

**LUIS ERNESTO FARINHA ARCIERI**

**Desenvolvimento e avaliação de ferramentas de imunização baseadas na região globular da fibra adenoviral modificada com o domínio C4 da glicoproteína gp120 do HIV**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Armando Morais Ventura

São Paulo

2008

## RESUMO

Farinha-Arcieri LE. Desenvolvimento e avaliação de ferramentas de imunização baseadas na região globular da fibra adenoviral modificada com o domínio C4 da glicoproteína gp120 do HIV [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) infecta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo imprescindível o desenvolvimento de uma vacina que bloqueie o avanço desse agente. Entre as proteínas que têm sido testadas com o objetivo de imunização, encontra-se a gp120, glicoproteína do envelope viral. Esta proteína apresenta domínios variáveis e conservados, dentre os quais está o domínio conservado C4. Este domínio é muito importante porque está envolvido no reconhecimento do receptor viral na superfície das células alvo, a molécula CD4. Além disso, anticorpos dirigidos contra ele são neutralizantes do HIV, porém, indivíduos infectados com o vírus não produzem anticorpos que tenham a capacidade de reconhecê-lo. Num trabalho anterior do laboratório, o domínio C4 da proteína gp120 foi introduzido dentro da região globular da proteína fibra do adenovírus, sem que houvessem alterações nas propriedades bioquímicas desta proteína. Considerando que a proteína fibra do adenovírus é estimulante do sistema imune, decidimos testar a capacidade de indução de anticorpos anti-C4 por essa proteína modificada. Assim, foram construídos vetores plasmídicos e adenovirais portando o gene da região globular da fibra adenoviral modificada com o domínio C4 (RGF-C4). A imunização de camundongos com esses vetores, mostrou a indução de anticorpos específicos para o domínio C4, capazes de reconhecer a proteína gp120. Os dados obtidos mostraram que o melhor esquema de imunização foi a administração de uma dose inicial de um vetor plasmídico expressando o gene gp120, seguida por uma ou mais doses de outro vetor plasmídico expressando a proteína híbrida RGF-C4. Também construímos um baculovírus recombinante expressando a fibra modificada, a qual foi purificada por HPLC. Esta proteína apresentou sinais de degradação, sendo possível purificar fragmentos de menor tamanho junto com a proteína integral. Camundongos imunizados com a proteína híbrida também produziram anticorpos específicos para o domínio C4, capazes de reconhecer a proteína gp120. Além disso, mostramos que a imunização com a região globular da fibra adenoviral, modificada com o epítipo V5 de paramyxovírus foi capaz de produzir anticorpos específicos contra ele. Nossos dados sugerem que a região globular da fibra adenoviral é uma boa plataforma para a exposição de epítopos de imunização.

**Palavras-Chave:** Adenovírus. HIV. Baculoviridae. Vacinas. Proteínas recombinantes. Imunização.

## ABSTRACT

Farinha-Arcieri LE. Development and evaluation of immunization tools based on the Adenovirus Fiber Knob modified with the C4 domain of HIV gp120 glycoprotein. [PhD thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Human Immunodeficiency Virus (HIV) infects millions of people worldwide, and the development of a vaccine that blocks the spread of this agent is urgently needed. Among the proteins that have been tested with immunization purposes is the gp120, a viral glycoprotein located in the virus envelope. This protein has variable and conserved domains, among which is the C4 domain. The importance of this region is due to its involvement on the recognition of the viral receptor in the target cells, the CD4 molecule. Besides, antibodies that recognize this domain neutralize HIV, although they are not found in infected individuals. In a previous work of our laboratory, gp120 C4 domain was introduced into adenovirus fiber knob region, with no disturbance of its biochemical properties. Taking into consideration that adenovirus fiber can stimulate the immune system, we decided to test the ability of this hybrid protein to induce the production of anti-C4 antibodies. To achieve so, we constructed DNA and adenovirus vectors carrying the fiber knob gene with the C4 modification (RGF-C4). Immunization of mice with these vectors showed the production of C4 specific antibodies, which were capable of recognizing the gp120 glycoprotein. The best immunization scheme was when mice were inoculated with plasmid DNA expressing the gp120 gene, followed by one or more doses of plasmid DNA expressing the hybrid protein. We also constructed a recombinant baculovirus expressing the modified fiber knob, which was purified by HPLC. This protein showed some degradation, and we were able to purify these degradation products among with the whole protein. Mice immunized with the hybrid protein also showed the production of C4 specific antibodies, which were able to recognize the gp120 glycoprotein. We also show that the immunization of a fiber knob modified with the V5 epitope from paramyxovirus was capable of inducing specific antibodies against this epitope. Our data suggest that adenovirus fiber knob is a good carrier protein for epitope immunization.

**Key words:** Adenovirus. HIV. Baculoviridae. Vaccines. Recombinant Proteins. Immunization.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Adenovírus

Os Adenovírus (Ad) foram isolados e caracterizados inicialmente em 1953 por 2 grupos que procuravam agentes etiológicos de infecções respiratórias agudas (Rowe et al., 1953; Hilleman e Werner, 1954). Foi verificado, posteriormente, que estes vírus são responsáveis por apenas uma pequena porção das doenças respiratórias agudas na população geral e por 5 a 10 % das doenças respiratórias em crianças. Além de doenças respiratórias, os Ad produzem conjuntivite, e têm sido associados a uma variedade de síndromes clínicas, sendo a mais destacada a gastroenterite infantil. Em pacientes imunocompetentes, as infecções adenovirais costumam ser leves. Já em neonatos e pacientes imunocomprometidos, os Ad podem causar infecções letais resultando em hepatite fulminante, pneumonia e encefalite (Gonçalves e de Vries, 2006; Berk, 2007).

### 1.1.1 Classificação

Os Ad são classificados na Família *Adenoviridae*. Um estudo recente (Davison, Benko e Harrach, 2003) definiu 5 clados (grupos de vírus que dividem um ancestral comum), que correspondem aos quatro gêneros aceitos mais um quinto gênero que é proposto. Dois gêneros, *Mastadenovirus* e *Aviadenovirus*, infectam mamíferos e aves respectivamente. Outros dois gêneros, *Atadenovirus* e *Siadenovirus*, possuem um maior número de hospedeiros. Os *Atadenovirus*, assim denominados pelo conteúdo elevado de pares de bases AT no genoma, são encontrados em isolados de répteis, aves, marsupiais e mamíferos; Os *Siadenovirus* aparecem em isolados de anfíbios e aves, já o único Ad de peixes estaria classificado num quinto gênero.

Os Ad humanos estão classificados dentro do gênero *Mastadenovirus*. Na atualidade são conhecidos 51 sorotipos (Ad1- Ad51), assim classificados com base na resistência à neutralização por anti-soros de outros Ad humanos conhecidos. Estes sorotipos são subdivididos em 6 grandes subgrupos ou espécies, nomeadas de A a F, de acordo com a capacidade de aglutinação de eritrócitos (Berk, 2007). Os vírus Ad2 e Ad5, pertencentes ao subgrupo C estão entre os melhor caracterizados genética e molecularmente (Martínez-Flores, Jiménez-Orozco e Villegas-Castrejón, 2006; Berk, 2007).

### 1.1.2 Estrutura dos Adenovírus

Os Ad são vírus não envelopados, de aproximadamente 90 nm de diâmetro, constituídos por um capsídeo externo, um núcleo protéico central que cobre o DNA linear e várias proteínas acessórias. O capsídeo tem morfologia icosaédrica regular (20 faces triangulares e 12 vértices) e está constituído por 252 subunidades ou capsômeros. Desses capsômeros, 240 são hexagonais (hexon) distribuídos nas 20 faces do icosaedro, e 12 são pentagonais (penton) localizados nos vértices do icosaedro. Cada hexon e cada penton estão rodeados de cinco ou seis unidades vizinhas respectivamente. Os penton estão constituídos por uma base que forma parte da superfície do capsídeo, de onde se projeta uma espícula denominada Fibra (Berk, 2007; Martínez-Flores, Jiménez-Orozco e Villegas-Castrejón, 2006).

A análise eletroforética das proteínas virais mostra a presença de 11 polipeptídeos estruturais (Figura 1). O capsídeo é constituído por 7 polipeptídeos, dos quais o polipeptídeo II, de 967 aminoácidos (aa), é o mais abundante. Cada hexon está formado por 3 moléculas fortemente associadas do polipeptídeo II. Os polipeptídeos VI (217 aa), VIII (134 aa) e IX (139 aa) conferem estabilidade ao hexon, sendo que os polipeptídeos VI e VIII ligam o capsídeo ao núcleo viral. Cinco unidades associadas do polipeptídeo III (571 aa) constituem a base do penton. O polipeptídeo IIIa (566 aa), permite a ligação do penton com o hexon, e também funciona como ligação entre o hexon e a proteína VII do núcleo viral. O polipeptídeo IV (582 aa) forma a fibra adenoviral trimerica, a qual se projeta de cada vértice do icosaedro. O núcleo viral contém 4 proteínas básicas ricas em arginina, e uma cópia do genoma viral de DNA. Os polipeptídeos V (368 aa), VII (174 aa) e a proteína  $\mu$  ou X (19 aa), são as três proteínas que ficam em contato com o DNA. O polipeptídeo VII é o constituinte majoritário do núcleo viral e atua de maneira análoga às histonas. O polipeptídeo V liga-se à base do penton e funciona como âncora entre o núcleo e o capsídeo. Existe ainda uma quarta proteína no núcleo viral, a proteína terminal (PT) de 671 aa, que se liga covalentemente às extremidades 5' do DNA (Martínez-Flores, Jiménez-Orozco e Villegas-Castrejón, 2006; Rux e Burnett, 2004). Existem dados estruturais para a proteína Hexon (Rux e Burnett, 2000), Penton (Zubieta et al., 2005) e para a proteína Fibra (Xia et al., 1994; van Raaij et al., 1999a).

### 1.1.3 Fibra Adenoviral

A proteína Fibra é a encarregada do reconhecimento do receptor viral nas células hospedeiras, a proteína de membrana CAR (*Coxsackie B and Adenovirus Receptor*) (Louis et

al., 1994; Chroboczek, Ruigrok e Cusack, 1995). A Fibra é um homotrímero que pode ser dividido em 3 regiões: uma cauda N-terminal, que interage com a proteína base do penton, um talo central cujo comprimento varia para cada tipo de Ad, e uma região globular C-terminal encarregada de ligar-se ao receptor viral (Figura 2). Todos os Ad de mamífero possuem 12 Fibras, uma em cada vértice do icosaedro, ligada de forma não covalente à base do penton. Os vírus do subgrupo F (HAd40 e HAd41) possuem duas Fibras de comprimentos diferentes, mas apenas uma por vértice. Já os Ad aviários possuem duas Fibras por vértice, as quais podem ser de tamanhos diferentes (Chroboczek, Ruigrok e Cusack, 1995).

A Fibra adenoviral possui a capacidade de trimerização independente da presença das outras proteínas virais. Esta proteína tem sido produzida utilizando diversos sistemas de expressão e em todos os casos, foi possível recuperá-la como um trímero (Chroboczek, Ruigrok e Cusack, 1995). A Região Globular da Fibra Adenoviral (RGFA) também tem sido expressa de forma isolada em sistemas procarióticos e eucarióticos. Para os sorotipos 2 e 5, a proteína apresentou-se em forma de trímeros e com a capacidade de ligação ao CAR inalterada, sendo capaz de inibir a infecção de diversos Ad (Louis et al., 1994; Henry et al., 1994).

#### **1.1.4 Genoma adenoviral**

O Adenovírus humano do tipo 2 (Ad2) foi o primeiro a ser seqüenciado e seu genoma possui 35.937 pares de bases (pb); posteriormente foi caracterizado o Ad5. Esses genomas possuem 95 % de identidade, com exceção das regiões codificantes para a proteína Fibra. O DNA adenoviral possui duas seqüências de terminais repetidos invertidos com 100 a 140 pb. Estas seqüências, localizadas em cada extremo do DNA linear, podem hibridar e conferir a capacidade de circularizar o DNA viral durante a replicação. Ainda possuem seqüências de ação em *cis* que reconhecem as proteínas de empacotamento (Berk, 2007).

Os genomas dos Ad humanos possuem:

- Cinco unidades de transcrição precoce (E1A, E1B, E2, E3 e E4). Os transcritos destas unidades produzem proteínas com funções regulatórias.
- Três unidades precoces retardadas (IX, IVa2 e E2 tardia).
- Uma unidade tardia ou tardia principal, que é processada para produzir cinco famílias de mRNAs tardios (L1 a L5). Estes RNAs são processados principalmente pela RNA polimerase II e produzem as proteínas estruturais.

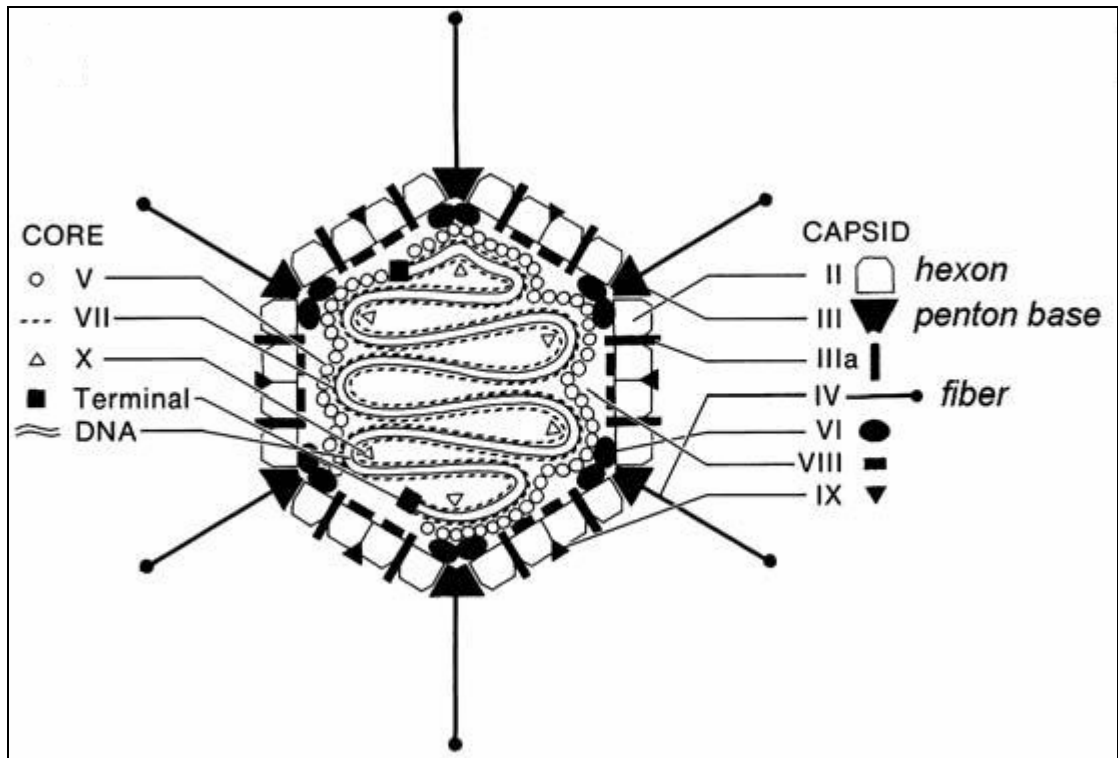
- Um ou dois genes VA-RNA que codificam RNAs associados a vírus que são processados pela RNA polimerase III.

### **1.1.5 Adenovírus como vetores para a transferência de genes**

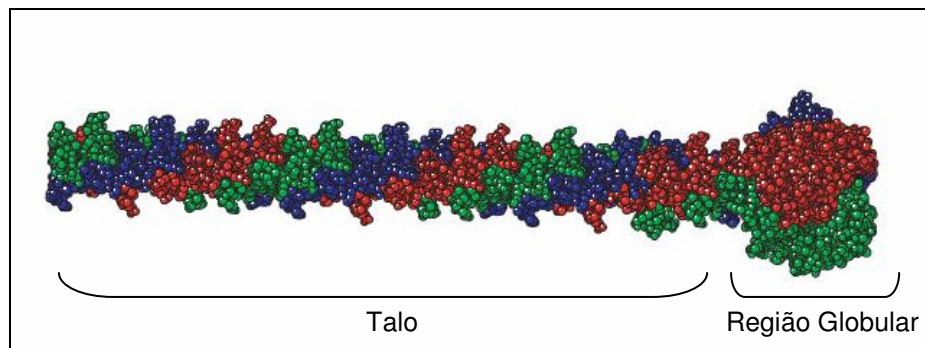
Os Ad tem sido base para a geração de diversos vetores recombinantes para a transferência de genes. Varias características favorecem a utilização destes vírus com essa finalidade:

- 1) Amplo tropismo celular.
- 2) Capacidade de infecção de células quiescentes ou em qualquer fase do ciclo celular.
- 3) Possibilidade de produção de vetores replicativos ou não replicativos.
- 4) Alta capacidade de incorporação de informação genética.
- 5) Baixa frequência de recombinação com o genoma do hospedeiro.
- 6) Genoma episomal.
- 7) Expressão transiente do gene de interesse por até 60 dias.
- 8) Facilidade de produção e de titulação no laboratório.

Apesar disso, estes vírus apresentam algumas desvantagens: eles não conseguem infectar células que não expressam o receptor CAR (células hematopoiéticas, epitélio das vias aéreas, tumores primários); sua utilização *in vivo* está limitada pelo amplo espectro de células que estes vírus são capazes de infectar, e pela resposta inflamatória induzida pelo vetor (Krasnykh, et al., 1998; Douglas et al., 1999; Curiel, 1999; Koizumi et al., 2003). Os vetores adenovirais têm sido utilizados com sucesso tanto em terapia gênica quanto em experimentos de imunização.



**Figura 1.** Representação esquemática de um Adenovírus.  
 Fonte: Rux e Burnett, 2004.



**Figura 2.** Modelo espacial da região globular e do talo da Fibra adenoviral. As 3 cadeias do polipeptídeo IV estão representadas em verde, azul e vermelho.  
 Fonte: Modificado de van Raaij et al., 1999b.

### 1.1.5.1 Adenovírus e terapia gênica

O interesse na utilização de Ad recombinantes como vetores para a transferência de genes surgiu dos esforços em desenvolvê-los para o uso em terapia gênica (Barouch e Nabel, 2005). A utilização de vetores adenovirais para terapia gênica é ampla. Até julho de 2006, os vetores adenovirais constituíam 26% dos ensaios clínicos em terapia gênica. Destes, 76% dos ensaios estavam envolvidos no tratamento do câncer, seguidos pelo tratamento de doenças



vasculares e de desordens monogênicas com 14 e 7% respectivamente (Campos e Barry, 2007).

Um dos obstáculos na utilização dos vetores Adenovirais em terapia gênica é que a infecção dos Ad é dependente da expressão do receptor CAR no tecido alvo. Este fator limita a utilização desses vetores para a transdução de muitas células tumorais e de células de origem hematopoiética (Kurachi et al., 2007a; Koizumi et al., 2003). Diversas estratégias têm sido adotadas com a finalidade de alterar o tropismo destes vetores. Uma delas é a modificação da proteína fibra com fibras derivadas de outros sorotipos virais as quais se ligam a receptores celulares diferentes do CAR (Koizumi et al., 2003; Curiel et al., 1999). Krasnykh e colaboradores (1996) produziram um Ad5 quimérico que possui a região globular da fibra do Ad3. Este vetor adenoviral mostrou o tropismo viral próprio do sorotipo 3.

A modificação direta das proteínas do capsídeo viral mediante inclusão de peptídeos com afinidade por moléculas da superfície celular distintas do CAR é outra estratégia muito utilizada (Wickham et al., 1997; Curiel, 1999). A seleção dos sítios para a introdução destas modificações sem alteração das propriedades das proteínas virais foi facilitada após a resolução das estruturas das proteínas do capsídeo viral. No caso da região globular da fibra, ela apresenta várias alças capazes de serem modificadas. Estas alças variam significativamente entre os diferentes sorotipos virais, tanto em tamanho quanto em seqüência aminoacídica, o que implica que a incorporação de seqüências heterólogas pode ser bem tolerada pela estrutura da proteína (Krasnykh, Douglas e van Beusechem, 2000).

As regiões mais estudadas para a incorporação de seqüências na região globular da fibra são o terminal carboxila (C-terminal) e alça HI. Estudos iniciais (Michael et al., 1995) mostraram que a modificação da região C-terminal da fibra com diferentes epítomos não afetou a trimerização da proteína. A alça HI, devido a uma disposição mais externa na proteína, não contribui nas interações que favorecem a trimerização da fibra e também não está envolvida na formação do sítio de ligação ao receptor. Krasnykh e colaboradores (1998) conseguiram introduzir com sucesso o epítomo FLAG na alça HI sem alterar a trimerização da fibra.

Em estudos recentes, Kurachi e colaboradores (2007a) modificaram as proteínas hexon, IX e fibra para a inclusão do peptídeo RGD ou de um trecho de lisinas, seqüências que ligam integrinas  $\alpha_v$  ou proteoglicanos com heparan-sulfato respectivamente. A comparação da eficiência de transdução de Ads com estas modificações mostraram que as modificações da proteína fibra foram as mais efetivas para a transdução de células CAR deficientes. Em outro estudo do mesmo grupo (Kurachi et al., 2007b) foi introduzida uma seqüência da proteína

TAT do vírus HIV na alça HI da região globular da Fibra adenoviral. Esta modificação mostrou-se eficiente na produção de Ad com a capacidade de transdução tanto de células de glioma humano CAR deficientes LN444 e SF295, quanto de células de origem sanguínea, tais como U937 e Jurkatt. Todas as modificações descritas não alteraram as propriedades de interação da proteína Fibra.

### **1.1.5.2 Adenovírus recombinantes como vetores para imunização**

Os vetores adenovirais recombinantes também têm sido estudados como candidatos vacinais. Características como o curto período de expressão do transgene, a persistência reduzida do vetor *in vivo* e a geração de uma resposta imune vigorosa contra o transgene, fazem dos vetores adenovirais bons vetores vacinais. Para aumentar a segurança destes vetores, a região E1 é retirada do genoma adenoviral. Como esta região codifica proteínas críticas para a replicação viral, esses vetores modificados pela deleção da região E1 são deficientes em replicação. Esta região pode ser substituída então por um cassete de expressão que codifica o antígeno de interesse sob controle de um promotor eucariótico constitutivo (Baruch e Nabel, 2005). Têm sido produzidos vetores Adenovirais que expressam antígenos de diversos patógenos, como o Vírus Ebola (Wang et al., 2006), e o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Barouch e Nabel, 2005) entre outros.

O adenovírus humano do tipo 5 é um dos mais utilizados para o desenvolvimento de vetores, porém, um dos problemas principais na sua utilização é que grande parte da população humana possui anticorpos circulantes contra este vírus. Esta imunidade preexistente pode impedir a infecção das células pelo vetor, o que pode prejudicar a eficiência desses vetores. Para resolver este problema, Ad de outras espécies estão sendo estudados como possíveis vetores vacinais (Bangari e Mittal, 2006). Entre eles, os vetores baseados em Ad de chimpanzé têm mostrado bons resultados (Pinto et al., 2004; de Souza et al., 2007).

### **1.1.6 Imunogenicidade da Fibra adenoviral**

A Fibra adenoviral, junto com as proteínas Hexon e Base do Penton possuem os determinantes antigênicos que são importantes na classificação sorológica dos Ad (Chroboczek, Ruigrok e Cusack, 1995). Além disso, do ponto de vista imunológico, tem sido mostrado que a fibra adenoviral tem a capacidade de atuar como adjuvante (Gibson, Tiensiwakul e Khoobyarian, 1982). Tamanini e colaboradores (2006) mostraram que a simples ligação da fibra ou da região globular da fibra adenoviral ao receptor CAR é

suficiente para induzir a produção de sinais pró-inflamatórios, como as proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) ou o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).

A modificação das proteínas do capsídeo viral com a introdução de seqüências heterólogas também tem sido utilizada com fins de imunização. Esta idéia está baseada em que a resposta imune às proteínas do capsídeo viral aumenta com as sucessivas exposições ao vírus, e, portanto, as respostas imunes contra epítomos que formam parte do capsídeo viral devem aumentar concomitantemente. A incorporação de um peptídeo imunogênico nas proteínas do capsídeo viral teria a vantagem teórica deste ser processado junto como as proteínas do capsídeo, resultando numa resposta humoral similar à induzida pelas proteínas virais (Worgall et al., 2005)

Num estudo realizado recentemente (Krause et al., 2006), um epítomo da proteína hemaglutinina do vírus influenza foi introduzido nas diferentes proteínas do capsídeo adenoviral (Hexon, proteína IX, Penton e Fibra). Assim, foram geradas diversas partículas adenovirais, cada uma delas portando o epítomo da hemaglutinina em cada uma das proteínas do capsídeo viral. Os vetores adenovirais assim modificados foram utilizados na imunização de diversas cepas de camundongos. Em todos os casos, os autores demonstraram que a melhor resposta imune contra o epítomo da hemaglutinina foi obtida quando este estava inserido na região globular da fibra adenoviral.

## **1.2 Vírus da Imunodeficiência Humana**

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), agente da Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), é a principal causa de mortalidade na África sub-Sahariana e é a quarta causa de morte no mundo todo. A cada dia, mais de 6.800 pessoas são infectadas com o HIV e mais de 5.700 morrem de AIDS, em grande parte por acesso inadequado aos serviços de prevenção e tratamento do vírus. Para 2007, foi estimado que 2,5 milhões de pessoas teriam contraído o vírus e 2,1 milhões de pessoas teriam ido a óbito em decorrência da AIDS. Nesse ano, o número de pessoas vivendo com HIV no mundo todo teria alcançado os 33,2 milhões (WHO, 2007). No Brasil estariam localizados 1/3 das pessoas infectadas com HIV da América Latina, sendo que até 2005 foi estimado que 620.000 estivessem infectadas com o vírus (Dourado et al., 2007). É extremamente necessário o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra o HIV que possa ser utilizada na prevenção da doença, ou como tratamento terapêutico, em combinação com drogas antivirais (Srivastava, Ulmer e Barnett, 2005).

### 1.2.1 Classificação

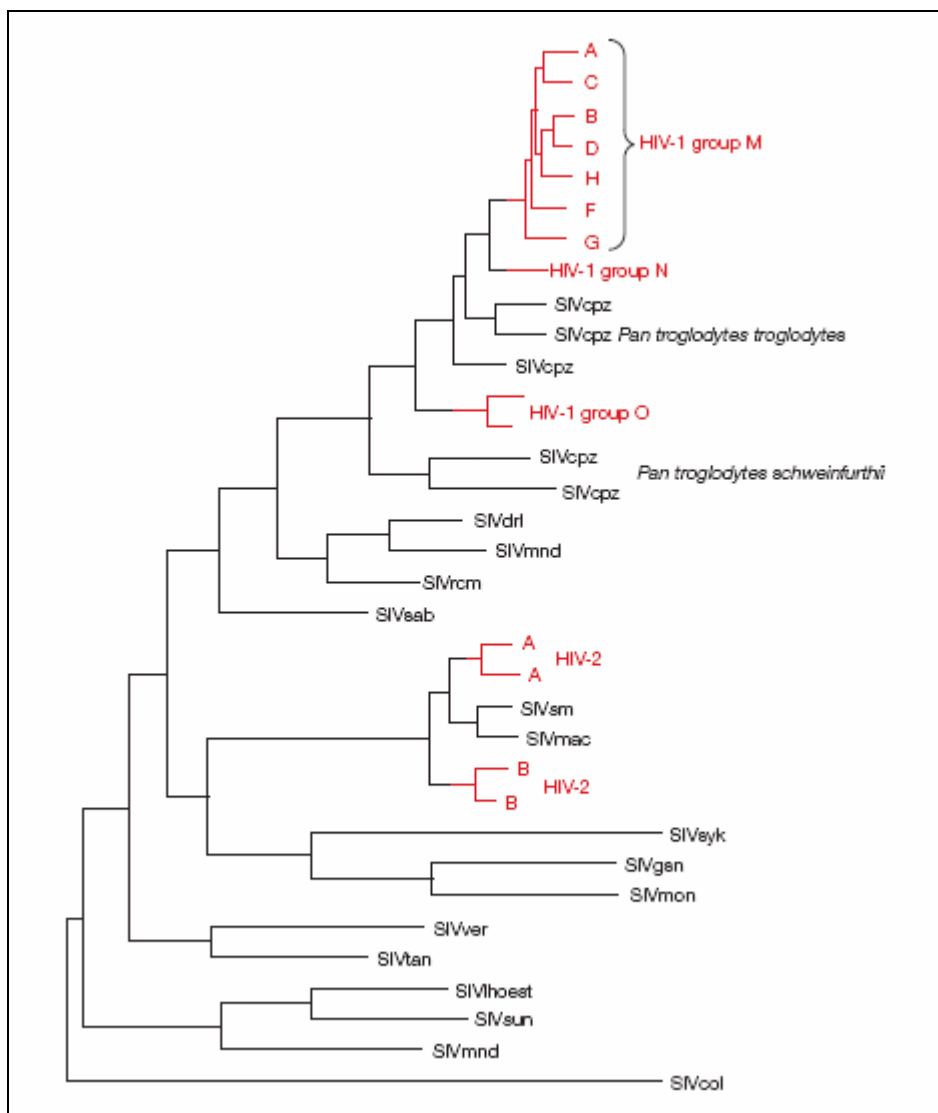
O HIV pertence à família *Retroviridae*, vírus que possuem genomas de RNA que durante o transcurso do ciclo viral são convertidos em moléculas de DNA pelo processo de retrotranscrição. Dentro dessa família, este vírus se classifica no gênero lentivirus, junto com o Vírus da Imunodeficiência de Símio (SIV) e outros (Goff, 2007). Estes dois vírus constituem o grupo de lentivírus de primatas. Como o nome sugere, os lentivírus produzem uma doença persistente de progressão lenta, tendo como alvo linhagens de células hematopoiéticas e macrófagos diferenciados (Freed e Martin, 2007).

O HIV foi isolado pela primeira vez em 1983, mas em meados dos anos 80 já era evidente a circulação em populações humanas de dois tipos de HIV, o HIV-1 e o HIV-2, com estruturas genômicas levemente diferentes. Ambos os vírus estão caracterizados por uma extensa diversidade genética. Estes dois vírus estão relacionados a diferentes SIVs, o que indica origens evolutivas diferentes. Filogeneticamente, o HIV-1 tem parentesco com o SIV de Chimpanzé, enquanto o HIV-2 tem parentesco com o macaco *Sooty Mangabey* (Figura 3). O HIV-1 é dividido em três grupos, denominados M (*Main*), O (*outlier*) e N (*non-M, non-O*) (Figura 3). O grupo M contém mais de 95% dos isolados virais e tem distribuição global, sendo subdividido ainda em 9 subtipos e 15 formas recombinantes em circulação. Já os grupos O e N estão restritos a indivíduos da África ocidental. O HIV-2 também é comum em indivíduos da África ocidental e está composto de 7 subtipos (Rambaut et al., 2004).

Diversos fatores contribuem na extraordinária heterogeneidade genética do HIV-1:

- 1) Síntese de DNA com altas taxas de erro durante a transcrição reversa do genoma ( $3 \times 10^{-5}$  mutações/nucleotídeo/ciclo de replicação).
- 2) Alta frequência de recombinação na transcrição reversa.
- 3) Altos níveis de produção de progênie viral *in vivo* ( $10^9$  partículas/dia; 150 a 300 ciclos de replicação por ano).
- 4) Grande quantidade de indivíduos infectados.

Estima-se que num indivíduo infectado, a diversidade genética viral aumenta 1% ao ano a partir do vírus fundador durante a etapa assintomática da infecção. É utilizado o termo *quasispecies* para descrever o conjunto de populações diversas de vírus em um indivíduo infectado com HIV-1 (Freed e Martin, 2007).



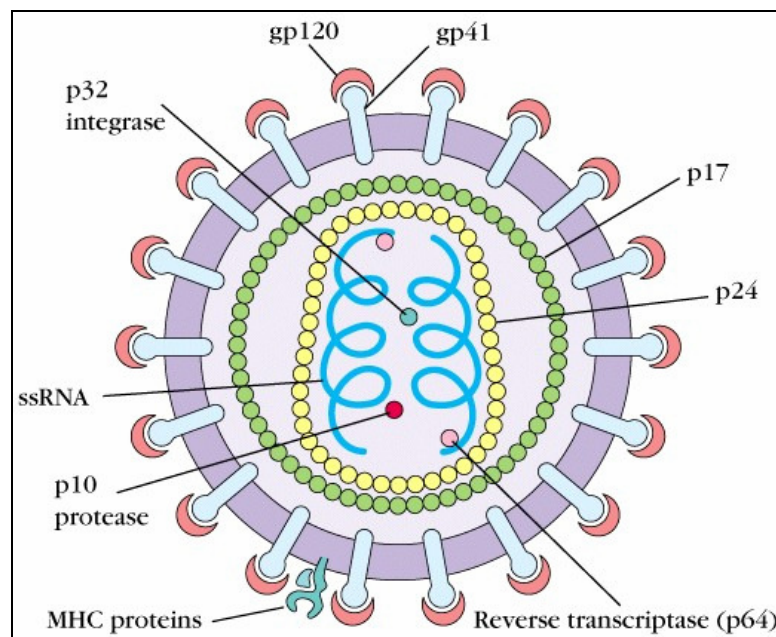
**Figura 3.** História evolutiva dos lentivírus de primatas. Relações filogenéticas do HIV-1 e HIV-2, baseadas na identidade de seqüências do gene da polimerase viral. Na árvore, as diferentes linhagens do HIV se destacam em vermelho. cpz: Chimpanzé; mac: Macaco; sm: Macaco *Sooty Mangabey*.  
 Fonte: Rambaut et al., 2004.

### 1.2.2 Genoma e estrutura viral

Os vírions do HIV possuem uma membrana lipídica ou envelope derivado das células alvo, as quais possuem o marcador CD4 na sua superfície, incluindo-se os linfócitos T *helper*, células da linhagem monócito/macrófago e células dendríticas. Este envelope circunda um nucleocapsídeo que contém o genoma viral, composto por duas moléculas idênticas de RNA de fita simples, de aproximadamente 9,2 kb, de polaridade positiva (Figura 4). Estes RNAs, por serem gerados pela RNA polimerase II do hospedeiro, possuem muitas características do RNA mensageiro celular, tais como a presença de cap na extremidade 5', e cauda poli-A na extremidade 3'.

Nas etapas iniciais da infecção, o genoma viral de RNA é convertido em DNA de dupla fita linear graças à atividade de uma transcriptase reversa codificada pelo vírus. Este DNA linear é integrado no genoma da célula hospedeira, onde se denomina provírus. Assim, o HIV possui duas formas genômicas: RNA de fita simples na fase extracelular do ciclo viral e DNA de dupla fita dentro da célula.

O genoma do HIV possui três genes estruturais, denominados *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica o precursor para as proteínas do capsídeo viral: a proteína de Matriz (p17), que permanece ligada à face interna do envelope e acredita-se que contate o domínio citoplasmático das proteínas do envelope; a proteína principal do capsídeo (p24), que envolve o núcleo viral dando-lhe forma cônica; e a proteína do nucleocapsídeo, uma proteína pequena e básica associada ao RNA viral (Figura 4). O gene *pol* codifica para a protease, a transcriptase reversa e a integrase viral. O gene *env* codifica para as glicoproteínas do envelope, gp41 e gp120. O genoma do HIV inclui genes regulatórios essenciais (*tat* e *rev*) e genes regulatórios não essenciais (*nef*, *vif*, *vpu* e *vpr*) (Luciw, 1996; Freed e Martin, 2007).



**Figura 4.** Estrutura do HIV.

Fonte: <http://tutor.lscf.ucsb.edu/instdev/sears/immunology/Immunodeficiencies/figure19-08a.htm>

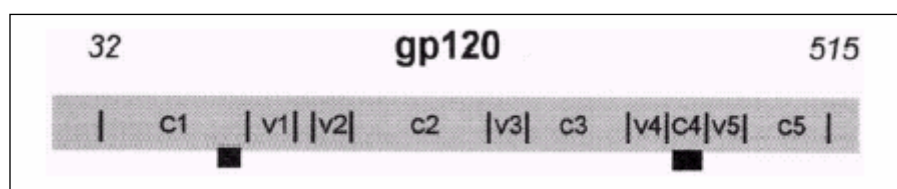
### 1.2.3 Glicoproteínas do envelope do HIV

As glicoproteínas do envelope viral, gp120 e gp41, têm a função de mediar a entrada do vírus nas células alvo. A ligação do vírus à célula alvo acontece inicialmente mediante a interação da gp120 com a molécula CD4, seguida da ligação dos co-receptores CCR5 ou

CXCR4, estas últimas pertencentes à família de receptores de quimiocinas. A gp41 promove a fusão entre a bicamada lipídica viral e a membrana plasmática da célula hospedeira (Freed e Martin, 2007).

As glicoproteínas virais são sintetizadas a partir do gene *env*, como uma poliproteína precursora denominada gp160. A clivagem intracelular da gp160 produz a subunidade amino-terminal gp120 e a subunidade C-terminal gp41 com 550 e 351 aa respectivamente. A gp120 é uma proteína altamente glicosilada e hidrofílica, que se localiza na superfície externa do envelope viral (Figura 4), assim como na membrana plasmática de células infectadas. A gp41 é uma proteína relativamente hidrofóbica e atravessa a membrana lipídica dos vírions e das células infectadas, sendo classificada como uma proteína integral de membrana do tipo I (Luciw, 1996). Na forma madura, as glicoproteínas do envelope estão ligadas mediante interações não covalentes formando um heterodímero. Nesta associação estão envolvidos múltiplos pontos de contato entre as subunidades. Através de interações não covalentes o heterodímero se organiza num trímero. Isto tem conseqüências importantes para a antigenicidade e a imunogenicidade do oligômero (Poignard et al., 2001).

A comparação das seqüências dos genes *env* de distintos isolados do HIV-1 revela um padrão de cinco regiões de alta variabilidade (V1-V5) e cinco regiões constantes (C1-C5) para a subunidade gp120, como esquematizado na Figura 5 (Kropelin et al., 1998; Srivastava, Ulmer e Barnett, 2005). A gp41 não apresenta tanta heterogeneidade de seqüência, sendo uma proteína mais conservada. Na gp120, as regiões envolvidas na ligação ao CD4 mapeiam nos domínios C3 e C4, embora um domínio mais descontínuo e dependente de conformação esteja envolvido na ligação de alta afinidade entre gp120 e CD4 (Lasky et al., 1987; Zolla-Pazner, 2004; Freed e Martin, 2007). Um peptídeo com a seqüência do domínio C4 é capaz de bloquear a interação entre a proteína gp120 e a molécula CD4, e anticorpos dirigidos contra ele reconhecem a gp120 nativa (Maddon et al., 1986; Lasky et al., 1987).



**Figura 5.** Representação esquemática da seqüência da proteína gp120, mostrando as regiões constantes (C) e variáveis (V) da proteína e dois sítios de ligação ao CD4 (■), um localizado na região C1 e o outro na região C4.

Fonte: Kropelin et al., 1998.

## **1.2.4 Vacinação contra o HIV**

Na atualidade, dentre as vacinas virais licenciadas para utilização em humanos se incluem as vacinas baseadas em vírus atenuados, vírus inativados e vacinas de subunidades protéicas. Estes métodos não têm produzido uma vacina efetiva contra o HIV. As vacinas baseadas em vírus atenuados têm tido bons resultados de proteção em primatas não humanos, mas uma vacina deste tipo seria de alto risco, devido à possível reversão do agente vacinal. As vacinas baseadas em vírus inativado não se mostraram eficientes na indução de uma resposta imune protetora. Já a imunização com a glicoproteína gp120, apesar de induzir uma ótima resposta humoral, gera anticorpos que não mostraram alto poder de neutralização. Assim, os métodos tradicionais de desenvolvimento de vacinas, que tiveram sucesso no passado contra outros vírus, não têm se mostrado eficientes para o HIV (Robinson, 2007; Letvin, 2006). É necessário um novo tipo de vacina para controlar a epidemia de HIV.

### **1.2.4.1 Resposta imune e controle da infecção pelo HIV**

Apesar da quantidade de dados que apóiam a importância dos anticorpos na prevenção das infecções virais, a percepção sobre o papel dos anticorpos na prevenção da infecção pelo HIV-1 tem variado muito com o tempo. Em meados dos anos 80, no início da epidemia de AIDS, acreditava-se que a indução de uma resposta de anticorpos seria suficiente para conferir proteção contra a infecção. Apesar disso, estudos clínicos no início dos anos 90 confirmaram que as respostas de anticorpos neutralizantes, induzidas mediante a imunização com gp120 monomérica, não foram suficientes na prevenção ou controle da infecção pelo HIV. Portanto, o foco vacinal mudou da indução de anticorpos neutralizantes para a indução de imunidade celular. Estudos pré-clínicos iniciais estabeleceram a correlação entre uma potente atividade de linfócitos citotóxicos com uma reduzida carga viral. Apesar disso, dados obtidos de estudos em macacos Rhesus sugeriram que as respostas celulares baseadas em um único epítipo podem não ser suficientes no controle da replicação viral. Na atualidade, acredita-se que seja necessária a indução de uma resposta tanto humoral quanto celular para alcançar a proteção máxima (Zolla-Pazner, 2004; Srivastava, Ulmer e Barnett, 2005). Esta idéia também está apoiada pelas características da transmissão do HIV. Devido ao fato de que o vírus é transmitido tanto como vírus livre ou como vírus associado a células, a sua contenção requer mecanismos imunes que atuem tanto em partículas virais extracelulares quanto intracelulares. Como o vírus livre somente pode ser eliminado mediante a ligação de anticorpos neutralizantes, enquanto o vírus associado a células é eliminado mediante respostas



mediadas por células, uma vacina efetiva deverá induzir ambos os tipos de resposta para conferir proteção contra o HIV (Letvin, 2006; Santra et al., 2005).

Por outro lado, o HIV é transmitido tanto pelo contato sexual quanto hematologicamente, neste caso através de agulhas ou produtos sanguíneos contaminados. Assim, o vírus pode iniciar a infecção atravessando uma barreira mucosa ou por entrada direta numa célula da linhagem monócito/macrófago ou da linhagem T no sangue periférico. Então, é razoável assumir que uma vacina efetiva contra o HIV deva induzir respostas imunes de mucosa e sistêmicas para prover uma defesa efetiva contra a infecção (Letvin, 2006; Santra et al., 2005).

#### **1.2.4.2 Anticorpos neutralizantes do HIV**

As glicoproteínas do envelope do HIV-1 são o único foco das vacinas baseadas na produção de anticorpos simplesmente porque são as únicas proteínas virais expostas no exterior da partícula viral, e portanto, as únicas capazes de gerar anticorpos neutralizantes (Eggink, Melchers e Sanders, 2007). Várias características virais limitam a produção de anticorpos neutralizantes num indivíduo infectado. Em primeiro lugar, a resposta de anticorpos está direcionada aos domínios variáveis da gp120, sendo que a maioria dos anticorpos neutralizantes é específica para o domínio V3 da proteína gp120 (Luciw, 1996), o que facilita o escape viral. Outro fator é a produção de formas não funcionais e altamente imunogênicas das proteínas de superfície, as quais funcionam como armadilhas para o sistema imune. Estas proteínas induzem a produção de anticorpos que não são neutralizantes porque não reconhecem as proteínas de superfície quando estão dispostas num trímero funcional. Por último, a presença de um escudo glicoproteico na superfície da gp120 limita a produção de anticorpos neutralizantes (Eggink, Melchers e Sanders, 2007; Karlsson Hedestam et al., 2008).

Têm sido identificados alguns anticorpos capazes de neutralizar isolados virais diversos. Dentre eles, dois estão dirigidos contra a gp41 (2F5 e 4E10) e outros dois estão dirigidos contra a gp120 (2G12 e b12). Duas propriedades são importantes para que um anticorpo neutralize múltiplas cepas virais. Primeiro, ele deve ligar-se ao trímero funcional. Segundo, ele deve ligar-se a uma região conservada que esteja presente e acessível em diversos isolados virais primários (Eggink, Melchers e Sanders, 2007). O anticorpo IgGb12 (Burton et al., 1994) é um anticorpo que cumpre com estes requisitos, ao ligar-se ao sítio de ligação à CD4, bloqueando a interação entre CD4 e gp120 (Roben et al., 1994; Zwick et al.,

2003). Esta propriedade provavelmente não seja tão importante *per se*, já que se acredita que qualquer anticorpo que se ligue ao trimero funcional seja capaz de neutralizar simplesmente através da presença da molécula de imunoglobulina, que é volumosa. Apesar disso, como todos os vírus necessitam de CD4 para entrar na célula, o sítio de ligação a CD4 é um dos poucos sítios no trimero de gp120 que está conservado nas diferentes cepas de HIV-1 (Eggink, Melchers e Sanders, 2007). O anticorpo IgGb12 é considerado atualmente o anticorpo mais potente e amplamente neutralizante do vírus (Pantophlet et al., 2006).

A importância dos anticorpos na proteção contra a infecção pelo HIV é revelada em experimentos de imunização passiva utilizando anticorpos neutralizantes. Emini e colaboradores (1992) mostraram que a administração de um anticorpo específico para o domínio V3 da proteína gp120 protegeu chimpanzés da infecção pelo HIV. Mascola e colaboradores (1999) mostraram em macacos *Rhesus* que a administração de um coquetel de anticorpos neutralizantes protegeu macacos do desafio com um vírus quimérico símio/humano (SHIV). Apesar disso, a proteção contra a infecção nestes modelos experimentais tem requerido níveis de anticorpos circulantes muito altos para serem induzidos pelas estratégias tradicionais de vacinação (Letvin, 2006).

Para conseguir prevenir a infecção pelo HIV através de uma vacina, esta deve induzir anticorpos capazes de neutralizar uma grande variedade de isolados virais. Para tanto, seria necessária a produção de um imunógeno capaz de induzir uma resposta de anticorpos com um poder de neutralização amplo (Letvin, 2006). Diversas estratégias estão sendo exploradas com essa finalidade, como a utilização de trimeros em forma nativa das proteínas da superfície viral como imunógenos. Outra estratégia em estudo é a imunização com complexos gp120/CD4. Esta estratégia está baseada em que após a interação com o receptor CD4, ocorrem mudanças conformacionais na gp120 que expõem novos epítomos sensíveis à neutralização por anticorpos. Por ultimo, também estão em estudo a introdução de modificações na gp120 para a indução de respostas de anticorpos contra regiões conservadas da proteína (Srivastava, Ulmer e Barnett, 2005).

#### **1.2.4.3 Vacinas para a indução de resposta celular contra HIV**

Embora os anticorpos neutralizantes contribuam com a eliminação do vírus (*clearance*) o controle imune do HIV-1 depende da imunidade celular. Células CD8<sup>+</sup> de um indivíduo infectado podem inibir a replicação do HIV-1 ou do SIV em células CD4<sup>+</sup> autólogas. A contenção inicial da replicação destes vírus em indivíduos com infecção aguda

está associada temporalmente à aparição de uma resposta específica de linfócitos CD8<sup>+</sup>, e níveis elevados destas células no sangue estão associados a um *status* clínico favorável em indivíduos com infecção crônica. Além disso, em macacos com depleção de células CD8<sup>+</sup> não existe controle da replicação viral na infecção primária, o que leva os animais a óbito após uma doença de progressão rápida. Todas estas evidencias sugerem que uma vacina efetiva deva induzir uma potente resposta celular (Letvin, 2006).

Para a indução de uma resposta celular contra o HIV, têm sido utilizadas 4 estratégias: 1) Imunização com vetores virais; 2) Imunização com vacinas de DNA; 3) Administração de proteínas ou peptídeos com adjuvantes; 4) A combinação de duas ou mais modalidades de administração de antígenos em protocolos de imunização *prime/boost* (Robinson, 2007).

A principal vantagem da utilização de vetores virais é a alta eficiência de administração do antígeno vacinal dentro das células. Além disso, eles podem prover sinais para ativação do sistema imune. Um inconveniente destes vetores é que em alguns casos, a expressão do antígeno vacinal deve competir com a expressão dos antígenos do vetor vacinal. Além disso, para muitos vetores existe imunidade prévia, o que restringe a eficácia da imunização. Essencialmente, todos os sistemas virais têm sido utilizados no desenvolvimento de vacinas contra o HIV. Os principais vetores utilizados até o momento são os baseados no sorotipo 5 de Ad e no vírus vaccinia (Robinson, 2007).

As vacinas de DNA consistem apenas em um plasmídeo bacteriano que possui clonado o gene de interesse vacinal, o qual está submetido ao controle de seqüências regulatórias de células de mamífero. A utilização destas vacinas tem como grande vantagem a expressão exclusiva do antígeno vacinal, o que resulta numa resposta imune altamente focalizada. Apesar da utilização deste sistema ser limitada pela dificuldade de entrada do DNA nas células do organismo imunizado (Gurunathan, Klinman e Seder, 2000), os resultados de imunização com DNA têm mostrado a indução de robustas respostas imunes em animais de laboratório. No entanto, essas respostas foram menos efetivas em ensaios clínicos em humanos. Portanto, existe uma pesquisa intensa para encontrar adjuvantes que aumentem a imunogenicidade destas vacinas. A imunização com vacinas de DNA associadas a sais de alumínio convencionais, por exemplo, tem mostrado grande eficácia no aumento da resposta ao antígeno vacinal (Ulmer et al., 1999; Rosado-Vallado et al., 2005; Greenland e Letvin, 2007).

A imunização com proteínas e peptídeos na presença de adjuvantes tem tido algum sucesso na indução de respostas de células T. Apesar disso, a eficiência deste sistema é muito

baixa, devido à incapacidade de apresentação desses antígenos em forma apropriada para a geração de uma reposta celular robusta.

As melhores respostas de células T tem sido induzidas através de estratégias *prime/boost*, que utilizam um vetor vacinal na primeira imunização e um vetor diferente na dose seguinte. A combinação de uma dose inicial de DNA seguida por um *boost* com Ad5 tem sido utilizada com muita frequência. Nesta estratégia, o primeiro vetor não induz uma resposta imune contra o segundo vetor de imunização. Portanto, há uma imunidade pré-existente mínima contra o segundo vetor, não impedindo a estimulação das células de memória que foram geradas na imunização com o primeiro vetor. O regime vacinal heterólogo DNA/Ad5 foi utilizado com sucesso em macacos, onde a imunização com vetores expressando proteínas do envelope viral tem se mostrado protetora (Letvin et al, 2004; Mascola et al., 2005).

Em humanos a imunização com vetores adenovirais expressando antígenos do HIV não tem mostrado bons resultados. Recentemente, um ensaio clínico da Indústria Farmacêutica Merck, onde eram administrados vetores adenovirais expressando diversos antígenos de HIV, foi interrompido. A análise dos indivíduos vacinados revelou que a vacina não foi capaz de proteger contra a infecção contra o HIV. Análises posteriores mostraram a possibilidade de que em indivíduos com imunidade pré-existente contra o vetor vacinal, a vacina tenha aumentado a susceptibilidade à infecção pelo vírus (Ledford, 2007; Cohen, 2007).

### **1.3 Expressão de proteínas em sistemas baculovirais**

Os vetores de expressão baculovirais provêm um sistema confiável e versátil para a produção de proteínas recombinantes em células de inseto. Embora existam muitos isolados de baculovírus, o membro protótipo da família dos *Baculoviridae*, *Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus* (AcMNPV) é o mais utilizado. Este vírus pode ser propagado com facilidade em varias linhagens celulares provenientes de insetos, tais como *Spodoptera frugiperda* (*Sf*), *Trichoplusia ni* (*Tn*) entre outras. Nestas células, os genes virais são expressos nas fases precoce, tardia e muito tardia. Os genes precoces e tardios estão envolvidos na produção de partículas virais para a infecção de novas células. Já os genes muito tardios, que codificam para as proteínas polyhedrina e p10, são requeridos para a produção dos corpúsculos de oclusão, que estão envolvidos na transmissão viral entre hospedeiros distintos. Estes genes estão sob o controle de promotores fortes, e podem ser

eliminados do genoma viral sem afetar a produção de partículas infecciosas. Assim, seqüências exógenas podem substituir esses genes virais, possibilitando sua expressão em células de inseto (Possee, 1997).

A estratégia clássica utilizada para isolar vetores de expressão baculovirais consiste na construção de um plasmídeo no qual o gene de interesse esteja clonado a 3' do promotor do gene da polyhedrina. Em seguida, via recombinação homóloga, o plasmídeo é utilizado para introduzir o novo gene no genoma viral, tomando o lugar do gene da polyhedrina. O vírus recombinante resultante pode infectar células de inseto e expressar o gene de interesse sob controle do promotor da polyhedrina. A força deste promotor é uma das principais vantagens dos vetores de expressão baculovirais, já que permite a síntese de grandes quantidades de proteína no transcurso da infecção viral. Outra grande vantagem da utilização de baculovírus recombinantes na produção de proteínas é que as células de inseto possuem a maioria das atividades de processamento de proteínas associadas aos organismos eucariontes superiores e, portanto, podem produzir proteínas que são mais autênticas que as produzidas em sistemas procarióticos (Jarvis, Weinkauff e Guarino, 1996; Jones e Morikawa, 1996; Kost, Condreay e Jarvis, 2005).

#### **1.4 Domínio C4 da glicoproteína gp120 e Fibra adenoviral**

Num trabalho prévio de nosso grupo (Zerbini, Libermann e Ventura, 2002), o domínio C4 da proteína gp120 do vírus HIV foi introduzido dentro da região globular da fibra adenoviral. A finalidade dessa modificação foi a de produzir um novo vetor adenoviral capaz de infectar células CD4 positivas. Mediante uma estratégia de PCR externa, a região codificante do gene da fibra compreendida entre os nucleotídeos 1236 e 1368 foi substituída pela região codificante do domínio C4. Assim, retiraram-se os aa compreendidos entre as posições 412 e 458 da proteína fibra, os quais foram substituídos pela região compreendida entre os aa 383 e 426 da glicoproteína gp120 (HIV-1, cepa HXB2). A região substituída da proteína fibra apresenta um perfil de hidropaticidade similar ao do domínio C4. De acordo com o modelo tridimensional da fibra adenoviral (van Raaij et al., 1999a) esta região está composta pelas alças AB, BC e CD, assim como por duas folhas  $\beta$  denominadas V, e contem aa que são conservados nos Ad. Segundo esse modelo, a alça AB estaria participando das interações entre a fibra adenoviral e o receptor CAR. Zerbini, Libermann e Ventura (2002) mostraram que apesar de que a substituição realizada na fibra incluir parte da alça AB, a

ligação da fibra com o receptor CAR não se viu totalmente comprometida. Assim, esta região poderia ser alvo de modificações para a introdução de seqüências exógenas.

De acordo com Novelli e Boulanger (1991), que realizaram estudos de deleção na fibra adenoviral, a região da proteína encarregada da trimerização mapeia no extremo C-terminal, entre os aa 541 e 582. Em concordância com esse dado, Zerbini, Libermann e Ventura (2002), demonstraram que a incorporação do domínio C4 na região globular da fibra não interferiu com a trimerização da proteína. Os autores também mostraram que o domínio C4 estava na conformação correta e acessível aos anticorpos no contexto do Ad quimérico. Para tanto, foi realizado um ensaio de imunoprecipitação utilizando o anticorpo monoclonal IgGb12, que como já foi mencionado anteriormente é específico para o domínio C4 e é neutralizante do vírus HIV.

Considerando as propriedades imunológicas da fibra adenoviral, e que o domínio C4 se encontra acessível aos anticorpos no contexto desta proteína, é muito atraente a idéia de utilização desta proteína quimérica como imunógeno para a produção de anticorpos específicos para a glicoproteína gp120, com potencial de neutralização de amplo espectro.

## 2 CONCLUSÕES

- ✓ Foram obtidos três vetores plasmídicos portando os genes RGF-C4, RGFA e gp120. Não foi possível determinar a expressão desses genes *in vitro*.
- ✓ A partir dos vetores plasmídicos foram gerados três vetores adenovirais portando os genes de interesse. Também não foi possível determinar a expressão dos genes *in vitro*.
- ✓ Os dados obtidos na imunização com os vetores plasmídicos mostraram a indução de anticorpos anti-C4 pelo vetor pShuttle RGF-C4. A melhor resposta obtida foi quando esse vetor foi administrado após o vetor pShuttle gp120.
- ✓ A utilização da proteína CTB-C4 não se mostrou apropriada para a determinação da resposta celular nos animais imunizados. Ainda assim, os dados obtidos sugeriram a produção de níveis mais elevados de IFN- $\gamma$  em esplenócitos de animais imunizados com pShuttle120/pShuttleRGF-C4.
- ✓ Foram obtidos três vetores baculovirais expressando as proteínas RGF-C4, RGFA e gp120.
- ✓ A proteína RGFA foi purificada com sucesso e demonstramos a funcionalidade da mesma.
- ✓ A proteína RGF-C4 foi expressa em forma insolúvel e as estratégias adotadas para o *refolding* não produziram uma proteína funcional. Mostramos dados que sugerem a degradação da proteína e a possível expressão de uma versão de menor tamanho.
- ✓ A imunização com a proteína RGF-C4 extraída de gel de poliacrilamida mostrou a indução de anticorpos com a capacidade de reconhecer a gp120.
- ✓ A imunização com a proteína RGF-C4 purificada em coluna de níquel, induziu anticorpos anti-C4.
- ✓ A imunização com a proteína RGFA induziu anticorpos contra o epítipo V5.
- ✓ Os dados obtidos sugerem que a exposição de epítipos na RGFA pode ser uma boa estratégia para induzir uma resposta imune epítipo específica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bangari DS, Mittal SK. Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine*. 2006 Feb 13;24(7):849-62.
- Barouch DH, Nabel GJ. Adenovirus vector-based vaccines for human immunodeficiency virus type 1. *Hum Gene Ther*. 2005 Feb;16(2):149-56.
- Berk AJ. Adenoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2395-436. 2 vol.
- Burton DR, Pyati J, Koduri R, Sharp SJ, Thornton GB, Parren PW, Sawyer LS, Hendry RM, Dunlop N, Nara PL. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science*. 1994 Nov 11;266(5187):1024-27.
- Campos SK, Barry MA. Current advances and future challenges in Adenoviral vector biology and targeting. *Curr Gene Ther*. 2007 Jun;7(3):189-204.
- Chroboczek J, Ruigrok RW, Cusack S. Adenovirus fiber. *Current Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;199 (Pt 1):163-200.
- Cohen J. AIDS research. Did Merck's failed HIV vaccine cause harm? *Science*. 2007 Nov 16;318(5853):1048-49.
- Curiel DT. Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;886:158-71.
- Davison AJ, Benko M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol*. 2003 Nov;84(Pt 11):2895-908.
- de Souza AP, Haut LH, Silva R, Ferreira SI, Zanetti CR, Ertl HC, Pinto AR. Genital CD8+ T cell response to HIV-1 gag in mice immunized by mucosal routes with a recombinant simian adenovirus. *Vaccine*. 2007;25:109-16.
- Douglas JT, Miller CR, Kim M, Dmitriev I, Mikheeva G, Krasnykh V, Curiel DT. A system for the propagation of adenoviral vectors with genetically modified receptor specificities. *Nat Biotechnol*. 1999 May;17(5):470-5.
- Dourado I, Milroy CA, Mello MA, Ferraro GA, Castro-Lima Filho H, Guimarães ML, Morgado MG, Teixeira MG, Barreto ML, Galvão-Castro B. HIV-1 seroprevalence in the general population of Salvador, Bahia State, Northeast Brazil. *Cad Saude Publica*. 2007 Jan;23(1):25-32.
- Eggink D, Melchers M, Sanders RW. Antibodies to HIV-1: aiming at the right target. *Trends Microbiol*. 2007 Jul;15(7):291-4.
- Emini EA, Schleif WA, Nunberg JH, Conley AJ, Eda Y, Tokiyoshi S, Putney SD, Matsushita S, Cobb KE, Jett CM. Prevention of HIV-1 infection in chimpanzees by gp120 V3 domain-specific monoclonal antibody. *Nature*. 1992 Feb 20;355(6362):728-30.



Freed EO, Martin MA. HIVs and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2107-85. 2 vol.

Gibson M, Tiensiwakul P, Khoobyarian N. Adenovirus fiber protein (FP) functions as a mitogen and an adjuvant. *Cell Immunol*. 1982 Nov 1; 73(2): 397-403.

Greenland JR, Letvin NL. Chemical adjuvants for plasmid DNA vaccines. *Vaccine*. 2007 May 10;25(19):3731-41.

Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:927-74.

Goff, SP. Retroviridae: The Retroviruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2000-69. 2 vol.

Gonçalves MA, de Vries AA. Adenovirus: from foe to friend. *Rev Med Virol*. 2006;16(3):167-86.

Henry LJ, Xia D, Wilke ME, Deisenhofer J, Gerard RD. Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in *Escherichia coli*. *J Virol*. 1994 Aug;68(8):5239-46.

Hilleman MR, Werner JH. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1954;85:183-8.

Jarvis DL, Weinkauff C, Guarino LA. Immediate-early baculovirus vectors for foreign gene expression in transformed or infected insect cells. *Protein Expr Purif*. 1996 Sep;8(2):191-203.

Jones I, Morikawa Y. Baculovirus vectors for expression in insect cells. *Curr Opin Biotechnol*. 1996 Oct;7(5):512-6.

Karlsson Hedestam GB, Fouchier RA, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, Wyatt RT. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Feb;6(2):143-55.

Koizumi N, Mizuguchi H, Utoguchi N, Watanabe Y, Hayakawa T. Generation of fiber-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J Gene Med*. 2003 Apr;5(4):267-76.

Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 2005 May;23(5):567-75.

Krasnykh VN, Mikheeva GV, Douglas JT, Curiel DT. Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J Virol*. 1996 Oct;70(10):6839-46.

Krasnykh V, Dmitriev I, Mikheeva G, Miller CR, Belousova N, Curiel DT. Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J Virol*. 1998 Mar;72(3):1844-52.

Krasnykh VN, Douglas JT, van Beusechem VW. Genetic targeting of adenoviral vectors. *Mol Ther.* 2000 May;1(5 Pt 1):391-405.

Krause A, Joh JH, Hackett NR, Roelvink PW, Bruder JT, Wickham TJ, Kovesdi I, Crystal RG, Worgall S. Epitopes expressed in different adenovirus capsid proteins induce different levels of epitope-specific immunity. *J Virol.* 2006 Jun;80(11):5523-30.

Kröpelin M, Süsal C, Daniel V, Opelz G. Inhibition of HIV-1 gp120 binding to CD4+ T cells by monoclonal antibodies directed against the gp120 C1 or C4 region. *Immunol Lett.* 1998 Aug;63(1):19-25.

Kurachi S, Koizumi N, Sakurai F, Kawabata K, Sakurai H, Nakagawa S, Hayakawa T, Mizuguchi H. Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon. *Gene Ther.* 2007a Feb;14(3):266-74.

Kurachi S, Tashiro K, Sakurai F, Sakurai H, Kawabata K, Yayama K, Okamoto H, Nakagawa S, Mizuguchi H. Fiber-modified adenovirus vectors containing the TAT peptide derived from HIV-1 in the fiber knob have efficient gene transfer activity. *Gene Ther.* 2007b Aug;14(15):1160-5.

Lasky LA, Nakamura G, Smith DH, Fennie C, Shimasaki C, Patzer E, Berman P, Gregory T, Capon DJ. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell.* 1987 Sep 11; 50(6): 975-85.

Ledford H. HIV vaccine may raise risk. *Nature.* 2007 Nov 15;450(7168):325.

Letvin NL, Huang Y, Chakrabarti BK, Xu L, Seaman MS, Beaudry K, Koriath-Schmitz B, Yu F, Rohne D, Martin KL, Miura A, Kong WP, Yang ZY, Gelman RS, Golubeva OG, Montefiori DC, Mascola JR, Nabel GJ. Heterologous envelope immunogens contribute to AIDS vaccine protection in rhesus monkeys. *J Virol.* 2004 Jul;78(14):7490-7.

Letvin NL. Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat Rev Immunol.* 2006 Dec;6(12):930-9.

Louis N, Fender P, Barge A, Kitts P, Chroboczek J: Cell-binding domain of adenovirus serotype 2 fiber. *J Virol.* 1994;68:4104-6.

Luciw PA. Human immunodeficiency viruses and their replication. In: Fields BM, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996, p. 1881-952. 2 vol.

Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and brain. *Cell.* 1986 Nov 7; 47(3):333-48.

Martínez-Flores F, Jiménez-Orozco FA, Villegas-Castrejón H. Biología molecular de los vectores adenovirales. *Cir Cir.* 2006 Nov-Dec;74(6):483-93.

Mascola JR, Lewis MG, Stiegler G, Harris D, VanCott TC, Hayes D, Louder MK, Brown CR, Sapan CV, Frankel SS, Lu Y, Robb ML, Katinger H, Birx DL. Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J Virol.* 1999 May;73(5):4009-18.

Mascola JR, Sambor A, Beaudry K, Santra S, Welcher B, Louder MK, Vancott TC, Huang Y, Chakrabarti BK, Kong WP, Yang ZY, Xu L, Montefiori DC, Nabel GJ, Letvin NL. Neutralizing antibodies elicited by immunization of monkeys with DNA plasmids and recombinant adenoviral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J Virol.* 2005 Jan;79(2):771-9.

Michael SI, Hong JS, Curiel DT, Engler JA. Addition of a short peptide ligand to the adenovirus fiber protein. *Gene Ther.* 1995 Nov;2(9):660-8.

Novelli A, Boulanger PA. Deletion analysis of functional domains in baculovirus-expressed adenovirus type 2 fiber. *Virology.* 1991 Nov;185(1):365-76.

Pantophlet R, Burton DR. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:739-69.

Pinto AR, Fitzgerald JC, Gao GP, Wilson JM, Ertl HC. Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen upon oral immunization of mice with a simian E1-deleted adenoviral vector. *Vaccine.* 2004;22:697-703.

Poignard P, Saphire E O, Parren P W, Burton D R. GP 120: Biologic Aspects of Structural Features. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 253-74.

Possee RD. Baculoviruses as expression vectors. *Curr Opin Biotechnol.* 1997 Oct;8(5):569-72.

Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet.* 2004 Jan;5(1):52-61.

Roben P, Moore JP, Thali M, Sodroski J, Barbas CF 3rd, Burton DR. Recognition properties of a panel of human recombinant Fab fragments to the CD4 binding site of gp120 that show differing abilities to neutralize human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1994 Aug;68(8):4821-8.

Robinson HL. HIV/AIDS vaccines: 2007. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Dec;82(6):686-93.

Rosado-Vallado M, Mut-Martin M, García-Miss Mdel R, Dumonteil E. Aluminium phosphate potentiates the efficacy of DNA vaccines against *Leishmania mexicana*. *Vaccine.* 2005 Nov 16;23(46-47):5372-9.

Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1953;84:570-3.

Rux JJ, Burnett RM. Type-specific epitope locations revealed by X-ray crystallographic study of adenovirus type 5 hexon. *Mol Ther.* 2000;1(1):18-30.

Rux JJ, Burnett RM. Adenovirus structure. *Hum Gene Ther.* 2004;15(12):1167-76.

Santra S, Seaman MS, Xu L, Barouch DH, Lord CI, Lifton MA, Gorgone DA, Beaudry KR, Svehla K, Welcher B, Chakrabarti BK, Huang Y, Yang ZY, Mascola JR, Nabel GJ, Letvin NL. Replication-defective adenovirus serotype 5 vectors elicit durable cellular and humoral immune responses in nonhuman primates. *J Virol.* 2005;79(10):6516-22.

Srivastava IK, Ulmer JB, Barnett SW. Role of neutralizing antibodies in protective immunity against HIV. *Hum Vaccin.* 2005 Mar-Apr;1(2):45-60.

Tamanini A, Nicolis E, Bonizzato A, Bezzetti V, Melotti P, Assael BM, Cabrini G. Interaction of Adenovirus Type 5 Fiber with the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Activates Inflammatory Response in Human Respiratory Cells. *J Virol.* 2006 Nov;80(22):11241-54.

Ulmer JB, DeWitt CM, Chastain M, Friedman A, Donnelly JJ, McClements WL, Caulfield MJ, Bohannon KE, Volkin DB, Evans RK. Enhancement of DNA vaccine potency using conventional aluminum adjuvants. *Vaccine.* 1999 Aug 20;18(1-2):18-28

van Raaij MJ, Louis N, Chroboczek J, Cusack S. Structure of the human adenovirus serotype 2 fiber head domain at 1.5 Å resolution. *Virology.* 1999a Sep 30;262(2):333-43.

van Raaij MJ, Mitraki A, Lavigne G, Cusack S. A triple beta-spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein. *Nature.* 1999b Oct 28;401(6756):935-8.

Zolla-Pazner S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat Rev Immunol.* 2004 Mar;4(3):199-210.

Zubieta C, Schoehn G, Chroboczek J, Cusack S. The structure of the human adenovirus 2 penton. *Mol Cell.* 2005 Jan 7;17(1):121-35.

Wang D, Raja NU, Trubey CM, Juompan LY, Luo M, Woraratanadharm J, Deitz SB, Yu H, Swain BM, Moore KM, Pratt WD, Hart MK, Dong JY. Development of a cAdVax-based bivalent ebola virus vaccine that induces immune responses against both the Sudan and Zaire species of Ebola virus. *J Virol.* 2006;80:2738-46.

Wickham TJ, Tzeng E, Shears LL 2nd, Roelvink PW, Li Y, Lee GM, Brough DE, Lizonova A, Kovesdi I. Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol.* 1997 Nov;71(11):8221-9.

Worgall S, Krause A, Rivara M, Hee KK, Vintayen EV, Hackett NR, Roelvink PW, Bruder JT, Wickham TJ, Kovesdi I, Crystal RG. Protection against *P. aeruginosa* with an adenovirus vector containing an OprF epitope in the capsid. *J Clin Invest.* 2005 May;115(5):1281-9.

World Health Organization. Aids Epidemic Update. Geneva: UNAIDS; Dec. 2007.

Xia D, Henry LJ, Gerard RD, Deisenhofer J. Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution. *Structure.* 1994;2:1259-70.

Zerbini LF, Libermann TA, Ventura AM. Insertion of an exogenous domain in the adenovirus type 2 fiber globular region. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Aug 30;296(4):897-903.  
Zolla-Pazner S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat Rev Immunol.* 2004 Mar;4(3):199-210.

Zubieta C, Schoehn G, Chroboczek J, Cusack S. The structure of the human adenovirus 2 penton. *Mol Cell.* 2005 Jan 7;17(1):121-35.

Zwick MB, Parren PW, Saphire EO, Church S, Wang M, Scott JK, Dawson PE, Wilson IA, Burton DR. Molecular features of the broadly neutralizing immunoglobulin G1 b12 required for recognition of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol.* 2003 May;77(10):5863-76.