FRANCISCO ANDRÉ MARQUES DE OLIVEIRA CARIRI

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

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

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

São Paulo
2014

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 O vírus HIV

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

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

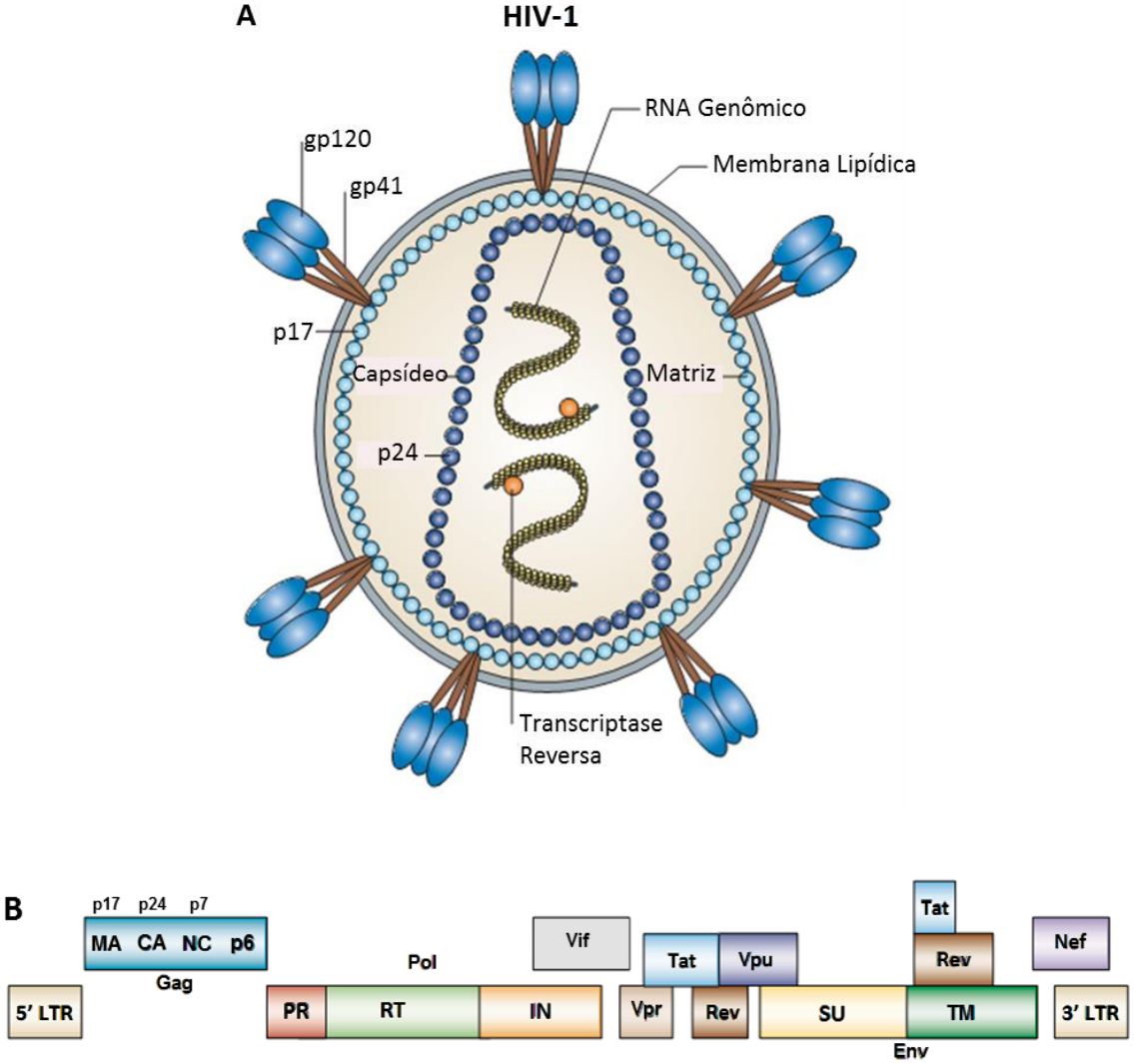

Figura 1 – Representação esquemática do HIV-1 e do seu genoma. A – O envelope viral apresenta complexos triméricos gp120–gp41 embebidos na membrana; A proteína transmembrana gp41 interage com a matriz (formada pela proteína p17 – em azul claro); O capsídeo (formada pela proteína p24 – em azul escuro)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

1.2 Antígenos do HIV utilizados em vacinas

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

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

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

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

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

1.3 Vacinas profiláticas anti-HIV

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4 O vírus HSV

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

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

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

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

1.5 Vacinas anti-HSV

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

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

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

1.6 A Glicoproteína D e seu efeito imunoestimulador

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

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

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

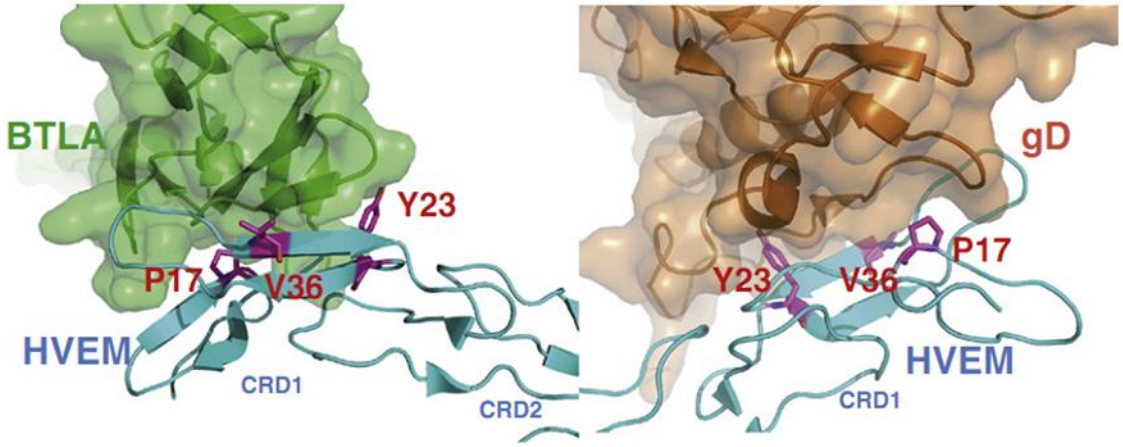

Figura 2 – Estrutura dos Complexos BTLA/HVEM (esquerda) e gD/HVEM (direita) obtida por cristalografia. Representação da superfície do BTLA (em verde – lado esquerdo) e da gD (em marrom – lado direito). A figura mostra o modelo do HVEM (em azul) evidenciando os três resíduos de aminoácidos P17, Y23 e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

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

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

1.7 Vacina de DNA

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

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

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

1.8 Aumento da imunogenicidade da vacina de DNA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS[1]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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