de sequências heterólogas diversas alteram a imunogenicidade da gD codificada por vacinas de DNA.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível construir e avaliar a imunogenicidade de dois plasmídeos vacinas, pIRES I e pIRES II, com características trivalentes contra HIV, HSV-1 e tumores induzidos por HPV-16. Embora eficientes, os plasmídeos se mostraram diferentes em relação à indução de respostas imunológicas contra cada um dos antígenos e patógenos. Embora os resultados tenham demonstrado claramente a viabilidade de vacinas multivalentes com propriedades terapêuticas frente a três importantes infecções virais, pesquisas complementares devem ser feitas no sentido de aumentar tanto a imunogenicidade como o potencial protetor vacinal alcançado.

REFERÊNCIAS¹

ALEXAKI, A.; LIU, Y.; WIGDAHL, B. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. **Current HIV Research**, v. 6, n. 5, p. 388-400, 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.

APPAY, V. et al. CD8⁺ T cell efficacy in vaccination and disease. **Nature Medicine**, v. 14, n. 6, p. 623-628, 2008.

ARRODE, G. et al. Phenotypic and Functional Analysis of Immune CD8⁺ T Cell Responses Induced by a Single Injection of a HIV DNA Vaccine in Mice. **Journal of Immunology**, v. 178, p. 2318-2327, 2007.

AUGENBRAUN, M. et al. Increased genital shedding of herpes simplex virus type 2 in HIV-seropositive women. **Annals of Internal Medicine**, v. 123, p. 845-847, 1995.

AUTRAN, B. et al. Therapeutic Vaccines for Chronic Infections. **Science**, v. 305, n. 5681, p. 205-208, 2004.

BAGDADES, E. K. et al. Relationship between herpes simplex virus ulceration and CD4⁺ cell counts in patients with HIV infection. **AIDS**, v. 6, p. 1317-1320, 1992.

BANGHAM, C. R. CTL quality and the control of human retroviral infections. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 7, p. 1700-1712, 2009.

BANSAL, G. P.; MALASPINA, A.; FLORES, J. Future paths for HIV vaccine research: Exploiting results from recent clinical trials and current scientific advances. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**, v. 12, n. 1, p. 39-46, 2009.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informações e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BEDARD, K.M.; SEMLER, B.L. Regulation of picornavirus gene expression. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 702-713, 2004.

BERGER, E. A.; MURPHY, P. M.; FARBER, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 657-700, 1999.

BOSCH, F. X. Epidemiology of human papillomavirus infections: new options for cervical. cancer prevention. **Salud Publica de Mexico**, v. 45, p. S326-S339, 2003. Supplement 3.

BROWN, D. R. et al. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 2, p. 182-192, 2005.

BURD, E. M. Human Papillomavirus and Cervical Câncer. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2003.

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

BURKE, R. L. Current developments in herpes simplex virus vaccines. **Seminars in Virology**, v. 4, p. 187-197, 1993.

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, n. 2, p. 235-239, 2002.

CHAN, W.; LUKIG, M.; LIEW, F. Helper T cells induced by an immunopurified herpes simplex virus type I (HSV-1) 115 kilodalton glycoprotein (gB) protect mice against HSV-I infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 162, n. 4, p. 1304-1318, 1985.

CHEN, C. H. et al. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. **Cancer Research**, v. 60, p. 1035-1042, 2000.

CHENG, W. F. et al. Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 669–678, 2001.

CHITNIS, C. E.; MILLER, L. H. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 2, p. 497-506, 1994.

CHUN, T. W. et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. **Nature**, v. 387, n. 6629, p. 183-188, 1997.

CHUNG, A. et al. The utility of ADCC responses in HIV infection. **Current HIV Research**, v. 6, n. 6, p. 515-519, 2008.

CLIFFORD, G.M. et al. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. **AIDS**, v. 20, p. 2337-2344, 2006.

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

CUNNINGHAM, A. L. et al. Evolution of recurrent herpes simplex lesions: an immunohistologic study. **Journal of Clinical Investigation**, v. 75, p. 226-233, 1985.

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

DE ARRUDA, L. et al. DNA vaccine encoding human immunodeficiency virus-1 Gag, targeted to the major histocompatibility complex II compartment by lysosomal associated membrane protein, elicits enhanced long-term memory response. **Immunology**, v. 112, n. 1, p. 126-133, 2004.

DE VILLIERS, E. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DINIZ, M. O. et al. 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, n. 10, p. 1576-1583, 2010.

DONNELLY, J. J. et al. DNA vaccines. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 617-648, 1997.

DUERR, A. et al. Human papillomavirus-associated cervical cytologic abnormalities among women with or at risk of infection with human immunodeficiency virus. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 184, p. 584-590, 2001.

DYSON, C. et al. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, p. 934-940, 1989.

FAHEY, J. L. et al. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 3, p. 166-172, 1990.

FANALES-BELASIO, E. et al. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. **Annali dell' Istituto Superiore di Sanità**, v. 46, n. 1, p. 5-14, 2010.

FIEBIG, E. W. et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. **AIDS**, v. 17, n. 13, p. 1871-1879, 2003.

FORD, E. S.; PURONEN, C. E.; SERETI, I. Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 4, n. 3, p. 206-214, 2009.

FRANCO, E. L. et al. Cervical cancer prevention: Promises and perils in a changing landscape. **Oncology Exchange**, v. 5, p. 9-13, 2006.

FRANKEL, A.D.; YOUNG, J.A. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 1-25, 1998.

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, p. 5002-5012, 1992.

GARCIA, F. et al. ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. **Obstetrics & Gynecology**, v. 103, p. 317-326, 2004.

GLICK, M. Clinical aspects of recurrent oral herpes simplex virus infection. **Compendium of continuing education in dentistry**, v. 23, p. 4-8, 2002. Supplement 2.

GOLDSTONE, S. E. et al. HspE7, a novel immunotherapy, in patients with anogenital warts. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 45, p. 502-507, 2002.

GUIMARAES, M. L. et al. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 18, n. 17, p. 1261-1269, 2002.

HALFORD, W. P.; GEBHARDT, B. M.; CARR, D. J. Mechanisms of herpes simplex virus type 1 reactivation. **Journal of Virology**, v. 70, p. 5051-60, 1996.

HARPER, D. M. et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 364, p. 1757-1765, 2004.

HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

HEMELAAR, J. et al. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. **AIDS**, v. 20, n. 16, p. 13-23, 2006.

HENG, M. C. Y.; HENG, S. Y.; ALLEN, S. G. Co-infection and synergy of human immunodeficiency virus-1 and herpes simplex virus-1. **Lancet**, v. 343, p. 255-258, 1994.

HOWLEY, P. M. Role of the human papillomaviruses in human cancer. **Cancer Research**, v. 51, p. 5019s-5022s, 1991. Supplement 18.

Jl, H. et al. Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. **Human Gene Therapy**, v. 10, p. 2727–2740, 1999.

JONES, C. A.; CUNNINGHAM, AL. Vaccination strategies to prevent genital herpes and neonatal herpes simplex virus (HSV) disease. **Herpes**, v. 11, n. 1, p. 12-17, 2004.

KASSIM, S. et al. *In vivo* ablation of CD11c-positive dendritic cells increases susceptibility to herpes simplex virus type 1 infection and diminishes NK and T-cell responses. **Journal of Virology**, v. 80, n. 8, p. 3985–3993, 2006.

KEELE, B. F. et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. **Science**, v. 313, n. 5786, p. 523-526, 2006.

KENTER, G. G. et al. Phase I immunotherapeutic trial with long peptides spanning the E6 and E7 sequences of high-risk human papillomavirus 16 in end-stage cervical cancer patients shows low toxicity and robust immunogenicity. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 1, p. 169-177, 2008.

KLENCKE, B. et al. Encapsulated plasmid DNA treatment for human papillomavirus 16-associated anal dysplasia: a phase I study of ZYC101. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 1028–1037, 2002.

KLINMAN, D.M. et al. DNA vaccines: safety and efficacy issues. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 19, n. 2, p. 245-256, 1997.

KOELLE, D. M.; COREY, L. Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 96-113, 2003.

KORBER, B. et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1789-1796, 2000.

LAFFERTY, W.E. The changing epidemiology of HSV-1 and HSV-2 and implications for serological testing. **Herpes**, v. 9, p. 51-55, 2002.

LAQUERRE, S. et al. Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 Glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. **Journal of Virology**, v. 72, n. 7, p. 6119-6130, 1998.

LASARO, M. O. et al. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 1541-1550, 2005

LASARO, M. O. et al. Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. **Nature Medicine**, v. 14, n. 2, p. 205-212, 2008.

LEVI, J. E. et al. High Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) Infections and High Frequency of Multiple HPV Genotypes in Human Immunodeficiency Virus-Infected Women in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3341-3345, 2002.

LIANG, R. et al. Compatibility of plasmids encoding bovine viral diarrhea virus type 1 and type 2 E2 in a single DNA vaccine formulation. **Vaccine**, v. 25, p. 5994-6006, 2007.

MANOJ, S. et al. Immunization with a dicistronic plasmid expressing a truncated form of bovine herpesvirus-1 glycoprotein D and the amino-terminal subunit of glycoprotein B results in reduced gB-specific immune responses. **Virology**, v. 313, p. 296-307, 2003.

MARQUES, E. T. A. et al. HIV-1 p55Gag Encoded in the Lysosome-associated Membrane Protein-1 as a DNA Plasmid Vaccine Chimera Is Highly Expressed, Traffics to the Major Histocompatibility Class II Compartment, and Elicits Enhanced Immune Responses. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 37926-37936, 2003.

MARSTERS, S. A. et al. Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 22, p. 14029-14032, 1997.

MCCUTCHAN, F. E. et al. Diversity of envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 of recent seroconverters in Thailand. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 16, n. 8, p. 801-805, 2000.

MCMURRAY, H. R. et al. Biology of human papillomaviruses. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, p. 15-33, 2001.

MELIEF, C. J. et al. Long peptide vaccine-induced migration of HPV16-specific type 1 and 2 T cells into the lesions of VIN III patients associated with complete clinical responses. **Cancer Immunity**, v. 7, p. 20, 2007. Supplement 1.

MERRICK, W. C. Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. **Gene**, v. 332, p. 1-11, 2004.

MERTZ, G. J. et al. Double-blind placebo-controlled trial of a herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccine in persons at high risk for a genital herpes infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 161, p. 653-660, 1990.

MIZUGUCHI, H. et al. IRES-Dependent Second Gene Expression Is Significantly Lower Than Cap-Dependent First Gene Expression in a Bicistronic Vector. **Molecular Therapy**, v.1, n. 4, p. 376-382, 2000.

MOLE, L. et al. The impact of active herpes simplex virus infection on human immunodeficiency virus load. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, p. 766-770, 1997.

MONIZ, M. et al. HPV DNA vaccines. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. 55-68, 2003.

MONTGOMERY, R.I. et al. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. **Cell**, v. 87, n. 3, p. 427-436, 1996.

MORIUCHI, M. et al. Herpes simplexvirus infection induces replication of human immunodeficiency virus type 1. **Virology**, v. 278, n. 2, p. 534-540, 2000.

MOSCA, J. D. et al. Activation of human immunodeficiency virus by herpesvirus infection: identification of a region within the long terminal repeat that responds to a trans-acting factor encoded by herpes simplex virus 1. **PNAS**, v. 84, n. 21, p. 7408-12, 1987.

MOSCICKI, A. B. et al. Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and -uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. **Journal of Infectious Disease**, v. 190, n. 1, p. 37-45, 2004.

MOUNTFORD, P. S.; SMITH, A.G. Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis. **Trends in Genetics**, v. 11, n. 5, p. 179-184, 1995.

MUNOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 518-527, 2003.

NAHMIAS, A. J.; ROIZMAN, B. Infection with herpes simplex viruses 1 and 2. **New England Journal of Medicine**, v. 289, p. 781-789, 1973.

NICOL, A. F. et al. Cell-cycle and suppressor proteins expression in uterine cervix in HIV/HPV co-infection: comparative study by tissue micro-array (TMA). **BMC Cancer**, v. 8, 2008.

NORRILD, B. Immunochemistry of herpes simplex virus glycoproteins. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 90, p. 67-106, 1980.

OHANA, B. et al. Novel approach for specific detection of herpes simplex virus type 1 and 2 antibodies and immunoglobulin G and M antibodies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, p. 904-908, 2000.

PAAVONEN, J. Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related genital neoplasias. **International Journal of Infectious Disease**, v. 2, p. S3-9, 2007b. Suplementar.

PALEFSKY, J. M. et al. Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. **Journal of Infection Diseases**, v. 183, p. 383-391, 2001.

PARKIN, D.; BRAY, F. The burden of HPV-related cancers. **Vaccine**, v. 24, p. 11-25, 2006.

RAJCANI, J.; DURMANOVA, V. Developments in herpes simplex virus vaccines: old problems and new challenges. **Folia Microbiologica**, v. 51, n. 2, p. 67-85, 2006.

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

RIBES, J. et al. Six-year study of the incidence of herpes in genital and nongenital cultures in a central Kentucky medical center patient population. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3321-3325, 2001.

ROMAN, L. D. et al. A phase II study of Hsp-7 (SGN-00101) in women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecologic Oncology**, v. 106, n. 3, p. 558-566, 2007.

SCHACKER, T. et al. Frequent recovery of HIV-1 from genital herpes simplex virus lesions in HIV-1 infected men. **Journal of the American Medical Association**, v. 280, p. 61-66, 1998.

SCOTT, D. A. et al. Detection of herpes simplex virus type 1 shedding in the oral cavity by Polymerase chain reaction and enzymelinked immunosorbent assay at the prodromal stage of recrudescence herpes labialis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 26, p. 305-309, 1997.

SEDER, R. A.; HILL, A. V. S. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. **Nature**, v. 406, p. 793-798, 2000.

SEDY, J. R. et al. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. **Nature Immunology**, v. 6, n. 1, p. 90-98, 2005.

SHEDLOCK, D. J.; WEINER, D. B. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 68, p. 793-806, 2000.

SHEETS, E. E. et al. Immunotherapy of human cervical high-grade cervical intraepithelial neoplasia with microparticle-delivered human papillomavirus 16 E7 plasmid DNA. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 188, p. 916-926, 2003.

SHIEH, M. et al. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. **Journal of Cell Biology**, v. 116, n. 5, p. 1273-1281, 1992.

SIMMONS, A. Clinical manifestations and treatment considerations of herpes simplex virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. s71-77, 2002. Supplement 1.

SIN, J. I. et al. DNA Vaccines Encoding Interleukin-8 and RANTES Enhance Antigen-Specific Th1-Type CD4⁺ T-Cell-Mediated Protective Immunity against Herpes Simplex Virus Type 2 *In vivo*. **Journal of Virology**, v. 74, n. 23, p. 11173–11180, 2000.

SIN, J. I. et al. IL-12 Gene as a DNA Vaccine Adjuvant in a Herpes Mouse Model: IL-12 Enhances Th1-Type CD4⁺ T Cell-Mediated Protective Immunity Against Herpes Simplex Virus-2 Challenge. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 2912-2921, 1999.

SMITH, J. A.; DANIEL, R. Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses. **ACS Chemical Biology**, v. 1, n. 4, p. 217-226, 2006.

SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. **International Journal of Cancer**, v. 121, p. 621–632, 2007.

SPEAR, P. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cell Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 401-410, 2004.

STAMATATOS, L. et al. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? **Nature Medicine**, v. 15, n. 8, p. 866-870, 2009.

STANBERRY, L. R. et al. Glycoprotein-D adjuvant vaccine to prevent genital herpes. **New England Journal of Medicine**, v. 347, p. 1652-1661, 2002.

STEVENSON, F. K. et al. DNA vaccines to attack cancer. **PNAS**, v. 101, p. 14646-14652, 2004.

STOOPLER, E. T. et al. Herpes simplex and varicella-zoster infections: clinical and laboratory diagnosis. **General Dentistry**, v. 51, p. 281-287, 2003.

STRICKLER, H. D. et al. Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. **Journal of National Cancer Institute**, v. 97, p. 577-586, 2005.

TORNESELLO, M. L. et al. Human immunodeficiency virus type 1 tat gene enhances human papillomavirus early gene expression. **Intervirology**, v. 36, p. 57-64, 1993.

TURNER, R. et al. Shedding and survival of herpes simplex virus from “fever blisters”. **Pediatrics**, v. 70, 547-549, 1982.

VILLA, L. L. et al. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18. **Vaccine**, v. 24, p. 5571-5583, 2006.

VON KNEBEL DOEBERITZ, M. et al. Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRB interactions. **Journal of Pathology**, v. 189, p. 12-19, 1994.

WALD, A. et al. Frequent genital herpes simplex virus 2 shedding in immunocompetent women. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 5, p. 1092-1097, 1997.

WASSERHEIT, J. N. Epidemiological synergy: interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases. **Sexual Transmitted Diseases**, v. 29, p. 61-77, 1992.

WAWER, M. J. et al. Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 9, p. 1403-1409, 2005.

WEISS, H. Epidemiology of herpes simplex virus type 2 infection in the developing world. **Herpes**, v. 11, p. 24-35, 2004.

WERNES, B. A. et al. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, v. 248, n. 4951, p. 76-79, 1990.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p. 145-151, 2002.

WU, T.C. Therapeutic human papillomavirus DNA vaccination strategies to control cervical cancer. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 310-314, 2007.

ZARLING, J. et al. Human cytotoxic T cell clones directed against herpes simplex virus- infected cells. IV. Recognition and activation by cloned glycoproteins gB and gD. **Journal of Immunology**, v. 136, n. 12, p. 4669–4673, 1986.

ZHANG, H. Y. et al. Optimization strategy for plasmid DNAs containing multiple-epitopes of foot-and-mouth disease virus by cis-expression with IL-2. **Vaccine**, v. 26, p. 769-777, 2008.

ZUR HAUSEN, H. Perspectives of contemporary papillomavirus research. **Vaccine**, v. 24, p. S3/iii-iv, 2006.