

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Victória Alves Santos Lunardelli

**DIRECIONAMENTO *IN VIVO* DE EPÍTOPOS DO HIV PARA CÉLULAS
DENDRÍTICAS COMO NOVA ESTRATÉGIA VACINAL**

São Paulo

2016

Victória Alves Santos Lunardelli

**DIRECIONAMENTO *IN VIVO* DE EPÍTOPOS DO HIV PARA CÉLULAS
DENDRÍTICAS COMO NOVA ESTRATÉGIA VACINAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Mauro Fantini Nogueira Martins e co-orientado pela Prof^a. Dr^a. Daniela Santoro Rosa, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2016

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Lunardelli, Victoria Alves Santos

Direcionamento *in vivo* de epítomos do HIV para células dendríticas como nova estratégia vacinal / Victoria Alves Santos Lunardelli. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2016.

91 p.

Orientação de Mauro Fantini Nogueira Martins

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2016.

1. Anticorpos monoclonais 2. Células dendríticas 3. DNA 4. HIV 5. Mapeamento de epítomos 6. Vacinas I. Martins, Mauro Fantini Nogueira II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 614.47

Victória Alves Santos Lunardelli

**DIRECIONAMENTO *IN VIVO* DE EPÍTOPOS DO HIV PARA CÉLULAS
DENDRÍTICAS COMO NOVA ESTRATÉGIA VACINAL**

São Paulo, 24 de outubro de 2016.

Prof. Dr. Mauro Fantini Nogueira Martins

Prof^a. Dr^a. Daniela Santoro Rosa

Prof^a. Dr^a. Beatriz Helena Pizarro De Lorenzo

Aos meus pais, Ricardo e Lucimar e ao meu irmão, Rafael,

Pela torcida e incentivo. Por darem inúmeros motivos de serem admirados.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Mauro Fantini Nogueira Martins por ser mais que um simples professor, por ser um incrível mestre e palhaço, por demonstrar amor pela imunologia e conciliar prazer e dedicação pelo que faz. Agradeço por sempre me deixar intrigada em suas aulas, deixando claro que a imunologia é uma ciência sem respostas claras, de descobertas, o que me fez querer ser pesquisadora.

Da mesma forma, agradeço a minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Daniela Santoro Rosa, que foi muito mais do que uma co-orientadora. Agradeço por me inspirar todos os dias a querer ser pelo menos um terço da pesquisadora que é. Agradeço também por me ensinar o bê-a-bá da ciência e de sempre estar presente para socorrer quando a pecinha é o problema. Por último, agradeço por tornar o ambiente de trabalho sempre agradável com sua amizade, comidas gostosas e cachorros.

Aos meus amigos de laboratório, por toda a ajuda tanto em por a mão na massa quanto intelectual, que foram de extrema importância para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho. Em especial a Juliana (Juju), que me ensinou um pouco de tudo, desde como pipetar até em como planejar um experimento, sempre com muito divertimento. É claro, por ser uma grande amiga. Muito obrigada também Edgar, Marcela, Marcelo e Fernanda.

Ao Giancarlo, pelo companheirismo, amor e amizade. Por compartilhar toda felicidade e dificuldade durante esses anos. Por ser meu porto seguro.

Aos meus amigos de faculdade, pois esses quatro anos seriam totalmente sem graça sem eles. Por participarem dessa etapa importante da minha vida e fazerem parte do que eu sou hoje. Que essa amizade não acabe por aqui. Muito obrigada Giovanna, Gabriela, Rafaella, Tamara, Evelyn, Gabriel, Rodolfo, Leonardo, Roberto.

Aos Narizes de Plantão por terem me rerepresentado a mim mesma, àquela criança de anos atrás. Pela leveza, sinceridade, carinho e encontros. Pelos 247 anos de aprendizado a serem alcançados.

Aos meus amigos de colégio, que nunca entenderam minhas ausências, mas sempre me amaram do mesmo jeito. Muito obrigada Alessandra, Letícia, Thalita, Tabata, Flávia e Pedro.

Muito obrigada.

“Aja como se o que você faz fizesse diferença, porque faz.”

William James

LUNARDELLI, V.A.S. **Direcionamento *in vivo* de epítomos do HIV para células dendríticas como nova estratégia vacinal.** 2016. 91f. Trabalho de Conclusão de Curso (Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

A epidemia causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é a infecção mais emergente das últimas décadas e, até o momento, não existe uma vacina eficaz disponível. Diversos estudos indicam que anticorpos, linfócitos T (LT) CD4⁺ e CD8⁺ desempenham um papel importante na imunidade contra o HIV. Em relação ao desenvolvimento de vacinas baseadas na indução de imunidade celular, acredita-se que a geração de respostas imunes amplas e funcionalmente relevantes contra epítomos conservados de LT CD4⁺ e CD8⁺, seja um pré-requisito essencial para novos candidatos à vacina. Em estudos prévios, nosso grupo demonstrou que a imunização de camundongos com uma vacina de DNA, codificando epítomos para LT CD4⁺ do HIV-1, foi capaz de induzir resposta específica e ampla de LT CD4⁺ e CD8⁺. Apesar dos resultados obtidos serem bastante promissores, vacinas de DNA apresentam limitada imunogenicidade em humanos. Por esse motivo, diferentes estratégias vêm sendo utilizadas para o desenvolvimento de novos imunógenos. Diversos estudos têm focado no desenvolvimento de vacinas baseadas na capacidade de células dendríticas (DC) em modular as respostas imunes adaptativas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo gerar um anticorpo monoclonal (mAb) quimérico contra um receptor de superfície das DCs (DEC205) em fusão com epítomos do HIV. Para tal, foi produzido um mAb quimérico α DEC205 fusionado a uma sequência de oito epítomos para linfócitos T CD4⁺ do HIV (denominada HIVBr8) e uma vacina de DNA codificando os mesmos epítomos. Em seguida, os mAbs foram submetidos a um ensaio de ligação com células CHO e esplenócitos murinos para verificar a capacidade de ligação destes anticorpos. Ambos se ligaram de maneira dose dependente e específica ao receptor DEC205 em células CHO DEC205⁺ e em células dendríticas CD8 α ⁺. A fim de avaliar a melhor via de imunização, camundongos BALB/c foram imunizados com o mAb α DEC205HIVBr8 pela via subcutânea (S.C.) ou intraperitoneal (I.P.) na presença do adjuvante poly I:C. Os animais imunizados pela via I.P. apresentaram maior número de células produtoras de IFN γ e proliferação de LT CD4⁺ e CD8⁺ específicos quando comparado ao grupo imunizado pela via S.C. Posteriormente, avaliamos o esquema de imunização *prime-boost* heterólogo (DNA/ mAb ou vice-versa). Para tal, os animais foram imunizados com uma dose da vacina de DNA HIVBr8 pela via intramuscular seguida de uma dose de α DEC205HIVBr8 na presença de poly I:C pela via intraperitoneal ou vice-versa. A resposta imune foi comparada aos grupos que receberam duas doses de DNA ou duas doses de mAb (*prime-boost* homólogo). Tanto o grupo que recebeu duas doses de α DEC205HIVBr8 quanto o grupo que recebeu HIVBr8/ α DEC205HIVBr8 apresentaram maior número de células produtoras de IFN γ e maior porcentagem de LT CD4⁺ e CD8⁺ polifuncionais HIV-específicos quando comparados aos demais grupos. Baseados nesses resultados, podemos concluir que o mAb α DEC205HIVBr8 e a vacina de DNA que codifica os mesmos epítomos foram produzidos com sucesso. Além disso, a melhor estratégia vacinal é composta por duas doses de α DEC205HIVBr8 na presença de poly I:C administrados pela via intraperitoneal ou com uma dose de DNA HIVBr8 seguida de uma dose de α DEC205HIVBr8.

Palavras-chave: Anticorpos Monoclonais. Células Dendríticas. DNA. HIV. Mapeamento de Epítomos. Vacinas.

LUNARDELLI, V.A.S. ***In vivo* targeting of HIV epitopes to dendritic cells as a new vaccine strategy**. 2016. 91p. Course Competition Assignment (Biomedicine) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

The epidemic caused by human immunodeficiency virus (HIV) is the most important emerging infection in the last decades and until now, there isn't an effective vaccine against HIV yet. Several studies indicate that antibodies, CD4⁺ and CD8⁺ T cells play a major role in immunity against HIV. In regard to vaccines based on the induction of cellular immunity, it is thought that the induction of broad and functional relevant immune responses against CD4⁺ and CD8⁺ T cell conserved epitopes is an important requirement for new vaccine candidates. In previous studies, our group showed that mice immunization with a DNA vaccine encoding multiple CD4⁺ T cell epitopes from HIV-1 was able to induce broad, polyfunctional and long-term CD4⁺ and CD8⁺ T responses. Although the results obtained with this vaccine formulation are quite promising, DNA vaccines have shown limited immunogenicity in humans. For this reason, in the recent years, different strategies and platforms for immunogens production have been developed. The ability of dendritic cells (DCs) to modulate the adaptive immune responses has also been the focus for vaccine development. In this context, the main goal of this project is to produce a chimeric monoclonal antibody against DC surface receptor (DEC205) fused to the HIV epitopes. To this end, a chimeric mAb α DEC205 fused to a sequence of eight epitopes for CD4⁺ T cells of HIV (HIVBr8) and a DNA vaccine encoding the same epitopes were produced. Then, mAbs were submitted to a binding assay with CHO cells and murine splenocytes to verify the binding capacity of these antibodies. Both bind in a dose dependent and specific way to DEC205 receptor in DEC205⁺ CHO cells and CD8 α ⁺ dendritic cells. In order to assess the best route of immunization, BALB/c mice were immunized with mAb α DEC205HIVBr8 by subcutaneous (S.C.) or intraperitoneally (I.P.) in the presence of poly I:C adjuvant. The animals immunized by the I.P. route had a greater number of IFN γ producing cells and proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ specific T cells when compared to the group immunized via S.C. Later, we evaluated the heterologous prime-boost immunization (DNA/mAb or vice versa). To this end, animals were immunized with one dose of HIVBr8 DNA vaccine by the intramuscular route followed by one dose of α DEC205HIVBr8 in the presence of poly I: C by the intraperitoneal route or vice versa. The immune response was compared to the groups that received two doses of DNA or two doses of mAb (homologous prime-boost). Both groups that received two doses of α DEC205HIVBr8 and group that received HIVBr8/ α DEC205HIVBr8 showed higher number of IFN γ producing T cells and higher percentage of polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ HIV-specific T cells when compared to other groups. Based on these results, we can conclude that mAb α DEC205HIVBr8 and DNA vaccine encoding the same epitopes were successfully produced. Furthermore, the best vaccine strategy consists of two doses of α DEC205HIVBr8 in the presence of poly I:C administered by intraperitoneal route or one dose of DNA HIVBr8 followed by one dose of α DEC205HIVBr8.

Key-words: Monoclonal Antibody. Dendritic Cells. DNA. HIV. Epitope Mapping. Vaccines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Mapa epidemiológico do número de pessoas infectadas pelo HIV-1 no mundo.....	19
Figura 2	– Organização do vírus HIV-1.....	22
Figura 3	– Esquema representativo do ciclo de vida do vírus HIV-1.....	24
Figura 4	– Curso natural da infecção pelo HIV-1.....	26
Figura 5	– Microscopia de fluorescência de linfonodo de camundongo.....	35
Figura 6	– Processamento intracelular de antígenos direcionados para receptores de células dendríticas.....	37
Figura 7	– Esquema representativo da transfecção de células HEK293T para produção dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8.....	45
Figura 8	– Análise da integridade dos plasmídeos pDEC205 e pDEC205HIVBr8 após purificação.....	52
Figura 9	– Análise da de dos plasmídeos pVAX e pVAXHIVBr8 após a purificação.....	53
Figura 10	– Produção dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8.....	54
Figura 11	– Western Blot após purificação dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8.....	55
Figura 12	– Ensaio de ligação dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 a células CHO que expressam os receptores DEC205 ou DCIR2.....	56
Figura 13	– Ensaio de ligação dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 a esplenócitos.....	58
Figura 14	– Número de células produtoras de IFN γ após imunização com os anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 utilizando diferentes vias de administração.....	59
Figura 15	– Avaliação de proliferação celular após imunização com os anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 utilizando diferentes vias de administração.....	60
Figura 16	– Número de células produtoras de IFN γ em esplenócitos de animais imunizados com o anticorpo α DEC205HIVBr8 e/ou a vacina de DNA HIVBr8.....	61
Figura 17	– Avaliação da proliferação celular em animais imunizados com o anticorpo α DEC205HIVBr8 e/ou a vacina de DNA HIVBr8.....	62
Figura 18	– Avaliação do perfil funcional induzido pela imunização com o anticorpo α DEC205HIVBr8 e/ou a vacina de DNA HIVBr8.....	64

LISTA DE FIGURAS APÊNDICE

Figura 1	–	Estratégia de análise para avaliação da ligação dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 a esplenócitos totais.....	71
Figura 2	–	Estratégia de análise para avaliação da proliferação celular e produção de citocinas intracelulares através de ensaio com CFSE.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Ensaio de eficácia concluídos e em andamento para o desenvolvimento de uma vacina contra o HIV.....	31
Tabela 2	–	Sequência de aminoácidos dos epítomos do HIV identificados.....	41
Tabela 3	–	Painel de anticorpos para análise de citometria multiparamétrica.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

2-ME	- 2-mercaptoetanol
ADCC	- Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
AEC	- 3-amino-9-ethyl-carbazole
AIDS	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Alum	- Hidróxido de alumínio
APCs	- Células Apresentadoras de Antígeno
APC	- Alofococianina
ARV	- Drogas Antirretrovirais
BSA	- Albumina Sérica Bovina
CaCl ₂	- Cloreto de Cálcio
CCR5	- C-C Receptor de quimiocina tipo 5
CD	- Cluster de Diferenciação
CFSE	- Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMSP	- Células Mononucleares do Sangue Periférico
CO ₂	- Dióxido de Carbono
Con A	- Concanavalina A
CRFs	- Formas recombinantes circulantes
CS	- Circunsporozoíta
CSP	- Proteína Circunsporozoíta
CTL	- Linfócito T Citotóxico
CXCR4	- CXC Receptor de quimiocinas tipo 4
°C	- Grau centígrado
DC	- Célula dendríticas
DMEM	- Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
<i>E. coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
EDTA	- Ácido Etilenodiaminotetracético
ELIspot	- "Enzyme Immunospot Assay"
FACS	- PBS + 2% de Soro Fetal Bovino
FSC	- <i>Forward Scatter</i> - dispersão frontal da luz
FITC	- Isoticianato de fluoresceína
GALT	- <i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i> – Tecido linfoide associado ao intestino
Gp	- Glicoproteína
HAART	- <i>Higly active antiretrovial therapy</i> - Terapia antirretroviral altamente ativa
HBV	Vírus da Hepatite B

HCl	- Ácido clorídrico
HEK	- Célula Renal Embrionária Humana
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	- Antígeno Leucocitário Humano
HTLV	- Vírus T-Linfotrópico Humano
ICTV	- <i>International Committee on Taxonomy Viruses</i>
IL	- Interleucina
IFN- γ	- Interferon gama
IgG	- Imunoglobulina G
Kb	- Quilobase
KDa	- Quilodalton
KHCO ₃	- Bicarbonato de Potássio
L	- Litro
LAV	- Vírus Associado à Linfadenopatia
LB	- Meio Luria Bertani
LT CD4 ⁺	- Linfócito T CD4 ⁺
LT CD8 ⁺	- Linfócito T CD8 ⁺
M	- Molar
mAb	- Anticorpo Monoclonal
MB	- Macs Buffer
mg	- Miligrama
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
MMR	- <i>Macrophage Mannose Receptor</i> – Receptor de Manose de Macrófago
mRNA	- RNA mensageiro
MOPS	- 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
NaCl	- Cloreto de Sódio
NaOH	- Hidróxido de Sódio
ng	- Nanograma
NH ₄ Cl	- Cloreto de Amônio
nm	- Nanômetro
OMS	- Organização Mundial da Saúde
Pb	- Pares de base
PBS	- Tampão fosfato-salina
PE	- Ficoeritrina

PEI	- Polietilenimina
PerCP	- Clorofilperidina
pH	- Potencial Hidrogeniônico
poly I:C	- Polyinosinic-polycytidylic acid
R10	- Meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino
rcf	- Força centrífuga relativa
RNA	- Ácido Ribonucléico
RNAse	- Ribonuclease
Rpm	- Rotações por Minuto
RPMI	- Meio de Cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	- Transcriptase Reversa
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	- Dodecil Sulfato de Sódio Gel de Poliacrilamida em Eletroforese
SFB	- Soro Fetal Bovino
SIV	- Vírus da Imunodeficiência Símia
SPF	- <i>Specific Pathogen Free</i> – Livre de Agentes Patogênicos
SSC	- <i>Side Scatter</i> - dispersão lateral da luz
SUS	- Sistema Único de Saúde
TLR	- <i>Toll Like Receptor</i> – Receptores do tipo Toll
U	- Unidades
UFS	- Unidade Formadora de Spots
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
µM	- Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Epidemiologia do vírus da Imunodeficiência Humana.....	19
1.2 Filogenia do vírus da Imunodeficiência Humana.....	20
1.3 Ciclo de vida do HIV.....	21
1.4 Patogênese da infecção pelo HIV.....	24
1.5 Resposta imune contra o HIV.....	27
1.6 Vacinas contra HIV.....	30
1.7 Vacinas baseadas em epítomos conservados e capazes de se ligarem à múltiplas moléculas MHC de classe II.....	33
1.8 Células dendríticas.....	34
2 OBJETIVOS.....	40
2.1 Objetivo Geral.....	40
2.2 Objetivos Específicos.....	40
3 METODOLOGIA.....	41
3.1 Obtenção dos plasmídeos que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo α DEC205.....	41
3.2 Clonagem da sequência de DNA que codifica os epítomos para linfócitos T CD4 ⁺ do HIV em fusão com a sequência do anticorpo α DEC205.....	41
3.3 Clonagem da sequência de DNA que codifica os epítomos em vetor para expressão em células de mamífero.....	41
3.4 Transformação de bactérias <i>E. coli</i> DH5 α competentes.....	42
3.5 Purificação em larga escala do DNA plasmidial.....	43
3.6 Quantificação e avaliação da integridade dos plasmídeos purificados.....	44
3.7 Transfecção de células HEK293T.....	44
3.8 Precipitação e purificação dos anticorpos α DEC205.....	44
3.9 Ensaio de ligação dos anticorpos aos receptores DEC205 de células CHO e a esplenócitos totais.....	45
3.10 Western Blot.....	46
3.11 Animais.....	46
3.12 Imunização experimental.....	47
3.13 Avaliação da resposta imune celular.....	47
3.13.1 Suspensão Celular.....	47
3.13.2 Citometria Multiparamétrica.....	48

3.13.3 ELIspot IFN- γ	49
3.13.4 Análise estatística.....	50
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Purificação dos plasmídeos que codificam os anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 e da vacina de DNA HIVBr8.....	51
4.2 Purificação dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8.....	53
4.3 Ensaio de ligação dos anticorpos a células CHO que expressam os receptores DEC205 ou DCIR2.....	55
4.4 Ensaio de ligação dos anticorpos a esplenócitos totais.....	56
4.5 Avaliação de diferentes vias de imunização com os anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8.....	59
4.6 Avaliação da imunogenicidade do anticorpo α DEC205HIVBr8 e da vacina de DNA HIVBr8 em <i>prime-boost</i> homólogo ou heterólogo.....	60
5 DISCUSSÃO.....	65
6 CONCLUSÃO.....	70
APÊNDICE.....	71
Apêndice A. Figuras.....	71
ANEXOS.....	73
Anexo A. Aprovação de Comitê de Ética.....	73
REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma imunodeficiência secundária descrita em 1981 pela observação de indivíduos que apresentavam pneumonias recorrentes causadas por *Pneumocystis jirovecii* e frequentemente sarcoma de Kaposi. Devido à semelhança entre os casos, possivelmente se tratava de uma doença infecciosa e transmissível, porém até o momento desconhecida. Somente em 1986, foi demonstrado que a AIDS era na verdade uma doença crônica causada por um vírus, denominado Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (QUINN, 2008).

Para que a infecção pelo HIV ocorra é necessário que a célula expresse em sua superfície a molécula CD4, receptor primário do HIV, além dos receptores de quimiocinas, CCR5 ou CXCR4. Sendo assim, o vírus tem como células alvo linfócitos T (LT) CD4⁺, monócitos/macrófagos (QUINN, 2008) e células da microglia (COSENZA *et al.*, 2002). A transmissão viral ocorre principalmente com o contato com sangue/hemoderivados, sêmen, secreção vaginal e leite materno contaminados (QUINN, 2008).

Com o desenvolvimento e a introdução de drogas antirretrovirais (ARV) foi possível estabelecer melhor qualidade de vida e longevidade para pacientes soropositivos. A partir de 1996, foi introduzida a Terapia Antiretroviral Altamente Ativa (HAART- *Highly Active Antiretroviral Therapy*), que consiste na administração combinada de pelo menos três drogas ARVs e foi o marco principal na redução da propagação da epidemia (FONSECA e BASTOS, 2007). No Brasil, onde a terapia é distribuída gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS), houve uma drástica redução na incidência das doenças oportunistas, das internações e consequentemente das mortes relacionadas à AIDS. Entretanto, mesmo com os avanços no conhecimento da patogenia causada pelo vírus e da resposta imune à infecção, até o momento não existe uma vacina eficaz contra a infecção pelo HIV.

1.1 Epidemiologia do vírus da Imunodeficiência Humana

A epidemia causada pelo HIV-1 é uma das infecções mais emergentes das últimas décadas, com cerca de 36,9 milhões de indivíduos infectados no mundo (Figura 1), e somente no ano de 2014 foram observadas 2 milhões de novas infecções e 1,2 milhões de mortes. O principal grupo afetado pelo vírus é composto de jovens entre 14 e 25 anos de idade, grupo este que corresponde a aproximadamente 40% das novas infecções (UNAIDS/WHO, 2014).

O vírus já se espalhou por diversos continentes, sendo que aproximadamente dois terços dos adultos e crianças infectados pelo HIV se encontram na África subsaariana e no sudeste asiático. Já no Brasil, onde se encontra um terço da população infectada da América do Sul e Central, foram notificados 798 mil casos de infecção pelo HIV-1 e 289 mil óbitos de 1980 até junho de 2014 em decorrência da AIDS (**BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO AIDS**, 2015).



Figura 1 – Mapa epidemiológico do número de pessoas infectadas pelo HIV-1 no mundo.

Apesar de ser observada uma tendência na redução do número de novas infecções pelo HIV-1, estima-se que o elevado índice de mortalidade ainda se

manterá devido ao acesso inadequado e limitado ao tratamento em muitos países (KATES e LEVI, 2007).

1.2 Filogenia do Vírus da Imunodeficiência Humana

O HIV é um vírus originário de uma zoonose símia através da transmissão do vírus da imunodeficiência símia (SIV) de primatas não-humanos para humanos no continente africano. Em 1983, o vírus foi primeiramente descrito na França por Montagnier como um novo vírus associado à linfadenopatia (LAV) (BARRE-SINOSSI *et al.*, 1983). Em 1984, um grupo dos Estados Unidos liderado por Robert Gallo descreveu o vírus isolado de pacientes que apresentavam sintomas referentes à AIDS como o terceiro tipo do vírus HTLV (Vírus T-linfotrópico humano) (GALLO *et al.*, 1984). A análise das sequências nucleotídicas dos vírus LAV e HTLV-III isolados mostrou a semelhança entre eles sendo possivelmente descrições de um mesmo vírus. Somente em 1986, o *International Committee on Taxonomy Viruses* (ICTV) renomeou o novo vírus como Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e apontou como causador da AIDS (COFFIN *et al.*, 1986).

O HIV pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentiviridae* e é subdividido em HIV-1 e HIV-2 (SALEMI *et al.*, 2001). O HIV-1 é o principal agente causador da pandemia e se assemelha ao vírus SIV_{cpz}, vírus da imunodeficiência símia que infecta chimpanzés. Por outro lado, o HIV-2 está associado ao vírus encontrado em macacos *Mangabei fuligens* e possui menor disseminação mundial devido a sua menor capacidade de transmissão (PEETERS *et al.*, 2013).

O HIV-1 é dividido em três grandes grupos: M (*Major*), O (*Outlier*) e N (*Non Major e Non Outlier*) (KORBER *et al.*, 2000; KEELE *et al.*, 2006). Foram observadas linhagens relacionadas aos grupos M e N em chimpanzés e outros estudos indicam que o tipo O pode ter sido originado a partir de gorilas (VAN HEUVERSWYN *et al.*, 2006). O grupo M é o mais predominante na população e sofreu diversas variações genéticas ao longo das décadas que permaneceram na população, sendo necessária a divisão de cada subtipo em clados. Os clados são denominados por letras (A, B, C, D, F, G, H, J e K), além da classificação dos sub-subtipos denominados por números e das formas recombinantes circulantes (FRC)

(MCCUTCHAN *et al.*, 2000), tendo atualmente cerca de 55 FRCs reportadas (LAU e WONG, 2013). Em conjunto, os clados, sub-subtipos e FRCs do grupo M são responsáveis por 90% das infecções por HIV pelo mundo (MCCUTCHAN, 2000; PEETERS e SHARP, 2000).

Até 2005, o HIV-1 clado C era responsável por cerca de 50% do número de infecções, seguido pelo clado A e o clado B era predominante nos países industrializados, com cerca de 10% das infecções (HEMELAAR *et al.*, 2006). No entanto, nos últimos anos o clado B do HIV-1 se tornou o mais predominante, com aproximadamente 60% das infecções ao redor do mundo (LAU e WONG, 2013). As populações africana e asiática possuem o vírus dos clados A, D, F e FRCs amplamente disseminados (POTTS *et al.*, 1993). Com relação aos subtipos virais observados no Brasil, estima-se que os clados B (77,2%), C (3,3%), D (0,5%) e F (6,4%), bem como formas recombinantes B/F e B/C são os mais prevalentes (MORGADO *et al.*, 1994; GUIMARAES *et al.*, 2002).

A distribuição global dos subtipos e das formas recombinantes circulantes reflete a complexidade da epidemiologia do HIV -1.

1.3 Ciclo de vida do HIV

O genoma do HIV-1 contém cerca de 9.800 pares de bases e é constituído por duas moléculas de RNA (Ácido Ribonucleico) (Figura 2A) (BURGER e POLES, 2003) que codificam as proteínas: Gag, Env e Pol – proteínas estruturais – Vif, Vpr e Vpu – proteínas acessórias – e Rev, Nef e Tat – proteínas regulatórias (Figura 2B) (BURGER e POLES, 2003; POTTER *et al.*, 2004).

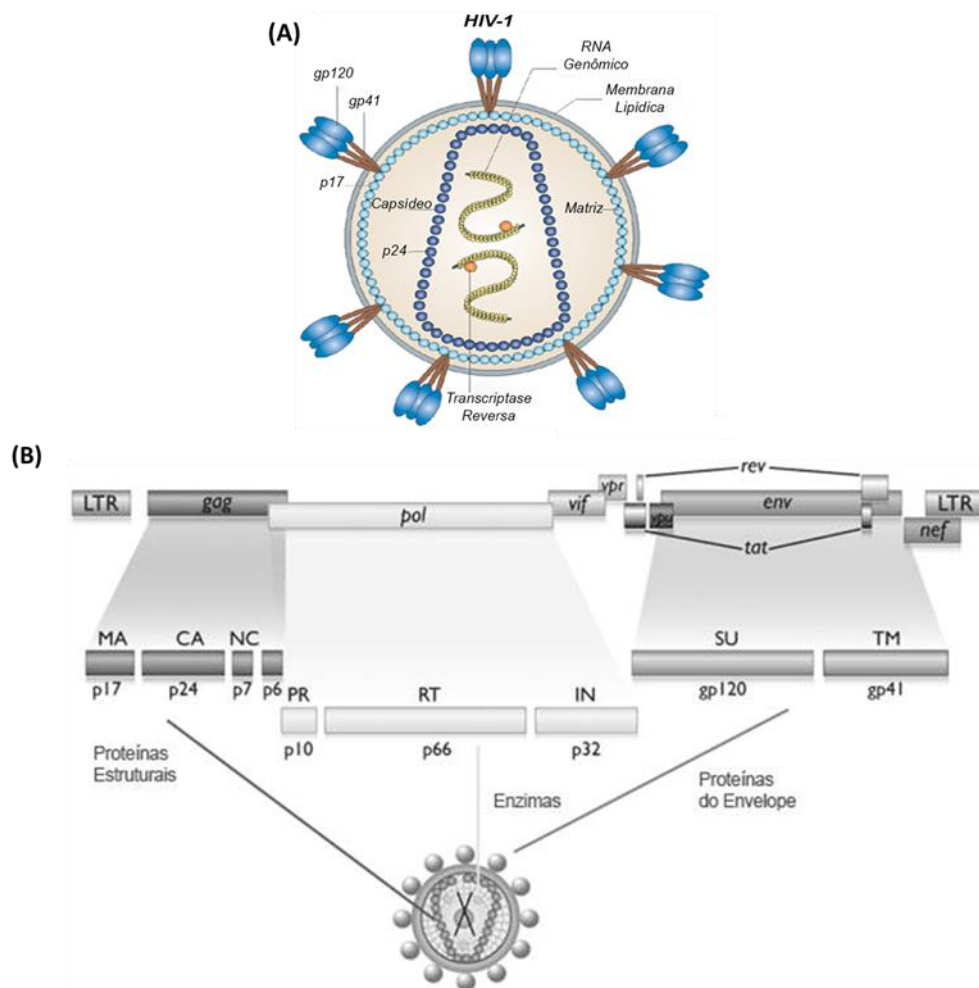


Figura 2 – Organização do vírus HIV-1: (A) Esquema representativo do vírus HIV-1. O complexo proteico trimérico gp41-gp120 está representado incorporado na membrana lipídica. Além disso, o vírus é composto por proteínas de matriz (p17), proteínas de capsídeo (p24), duas fitas de RNA contendo a enzima transcriptase reversa. (B) Esquema representativo do genoma do HIV-1. O genoma do vírus é composto por duas fitas de RNA (9800 pares de base) e possui os genes gag (codifica proteína p17, p24, p7 e p6), pol (codifica proteínas p10, p66 e p32), env (codifica proteínas gp120 e gp41), vif, vpr, vpu, tat, rev e nef. MA=matriz; CA=capsídeo; NC=nucleocapsídeo; PR=protease; RT=transcriptase reversa; IN=integrase; SU=superfície; TM=transmembrana. Fonte: Adaptado de (KARLSSON HEDESTAM *et al.*, 2008).

Para que a infecção ocorra, o HIV utiliza um mecanismo de interação entre as proteínas do envelope viral e os receptores de superfície da célula alvo (Figura 3). O complexo trimérico do envelope viral é composto pelas glicoproteínas gp120 e gp41 e é essencial para que vírus consiga entrar na célula, processo que ocorre

inicialmente pela ligação da proteína gp120 ao receptor CD4 da célula alvo. Em seguida, a gp120 sofre uma alteração conformacional e expõe um domínio específico que é capaz de se ligar aos receptores de quimiocinas na membrana celular, como o CCR5, expresso por monócitos/macrófagos, células dendríticas e linfócitos T, ou CXCR4, expresso por diversas células, como linfócitos T (FANALES-BELASIO *et al.*, 2010).

A ligação da proteína gp120 com a molécula de CD4 e com o receptor de quimiocinas (CCR5 ou CXCR4) é um processo estável que permite que a porção N-terminal da gp41 penetre na membrana celular do hospedeiro e a aproxime da membrana viral, levando então a fusão das mesmas e possibilitando que o material genético viral seja introduzido na célula alvo (MELIKYAN *et al.*, 2000; MARKOSYAN *et al.*, 2003; FORSELL *et al.*, 2009; FANALES-BELASIO *et al.*, 2010). A enzima transcriptase reversa converte o RNA viral em DNA (ácido desoxirribonucleico) proviral (FANALES-BELASIO *et al.*, 2010), e este por sua vez é integrado ao DNA da célula infectada no núcleo. A ausência da atividade de revisão da transcriptase reversa torna-se, nesse momento, fundamental para geração de mutações e, consequente diversidade genética do HIV (BEBENEK *et al.*, 1989; BOYER *et al.*, 1992). Quando a célula infectada é ativada, o DNA proviral é transcrito em mRNA viral e as proteínas estruturais dos novos vírions são sintetizadas no citoplasma. As proteínas codificadas pelos genes pol e gag formam o core da partícula viral em maturação. O gene env codifica para a proteína gp160, que posteriormente sofre processo de clivagem pela furina, uma protease do hospedeiro, e dá origem às proteínas do envelope, gp120 e gp41 – etapa necessária para a geração das partículas virais infecciosas (GOMEZ e HOPE, 2005; FANALES-BELASIO *et al.*, 2010). Por último, ocorre o processo de brotamento, no qual a membrana lipídica do vírus incorpora várias proteínas da célula hospedeira e fica enriquecida com fosfolipídios e colesterol. Uma única célula infectada pode produzir até 10^{10} vírus por dia (COFFIN, 1995) e o processo de replicação viral leva a morte das células infectadas (KLIMAS *et al.*, 2008) (Figura 3).

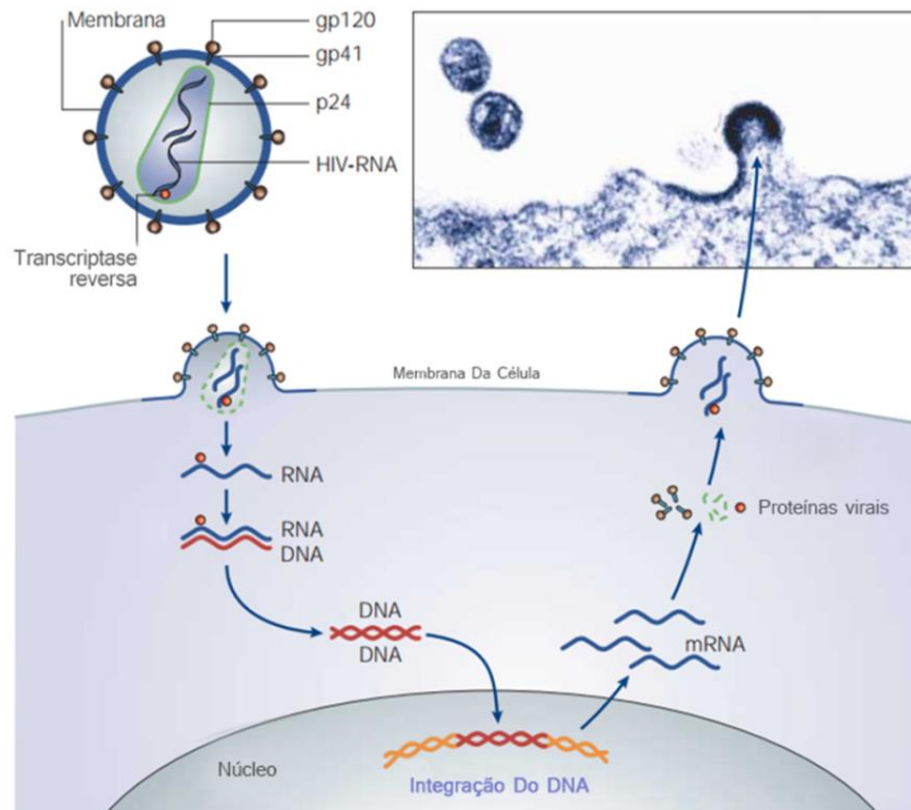


Figura 3 – Esquema representativo do ciclo de vida do vírus HIV-1: O vírus HIV-1 se liga a célula-alvo e as membranas (vírus/hospedeiro) se fundem, possibilitando que o material genético viral seja introduzido na célula-alvo. A enzima transcriptase reversa converte o RNA viral em DNA e este por sua vez, é integrado ao DNA da célula infectada no núcleo. Quando a célula é ativada, o DNA proviral é transcrito em mRNA viral e as proteínas virais são, sintetizadas. Por último, há a liberação de novas partículas virais para o meio extracelular. Fonte: Adaptado de (SIMON e HO, 2003).

1.4 Patogênese da infecção pelo HIV.

A patogênese da infecção pelo HIV-1 e a progressão para a AIDS dependem principalmente de dois fatores: propriedades do vírus infectante e sistema imune do hospedeiro. O equilíbrio entre estes determina a evolução da doença, culminando em um quadro de imunodeficiência ou de sobrevivência por longo período (SIMON *et al.*, 2006; FANALES-BELASIO *et al.*, 2010). As células infectadas podem ser lisadas durante o processo de liberação de novas partículas virais ou permanecer em estado latente atuando como reservatórios virais, particularmente em macrófagos e LT CD4⁺. Os reservatórios são um grande desafio para a completa

erradicação da infecção, pois não são eliminados com o uso da terapia antirretroviral atual (BAROUCH e DEEKS, 2014).

Nos primeiros dias após a infecção, entre o 10^o até o 12^o dia, ocorre um período chamado de “eclipse”, no qual o RNA viral ainda não é detectável no plasma (FIEBIG *et al.*, 2003). Após esse período, partículas virais chegam aos linfonodos drenantes e infectam LT CD4⁺ que expressam o receptor de quimiocina CCR5. Além disso, células dendríticas podem facilitar ainda mais o processo de infecção ao fagocitarem partículas virais e transportá-las para linfócitos ativados (GEIJTENBEEK *et al.*, 2000). Outro tecido alvo do vírus é o tecido linfóide associado a mucosas (GALT- *Gut Associated Lymphoid Tissue*) pelo fato de ser rico em linfócitos T CD4⁺CCR5⁺ (GASPER-SMITH *et al.*, 2008). É possível observar no GALT logo nas primeiras semanas a infecção de aproximadamente 20% dos LT CD4⁺ e até 60% das células que não foram infectadas são ativadas e morrem por apoptose. Esse fenômeno acarreta uma depleção maciça de LT CD4⁺ nas três primeiras semanas após a infecção (BRENCHLEY *et al.*, 2004). Neste momento, geralmente entre 21 e 28 dias após a infecção pelo HIV, a viremia no sangue sobe rapidamente e atinge o pico acima de 100 milhões de cópias/mm³, coincidindo com a fase de soroconversão do indivíduo (Figura 4), simultaneamente o número de LT CD4⁺ diminui durante o pico da viremia. (LINDBACK *et al.*, 2000; FIEBIG *et al.*, 2003).

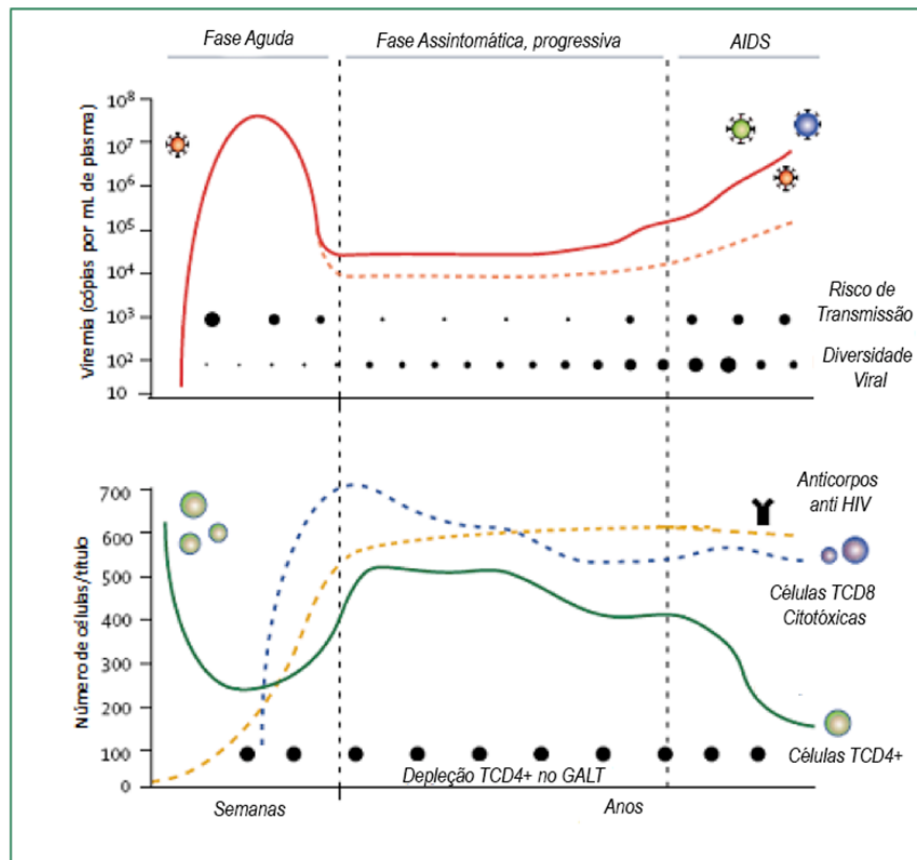


Figura 4 – Curso natural da infecção pelo HIV-1: Viremia no plasma (gráfico superior); Dinâmica de alterações no compartimento celular/humoral (gráfico inferior). A fase aguda da infecção é caracterizada por uma elevada viremia plasmática (linha vermelha superior), queda acentuada de LT CD4⁺ (linha verde inferior) e ausência de anticorpos HIV-específicos (linha pontilhada laranja inferior). A viremia cai com o aparecimento de LT CD8⁺ citotóxicos (CTL) específicos (linha pontilhada azul inferior), o título de anticorpos aumenta (linha pontilhada laranja inferior) e o “set point” viral é atingido (linha vermelha tracejada – superior). Com o passar dos anos, ocorre uma disfunção progressiva do sistema imune e a carga viral volta a subir. Nesse momento começam a aparecer os primeiros sintomas clínicos da AIDS. O risco de transmissão é maior nas primeiras semanas durante o pico de viremia (círculos preenchidos superiores). GALT = tecido linfóide associado ao intestino. Fonte: Adaptado de (SIMON *et al.*, 2006).

A fase seguinte é caracterizada pela queda da viremia (12 a 20 semanas após o contato com o vírus) em até 100 vezes, atingindo um nível estável denominado *set point* viral (KAHN e WALKER, 1998), momento no qual o número de LT CD4⁺ retorna a níveis normais no sangue, mas não no GALT, caracterizando

então o início da fase crônica da doença. Na ausência de terapia antiretroviral, o *set point* viral é mantido devido a um balanço entre o *turnover* viral e a resposta imune do hospedeiro (MCMICHAEL *et al.*, 2010).

Embora não ocorra depleção direta de linfócitos B durante a fase inicial da infecção pelo HIV, a resposta é prejudicada devido à destruição em massa dos centros germinativos das placas de Peyer's do trato gastrointestinal nos primeiros 80 dias de infecção (LEVESQUE *et al.*, 2009).

Como foi elucidado, um aspecto importante da infecção pelo HIV é a disfunção progressiva do sistema imunológico (OPRAVIL *et al.*, 1991; FOLEY *et al.*, 1992; DOUEK *et al.*, 2003; BUSSMANN *et al.*, 2010) pela destruição dos tecidos linfóides – consequência da replicação viral e da ativação crônica das células do sistema imune. Este fato leva a disseminação viral para outros LT CD4⁺ e favorece a propagação do HIV-1 em outros tecidos linfóides. É nesse momento que os indivíduos começam a apresentar os sintomas clínicos da AIDS, tendo o aparecimento de doenças oportunistas como Sarcoma de Kaposi, Pneumocistose recorrente, neurotoxoplasmose, entre outras.

1.4 Resposta imune contra o HIV

Diversos estudos indicam que anticorpos neutralizantes, LT CD4⁺ e CD8⁺ desempenham um importante papel na imunidade contra o HIV (HAYNES, 2015).

A imunidade humoral contra infecções virais se caracteriza pela produção de anticorpos específicos capazes de neutralizar o vírus, impedindo dessa maneira sua entrada na célula hospedeira. A maioria dos anticorpos neutraliza partículas virais livres, antes que ocorra a infecção de uma célula alvo (KLASSE e SATTENTAU, 2002). No caso do HIV, os anticorpos capazes de neutralizá-lo são direcionados principalmente às glicoproteínas do envelope do vírus. Até o momento alguns anticorpos neutralizantes já foram descritos (SCHEID *et al.*, 2009; SCHEID *et al.*, 2011; WALKER *et al.*, 2011; KWONG e MASCOLA, 2012; MOUQUET *et al.*, 2012) e clonados a partir de indivíduos capazes de produzir anticorpos altamente neutralizantes para diversos isolados virais (SCHEID *et al.*, 2011). Mais recentemente, o tratamento de indivíduos soropositivos com um anticorpo altamente

neutralizante denominado 3BNC117 específico para o sítio de ligação da proteína Env na molécula de CD4⁺ foi capaz de impedir o aumento da viremia pelo período de seis meses na ausência de ART (CASKEY *et al.*, 2015; SCHOOFS *et al.*, 2016). Entretanto, até o momento não foi possível o desenvolvimento de um imunógeno capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes que impeçam a infecção pelo vírus, isso devido a grande diversidade das glicoproteínas virais assim como sua extensa glicosilação (MCCUTCHAN *et al.*, 2000; PANTOPHLET e BURTON, 2006; MCKNIGHT e AASA-CHAPMAN, 2007).

A imunidade celular para o HIV conta com a participação de LT CD4⁺ e CD8⁺ citotóxicos (CTL). Os CTLs específicos são capazes de lisar as células infectadas pelo HIV-1 por citotoxicidade a partir do reconhecimento de peptídeos virais apresentados na superfície da célula infectada pelas moléculas de MHC/HLA de classe I. A resposta de CTLs elimina células infectadas antes que as novas partículas virais sejam liberadas no meio extracelular, demonstrando que a atividade antiviral dessas células favorece no controle da progressão para doença (CARMICHAEL, 1993; CONNOR, 1993). Esses efeitos foram evidenciados em estudos realizados com macacos rhesus, uma vez que não se observa controle da infecção pelo SIV após depleção de linfócitos T CD8⁺ com anticorpos monoclonais (JIN *et al.*, 1999). Todavia, somente a existência e magnitude das respostas mediadas por CTLs não são suficientes para controlar a infecção aguda ou crônica pelo HIV (MCELRATH e HAYNES, 2010).

Os LTCD4⁺ desempenham um importante papel na indução de respostas imunes adaptativas funcionais através de mecanismos diretos (efeito citotóxico) ou indiretos (efeito auxiliar). Em relação ao seu efeito auxiliar, os LTCD4⁺ promovem e auxiliam a expansão e manutenção do status funcional de memória das CTLs (SHEDLOCK, 2003); auxiliam a mobilização de CTLs para os locais periféricos de infecção (NAKANISHI *et al.*, 2009); influenciam as respostas de linfócitos B e consequentemente produção e mobilização de anticorpos para locais periféricos; e também participam na imunidade protetora através da secreção de citocinas (BEVAN, 2004; NOVY *et al.*, 2007; IJIMA e IWASAKI, 2016). Dessa forma, a depleção progressiva dos LTCD4⁺ está associada a um declínio na atividade de CTL, o que corrobora para explicar a perda do controle da replicação viral em um

indivíduo cronicamente infectado, mesmo que ainda apresente LT CD8⁺ HIV-específicos (GANDHI e WALKER, 2002).

Nos últimos anos, diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de elucidar o papel dos LTCD4⁺ HIV-específicos. Já foi observado que LTCD4⁺ específicos foram capazes de controlar a replicação viral através do efeito citotóxico direto mediado por perforina e granzima e da produção de fatores antivirais solúveis como as quimiocinas que se ligam ao CCR5 (CCL3, CCL4, CCL5) impedindo assim a infecção de novas células alvo (KLATT e SILVESTRI, 2012). Além disso, a presença de LTCD4⁺ com fenótipo citotóxico está associada ao controle da viremia em macacos depletados de linfócitos T CD8⁺ e infectados pelo SIV (VON GEGERFELT *et al.*, 2010). De fato, foi observado que a vacinação de macacos rhesus com o vírus SIV atenuado induziu elevada frequência de células T CD4⁺ efectoras e resultou no controle da viremia após desafio com um vírus homólogo ou heterólogo (WYAND *et al.*, 1999; GAUDUIN *et al.*, 2006; REYNOLDS *et al.*, 2008). Além disso, o desenvolvimento de uma resposta de LT CD4⁺ de memória (MATTAPALLIL *et al.*, 2006), elevou a sobrevivência de primatas não-humanos após o desafio com SIV (LETVIN *et al.*, 2006).

Em humanos, foi relatado que indivíduos que já entraram na fase crônica da doença na ausência de tratamento, possuem um controle na replicação e diminuição da carga viral devido a uma resposta linfoproliferativa de LT CD4⁺ (ROSENBERG *et al.*, 1997). Já foi constatado que indivíduos que tem uma progressão lenta para a AIDS possuem resposta de LT CD4⁺ polifuncionais, produtores de IFN- γ e IL-2, contra a proteína p24 (Gag) que se relaciona inversamente com a carga viral e diretamente com a porcentagem de CTL produtores de IFN- γ (BOAZ *et al.*, 2002). Ademais, estudos sugerem que indivíduos Controladores de Elite, que conseguem controlar a infecção e possuem quantidades indetectáveis de RNA viral no plasma, apresentam maior magnitude de resposta de LT CD4⁺ de mucosa Gag-específicos produtores de IFN- γ , TNF- α e IL-2 quando comparada a indivíduos “não controladores” e indivíduos “não controladores” tratados com HAART (FERRE *et al.*, 2010).

1.5 Vacinas contra o HIV

Em países onde o acesso ao tratamento antirretroviral pela população é limitado, somente uma vacina eficaz poderia controlar a epidemia. Mesmo com os avanços tecnológicos, o conhecimento da patogenicidade do vírus e da resposta imune à infecção, até o momento não se obteve sucesso na elaboração de uma vacina eficaz contra a infecção pelo HIV. Dados da OMS (Organização Mundial da Saúde, 2013) mostram que, na ausência de uma vacina válida, a incidência de infecções pelo vírus HIV-1 chegará a 100 milhões de casos nas próximas décadas. Dessa forma, o desenvolvimento de uma vacina torna-se prioridade científica global.

Nas últimas três décadas, pesquisas com foco no desenvolvimento de novas estratégias vacinais para o HIV-1 demonstraram que uma proteção eficaz contra a infecção depende da indução não apenas da imunidade humoral com a produção de anticorpos capazes de neutralizar o vírus, mas também da imunidade celular capaz de reduzir a carga viral e controlar a progressão clínica e transmissão do vírus (WATKINS, 2008; BAROUCH e KORBER, 2010).

Até hoje as estratégias vacinais que visaram à indução de anticorpos neutralizantes contra o HIV-1 não conseguiram promover proteção esperada. Dessa forma, novas pesquisas baseadas em vacinas que induzam a imunidade celular contra proteínas virais têm surgido (HAYNES, 2015). Embora a urgência, até o momento somente seis candidatos vacinais completaram os ensaios clínicos de eficácia (Tabela 1).

Tabela 1 – Ensaios de eficácia concluídos e em andamento para o desenvolvimento de uma vacina contra o HIV.

Ensaio Clínico	Data	Vacina	Local	Grupo de Risco	Resultado
VAX003	2003	Proteína gp120	Tailândia	Usuários de drogas injetáveis	Sem eficácia
VAX004	2003	Proteína gp120	EUA e Europa	HSH e mulheres em risco	Sem eficácia
STEP	2004	Ad5	América do Norte e Sul/Austrália	HSH e mulheres em risco	Interrompido
Phambili	2007	Ad5	África do Sul	Muheres e homens heterossexuais	Interrompido
RV144	2009	ALVAC/ gp120 + alum	Tailândia	Comunidade	31% de eficácia
HVTN 505	2013	DNA/Ad5	EUA	HSH e mulheres transexuais	Sem eficácia
HVTN 702	2016	ALVAC/gp120 +MF59	África do Sul	Comunidade	-

Fonte: (Adaptado de (KOFF, 2016)).

O mais recente ensaio de fase III e o único a obter algum nível de eficácia foi o ensaio denominado RV144, composto pelas vacinas ALVAC e AIDSVAX, o qual teve como objetivo induzir tanto uma resposta celular quanto humoral, respectivamente. Os indivíduos receberam quatro doses iniciais (*prime*) com o vetor recombinante Canarypox codificando a gp120, Gag e protease (ALVAC). Em seguida, foram administradas duas doses de reforço (*boost*) da proteína gp120 (AIDSVAX) juntamente com o adjuvante hidróxido de alumínio (alum). Os indivíduos vacinados apresentaram redução de cerca de 30% na taxa de aquisição da infecção, mas não houve efeito sobre a carga viral (RERKS-NGARM *et al.*, 2009). Ao analisar a resposta imune desses indivíduos foi observada proliferação de LT CD4⁺ e anticorpos contra gp120 pouco neutralizantes, porém com a capacidade de se ligarem ao vírus, favorecendo a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (MCEL RATH e HAYNES, 2010). Um estudo realizado posteriormente com células mononucleares do sangue periférico (CMSP) dos indivíduos vacinados e não infectados, mostrou que a proliferação de LT CD4⁺ foi HIV-específica e apresentava perfil citotóxico (CD107⁺) (DE SOUZA *et al.*, 2012). O mais novo ensaio denominado HVTN 702, que visa aumentar a resposta imune observada no estudo anterior RV144 vacinará indivíduos sul africanos com duas formulações vacinais: ALVAC e a

proteína gp120 juntamente com o adjuvante MF59, diferente do utilizado no RV144. O ensaio será iniciado em novembro deste ano e, portanto ainda não apresenta resultados (Tabela 1).

Os resultados do ensaio RV144 demonstrando uma modesta eficácia, assim como os gerados em vacinas contra o SIV em primatas não humanos (HANSEN *et al.*, 2009; WILSON *et al.*, 2009; HANSEN *et al.*, 2013), sugerem que uma imunidade protetora contra o HIV é um objetivo que pode ser alcançado (WALKER e BURTON, 2010). Nos últimos anos, aperfeiçoamentos no desenho racional dos imunógenos vêm sendo feitos com o objetivo de desenvolver novos candidatos capazes de induzir resposta imune celular e/ou humoral HIV-específicas, além de aperfeiçoar as estratégias já existentes.

Com relação ao desenvolvimento de vacinas baseadas na indução de imunidade celular, acredita-se que a geração de respostas imunes amplas e funcionalmente relevantes contra epítomos conservados de LT CD4⁺ e CD8⁺ seja um pré-requisito essencial para novos candidatos à vacina (SEKALY, 2008; WATKINS *et al.*, 2008). Embora vacinas indutoras de imunidade celular não sejam capazes de bloquear a infecção viral, modelos animais têm demonstrado que essa abordagem é eficiente no controle da replicação do vírus (HANSEN *et al.*, 2009; WILSON *et al.*, 2009; HANSEN *et al.*, 2013).

As vacinas indutoras de resposta celular contra o HIV-1 desenvolvidas até o momento são em sua maioria destinadas a induzir respostas mediadas por linfócitos T CD8⁺ (WATKINS *et al.*, 2008). Entretanto, a participação dos LT CD4⁺ na imunidade contra o HIV-1, evidenciada por estudos com pacientes infectados e modelos de vacinas experimentais têm corroborado com a importância do desenvolvimento de uma vacina indutora de tal subtipo celular. A grande diversidade genética do HIV-1 exige o desenvolvimento de vacinas que sejam capazes de induzir uma imunidade protetora ampla, contra as diversas variantes circulantes do vírus. Até o momento, entretanto, nenhuma vacina foi desenhada para induzir, com grande cobertura populacional, uma resposta ampla de LT CD4⁺ contra peptídeos conservados entre os vários subtipos circulantes do HIV-1.

1.6 Vacinas baseadas em epítomos conservados e capazes de se ligarem à múltiplas moléculas de MHC de classe II.

Devido ao papel fundamental de LT CD4⁺ na indução, manutenção e diferenciação das respostas mediadas por linfócitos B e T CD8⁺, além do seu efeito protetor direto, a inclusão de epítomos apropriados do HIV-1 reconhecidos por LT CD4⁺ pode desempenhar um papel essencial nas imunizações candidatas à vacina contra o HIV.

Nos últimos anos, o nosso grupo se dedicou a mapear epítomos de LT CD4⁺ do HIV-1. Para tal, o genoma completo do HIV-1 (clado B) foi varrido com o algoritmo TEPITOPE e dezoito epítomos conservados do consenso do subtipo B do HIV-1 foram selecionados com a propriedade de se ligarem a pelo menos dois terços das 25 moléculas HLA-DR cobertas pelo algoritmo (FONSECA *et al.*, 2006). Os peptídeos foram reconhecidos por CMSP de mais de 90% dos indivíduos infectados pelo HIV-1, e efetivamente se ligavam *in vitro* a múltiplas moléculas HLA-DR (FONSECA *et al.*, 2006).

Recentemente, o nosso grupo mostrou que uma vacina de DNA codificando os 18 epítomos mapeados (HIVBr18) foi capaz de induzir resposta imune específica e ampla de LT CD4⁺, e também de CD8⁺, em camundongos transgênicos para diversas moléculas de HLA de classe II humanas (HLA-DR2, -DR4, -DQ6, DQ8), sugerindo que tal vacina pode induzir respostas imunes no contexto de múltiplas moléculas HLA de classe II e portanto poderia ter ampla cobertura na população humana (RIBEIRO *et al.*, 2010). Em combinação com os resultados obtidos de pacientes infectados por HIV, estes resultados sugerem que a maioria dos indivíduos poderia reconhecer múltiplos peptídeos contidos na vacina. O estudo onde se avaliou o perfil funcional das respostas de LT HIV- específicos induzidos pela vacina em camundongos BALB/c mostrou que a HIVBr18 foi capaz de induzir uma resposta de magnitude elevada, ampla e polifuncional de LT CD4⁺ e CD8⁺, e 8/18 peptídeos foram reconhecidos. Além disso, a vacina foi capaz de induzir LT CD4⁺ de memória central e efetora de longa duração (ROSA *et al.*, 2011).

Apesar dos resultados obtidos com essa formulação vacinal serem bastante promissores, as vacinas de DNA apresentam limitada imunogenicidade em animais

de grande porte, incluindo humanos (KUTZLER e WEINER, 2008). Essa limitação pode estar relacionada à baixa quantidade de proteína expressa nas células hospedeiras. Por esse motivo, nos últimos anos diferentes plataformas de produção de imunógenos vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de transpor essa barreira.

1.7 Células dendríticas

As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) que possuem importante papel no controle da imunidade e na manutenção da tolerância periférica (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998). Estas células possuem características importantes que fazem com que elas sejam especializadas em capturar, processar e apresentar antígenos, constituindo importante ponte entre as respostas inata e adquirida (revisto por (LOPEZ-BRAVO e ARDAVIN, 2008). As DCs foram primeiramente identificadas e purificadas com base na sua morfologia (STEINMAN e COHN, 1973). Posteriormente observou-se que estas células expressam um conjunto único de moléculas de superfície que foram identificadas utilizando-se diferentes anticorpos (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998). As DCs podem ser induzidas a maturação em resposta a vários tipos de estímulos e sua maturação resulta em mudanças fenotípicas que estão ligadas a capacidade aumentada de processar antígenos e ativar células T (HAWIGER et al., 2001).

A indução da imunidade adaptativa se dá após o processamento de antígenos e pela migração das DCs para os órgãos linfoides secundários, local onde ocorre a apresentação destes antígenos para os linfócitos T virgens. As DCs possuem várias subpopulações com funções diferentes no estado fisiológico (SHORTMAN e NAIK, 2007; VILLADANGOS e SCHNORRER, 2007). No baço de camundongos, onde as DCs foram primeiramente descritas, encontram-se duas subpopulações principais de DCs (SHORTMAN e LIU, 2002; DUDZIAK *et al.*, 2007). Ainda que ambas expressem altos níveis da integrina CD11c, uma delas expressa a cadeia alfa da molécula CD8 e a outra não (VREMEC *et al.*, 2000), e também diferem na expressão de receptores endocíticos. As DCs CD8 α^+ expressam elevados níveis do receptor DEC205/CD205 (VREMEC *et al.*, 2000; MCLELLAN *et al.*, 2002), reconhecido pelo anticorpo monoclonal DEC205 (α DEC205) (JIANG *et al.*, 1995). Já as DCs CD8 α^- expressam o

receptor DCIR2, reconhecido pelo anticorpo monoclonal 33D1 (DUDZIAK *et al.*, 2007).

Até o presente momento, os ligantes naturais destes receptores ainda não foram identificados, entretanto algumas diferenças já foram apontadas entre as populações de DCs que expressam um ou outro receptor (DUDZIAK *et al.*, 2007; STEINMAN e IDOYAGA, 2010). O receptor DEC205 pertence à família das lectinas tipo C do tipo I que inclui o receptor conhecido como MMR (*Macrophage Mannose Receptor*), langerina/CD207, DC-SIGN/CD209, BDA-2, Dectina-1 e DCIR-2 (JIANG *et al.*, 1995; MAHNKE *et al.*, 2000; FIGDOR *et al.*, 2002). O receptor DEC205 apresenta um domínio amino-terminal intracelular rico em cisteínas, um domínio de fibronectina tipo II e múltiplos domínios de reconhecimento de carboidratos (FIGDOR *et al.*, 2002). O DEC205 é altamente expresso pelas DCs presentes nas zonas de células T dos tecidos linfoides, particularmente nas DCs CD8 α^+ (Figura 5) (DEN HAAN *et al.*, 2000).

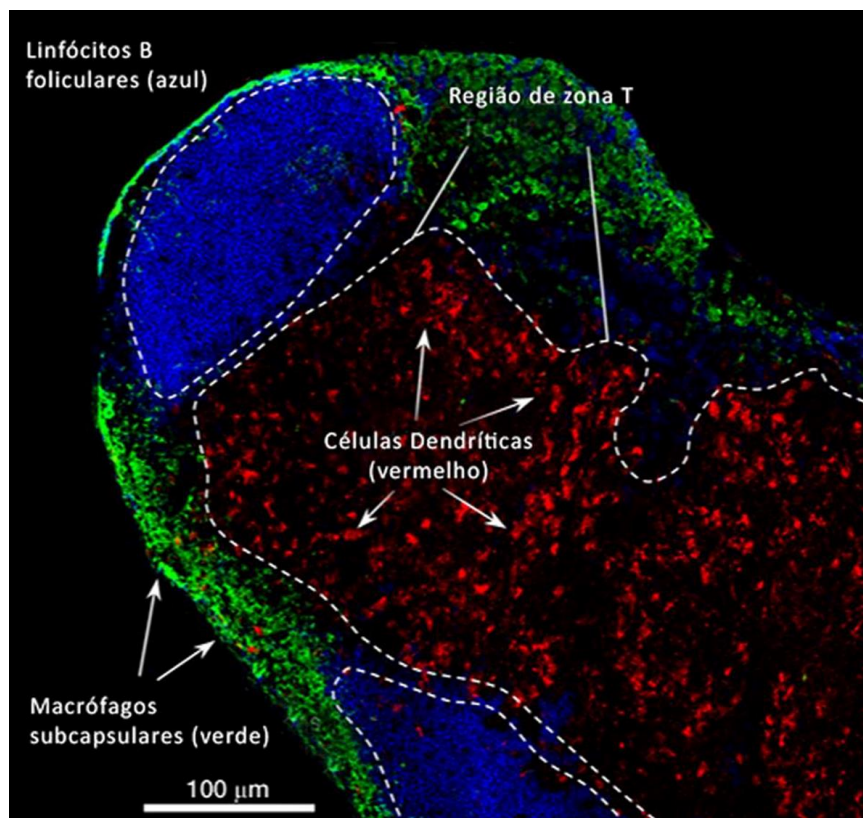
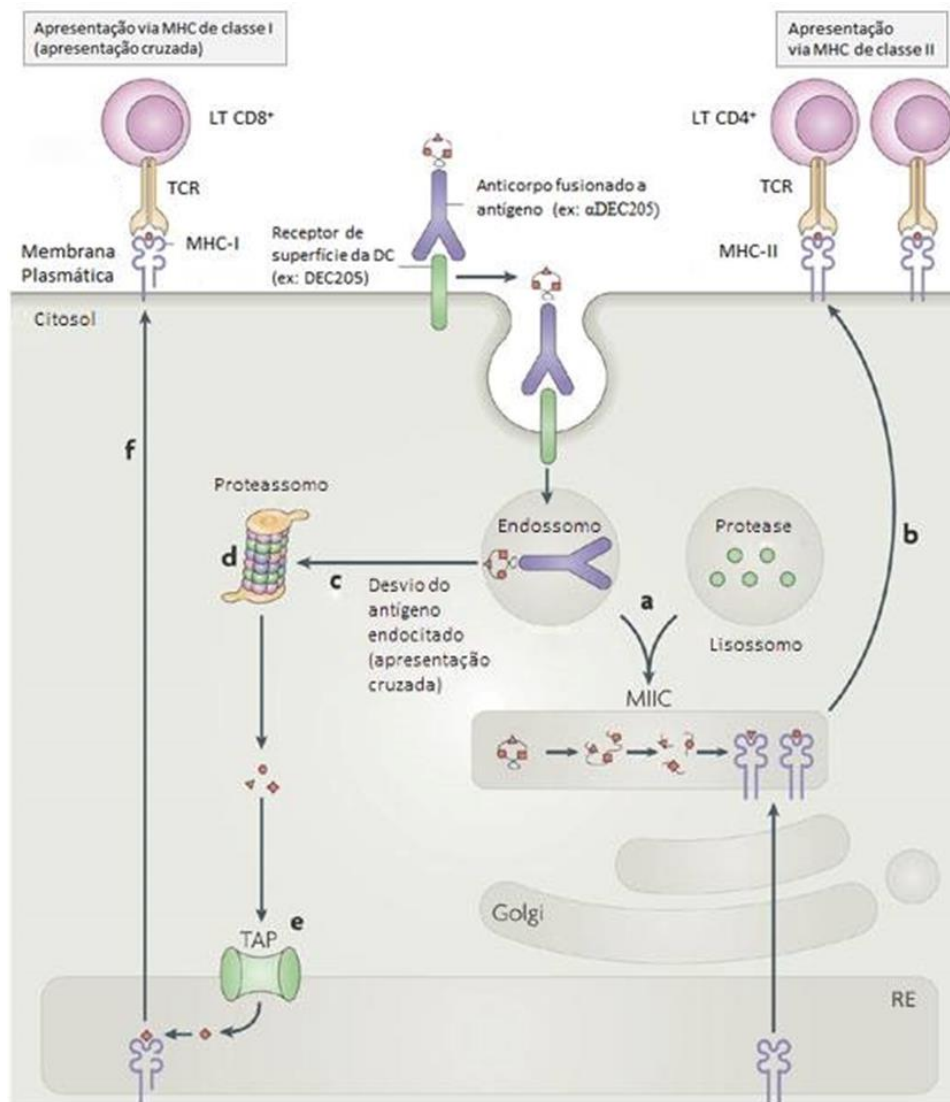


Figura 5 – Microscopia de fluorescência de linfonodo de camundongo: Microscopia de fluorescência de linfonodo de camundongo mostrando macrófagos subcapsulares

(marcados com anti-CD169, verde) células dendríticas DEC-205⁺ (marcadas com anti-DEC205, vermelho) e linfócitos B (marcados com anti-B220, azul). Linhas tracejadas marcando região de zona T e região folicular de linfócitos B. Fonte: Adaptado de (IDOYAGA e STEINMAN, 2009).

O conhecimento sobre a biologia das células dendríticas, tem permitido o desenvolvimento de estratégias vacinais baseadas na capacidade destas células em modularem as respostas imunes adaptativas, inclusive aquelas baseadas na indução de linfócitos T (FLYNN *et al.*, 2011). A partir de estudos anteriores verificou-se a capacidade e a possibilidade de direcionar proteínas diretamente para DCs através desses receptores, melhorando a apresentação de antígenos para LT CD4⁺ e CD8⁺. Os antígenos direcionados para as células dendríticas são endocitados em um compartimento endossomal e apresentados principalmente via molécula de MHC de classe II para LT CD4⁺, porém podem sofrer um desvio, saem do endossomo, são processados no citosol celular e apresentados via molécula de MHC de classe I para os linfócitos T CD8⁺ (Figura 6) (TACKEN *et al.*, 2007). A outra possibilidade de aumentar a resposta imune foi a descoberta dos receptores semelhantes a *Toll* - TRLs (*Toll like receptors*) (LEMAITRE *et al.*, 1996), que são capazes de desencadear um complexo de sinalizações intracelulares que culminam na produção de quimiocinas e citocinas por diversos tipos celulares inclusive por DCs. Com isso, levantou-se a possibilidade de direcionar antígenos para DCs através de receptores específicos e simultaneamente induzir a maturação destas células pela administração de agonistas de TRLs, garantindo a apresentação dos antígenos para os LT CD4⁺ e CD8⁺. (FLYNN *et al.*, 2011).



Nature Reviews | Immunology

Figura 6 – Processamento intracelular de antígenos direcionados para receptores de células dendríticas: Após a ligação de anticorpos fusionados a antígenos aos receptores de superfície das células dendríticas, estes são endocitados. A maior parte dos antígenos permanece no endossomo, que se funde ao lisossomo contendo proteases e resulta na degradação do antígeno em pequenos peptídeos. (a) os peptídeos se ligam a moléculas de MHC de classe II, estocadas em um compartimento de MHC-II (MIIC), e (b) são então apresentados na superfície celular para LT CD4⁺. Uma menor porcentagem dos antígenos (c) sofre um desvio, sai do endossomo e (d) é processado pelo proteassomo no citosol celular em pequenos peptídeos, apesar deste mecanismo ser ainda pouco elucidado. A partir de então, (e) os peptídeos tem acesso ao retículo endoplasmático (RE) e se associam a molécula de MHC de classe I, (f) podendo ser apresentados para os LT CD8⁺. TAP,

transportadora associada ao processamento de antígenos; TCR, receptor de células T. Fonte: Adaptado de (TACKEN *et al.*, 2007).

As primeiras demonstrações de que seria possível utilizar um anticorpo monoclonal (mAb) α DEC205 acoplado a um antígeno como uma ferramenta para atingir especificamente as DCs foi feita por Hawiger *et al.* (2001) e Bonifaz *et al.* (2004). Estes autores demonstraram que antígenos como lisozima de ovo de galinha ou ovoalbumina (OVA) poderiam ser seletivamente enviados para as DCs *in vivo* através do receptor DEC205, utilizando-se um mAb quimérico α DEC205 acoplado ao antígeno. O antígeno enviado às DCs foi eficientemente processado e apresentado tanto aos LT CD4⁺ quanto CD8⁺ transgênicos. Esses estudos evidenciaram que era possível direcionar antígenos para as DCs, utilizando mAb quiméricos α DEC205 acoplados aos antígenos.

A capacidade de tais receptores (DEC205 e DCIR2) em intermediarem a apresentação de antígenos *in vivo* foi demonstrada administrando anticorpos monoclonais anti-receptor fusionados às proteínas de interesse, (BONIFAZ *et al.*, 2004; BOSCARDIN *et al.*, 2006; TRUMPFHELLER *et al.*, 2006; DUDZIAK *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2007; TRUMPFHELLER *et al.*, 2008) proteínas de diferentes patógenos (BONIFAZ *et al.*, 2004; BOSCARDIN *et al.*, 2006; TRUMPFHELLER *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2007; TRUMPFHELLER *et al.*, 2008; HENRIQUES *et al.*, 2013; RAMPAZO *et al.*, 2015), tais como *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium falciparum* (BOSCARDIN *et al.*, 2006), *Trypanosoma cruzi* (RAMPAZO *et al.*, 2015), *Mycobacterium tuberculosis* (SILVA-SANCHEZ *et al.*, 2015), HIV (TRUMPFHELLER *et al.*, 2006; TRUMPFHELLER *et al.*, 2008; RUANE *et al.*, 2016) e vírus da dengue (DUDZIAK *et al.*, 2007; HENRIQUES *et al.*, 2013).

O estudo que utilizou o mAb α DEC205 fusionado à proteína circunsporozoíta (CSP), expressa pelas formas esporozoítas do *Plasmodium yoelii*, observou que a administração de uma dose do mAb quimérico α DEC205-CSP na presença de um estímulo de maturação (poly I:C, agonista de TLR3) para as DCs foi capaz de induzir LT CD4⁺ e CD8⁺, produtores de IFN- γ , em diferentes linhagens de camundongos (BOSCARDIN *et al.*, 2006). Em um trabalho no qual macacos *rhesus* foram imunizados com o mAb α DEC205 fusionado à proteína CS de *P. falciparum* na

presença do adjuvante poly I:C, observou-se a indução de LT CD4⁺ polifuncionais e a produção de anticorpos anti-CS com características neutralizantes (TEWARI *et al.*, 2010).

No caso do vírus da dengue a administração de uma dose do mAb quimérico α DEC205-NS1 na presença de um estímulo de maturação (poly I:C) para as DCs foi capaz de induzir elevados títulos de anticorpos e linfócitos T produtores de IFN- γ e uma imunidade protetora após desafio (HENRIQUES *et al.*, 2013). Já para o vírus HIV, já foi demonstrado que utilizando apenas uma dose do mAb α DEC205 acoplado à proteína Gag do vírus HIV na presença do adjuvante poly I:C demonstrou que a imunização foi capaz de induzir uma forte resposta imune mediada principalmente por LT CD4⁺ produtores de IFN- γ , mesmo quando os mesmos foram desafiados com um vírus vaccínia transgênico expressando a proteína Gag (TRUMPFHELLER *et al.*, 2006; TRUMPFHELLER *et al.*, 2008). A fim de testar a eficiência no direcionamento de antígenos, um estudo recente utilizou diferentes anticorpos contra diferentes receptores das células dendríticas (DEC205, CD207, DCIR, DCIR2, CLEC9A e TREML4), apontando a eficiência do anticorpo contra o receptor DEC205 na indução de resposta de CTL contra a proteína Gag do HIV em comparação a outros anticorpos. (KASTENMULLER *et al.*, 2014). Mais recentemente foi demonstrado pela primeira vez, que o direcionamento da proteína p24 utilizando o α DEC205 é capaz de gerar resposta HIV-específica no trato gastrointestinal pela imunização intranasal (RUANE *et al.*, 2016).

O primeiro estudo realizando em humanos utilizando o direcionamento de antígenos via DEC205 utilizou antígenos tumorais denominados NY-ESO-1 e mostrou que essa estratégia além de segura, estabilizou a doença para 13/45 pacientes testados e 2 pacientes obtiveram regressão tumoral (DHODAPKAR *et al.*, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal do projeto foi produzir um anticorpo monoclonal quimérico α DEC205 contendo epítomos do HIV e verificar se a imunização com o anticorpo é capaz de induzir resposta imune celular específica contra o HIV. Além disso, pretendemos comparar a resposta imune induzida pelo mAb com a induzida por uma vacina de DNA que codifica os mesmos epítomos.

2.2 Objetivos Específicos

- i. Clonagem da sequência de DNA que codifica os epítomos para linfócitos T CD4⁺ do HIV previamente descritos pelo nosso grupo em fase com a sequência da cadeia pesada do anticorpo α DEC205;
- ii. Purificação do mAb quimérico α DEC205HIVBr8 ou somente do anticorpo α DEC205 (controle negativo) a partir do sobrenadante de culturas de células HEK293T transfectadas com os plasmídeos codificando para as cadeias pesada e leve dos anticorpos;
- iii. Clonagem da sequência de DNA que codifica os mesmos epítomos para linfócitos T CD4⁺ do HIV no vetor pVAX;
- iv. Produção e purificação da vacina de DNA codificando epítomos do HIV;
- v. Imunização de camundongos com o mAb quimérico α DEC205-HIV na presença do adjuvante poly (I:C) e/ou com a vacina de DNA (*prime-boost* homólogo e heterólogo);
- vi. Análise da resposta imune celular HIV-específica nos diferentes grupos

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção dos plasmídeos que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo α DEC205.

Plasmídeos codificando as cadeias leve e pesada do anticorpo α DEC205 foram gentilmente cedidos pelo Dr. Michel Nussenzweig (The Rockefeller University, Nova York) e Dra. Silvia Beatriz Boscardin (Universidade de São Paulo) (BOSCARDIN *et al.*, 2006).

3.2 Clonagem da sequência de DNA que codifica os epítomos para linfócitos T CD4⁺ do HIV em fusão com a sequência do anticorpo α DEC205.

A sequência dos epítomos do HIV-1 selecionados foi: p6(32-46); p17(73-89); pol(785-799); gp160(188-201); rev(11-27); vpr3(65-82); vif(144-158); nef(180-194) (Tabela 2). Cada epítomo teve sua sequência nucleotídica otimizada para expressão em células de mamíferos. Essa otimização foi realizada com o auxílio de um banco de dados de *codon usage* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Após otimização, os epítomos foram colocados em sequência, obedecendo à ordem em que aparecem no genoma do HIV-1. Entre cada um foi inserido um espaçador de sequência GPGPG a fim de evitar a criação de epítomos juncionais (LIVINGSTON *et al.*, 2002).

Tabela 2 – Sequência de aminoácidos dos epítomos do HIV identificados.

Epítomo	Sequência de Aminoácidos
p6(32-46)	DKELYPLASLRSLFG
p17(73-89)	EELRSLYNTVATLYCVH
pol(785-799)	GKIILVAVHVASGYI
gp160(188-201)	NTSYRLISCNTSVI
rev(11-27)	ELLKTVRLIKFLYQSNP
vpr3(65-82)	QQLLFIHFRIGCRHSRIG
vif(144-158)	SLQYLALVALVAPKK
nef(180-194)	VLEWRFD SRLAFHHV

Sequência de aminoácidos e localização na sequência consenso do clado B dos diferentes epítomos para linfócitos T CD4⁺ do HIV-1 utilizados. Os epítomos foram descritos (FONSECA

et al., 2006) e avaliados quando a sua imunogenicidade (RIBEIRO *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2011) pelo nosso grupo.

Posteriormente, um gene sintético, codificando os epítomos *in tandem* assim como as sequencias espaçadoras, foi produzido a partir de um sintetizador pela empresa EZBiolab (<http://www.ezbiolab.com>). O gene sintético foi então subclonado no plasmídeo que codifica a cadeia pesada do DEC205 utilizando os sítios de restrição das enzimas *XhoI* e *NotI*.

3.3 Clonagem da sequência de DNA que codifica os epítomos em vetor para expressão em células de mamífero.

Para a produção da vacina de DNA, um gene sintético com otimização de códons foi produzido pela empresa EZBiolab e subclonado no vetor para expressão em células de mamífero pVAX1 utilizando os sítios para as enzimas de restrição *HindIII* e *NotI*.

3.4 Transformação de bactérias *E. coli* DH5 α competentes.

Para a transformação, 150-200ng dos plasmídeos pDEC205HIVBr8, pDEC205 (controle), pVAXHIVBr8 ou pVAX (controle) foram adicionados a tubos de microcentrifuga contendo alíquotas de 10 μ L de bactérias *E.coli* DH5 α competentes e 90 μ L de solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,1M. Após incubação em gelo por 30 minutos, os tubos foram colocados a 42°C por 35 segundos e recolocados em gelo por 5 minutos. Em seguida, foram acrescentados 500 μ L de meio LB (Invitrogen) sem antibiótico e os tubos foram incubados a 37°C por 1 hora, sob agitação constante (250rpm). Após esse período, os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 500 rcf e 400 μ L do sobrenadante foram descartados. O pellet foi ressuspendido no volume restante e 100 μ L foram semeados em placas de LB sólido contendo 50 μ g/mL de canamicina para os plasmídeos pVAXHIVBr8 e pVAX e 100 μ g/mL de ampicilina para os plasmídeos pDEC205HIVBr8 e pDEC205. A placa foi incubada a 37°C por 16 horas para a seleção dos clones resistentes ao antibiótico.

3.5 Purificação em larga escala do DNA plasmidial.

Para purificação dos plasmídeos, um clone resistente ao antibiótico foi selecionado para purificação em larga escala utilizando o “kit” comercial Giga Plasmid Purification, EndoFree (Qiagen) conforme a seguir. Inicialmente foi realizada a cultura de bactérias *E.coli* DH5 α transformadas individualmente com cada plasmídeo em 10 mL de meio LB líquido (Invitrogen) contendo 50 μ g/mL de canamicina para os plasmídeos pVAX e pVAXHIVBr8 e 100 μ g/mL de ampicilina para os plasmídeos pDEC205HIVBr8 e pDEC205. A cultura das bactérias transformadas com cada plasmídeo foi incubada durante 8 horas a 37°C sob agitação constante (250 rpm). A seguir, cada cultura foi diluída na razão de 1:500 em 2,5 litros de LB líquido, contendo canamicina (50 μ g/mL) ou ampicilina (100 μ g/mL) e incubada novamente a 37°C sob agitação constante (250rpm) durante 16 horas. Após esse período, o material foi centrifugado a 6000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet de bactérias foi ressuspendido em 125 mL de tampão P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM e RNase). Posteriormente, foram adicionados 125mL de tampão P2 (NaOH 200 mM; SDS 1%); a solução foi homogeneizada suavemente e então esperou-se o período de 5 minutos para a completa lise da parede bacteriana. Em seguida, foram adicionados 125 mL do tampão P3 (acetato de potássio 3M, pH 5,5) para neutralização da reação. A solução com as bactérias lisadas foi então transferida para um filtro proveniente do “kit” e mantida em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente, para que todo o material composto da parede e genoma bacterianos flutue sobre o líquido contendo o DNA de interesse. Após esse período o líquido foi filtrado a vácuo, lavado com 50mL do tampão FWB2 (acetato de potássio 1M, pH 5,0) e mantido no gelo por 30 minutos após adição de 30mL de tampão para remoção de endotoxinas. O filtrado foi aplicado em uma coluna de sefarose (Qiagen) previamente equilibrada com 75mL de tampão QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15% e Triton X-100 0,15 %). Após a aplicação do filtrado, a resina foi lavada com 600mL de tampão QC (NaCl 1,0 M; MOPS 50mM pH 7,0; etanol 15 %) e o DNA plasmidial foi eluído com 100mL de tampão QN (NaCl, 0,25 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %). O DNA eluído foi precipitado com 70mL de isopropanol e centrifugado à 14.000g por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, o DNA foi lavado com 10mL de etanol 70% (em

água livre de endotoxinas) e centrifugado a 14.000g por 10 minutos a 4°C. Por último, o pellet foi ressuscitado em 2,0 mL de água estéril livre de endotoxinas.

3.6 Quantificação e avaliação da integridade dos plasmídeos purificados.

Após a purificação dos plasmídeos, foi realizada a quantificação e avaliação da integridade dos mesmos. A quantificação dos plasmídeos foi realizada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 a 280nm, utilizando-se o aparelho Nanodrop Spectrophotometer ND-100. A avaliação da integridade dos plasmídeos foi realizada por análise de restrição com as endonucleases *HindIII* e *NotI* para o plasmídeo pVAXHIVBr8; *XhoI* e *NotI* para o plasmídeo pDEC205HIVBr8. O produto de digestão assim como o plasmídeo não digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com Blue Green Loading Dye I 1x (LGC, Biotecnologia). Por último, a construção foi sequenciada para confirmar a correta orientação do inserto (dados não mostrados).

3.7 Transfecção de células HEK293T.

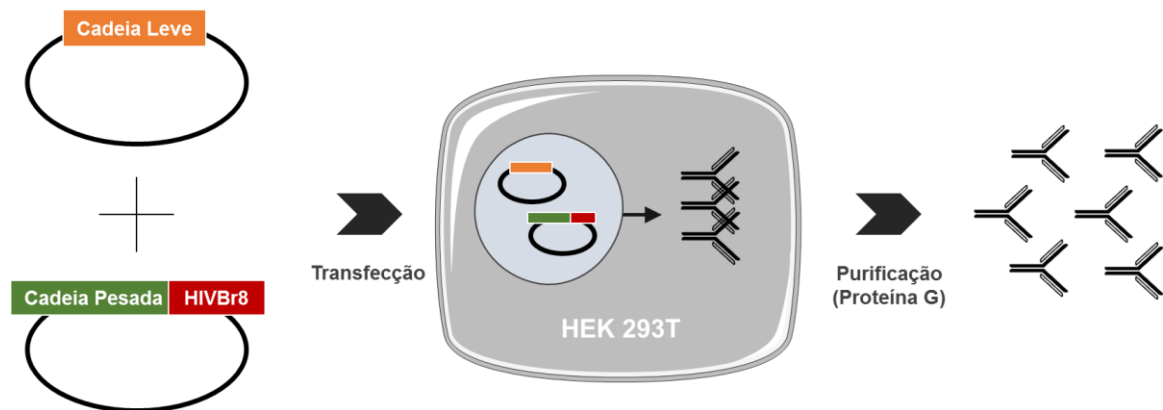
Células HEK293T foram semeadas em placas de 10 cm de diâmetro em meio DMEM acrescido de 2mM L-glutamina, 10U/mL penicilina, 1mM piruvato de sódio e 5% de soro fetal bovino com baixa concentração de IgG (Invitrogen). Após dois dias em cultura (quando a confluência estava em torno de 70%), as células foram transfectadas utilizando os plasmídeos que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo na presença de fosfato de cálcio e polietilenimina- PEI (0,45mg/mL, Sigma). As placas foram incubadas em estufa a 37°C, com 5% CO₂ por 5 dias.

3.8 Precipitação e purificação dos anticorpos αDEC205.

Após 5 dias em cultura, os sobrenadantes das culturas de células foram coletados e filtrados. Os anticorpos foram precipitados em uma solução contendo 60% de sulfato de amônio (Sigma). Os precipitados foram coletados por centrifugação e ressuscitados em PBS e o mesmo foi dialisado em PBS durante a noite. Os anticorpos monoclonais quiméricos foram purificados utilizando esferas de

proteína G (Amersham-Pharmacia) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (Figura 7).

Figura 7 – Esquema representativo da transfecção de células HEK293T para produção dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8.



Células HEK293T foram transfectadas utilizando os plasmídeos que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo e incubadas em estufa a 37°C, com 5% CO₂ por 5 dias. Após 5 dias em cultura, os sobrenadantes das culturas de células foram coletados, filtrados e os anticorpos monoclonais quiméricos foram purificados utilizando esferas de proteína G.

3.9 Ensaio de ligação dos anticorpos aos receptores DEC205 de células CHO e aos esplenócitos totais.

Os anticorpos purificados foram diluídos nas seguintes concentrações: 10, 1 e 0,1 µg/mL e incubados com 1x10⁵ células CHO (Células de Ovário de Hamster Chinês) expressando o receptor DEC205 murino. Como controle negativo, as mesmas concentrações de anticorpos foram incubadas com células CHO que expressam o receptor DCIR. Além disso, esplenócitos totais de camundongos BALB/c foram marcados concomitantemente com as mesmas diluições dos anticorpos purificados e foram incubados com anti-CD3, DX5 e CD19 marcados com biotina. Após 30 minutos de incubação, as células CHO e os esplenócitos foram lavados com tampão de FACS (PBS + 2% Soro Fetal Bovino) e incubados com um anticorpo secundário anti-camundongo marcado com PE (BD Biosciences) na diluição de 1:200 para as células CHO e também com Streptavidina-APCCy7 (diluição 1:100) para os esplenócitos. Após 30 minutos de incubação, as células

foram lavadas novamente e somente os esplenócitos tiveram mais uma etapa de marcação com os anticorpo anti-CD11c APC (diluição 1:200), MHCII FITC (diluição 1:200), CD8 Pacific Blue (diluição 1:200) (Tabela 3). As amostras foram lidas em citômetro de fluxo (FACS Canto II) e analisadas utilizando-se o software FlowJo (TreeStar).

3.10 Western Blot.

Para avaliar a expressão dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 realizamos o ensaio de western blot. Os anticorpos purificados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) e a transferência para a membrana de nitrocelulose (hybond-C extranitrocelulose GE Healthcare) foi obtida pelo sistema de transferência semi-seco. A eficiência da transferência foi verificada pela detecção da proteína na membrana com o reagente Ponceau-S (Sigma). Após a transferência, a membrana foi incubada com a solução de bloqueio (5% de leite desnatado e 2,5% de BSA em PBS-Tween 20 0,02%) durante a noite a 4°C sob agitação. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-Tween 20 0,05% e incubada com o anticorpo anti-IgG1 de camundongo (1:2000) conjugado a peroxidase (SouthernBiotech) para a detecção da cadeia pesada, e para a detecção da cadeia leve a membrana foi incubada com o anticorpo anti-Kappa de camundongo (1:2000) conjugado a peroxidase (SouthernBiotech). Os anticorpos foram incubados simultaneamente por 1 hora. Decorrido esse período, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-Tween 20 por 10 minutos cada lavagem. A revelação da membrana foi feita por quimioluminescência utilizando os reagentes do sistema ECL (GE Healthcare) e exposição a filmes autoradiográficos Hyperfilm (Kodak).

3.11 Animais.

Foram utilizados camundongos isogênicos fêmea de 6 a 8 semanas de idade da linhagem convencional BALB/c (H-2^d). Os animais provenientes do centro de desenvolvimento de modelos experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo foram mantidos e manipulados em condições SPF no biotério da disciplina de imunologia - BiDI, registro CEUA/UNIFESP nº.02. O projeto foi

submetido e aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (CEUA nº 4819180814) (Anexo A).

3.12 Imunização experimental.

Grupos de seis camundongos BALB/c (H-2^d) receberam duas doses, com o intervalo de quinze dias, pela via intraperitoneal ou subcutânea com 4µg do mAb αDEC205HIVBr8 na presença de 50µg do adjuvante poly I:C ou com 100µg da vacina de DNA pVAXHIVBr8 pela via intramuscular. Os grupos controle foram imunizados com o mAb αDEC205 na presença de poly I:C ou com o vetor vazio pVAX.

Além disso, outros grupos foram imunizados com uma dose inicial do mAb αDEC205HIVBr8 seguida de uma dose da vacina de DNA pVAXHIVBr8 ou vice-versa. Os grupos controles foram imunizados com uma dose do anticorpo monoclonal αDEC205 na presença de poly I:C seguida de uma dose com o vetor vazio pVAX ou vice-versa.

3.13 Avaliação da resposta imune celular.

3.13.1 Suspensão Celular.

Duas semanas após a última dose, os animais foram eutanasiados através da injeção intraperitoneal como uma dose três vezes superior a necessária para alcançar o plano anestésico de Xilazina (30mg/kg) e Cetamina (300mg/kg), e os baços coletados em fluxo laminar. As células foram obtidas após maceração gentil do órgão e lavadas por centrifugação (1700rpm a 4°C, por 6 minutos) com 10 mL de meio RPMI (Gibco) (suplementado com L-glutamina 2 mM (Sigma), solução de aminoácidos não essenciais (1%vol/vol) (Gibco), piruvato de sódio 1mM, 2-ME 5x10⁻⁵M (Sigma) e os antibióticos Gentamicina (40 g/mL) e Peflacin (20 g/mL) e vitamina (1%vol/vol)). Em seguida, as células foram tratadas com tampão hemolítico ACK (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 1 mM, Na₂EDTA 0,1 mM) para lise das hemácias e em seguida lavadas 2 vezes com 10 mL de RPMI. As células foram ressuspensas em

1mL de meio R10 (meio RPMI suplementado, contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco)).

3.13.2 Citometria Multiparamétrica.

Para monitorar a proliferação das células T, os esplenócitos dos camundongos imunizados foram marcados com CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester). Em síntese, esplenócitos isolados foram ressuspensos em PBS pré-aquecido (37°C) e marcados com 1,25 µM de CFSE (Molecular Probes) durante 10 minutos à 37°C. Após as lavagens com 5 mL de R10, as células foram ressuspensas em meio R10 na concentração de $2,5 \times 10^6$ /mL. As células foram cultivadas por 4 dias em estufa a 37°C e 5% CO₂ em placas de 96 poços de fundo U (Nunc) na concentração de 5×10^5 células na presença de Concanavalina A (Sigma - 2,5µg/mL) como controle positivo, com os oito peptídeos do HIV-1 (5µM), ou somente meio (como controle negativo). Após 4 dias de incubação, as células foram re-estimuladas na presença de anti-CD28 (2µg/mL – BD Pharmingen) e Concanavalina A (Sigma - 2,5µg/mL) ou com os oito peptídeos do HIV-1 (5µM). Após uma hora na estufa, 0,2µL/poço de Brefeldina GolgiPlug TM (BD Pharmingen) foi adicionada à cultura e as células foram incubadas por mais 12 horas. Após o período de incubação, as células foram coletadas e lavadas com “*Macs Buffer*” (MB) (0,5% BSA; 2mM EDTA em PBS) para marcação com os anticorpos monoclonais de superfície (CD3 APCCy7, CD4 PerCP e CD8 Pacific Blue) e posteriormente fixadas e permeabilizadas utilizando o kit BD Cytotfix/Cytoperm. Em seguida, foi realizada a marcação intracelular com os anticorpos monoclonais (IL-2 PE, TNF-α PeCy7 e IFN-γ APC) por 30 minutos no escuro à 4°C (Tabela 3). Foram adquiridos 1 milhão de eventos em um citômetro FACScanto II (BD Biosciences) e a análise foi feita com o auxílio do *software* FlowJo (Tree Star). Para ajuste das voltagens foram utilizadas *beads* (BD Biosciences) marcadas com os fluorocromos individualmente.

Tabela 3: Painel de anticorpos para análise de citometria multiparamétrica.

	Anticorpos	Clone	Tipo de Marcação
Ensaio de ligação aos esplenócitos	CD3 Biotinilado	145-2C11	Superfície
	DX5 Biotinilado	DX5	Superfície
	CD19 Biotinilado	1D3	Superfície
	Streptavidina APCCy7	----	Superfície
	CD11c APC	HL3	Superfície
	MHCII FITC	2G9	Superfície
	CD8 Pacific Blue	53-6.7	Superfície
Proliferação e detecção de citocinas intracelulares	CD3 APCCy7	145-2C11	Superfície
	CD4 PerCP	RM4-5	Superfície
	CD8 Pacific Blue	53-6.7	Superfície
	IL-2 PE	JES6-5H4	Intracelular
	IFN γ APC	XMG1.2	Intracelular
	TNF α PECy7	MP6-XT22	Intracelular

3.13.3 ELIspot IFN- γ .

Os ensaios de ELIspot foram realizados utilizando o set anti-*mouse* IFN- γ (e-bioscience) de acordo com as instruções do fabricante. Em síntese, o anticorpo de captura foi adicionado à placa em volume final de 100 μ L por poço e a placa incubada durante a noite a 4°C. Em seguida os poços foram lavados duas vezes com 200 μ L de tampão e cada poço foi bloqueado com 200 μ L de R10 durante uma hora à temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados às placas os estímulos: meio RPMI, como controle negativo, ConA (2,5 μ g/poço) como controle positivo, peptídeos do HIV-1 (5 μ M) em volume final de 100 μ L. Em seguida foram adicionadas as suspensões celulares na concentração de 3x10⁵ células/poço também em volume final de 100 μ L. Todos os estímulos e suspensões celulares foram preparados em R10 adicionados de 30 U/mL de IL-2 recombinante humana. Após adição dos estímulos e suspensões celulares, a placa foi novamente incubada a 37 °C em estufa à 5 % de CO₂ durante a noite. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes, o anticorpo de detecção foi diluído e adicionado aos poços (volume 100 μ L/poço) e as placas incubadas novamente durante 2 horas à temperatura

ambiente. Após lavagem dos poços, o conjugado enzimático foi diluído e adicionado aos poços (100 µL/poço), seguido de mais uma etapa de incubação de 1 hora à temperatura ambiente. Para revelação, os poços foram lavados 4 vezes e posteriormente adicionados 100 µL da solução final de substrato/poço AEC (3-amino-9-ethylcarbazole-BD) e a formação de *spots* foi monitorada de 5 – 60 minutos, levando em consideração o aumento do *background* nos poços de controle negativo. Passado esse período, o revelador foi desprezado e a reação interrompida com 5 lavagens com água deionizada.

3.13.4 Análise estatística.

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0®. A significância estatística (valores de $p < 0,05$) foi calculada utilizando-se One-way ANOVA ou Two-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey.

4 RESULTADOS

4.1 Purificação dos plasmídeos que codificam os anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 e da vacina de DNA HIVBr8.

Plasmídeos que codificam as cadeias leve e pesada do anticorpo α DEC205 foram cedidos pelo Dr. Michel Nussenzweig da Universidade de Rockefeller, Nova York e pela Dra. Silvia Beatriz Boscardin da Universidade de São Paulo. Primeiramente, para obtenção de maiores quantidades do DNA pDEC205HIVBr8, pDEC205, pVAXHIVBr8 e pVAX, bactérias *E. coli* DH5 α competentes foram transformadas e o DNA plasmidial foi purificado utilizando o kit de purificação comercial Giga Plasmid Purification, Endofree (Quiagen). Em sequência à purificação foi realizada a análise da integridade dos plasmídeos através da análise de restrição utilizando as enzimas *XhoI* e *NotI* para o plasmídeo pDEC205HIVBr8 e *HindIII* e *XhoI* para pVAXHIVBr8. Após a digestão e/ou linearização (utilizando apenas uma enzima) dos plasmídeos, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%.

Na Figura 8, podemos observar o gel de agarose resultante da análise de restrição dos plasmídeos pDEC205 e pDEC205HIVBr8. A digestão do plasmídeo pDEC205 mostrou uma banda de aproximadamente 7.500 pb correspondente ao tamanho esperado do vetor. Já para o pDEC205HIVBr8, é importante ressaltar que as bandas correspondentes ao plasmídeo circular e linear possuem tamanho um pouco maior que 7.500 pb devido ao inserto HIVBr8 de 515 pb. Após digestão do pDEC205HIVBr8 com as enzimas *XhoI* e *NotI* é observada a banda correspondente ao vetor (7.500 pb), além de observar a liberação de uma banda de 515 pb correspondente ao HIVBr8.

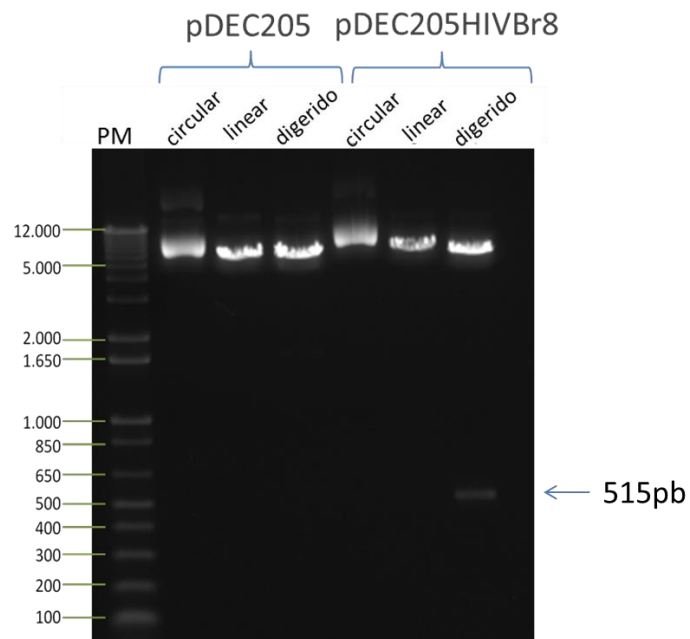


Figura 8 – Análise da integridade dos plasmídeos pDEC205 e pDEC205HIVBr8 após purificação: Gel de agarose 1% após purificação do plasmídeo pDEC205 e pDEC205HIVBr8; Peso Molecular (PM) (Ready-load 1Kb plus DNA ladder, Invitrogen); pDEC205: plasmídeo circular, linearizado com *XhoI* e digerido com *XhoI* e *NotI*; pDEC205HIVBr8: plasmídeo circular, linearizado com *XhoI* e digerido com *XhoI* e *NotI*.

Na Figura 9 podemos observar o resultado da análise de restrição dos plasmídeos pVAX e pVAXHIVBr8 realizada com as enzimas *HindIII* e *XhoI*. A eletroforese em gel de agarose mostrou que a digestão do plasmídeo vazio pVAX (figura 9A) revelou uma banda única de aproximadamente 3000pb, tamanho esperado do vetor. A digestão do pVAXHIVBr8 (figura 9B) liberou uma banda de 515pb correspondente ao tamanho do inserto HIVBr8 inserido, assim como também mostrou a banda de 3000pb do vetor.

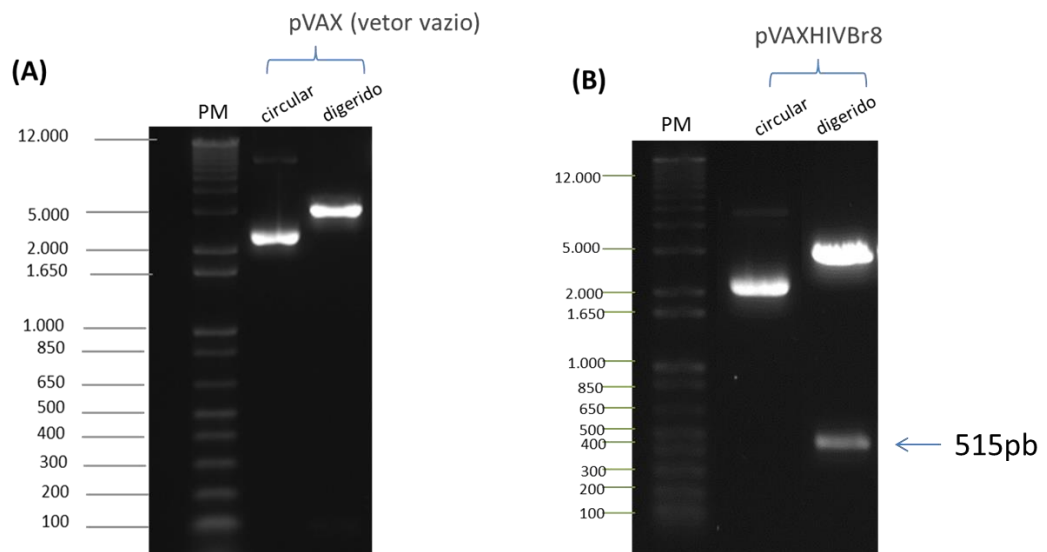


Figura 9 – Análise da integridade dos plasmídeos pVAX e pVAXHIVBr8 após a purificação: Gel de agarose 1% após purificação do plasmídeo pVAX (vetor vazio) e pVAXHIVBr8; (A) pVAX: Peso Molecular (PM) (Ready-load 1Kb plus DNA ladder, Invitrogen), plasmídeo circular e digerido com *HindIII* e *XhoI*; (B) pVAX-HIVBr8: Peso Molecular (PM) (Ready-load 1Kb plus DNA ladder, Invitrogen), plasmídeo circular e digerido com *HindIII* e *XhoI*.

O resultado nos mostra que ambos os plasmídeos foram produzidos e purificados com sucesso, ressaltando que não foi observada contaminação dos plasmídeos com DNA ou RNA genômicos. Além disso, a análise do sequenciamento da construção do pDEC205HIVBr8 e pVAXHIVBr8 confirmou a presença e correta orientação dos genes (dados não mostrados).

4.2 Purificação dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8.

Após a purificação dos plasmídeos pDEC205 e pDEC205HIVBr8 foi realizada a transfecção transiente de células HEK293T com os plasmídeos, de acordo com o item 3.7, a fim de purificar os anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8, respectivamente. Como podemos observar na figura 10, o anticorpo α DEC205 foi purificado com sucesso e após corrida em SDS-PAGE 12% sob condições redutoras é possível verificar uma banda correspondente a cadeia leve (L) e a cadeia pesada (H) que possuem respectivamente 25 e 50kDa. No caso do α DEC205HIVBr8, a

cadeia H possui também o linker e os oito epítomos para o HIV e portanto apresenta peso molecular maior que 50kDa.

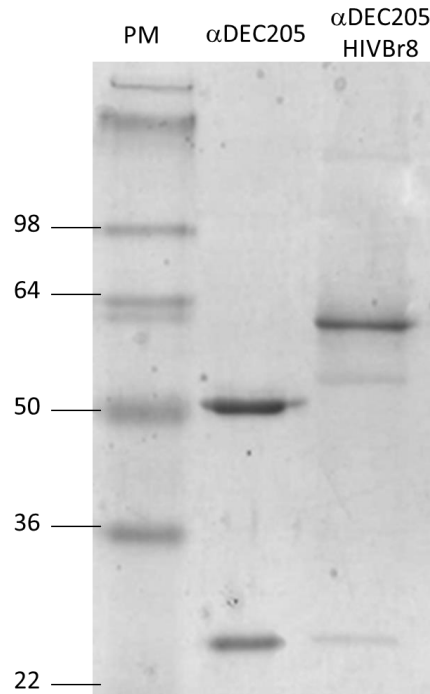


Figura 10 – Produção dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8: SDS-PAGE em condições redutoras após purificação dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 a partir do sobrenadante de culturas de células HEK293T transfectadas com os plasmídeos pDEC205 (α DEC205) e pDEC205HIVBr8 (α DEC205HIVBr8). O peso molecular (PM) está indicado à esquerda em kDa.

A fim de confirmar a presença das cadeias leve e pesada nos anticorpos, foi realizado o Western Blot (Figura 11). Como demonstrado, ao utilizarmos anticorpos específicos para a cadeia leve (kappa) e pesada de camundongos conjugados a peroxidase, tanto o α DEC205 quanto o α DEC205HIVBr8 apresentaram as bandas correspondente a cadeia leve e pesada.

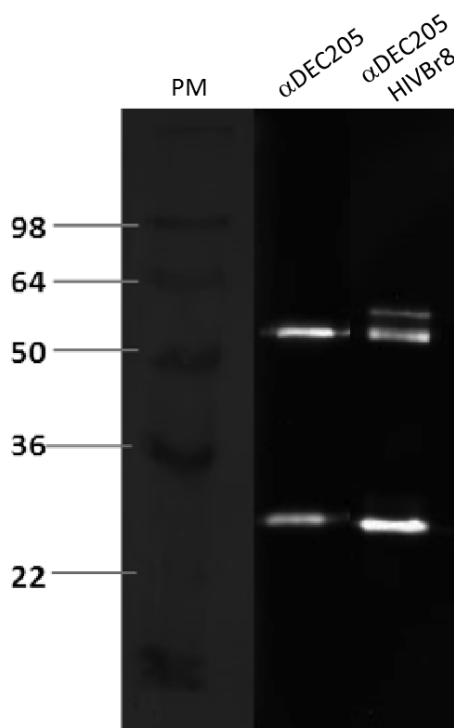


Figura 11 – Western Blot após purificação dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8: Western blot das eluições após purificação dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8: peso molecular (PM); α DEC205 e α DEC205HIVBr8.

4.3 Ensaio de ligação dos anticorpos a células CHO que expressam os receptores DEC205 ou DCIR2.

Em sequência a purificação, cada um dos anticorpos foi quantificado e submetido a um ensaio de ligação a células CHO (células de ovário de hamster chinês: *Chinese Hamster Ovary*) que expressam o receptor DEC205 ou DCIR2 (controle negativo) murinos (figura 12A e B respectivamente). As células foram incubadas com três diferentes concentrações de cada anticorpo: 10, 1 e 0,1 μ g/mL. Podemos observar que os anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 se ligaram de maneira dose dependente aos receptores DEC205 expressos na superfície das células CHO. Em contraste, não foi observado ligação dos anticorpos às células CHO que expressam o receptor DCIR2. Desses resultados podemos concluir que ambos os anticorpos produzidos se ligam de maneira dose dependente e específica ao receptor DEC205.

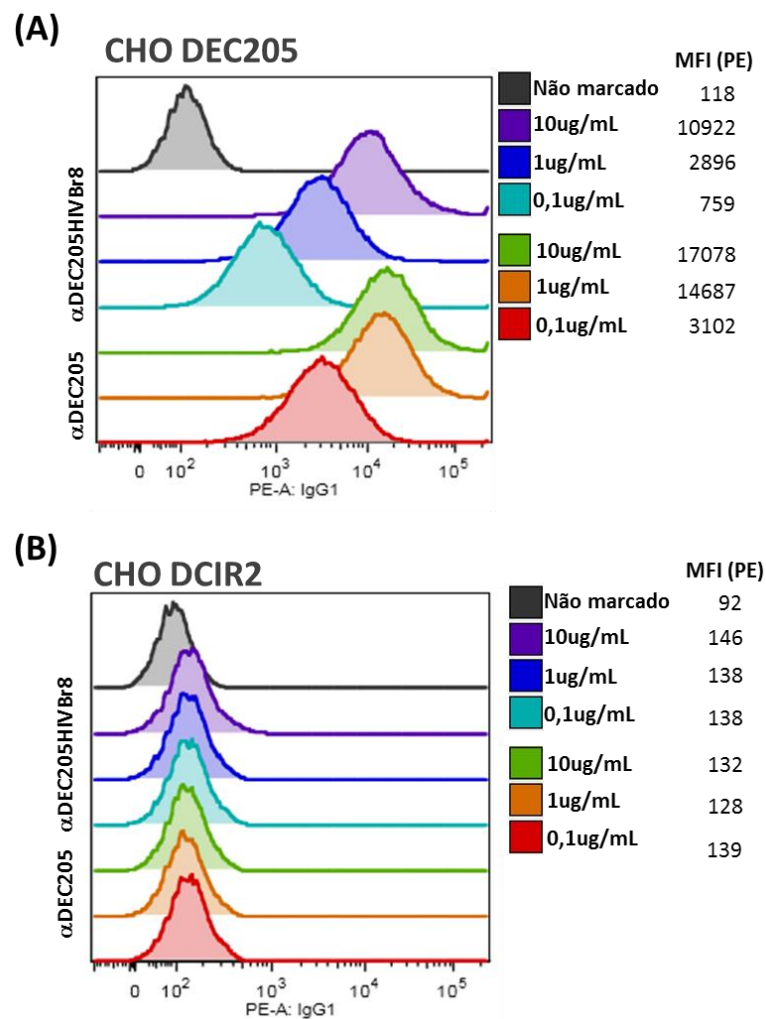


Figura 12 – Ensaio de ligação dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 a células CHO que expressam os receptores DEC205 ou DCIR2: Ensaio de ligação dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 nas concentrações de 10, 1 e 0,1 μ g/mL incubados com 1×10^5 células CHO que expressam o receptor DEC-205 ou o receptor DCIR por 30 minutos no gelo. Após duas lavagens, as células foram incubadas com um anticorpo anti-IgG de camundongo PE (1:2000) por 30 minutos e lavadas mais duas vezes. Trinta mil eventos foram adquiridos no citômetro FACSCanto II. A análise foi realizada utilizando-se o software FlowJo (TreeStar). MFI= Mediana da Intensidade de Fluorescência.

4.4 Ensaio de ligação dos anticorpos a esplenócitos totais.

Com o objetivo de confirmar se os anticorpos produzidos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 teriam a capacidade de se ligar às células do baço, realizamos uma marcação com diferentes concentrações dos anticorpos purificados. Os esplenócitos foram isolados e incubados com três diferentes concentrações de cada

anticorpo (10, 1 e 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e com os anticorpos biotinizados anti-DX5, anti-CD3 e anti-CD19 a fim de excluir as populações de células NK, linfócitos T e B, respectivamente. Posteriormente, as células foram também marcadas com streptavidina e anticorpos anti-CD11c, anti-MHCII e anti-CD8 para definir as subpopulações de células dendríticas, a estratégia de análise foi realizada assim como mostrado no Apêndice A, Figura 1.

Na figura 13A podemos observar que os anticorpos αDEC205 e $\alpha\text{DEC205HIVBr8}$ se ligaram de maneira dose dependente à superfície das células $\text{DX5}^- \text{CD3}^- \text{CD19}^- \text{CD11c}^+ \text{MHCII}^+ \text{CD8}^+$. Em contraste, não foi observado ligação dos anticorpos (figura 13B) às células que não expressam a cadeia alfa da molécula CD8 ($\text{DX5}^- \text{CD3}^- \text{CD19}^- \text{CD11c}^+ \text{MHCII}^+ \text{CD8}^-$) e às células $\text{DX5}^+ \text{CD3}^+ \text{CD19}^+$ (figura 13C). Desses resultados podemos concluir que os anticorpos produzidos possuem especificidade para as células dendríticas $\text{CD8}\alpha^+$ e expressam conseqüentemente o receptor DEC205.

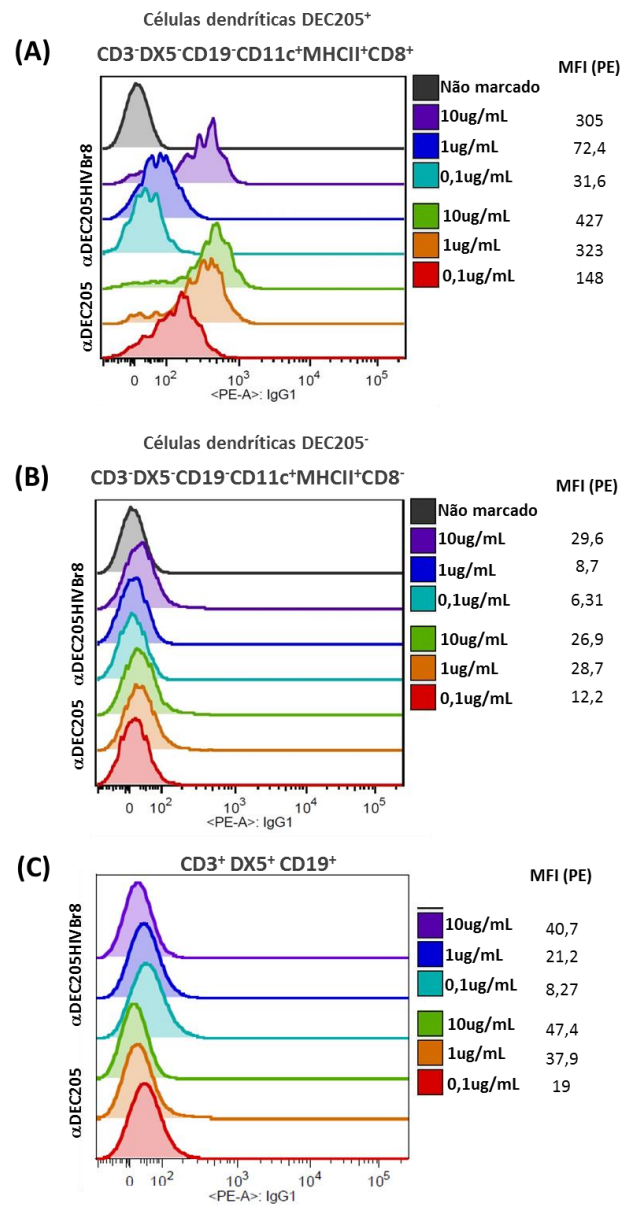


Figura 13 – Ensaio de ligação dos anticorpos αDEC205 e αDEC205HIVBr8 a esplenócitos: Ensaio de ligação dos anticorpos αDEC205 e αDEC205HIVBr8 nas concentrações de 10, 1 e 0,1 μg/mL incubados com esplenócitos recém isolados. Inicialmente as células foram incubadas por 30 minutos com os anticorpos purificados e com os anticorpos biotinizados anti-DX5, CD3 e CD19. Após duas lavagens, as células foram incubadas com um anticorpo anti-IgG de camundongo PE e Streptavidina-APCCy7 por 30 minutos e lavadas mais duas vezes. Por último, as células foram incubadas com os anticorpos anti CD11c APC, MHCII FITC e CD8 Pacific Blue. Após lavagem, foram adquiridos três milhões de eventos no citômetro FACSCanto II. A análise foi realizada utilizando-se o software FlowJo (TreeStar). MFI= Mediana de Intensidade de Fluorescência.

4.5 Avaliação de diferentes vias de imunização com os anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8.

Inicialmente para avaliar a melhor via de imunização com os anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8, camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados com duas doses de 4 μ g dos anticorpos pela via intraperitoneal (I.P) ou subcutânea (S.C) na presença de 50 μ g do adjuvante poly I:C. Como mostrado na figura 14, os esplenócitos do grupo que recebeu a vacina pela via intraperitoneal apresentaram maior número de células produtoras de $IFN\gamma$ quando comparado ao grupo imunizado pela via subcutânea.

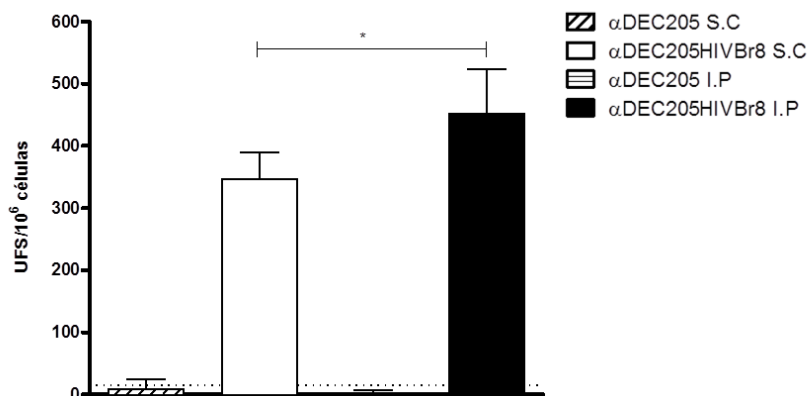


Figura 14 – Número de células produtoras de $IFN\gamma$ após imunização com os anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 utilizando diferentes vias de administração: Camundongos BALB/c (n=6) foram imunizados com duas doses de 4 μ g dos anticorpos α DEC205 ou α DEC205HIVBr8 na presença de 50 μ g de poly I:C pela via intraperitoneal ou subcutânea. Quinze dias após a última dose, o baço dos animais foi removido e os esplenócitos colocados em cultura, na presença do pool de peptídeos do HIV (5 μ M) a fim de avaliar a produção de $IFN\gamma$ pelo ensaio de ELISpot;. *Cutoff*: 15 UFS/10⁶ células. *p< 0,05; UFS= Unidade formadora de spots.

Além disso, ao avaliar a proliferação celular específica, observamos que os esplenócitos dos animais que receberam o anticorpo α DEC205HIVBr8 pela via I.P apresentaram uma porcentagem estatisticamente superior de linfócitos TCD4⁺ (figura 15A) específicos que proliferaram quando comparada aos dos demais grupos. O mesmo fenômeno pode ser verificado para os linfócitos TCD8⁺ (figura

15B) embora em menor magnitude. Em contraste, os esplenócitos dos animais imunizados com o anticorpo α DEC205 não apresentaram número significativo de células produtoras de $IFN\gamma$ nem proliferação de linfócitos T HIV-específicos.

Figura 15 – Avaliação da proliferação celular após imunização com os anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 utilizando diferentes vias de administração.

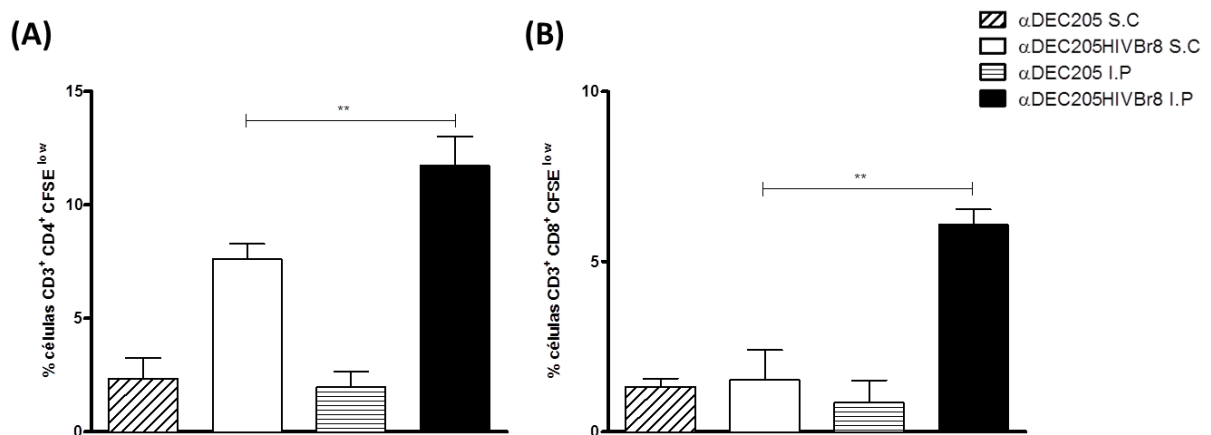


Figura 15 – Avaliação da proliferação celular após imunização com os anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 utilizando diferentes vias de administração: Camundongos BALB/c (n=6) foram imunizados com duas doses de 4 μ g dos anticorpos α DEC205 ou α DEC205HIVBr8 na presença de 50 μ g de poly I:C pela via intraperitoneal ou subcutânea. Quinze dias após a última dose, o baço dos animais foi removido e os esplenócitos marcados com 1,25 μ M de CFSE e colocados em cultura na presença do pool de peptídeos do HIV a fim de avaliar a proliferação de linfócitos (A) TCD4⁺ ou (B) CD8⁺; ** p<0,01.

4.6 Avaliação da imunogenicidade do anticorpo α DEC205HIVBr8 e da vacina de DNA HIVBr8 em estratégia de *prime-boost* homólogo ou heterólogo.

Determinada a melhor via de imunização dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8, decidimos testar a estratégia vacinal capaz de conferir resposta imune HIV-específica superior. Animais da linhagem BALB/c foram imunizados com duas doses de 4 μ g dos anticorpos pela via intraperitoneal na presença de 50 μ g de poly I:C ou duas doses de 100 μ g da vacina de DNA HIVBr8 pela via intramuscular, para avaliar a estratégia em *prime-boost* homólogo. Os demais grupos foram

utilizados a fim de testar a estratégia em *prime-boost* heterólogo, recebendo uma dose do anticorpo seguida de uma dose da vacina de DNA ou vice-versa.

Como mostrado na figura 16, os esplenócitos tanto do grupo que recebeu duas doses do anticorpo α DEC205HIVBr8 quanto do grupo que recebeu uma dose de DNA HIVBr8 seguida de uma dose de α DEC205HIVBr8, apresentaram maior número de células produtoras de $IFN\gamma$ quando comparados ao grupos que receberam duas doses da vacina de DNA ou uma dose do anticorpo seguido da vacina de DNA. Além disso, o grupo que recebeu α DEC205HIVBr8/HIVBr8 apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo que recebeu a vacina de DNA HIVBr8, que por sua vez, obteve menor magnitude de resposta observada.

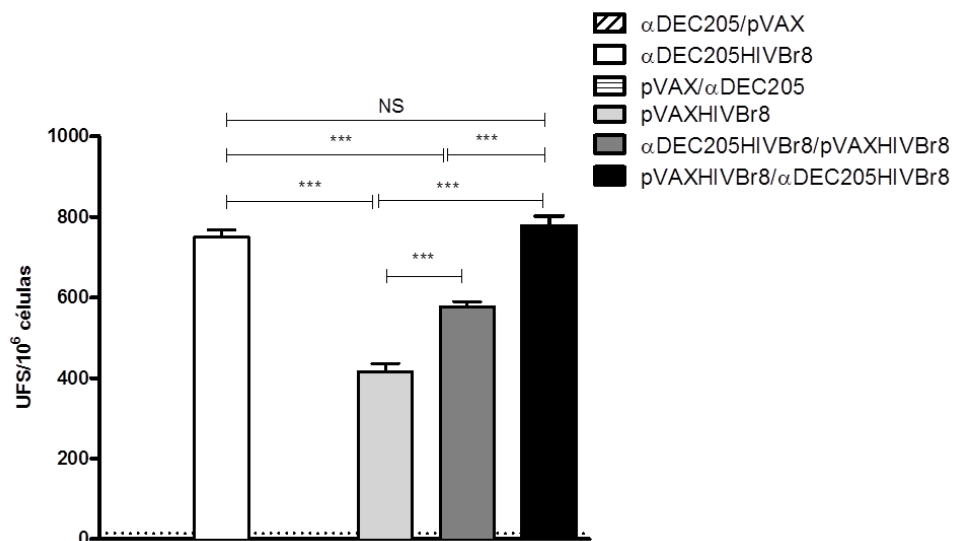


Figura 16 – Número de células produtoras de $IFN\gamma$ em esplenócitos de animais imunizados com o anticorpo α DEC205HIVBr8 e/ou a vacina de DNA HIVBr8: Camundongos BALB/c (n=6) foram imunizados com duas doses de 4 μ g do anticorpo α DEC205HIVBr8 na presença de 50 μ g de poly I:C pela via intraperitoneal e/ou duas doses de 100 μ g da vacina de DNA HIVBr8 pela via intramuscular. Quinze dias após a última dose, o baço dos animais foi removido e os esplenócitos colocados em cultura, na presença do pool de peptídeos do HIV (5 μ M) a fim de avaliar a produção de $IFN\gamma$ pelo ensaio de ELIspot;. *Cutoff*: 15 UFS/10⁶ células. ***p< 0,001; UFS=Unidade formadora de spots; NS=não significativa.

Ao avaliar a proliferação celular específica, observamos que os esplenócitos dos animais tanto do grupo que recebeu duas doses do anticorpo α DEC205HIVBr8 quanto do grupo que recebeu uma dose da vacina de DNA HIVBr8 seguida de uma dose de α DEC205HIVBr8 apresentaram porcentagem estatisticamente superior de linfócitos TCD4⁺ (figura 17A) que proliferaram quando comparados aos grupos que receberam duas doses da vacina de DNA ou uma dose do anticorpo α DEC205HIVBr8 seguido da vacina HIVBr8. O mesmo fenômeno pode ser verificado para os linfócitos TCD8⁺ (figura 17B), sendo que o grupo α DEC205HIVBr8/pVAXHIVBr8 apresentou maior porcentagem de proliferação quando comparado ao grupo que recebeu a vacina de DNA.

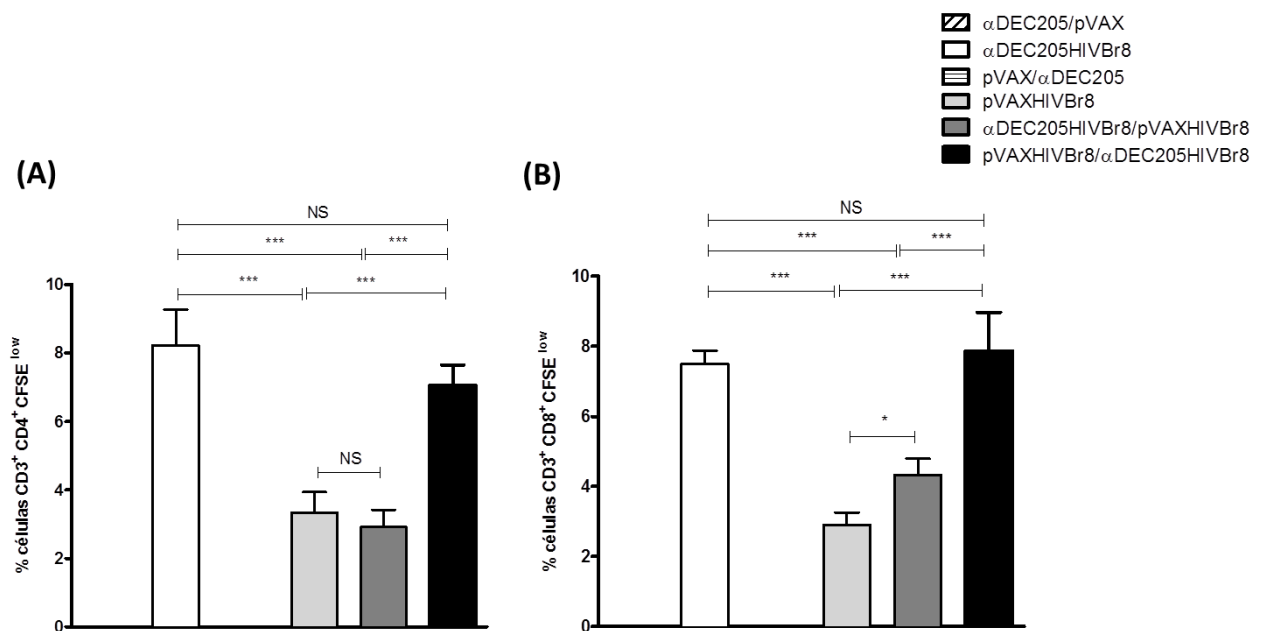


Figura 17 – Avaliação da proliferação celular em animais imunizados com o anticorpo α DEC205HIVBr8 e/ou a vacina de DNA HIVBr8: Camundongos BALB/c (n=6) foram imunizados com duas doses de 4 μ g dos anticorpos α DEC205 ou α DEC205HIVBr8 na presença de 50 μ g de poly I:C pela via intraperitoneal e/ou duas doses de 100 μ g da vacina de DNA HIVBr8 pela via intramuscular. Quinze dias após a última dose, o baço dos animais foi removido e os esplenócitos marcados com 1,25 μ M de CFSE e colocados em cultura na presença do pool de peptídeos do HIV-1 (5 μ M) a fim de avaliar a proliferação de linfócitos TCD4⁺ (A) ou CD8⁺ (B). ; *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001; NS=Não significativa.

Posteriormente, avaliamos se a imunização seria capaz de induzir células polifuncionais, ou seja, capazes de proliferar e produzir citocinas

simultaneamente. Para tal, foi utilizada a estratégia de análise *booleana* para avaliar a produção de citocinas em nível de célula única das células que proliferaram (Apêndice A; Figura 2). Como podemos observar na figura 18A, os esplenócitos dos animais que receberam duas doses do anticorpo α DEC205HIVBr8 apresentaram porcentagem superior de LT CD4⁺ polifuncionais que proliferam e produzem IFN γ /TNF α /IL-2 quando comparado ao grupo que recebeu duas doses da vacina de DNA HIVBr8 ou α DEC205HIVBr8/HIVBr8, não tendo diferença estatística ao grupo HIVBr8/ α DEC205HIVBr8. Ademais, tanto o grupo que recebeu duas doses do anticorpo α DEC205HIVBr8 quanto o grupo que recebeu HIVBr8/ α DEC205HIVBr8 apresentaram porcentagem estatisticamente superior de LT CD4⁺ capazes de proliferar e produzir IFN γ /TNF α simultaneamente ou produzir as citocinas IFN γ ou TNF α isoladamente quando comparados aos grupos que receberam duas doses da vacina de DNA ou α DEC205HIVBr8/HIVBr8.

Ao avaliar os LT CD8⁺ (figura 18B), as formulações vacinais se igualaram na indução de LT CD8⁺ que proliferam e produzem IFN γ /TNF α simultaneamente. Na produção de citocinas individuais, duas doses da vacina HIVBr8 foi superior na indução de LT CD8⁺ que proliferam e produzem IFN γ quando comparada aos grupos que receberam outras formulações com o anticorpo α DEC205HIVBr8. Entretanto, os esplenócitos dos animais imunizados com duas doses do anticorpo α DEC205HIVBr8 e HIVBr8/ α DEC205HIVBr8 obtiveram porcentagem estatisticamente superior de LT CD8⁺ que proliferam e produzem TNF α quando comparado ao grupo que recebeu duas doses da vacina de DNA HIVBr8 ou α DEC205HIVBr8/HIVBr8, sendo que o último apresentou também diferença quando comparado a vacina de DNA.

Em contraste, os esplenócitos dos animais controles que foram imunizados com o anticorpo α DEC205/pVAX ou pVAX/ α DEC205 não apresentaram produção significativa de citocinas e nem proliferação de linfócitos T (CD4⁺ ou CD8⁺) HIV-específicos.

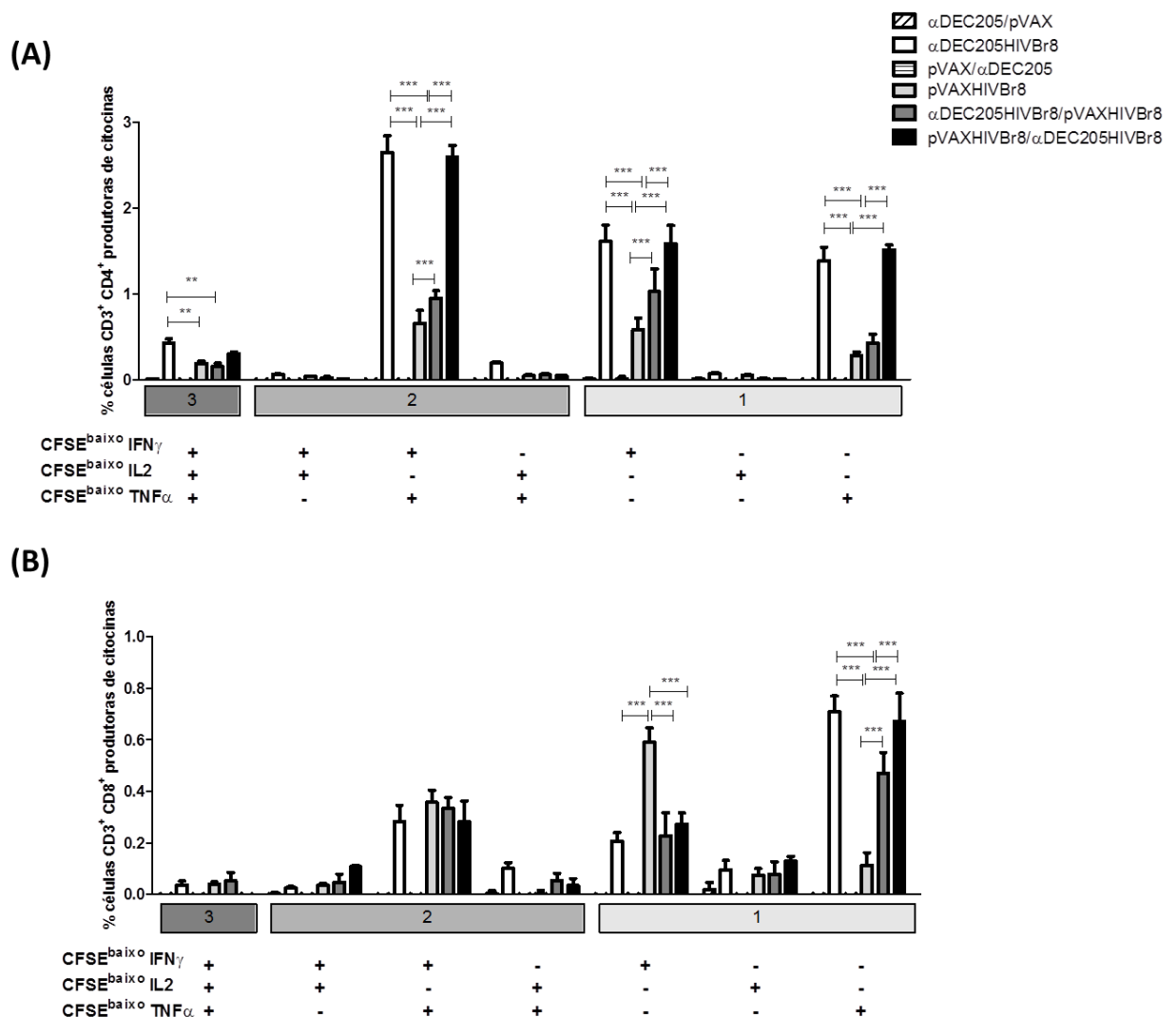


Figura 18 – Avaliação do perfil funcional induzido pela imunização com o anticorpo α DEC205HIVBr8 e/ou a vacina de DNA HIVBr8: Camundongos BALB/c (n=6) foram imunizados com duas doses de 4 μ g dos anticorpos α DEC205 ou α DEC205HIVBr8 na presença de 50 μ g de poly I:C pela via intraperitoneal e/ou duas doses de 100 μ g da vacina de DNA HIVBr8 pela via intramuscular. Quinze dias após a última dose, o baço dos animais foi removido e os esplenócitos marcados com 1,25 μ M de CFSE e colocados em cultura por cinco dias na presença do pool de peptídeos do HIV-1 (5 μ M). No quarto dia, as células foram re-estimuladas com o pool de peptídeos e foram adicionados anti-CD28 (2 μ g/mL) e brefeldina (0,2 μ L/poço). No dia seguinte, as células foram marcadas com os anticorpos de superfície anti-CD3, CD4 e CD8, além de anticorpos para detecção de citocinas intracelulares (anti-IFN γ , TNF α e IL-2). A) Polifuncionalidade de LT CD4⁺ e (B) polifuncionalidade de LT CD8⁺; *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

5 DISCUSSÃO

Foi demonstrado anteriormente pelo nosso grupo que uma vacina de DNA que codifica 18 epítomos de LTCD4⁺ promíscuos e conservados do HIV-1 denominada HIVBr18 (FONSECA *et al.*, 2006), foi capaz de induzir ampla resposta de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em camundongos transgênicos para moléculas HLA de classe II humanas (DR2, DR4, DQ6 e DQ8) (RIBEIRO *et al.*, 2010). Além disso, a vacina HIVBr18 induziu uma resposta de longa duração e polifuncional de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em camundongos BALB/c para oito dos 18 peptídeos do HIV presentes na vacina (ROSA *et al.*, 2011). Entretanto, por mais que vacinas de DNA sejam promissoras, possuem reduzida imunogenicidade em humanos (KUTZLER e WEINER, 2008) e nos últimos anos, diversas estratégias vem sendo desenvolvidas com o objetivo aumentar a imunogenicidade dessas vacinas (ROSA *et al.*, 2015). A fim de contornar essa limitação, produzimos um anticorpo monoclonal quimérico contra o receptor DEC205 fusionado a oito epítomos do HIV (α DEC205HIVBr8), que foram selecionados com base nos estudos anteriores do grupo (RIBEIRO *et al.*, 2010) (ROSA *et al.*, 2011). No presente trabalho, avaliamos se essa formulação vacinal possui potencial imunogênico superior *in vivo* em comparação ao de uma vacina de DNA (HIVBr8) que codifica os mesmos epítomos.

Para a produção e purificação dos anticorpos, células HEK293T foram transfectadas e os anticorpos produzidos como observado em outros trabalhos (HENRIQUES *et al.*, 2013; RAMPAZO *et al.*, 2015). No caso do anticorpo α DEC205HIVBr8 a eficiência na purificação foi relativamente menor a do anticorpo α DEC205. Entretanto, outros trabalhos também mostraram menor rendimento dos anticorpos α DEC205 quiméricos produzidos (BONIFAZ *et al.*, 2002; STYLIANOU *et al.*, 2011; BADILLO-GODINEZ *et al.*, 2015). Uma vez que ambos os anticorpos α DEC205 produzidos se ligaram especificamente às células CHO que expressam o receptor DEC205 e também se ligaram às células dendríticas que expressam a cadeia alfa da molécula de CD8, fomos avaliar a imunogenicidade do anticorpo *in vivo*.

O primeiro teste foi realizado para determinar qual via de imunização seria mais eficaz na indução da resposta imune específica. Apesar de alguns trabalhos já

terem demonstrado a eficácia da imunização pela via subcutânea com anticorpos α DEC205 (BONIFAZ *et al.*, 2002; BONIFAZ *et al.*, 2004), o grupo imunizado com α DEC205HIVBr8 pela via intraperitoneal induziu maior número de células produtoras de $\text{IFN}\gamma$, além de maior porcentagem de linfócitos T CD4^+ HIV-específicos capazes de proliferar. O mesmo fenômeno foi observado para linfócitos T CD8^+ , porém em menor magnitude. Outros trabalhos também demonstraram a eficácia da imunização pela via intraperitoneal com mAb α DEC205 utilizando antígenos de *Trypanosoma cruzi* (RAMPAZO *et al.*, 2015), dengue (HENRIQUES *et al.*, 2013) e *Plasmodium falciparum* (BOSCARDIN *et al.*, 2006).

Por mais que já se saiba da importância de linfócitos T CD8^+ citotóxicos como primeira resposta contra o HIV (WATKINS, 2008), já foi demonstrada que uma resposta prévia de linfócitos T CD4^+ é importante para a lenta progressão para AIDS (PANCRE *et al.*, 2007). Além disso, a depleção de LT CD4^+ em macacos rhesus reduziu a proteção mediada pela vacinação após o desafio com SIV (VACCARI *et al.*, 2008). Um estudo recente demonstrou que indivíduos infectados e não tratados que apresentaram resposta de linfócitos T CD4^+ gag-específicos produziam anticorpos altamente neutralizantes contra Env, o mesmo não foi observado em indivíduos que não tinham resposta de LT CD4^+ (RANASINGHE *et al.*, 2016). Dessa forma, uma vacina eficaz contra o HIV deve além de induzir resposta de CTL específica, induzir também resposta de LT CD4^+ .

Ao utilizar anticorpos α DEC205 é de se esperar resposta de LT CD4^+ , pois estes são internalizados em um compartimento endossomal e os antígenos processados e apresentados principalmente via molécula de MHC de classe II, o que leva a uma resposta mediada por LT CD4^+ (JIANG *et al.*, 1995). Entretanto, já foi mostrado que o anticorpo α DEC205 fusionado a OVA é capaz de ser processado e apresentado também via MHC de classe I e levar a expansão clonal de linfócitos T CD8^+ específicos (BONIFAZ *et al.*, 2002). Outros estudos mostraram que antígenos encapsulados por nanopartículas e direcionados para células dendríticas DEC205⁺ são apresentados via MHC-I, induzindo resposta de LT CD8^+ (CRUZ *et al.*, 2014; SALUJA *et al.*, 2014). Esse fenômeno pode ser explicado pela alta capacidade das DC murinas que expressam a cadeia alfa da molécula de CD8 em realizar apresentação cruzada (revisto por (KASTENMULLER *et al.*, 2014)). Todo esse

processo corrobora com os resultados obtidos com a imunização com α DEC205HIVBr8 na presença de poly I:C, que foi capaz de induzir resposta de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ que proliferaram quando estimulados com o pool de oito peptídeos do HIV.

As tentativas iniciais de desenvolver uma vacina contra o HIV focaram principalmente na indução da resposta imune humoral contra a proteína gp120 do vírus e não foram capazes de conferir proteção. A fim de tentar aumentar a resposta imune induzida, o estudo conhecido como RV144 mostrou que o esquema de imunização que inclui a indução da resposta (*prime*) com um vetor viral seguida da proteína Env como reforço (*boost*) induziu cerca de 30% de proteção nos indivíduos vacinados (RERKS-NGARM *et al.*, 2009). Ao analisar a resposta imune dos pacientes vacinados não foi observada resposta de CTL, mas foi observado proliferação de LT CD4⁺ específicos contra o vírus (MCEL RATH e HAYNES, 2010). Nos últimos anos diversos trabalhos mostraram que a utilização do esquema de imunização composto de *prime-boost* heterólogo é capaz de aumentar a magnitude e a qualidade da resposta imune à diversos patógenos, entre eles o HIV (RATTO-KIM S, 2012). O *prime-boost* heterólogo é caracterizado pela administração do mesmo antígeno utilizando diferentes vetores, como DNA e proteína (ou vice-versa) ou DNA e vetor viral (WOODLAND, 2004). Este conceito começou a ser utilizado na tentativa de desenvolver vacinas contra patógenos que necessitam de uma resposta imunológica mais robusta tanto humoral quanto celular, como HIV, *Mycobacterium tuberculosis* e *Plasmodium sp.*. Já tem sido demonstrado que esquemas de imunização baseados em *prime-boost* heterólogo são capazes de induzir resposta de elevada magnitude de linfócitos T de memória (RAMSHAW e RAMSAY, 2000).

A fim de determinar a melhor estratégia vacinal a ser utilizada, avaliamos o efeito da imunização inicial com a vacina de DNA HIVBr8 (*prime*) seguida do direcionamento dos mesmos antígenos utilizando o anticorpo α DEC205HIVBr8 (*boost*), ou vice-versa, caracterizando um *prime-boost* heterólogo. A resposta imune foi comparada a grupos que receberam a vacina de DNA HIVBr8 ou o anticorpo α DEC205HIVBr8 na estratégia de *prime-boost* homólogo. Os resultados obtidos mostraram que o grupo que recebeu o *prime-boost* heterólogo composto de HIVBr8/ α DEC205HIVBr8 e o grupo imunizado com duas doses de α DEC205HIVBr8

apresentaram maior número de células produtoras de $\text{IFN}\gamma$ e maior porcentagem de linfócitos T CD4^+ e CD8^+ HIV-específicos que proliferaram quando comparada aos demais grupos.

Ao analisar o perfil funcional dessas células, observamos que duas doses $\alpha\text{DEC205HIVBr8}$ foi capaz de induzir produção de LT CD4^+ polifuncionais, capazes de proliferar e produzir três citocinas ($\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha/\text{IL-2}$) simultaneamente. Além disso, tanto o grupo que recebeu duas doses de $\alpha\text{DEC205HIVBr8}$ quanto o grupo $\text{HIVBr8}/\alpha\text{DEC205HIVBr8}$ apresentaram maior porcentagem de células que proliferaram e produziram $\text{IFN}\gamma$ e/ou $\text{TNF}\alpha$. Para os LT CD8^+ , as formulações vacinais se igualaram na indução da resposta de LT CD8^+ que proliferaram e produzem $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ simultaneamente. Na produção de citocinas individuais, duas doses da vacina HIVBr8 foi superior na indução de LT CD8^+ que proliferaram e produzem $\text{IFN}\gamma$ quando comparada aos grupos que receberam outras formulações com o anticorpo $\alpha\text{DEC205HIVBr8}$. Entretanto, os grupos imunizados com duas doses do anticorpo $\alpha\text{DEC205HIVBr8}$, $\text{HIVBr8}/\alpha\text{DEC205HIVBr8}$ ou $\alpha\text{DEC205HIVBr8}/\text{HIVBr8}$ apresentaram maior porcentagem de células que proliferaram e produziram $\text{TNF}\alpha$ quando comparado ao grupo que recebeu a vacina de DNA HIVBr8 . Uma resposta de linfócitos polifuncionais é necessária para o controle da viremia pelo HIV. Já foi visto a importância no perfil funcional de LT CD4^+ no controle da infecção por SIV em macacos rhesus (YAMAMOTO *et al.*, 2009). Em humanos, foi demonstrado em indivíduos controladores de elite resposta superior de LT CD4^+ polifuncionais em comparação a indivíduos não controladores tratados com HAART (OWEN *et al.*, 2010), com produção superior de $\text{IFN}\gamma$, IL-2 e $\text{TNF}\alpha$ (EMU *et al.*, 2005; POTTER *et al.*, 2007), inclusive na região de mucosa (FERRE *et al.*, 2009). O que pode estar correlacionado com a presença de alelos específicos da molécula de HLA de classe II (HLA-DRB1*13 e HLA-DQB1*06), no qual controladores de elite que possuíam tais alelos obtiveram resposta polifuncional superior de LT CD4^+ de mucosa quando comparada aqueles que possuíam outros alelos (FERRE *et al.*, 2010).

Anteriormente, nosso grupo demonstrou que o *prime* com a vacina de DNA (HIVBr18) aumentou a magnitude e amplitude das respostas de células CD8^+ induzidas por vacinas de DNA, que codificam as proteínas Vif e Gag do HIV-1, pelo

mecanismo de auxílio cognato, uma vez que a vacina HIVBr18 compartilhava os mesmos epítomos (Vif e Gag) (RIBEIRO *et al.*, 2009). No presente trabalho, o *prime* com a vacina de DNA HIVBr8 seguido do *boost* com α DEC205HIVBr8 aumentou a magnitude de resposta ao pool de oito peptídeos do HIV quando comparado a vacina de DNA sozinha. Em contraste, o *prime* com o mAb α DEC205HIVBr8 seguido do *boost* com a vacina de DNA foi significativamente inferior na indução da resposta imune. Vacinas de DNA têm demonstrado maior eficácia quando são administradas no *prime* de formulações vacinais, seguidas do *boost* com proteínas recombinantes (WOODLAND, 2004; LU, 2006). Pensando que vacinas de DNA possuem baixo custo, facilidade de produção e estabilidade em temperaturas ambientes, utilizá-las para o controle de epidemias em locais de difícil acesso a questões de saúde é o que se tem de mais promissor nos últimos anos (WEDRYCHOWICZ, 2015). Dessa forma, utilizar o *prime* com uma vacina de DNA seguido do *boost* com o anticorpo se mostrou uma estratégia promissora futuramente.

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, é possível concluir que tanto o anticorpo α DEC205HIVBr8 quanto a vacina de DNA HIVBr8 foram produzidos e purificados com sucesso. A imunização com duas doses do anticorpo α DEC205HIVBr8 na presença de poly I:C pela via intraperitoneal foi a melhor estratégia capaz de induzir linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ polifuncionais. Além disso, foi demonstrado pela primeira vez que a utilização do *prime-boost* heterólogo utilizando a indução da resposta com uma vacina de DNA (HIVBr8) seguida do reforço com um anticorpo monoclonal quimérico (α DEC205HIVBr8) pode ser considerada uma estratégia eficaz na indução da resposta imune HIV-específica.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- i. Os anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 foram produzidos, purificados e se ligaram de maneira dose dependente e específica aos receptores DEC205 expressos por células CHO e às células dendríticas CD8 α^+ ;
- ii. A vacina de DNA que codifica os mesmos oito epítomos do HIV denominada HIVBr8 além de seu controle pVAX (vetor vazio) foram produzidos e purificados com sucesso;
- iii. A imunização de camundongos da linhagem BALB/c com duas doses do anticorpo α DEC205HIVBr8 pela via intraperitoneal induziu maior número de células produtoras de IFN γ e proliferação de linfócitos T CD4 $^+$ e CD8 $^+$ HIV-específicos do que a imunização com o mesmo pela via subcutânea;
- iv. A imunização de camundongos da linhagem BALB/c utilizando a estratégia *prime-boost* heterólogo com uma dose da vacina de DNA HIVBr8 seguida de uma dose do anticorpo α DEC205HIVBr8 ou a imunização com duas doses do anticorpo α DEC205HIVBr8 foi mais imunogênica do que a imunização com duas doses da vacina de DNA ou o *prime-boost* com α DEC205HIVBr8/HIVBr8.

APÊNDICE

Apêndice A. Figuras

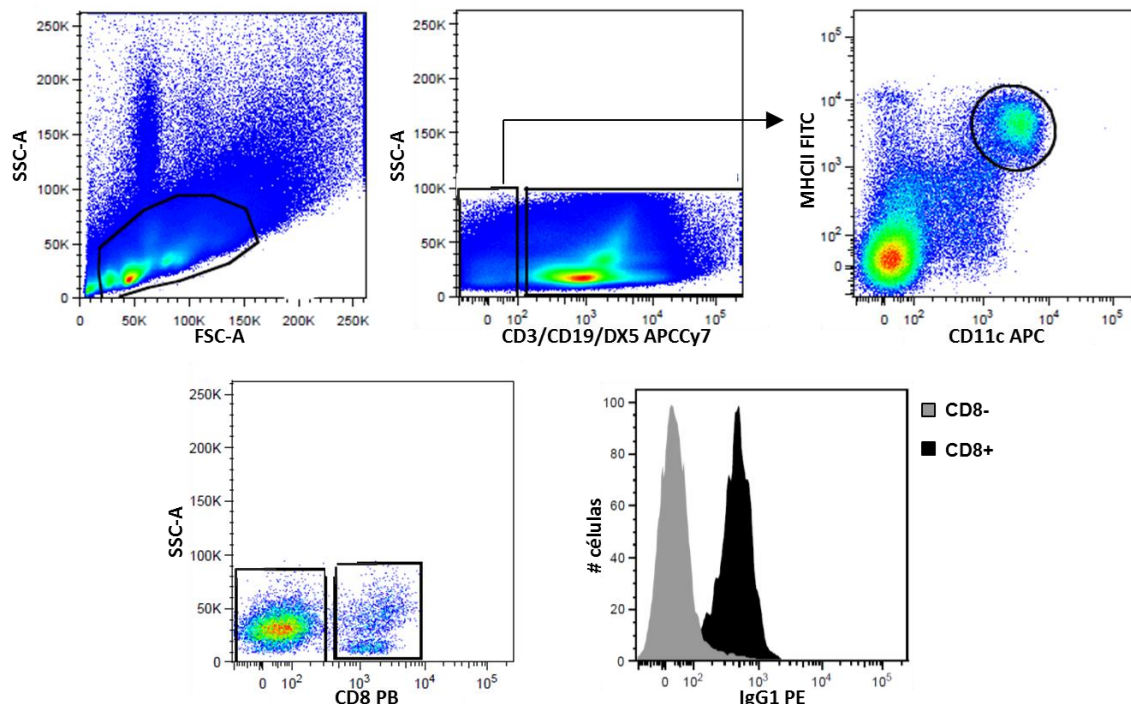


Figura 1: Estratégia de análise para avaliação da ligação dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 a esplenócitos totais: Ensaio de ligação dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 nas concentrações de 10, 1 e 0,1 μ g/mL incubados com esplenócitos recém isolados. Inicialmente as células foram incubadas por 30 minutos com os anticorpos α DEC205 ou α DEC205HIVBr8 e com os anticorpos biotinilados anti-DX5, CD3 e CD19. Após duas lavagens, as células foram incubadas com um anticorpo anti-IgG de camundongo PE e Streptavidina-APCCy7 por 30 minutos e lavadas mais duas vezes. Por último, as células foram incubadas com os anticorpos anti-CD11c APC, MHCII FITC e CD8 Pacific Blue. Após lavagem, três milhões de eventos foram adquiridos no citômetro FACSCanto II. A análise foi realizada utilizando-se o software FlowJo (TreeStar). Primeiramente foi feito um gate baseado em tamanho (FSC) x granulosidade (SSC). Em seguida um gate de exclusão das células CD3⁺CD19⁺DX5⁺ (linfócitos T, B e NK), seguido pelo gate na população duplo positiva para os marcadores CD11c e MHCII (células dendríticas). Dentro das duas subpopulações que expressam ou não a cadeia alfa da molécula de CD8 foi avaliada a intensidade de fluorescência da marcação com IgG1 (PE), nos permitindo avaliar ligação indireta dos anticorpos α DEC205 e α DEC205HIVBr8 às células dendríticas.

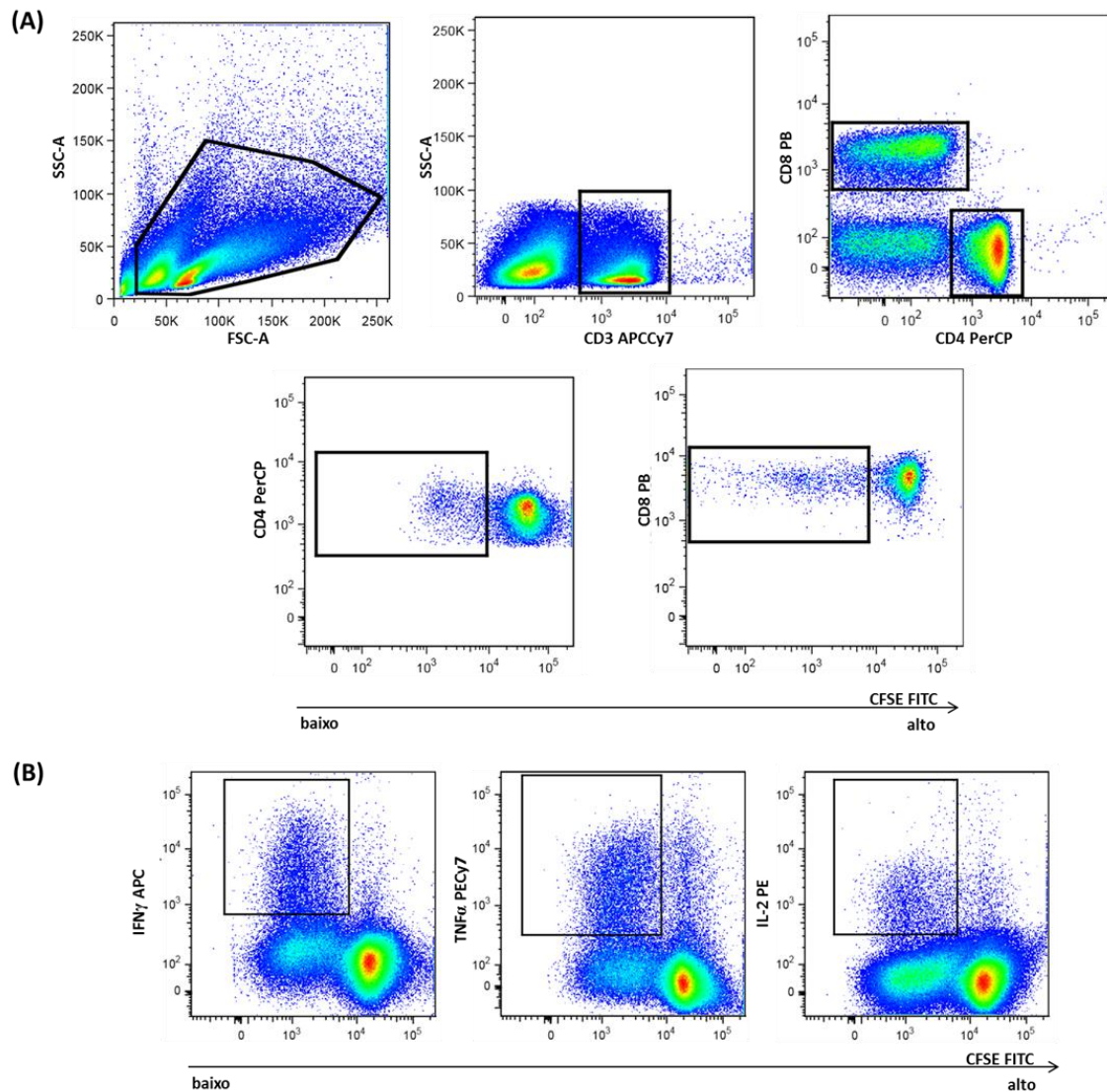


Figura 2: Estratégia de análise para avaliação da proliferação celular e produção de citocinas intracelulares através de ensaio com CFSE: Camundongos BALB/c foram imunizados e 15 dias após a última dose, o baço de cada animal foi removido. As células foram marcadas com a concentração de 1,25 μ M de CFSE e incubadas por 5 dias na presença do pool de peptídeos do HIV (5 μ M). A proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (A) foi avaliada com a estratégia de análise mostrada. Primeiramente foi feito um gate em linfócitos baseados em tamanho (FSC) x granulosidade (SSC). Em seguida um gate nas células CD3⁺ (linfócitos T), seguido por gates nas populações CD4⁺ e CD8⁺. Dentro das duas sub-populações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) foi avaliada a diminuição da intensidade de fluorescência do CFSE, nos permitindo avaliar a proliferação específica induzida em cada grupo experimental. A secreção de citocinas foi avaliada como mostra a estratégia de análise mostrada na figura A. Após definirmos os gates de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, foram definidas, em cada sub-população de linfócitos, as células que (B) secretam IFN- γ , TNF- α ou IL-2 isoladamente.

ANEXOS

Anexo A. Aprovação de Comitê de Ética.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



, 23 de junho de 2016
CEUA N 4819180814

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Daniela Santoro Rosa

Depto/Disc: Dep. Microbiologia, Imunologia E Parasitologia. Disciplina De Imunologia

Pesquisadores associados: Victória Alves Santos Lunardelli (unifesp); Daniela Santoro Rosa (orientador)

Título do projeto: "Análise da resposta imune celular após o direcionamento in vivo de antígenos do HIV para células dendríticas."

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

A epidemia causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é a mais importante infecção emergente das últimas décadas. A despeito dos avanços no conhecimento da patogênia do vírus e da resposta imune frente à infecção, até o momento não existe uma vacina eficaz contra a aquisição do HIV. Diversas linhas de evidência indicam que anticorpos, e células T CD4+ e T CD8+ desempenham um papel importante na imunidade contra o HIV.

Em relação ao desenvolvimento de vacinas baseadas na indução de imunidade celular, acredita-se que a geração de respostas imunes amplas e funcionalmente relevantes, contra epítomos conservados de linfócitos TCD4+ (LT) e CD8+, seja um pré-requisito essencial para novos candidatos a vacina. Nos últimos anos, vários estudos tem investigado o papel dos linfócitos T CD4+ HIV – específicos no controle da replicação do HIV-1.

Em estudos prévios, nosso grupo demonstrou que a imunização de camundongos com uma vacina de DNA, codificando epítomos para linfócitos T CD4+ do HIV-1, foi capaz de induzir resposta específica e ampla de linfócitos T CD4+ e T CD8+. Apesar dos resultados obtidos com essa formulação vacinal serem bastante promissores, as vacinas de DNA apresentam limitada imunogenicidade em animais de grande porte, incluindo humanos. Por esse motivo, nos últimos anos diferentes estratégias e plataformas de produção de novos imunógenos vêm sendo desenvolvidas.

Nos últimos anos, o conhecimento sobre a biologia das células dendríticas (DCs) tem permitido o desenvolvimento de estratégias vacinais baseadas na capacidade destas células em modular as respostas imunes adaptativas. Neste contexto, o presente projeto tem como objetivo geral produzir um anticorpo quimérico contra um receptor presente na superfície da DC (DEC205) em fusão com epítomos do HIV e testar sua imunogenicidade em camundongos. Dada a importância do direcionamento de antígenos para os linfócitos T, pretendemos avaliar se o anticorpo quimérico contendo epítomos do HIV é capaz de induzir uma resposta imune celular específica de elevada magnitude e amplitude. Para tal, camundongos BALB/c serão imunizados com o anticorpo anti-DEC205 HIV na presença de poly IC.

ANIMAIS:

Serão utilizados:

- 60 Camundongos isogênicos BALB/c, Fêmeas, idade: 8 semanas

Procedência: Centro de Desenvolvimento de modelos experimentais (CEDEME) - (n: 01)

Manutenção: Biotério da disciplina de imunologia - BiDI, registro CEUA/UNIFESP (n.:02)

VIGÊNCIA DO ESTUDO:

início previsto para: agosto/2014 com término previsto para: julho/2015

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 04/11/2014, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.

2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Atenciosamente

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

REFERÊNCIAS

- BADILLO-GODINEZ, O. *et al.* Targeting of rotavirus VP6 to DEC-205 induces protection against the infection in mice. **Vaccine**, v. 33, n. 35, p. 4228-37, Aug 20 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25850020> >.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-52, Mar 19 1998. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9521319 >.
- BAROUCH, D. H.; DEEKS, S. G. Immunologic strategies for HIV-1 remission and eradication. **Science**, v. 345, n. 6193, p. 169-74, Jul 11 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25013067> >.
- BAROUCH, D. H.; KORBER, B. HIV-1 vaccine development after STEP. **Annu Rev Med**, v. 61, p. 153-67, 2010. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20059334 >.
- BARRE-SINOUSI, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868-71, May 20 1983. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6189183> >.
- BEBENEK, K. *et al.* Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. **J Biol Chem**, v. 264, n. 28, p. 16948-56, Oct 5 1989. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2476448 >.
- BEVAN, M. J. Helping the CD8(+) T-cell response. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 8, p. 595-602, Aug 2004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15286726 >.
- BOAZ, M. J. *et al.* Presence of HIV-1 Gag-specific IFN-gamma+IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. **J Immunol**, v. 169, n. 11, p. 6376-85, Dec 1 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12444145 >.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO AIDS**, 2015. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e AIDS., 2015.
- BONIFAZ, L. *et al.* Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex

class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. **J Exp Med**, v. 196, n. 12, p. 1627-38, Dec 16 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12486105> >.

BONIFAZ, L. C. *et al.* In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. **J Exp Med**, v. 199, n. 6, p. 815-24, Mar 15 2004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15024047 >.

BOSCARDIN, S. B. *et al.* Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. **J Exp Med**, v. 203, n. 3, p. 599-606, Mar 20 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16505139 >.

BOYER, P. L.; FERRIS, A. L.; HUGHES, S. H. Cassette mutagenesis of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. **J Virol**, v. 66, n. 2, p. 1031-9, Feb 1992. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1370546 >.

BRENCHLEY, J. M. *et al.* CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. **J Exp Med**, v. 200, n. 6, p. 749-59, Sep 20 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15365096> >.

BURGER, S.; POLES, M. A. Natural history and pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **Semin Liver Dis**, v. 23, n. 2, p. 115-24, May 2003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12800065 >.

BUSSMANN, B. M. *et al.* Loss of HIV-specific memory B-cells as a potential mechanism for the dysfunction of the humoral immune response against HIV. **Virology**, v. 397, n. 1, p. 7-13, Feb 5 2010. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19962720 >.

CARMICHAEL, A., Jin, X., Sissons, P., Borysiewicz, L. Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. **J Exp Med**, v. 177, n. 2, p. 249-56, Feb 1 1993. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8093890 >.

CASKEY, M. *et al.* Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. **Nature**, v. 522, n. 7557, p. 487-91, Jun 25 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25855300> >.

COFFIN, J. *et al.* What to call the AIDS virus? **Nature**, v. 321, n. 6065, p. 10, May 1-7 1986. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3010128> >.

COFFIN, J. M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. **Science**, v. 267, n. 5197, p. 483-9, Jan 27 1995. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7824947 >.

CONNOR, R. I., Mohri, H., Cao, Y., Ho, D. D. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. **J Virol**, v. 67, n. 4, p. 1772-7, Apr 1993. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8095306 >.

COSENZA, M. A. *et al.* Human brain parenchymal microglia express CD14 and CD45 and are productively infected by HIV-1 in HIV-1 encephalitis. **Brain Pathol**, v. 12, n. 4, p. 442-55, Oct 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408230> >.

CRUZ, L. J. *et al.* Targeting nanoparticles to CD40, DEC-205 or CD11c molecules on dendritic cells for efficient CD8(+) T cell response: a comparative study. **J Control Release**, v. 192, p. 209-18, Oct 28 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25068703> >.

DE SOUZA, M. S. *et al.* The Thai phase III trial (RV144) vaccine regimen induces T cell responses that preferentially target epitopes within the V2 region of HIV-1 envelope. **J Immunol**, v. 188, n. 10, p. 5166-76, May 15 2012. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22529301 >.

DEN HAAN, J. M.; LEHAR, S. M.; BEVAN, M. J. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. **J Exp Med**, v. 192, n. 12, p. 1685-96, Dec 18 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11120766 >.

DHODAPKAR, M. V. *et al.* Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 232, p. 232ra51, Apr 16 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24739759> >.

DOUEK, D. C.; PICKER, L. J.; KOUP, R. A. T cell dynamics in HIV-1 infection. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 265-304, 2003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12524385 >.

DUDZIAK, D. *et al.* Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. **Science**, v. 315, n. 5808, p. 107-11, Jan 5 2007. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17204652 >.

EMU, B. *et al.* Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. **J Virol**, v. 79, n. 22, p. 14169-78, Nov 2005. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16254352> >.

FANALES-BELASIO, E. *et al.* HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. **Ann Ist Super Sanita**, v. 46, n. 1, p. 5-14, 2010. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20348614 >.

FERRE, A. L. *et al.* Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. **Blood**, v. 113, n. 17, p. 3978-89, Apr 23 2009. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109229> >.

FERRE, A. L. *et al.* HIV controllers with HLA-DRB1*13 and HLA-DQB1*06 alleles have strong, polyfunctional mucosal CD4+ T-cell responses. **J Virol**, v. 84, n. 21, p. 11020-9, Nov 2010. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20719952 >.

FIEBIG, E. W. *et al.* Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. **AIDS**, v. 17, n. 13, p. 1871-9, Sep 5 2003. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12960819 >.

FIGDOR, C. G.; VAN KOOYK, Y.; ADEMA, G. J. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 2, p. 77-84, Feb 2002. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11910898 >.

FLYNN, B. J. *et al.* Immunization with HIV Gag targeted to dendritic cells followed by recombinant New York vaccinia virus induces robust T-cell immunity in nonhuman primates. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 17, p. 7131-6, Apr 26 2011. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21467219 >.

FOLEY, P. *et al.* HIV infection of monocytes inhibits the T-lymphocyte proliferative response to recall antigens, via production of eicosanoids. **Immunology**, v. 75, n. 3, p. 391-7, Mar 1992. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1572689 >.

FONSECA, M. G.; BASTOS, F. I. Twenty-five years of the AIDS epidemic in Brazil: principal epidemiological findings, 1980-2005. **Cad Saude Publica**, v. 23 Suppl 3, p. S333-44, 2007. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17992340 >.

FONSECA, S. G., Coutinho-Silva, A., Fonseca, L. A., Segurado, A. C., Moraes, S. L., *et al.* Identification of novel consensus CD4 T-cell epitopes from clade B HIV-1 whole genome that are frequently recognized by HIV-1 infected patients. **AIDS**, v. 20, n. 18, p. 2263-73, Nov 28 2006. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17117012 >.

FORSELL, M. N.; SCHIEF, W. R.; WYATT, R. T. Immunogenicity of HIV-1 envelope glycoprotein oligomers. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 4, n. 5, p. 380-7, Sep 2009. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20048701 >.

GALLO, R. C. *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 500-3, May 4 1984. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6200936> >.

GANDHI, R. T.; WALKER, B. D. Immunologic control of HIV-1. **Annu Rev Med**, v. 53, p. 149-72, 2002. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11818468 >.

GASPER-SMITH, N. *et al.* Induction of plasma (TRAIL), TNFR-2, Fas ligand, and plasma microparticles after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission: implications for HIV-1 vaccine design. **J Virol**, v. 82, n. 15, p. 7700-10, Aug 2008. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18508902 >.

GAUDUIN, M. C. *et al.* Induction of a virus-specific effector-memory CD4+ T cell response by attenuated SIV infection. **J Exp Med**, v. 203, n. 12, p. 2661-72, Nov 27 2006. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17116733 >.

GEIJTENBEEK, T. B. *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 587-97, Mar 3 2000. Disponível em: <

<

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10721995 >.

GOMEZ, C.; HOPE, T. J. The ins and outs of HIV replication. **Cell Microbiol**, v. 7, n. 5, p. 621-6, May 2005. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15839891 >.

GUIMARAES, M. L. *et al.* High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 18, n. 17, p. 1261-9, Nov 20 2002. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12487814 >.

HANSEN, S. G. *et al.* Immune clearance of highly pathogenic SIV infection. **Nature**, Sep 11 2013. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24025770 >.

HANSEN, S. G. *et al.* Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. **Nat Med**, v. 15, n. 3, p. 293-9, Mar 2009. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19219024 >.

HAWIGER, D. *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. **J Exp Med**, v. 194, n. 6, p. 769-79, Sep 17 2001. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11560993 >.

HAYNES, B. F. New approaches to HIV vaccine development. **Curr Opin Immunol**, v. 35, p. 39-47, Aug 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26056742> >.

HEMELAAR, J. *et al.* Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. **AIDS**, v. 20, n. 16, p. W13-23, Oct 24 2006. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17053344 >.

HENRIQUES, H. R. *et al.* Targeting the non-structural protein 1 from dengue virus to a dendritic cell population confers protective immunity to lethal virus challenge. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. e2330, 2013. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23875054> >.

IDOYAGA, J.; STEINMAN, R. M. Section of mouse skin draining lymph node. **Immunology Image Resource - Cell**, 2009. Disponível em: < <http://www.cell.com/immunity/image-resource-lymphnode> >. Acesso em: 08/2016.

IJIMA, N.; IWASAKI, A. Access of protective antiviral antibody to neuronal tissues requires CD4 T-cell help. **Nature**, v. 533, n. 7604, p. 552-6, May 26 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27225131> >.

JIANG, W. *et al.* The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. **Nature**, v. 375, n. 6527, p. 151-5, May 11 1995. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7753172 >.

JIN, X., Bauer, D. E., Tuttleton, S. E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., *et al.* Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. **J Exp Med**, v. 189, n. 6, p. 991-8, Mar 15 1999. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10075982 >.

KAHN, J. O.; WALKER, B. D. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. **N Engl J Med**, v. 339, n. 1, p. 33-9, Jul 2 1998. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9647878 >.

KARLSSON HEDESTAM, G. B. *et al.* The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 2, p. 143-55, Feb 2008. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18197170 >.

KASTENMULLER, W. *et al.* Dendritic cell-targeted vaccines--hope or hype? **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 10, p. 705-11, Oct 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25190285> >.

KATES, J.; LEVI, J. Insurance coverage and access to HIV testing and treatment: considerations for individuals at risk for infection and for those with undiagnosed infection. **Clin Infect Dis**, v. 45 Suppl 4, p. S255-60, Dec 15 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18190296 >.

KEELE, B. F. *et al.* Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. **Science**, v. 313, n. 5786, p. 523-6, Jul 28 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16728595 >.

KLASSE, P. J.; SATTENTAU, Q. J. Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. **J Gen Virol**, v. 83, n. Pt 9, p. 2091-108, Sep 2002.

Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12185262 >.

KLATT, N. R.; SILVESTRI, G. CD4+ T cells and HIV: A paradoxical Pas de Deux. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 123, p. 123ps4, Feb 29 2012. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22378922 >.

KLIMAS, N.; KONERU, A. O.; FLETCHER, M. A. Overview of HIV. **Psychosom Med**, v. 70, n. 5, p. 523-30, Jun 2008. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18541903 >.

KOFF, W. C. A shot at AIDS. **Curr Opin Biotechnol**, v. 42, p. 147-151, May 3 2016.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27153215> >.

KORBER, B. *et al.* Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1789-96, Jun 9 2000. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10846155 >.

KUTZLER, M. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 10, p. 776-88, Oct 2008. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18781156 >.

KWONG, P. D.; MASCOLA, J. R. Human antibodies that neutralize HIV-1: identification, structures, and B cell ontogenies. **Immunity**, v. 37, n. 3, p. 412-25, Sep 21 2012. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22999947> >.

LAU, K. A.; WONG, J. J. Current Trends of HIV Recombination Worldwide. **Infect Dis Rep**, v. 5, n. Suppl 1, p. e4, Jun 6 2013. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24470968> >.

LEMAITRE, B. *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 973-83, Sep 20 1996.

Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8808632 >.

LETVIN, N. L. *et al.* Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. **Science**, v. 312, n. 5779, p. 1530-3, Jun 9 2006. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16763152> >.

LEVESQUE, M. C. *et al.* Polyclonal B cell differentiation and loss of gastrointestinal tract germinal centers in the earliest stages of HIV-1 infection. **PLoS Med**, v. 6, n. 7, p. e1000107, Jul 7 2009. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19582166 >.

LINDBACK, S. *et al.* Diagnosis of primary HIV-1 infection and duration of follow-up after HIV exposure. Karolinska Institute Primary HIV Infection Study Group. **AIDS**, v. 14, n. 15, p. 2333-9, Oct 20 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11089621 >.

LIVINGSTON, B. *et al.* A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. **J Immunol**, v. 168, n. 11, p. 5499-506, Jun 1 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12023344 >.

LOPEZ-BRAVO, M.; ARDAVIN, C. In vivo induction of immune responses to pathogens by conventional dendritic cells. **Immunity**, v. 29, n. 3, p. 343-51, Sep 19 2008. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18799142 >.

LU, S. Combination DNA plus protein HIV vaccines. **Springer Semin Immunopathol**, v. 28, n. 3, p. 255-65, Nov 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17021720> >.

MAHNKE, K. *et al.* The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. **J Cell Biol**, v. 151, n. 3, p. 673-84, Oct 30 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11062267 >.

MARKOSYAN, R. M.; COHEN, F. S.; MELIKYAN, G. B. HIV-1 envelope proteins complete their folding into six-helix bundles immediately after fusion pore formation. **Mol Biol Cell**, v. 14, n. 3, p. 926-38, Mar 2003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12631714 >.

MATTAPALLIL, J. J. *et al.* Vaccination preserves CD4 memory T cells during acute simian immunodeficiency virus challenge. **J Exp Med**, v. 203, n. 6, p. 1533-41, Jun 12 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735692> >.

MCCUTCHAN, F. E. Understanding the genetic diversity of HIV-1. **AIDS**, v. 14 Suppl 3, p. S31-44, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11086847> >.

MCCUTCHAN, F. E. *et al.* Diversity of envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 of recent seroconverters in Thailand. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 16, n. 8, p. 801-5, May 20 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10826486 >.

MCEL RATH, M. J.; HAYNES, B. F. Induction of immunity to human immunodeficiency virus type-1 by vaccination. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 542-54, Oct 29 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21029964> >.

MCKNIGHT, A.; AASA-CHAPMAN, M. M. Clade specific neutralising vaccines for HIV: an appropriate target? **Curr HIV Res**, v. 5, n. 6, p. 554-60, Nov 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18045111 >.

MCLELLAN, A. D. *et al.* Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression. **Blood**, v. 99, n. 6, p. 2084-93, Mar 15 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11877283 >.

MCMICHAEL, A. J. *et al.* The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 1, p. 11-23, Jan 2010. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20010788 >.

MELIKYAN, G. B. *et al.* Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. **J Cell Biol**, v. 151, n. 2, p. 413-23, Oct 16 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11038187 >.

MORGADO, M. G. *et al.* V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 10, n. 5, p. 569-76, May 1994. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7522493 >.

MOUQUET, H. *et al.* Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 47, p. E3268-77, Nov 20 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23115339> >.

NAKANISHI, Y. *et al.* CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. **Nature**, v. 462, n. 7272, p. 510-3, Nov 26 2009. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19898495 >.

NOVY, P. *et al.* CD4 T cells are required for CD8 T cell survival during both primary and memory recall responses. **J Immunol**, v. 179, n. 12, p. 8243-51, Dec 15 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18056368 >.

OPRAVIL, M. *et al.* Poor antibody response after tetanus and pneumococcal vaccination in immunocompromised, HIV-infected patients. **Clin Exp Immunol**, v. 84, n. 2, p. 185-9, May 1991. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2025948 >.

OWEN, R. E. *et al.* HIV+ elite controllers have low HIV-specific T-cell activation yet maintain strong, polyfunctional T-cell responses. **AIDS**, v. 24, n. 8, p. 1095-105, May 15 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20400885> >.

PANCRE, V. *et al.* Presence of HIV-1 Nef specific CD4 T cell response is associated with non-progression in HIV-1 infection. **Vaccine**, v. 25, n. 31, p. 5927-37, Aug 1 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17600593 >.

PANTOPHLET, R.; BURTON, D. R. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 739-69, 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16551265 >.

PEETERS, M.; JUNG, M.; AYOUBA, A. The origin and molecular epidemiology of HIV. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 11, n. 9, p. 885-96, Sep 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24011334> >.
PEETERS, M.; SHARP, P. M. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. **AIDS**, v. 14 Suppl 3, p. S129-40, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11086856> >.

POTTER, S. J. *et al.* Obstacles to successful antiretroviral treatment of HIV-1 infection: problems & perspectives. **Indian J Med Res**, v. 119, n. 6, p. 217-37, Jun 2004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15243161 >.

POTTER, S. J. *et al.* Preserved central memory and activated effector memory CD4+ T-cell subsets in human immunodeficiency virus controllers: an ANRS EP36 study. **J Virol**, v. 81, n. 24, p. 13904-15, Dec 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928341> >.

POTTS, K. E. *et al.* Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 strains in Kinshasa, Zaire. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 9, n. 7, p. 613-8, Jul 1993. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8369166 >.

QUINN, T. C. HIV epidemiology and the effects of antiviral therapy on long-term consequences. **AIDS**, v. 22 Suppl 3, p. S7-12, Sep 2008. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18845925 >.

RAMPAZO, E. V. *et al.* Antigen targeting to dendritic cells allows the identification of a CD4 T-cell epitope within an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0117778, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25679777> >.

RAMSHAW, I. A.; RAMSAY, A. J. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. **Immunol Today**, v. 21, n. 4, p. 163-5, Apr 2000. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10740236> >.

RANASINGHE, S. *et al.* HIV-1 Antibody Neutralization Breadth Is Associated with Enhanced HIV-Specific CD4+ T Cell Responses. **J Virol**, v. 90, n. 5, p. 2208-20, Mar 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26656715> >.

RATTO-KIM S, Currier JR, Cox JH, Excler JL, Valencia-Micolta A, Thelian D, Lo V, Sayeed E, Polonis VR, Earl PL, Moss B, Robb ML, Michael NL, Kim JH, Marovich MA. Heterologous prime-boost regimens using rAd35 and rMVA vectors elicit stronger cellular immune responses to HIV proteins than homologous regimens. **PLoS One**, 2012.

RERKS-NGARM, S. *et al.* Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. **N Engl J Med**, v. 361, n. 23, p. 2209-20, Dec 3 2009. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19843557 >.

REYNOLDS, M. R. *et al.* Macaques vaccinated with live-attenuated SIV control replication of heterologous virus. **J Exp Med**, v. 205, n. 11, p. 2537-50, Oct 27 2008. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18838548 >.

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, n. 6, p. e11072, 2010. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20552033 >.

RIBEIRO, S.P. *et al.* **Priming with a DNA vaccine encoding HIV CD4+ T cell epitopes enhances responses against subsequent immunization with plasmid encoding Vif.** *Congresso AIDS Vaccine*. Paris: 261 p. 2009.

ROSA, D. S. *et al.* A DNA Vaccine Encoding Multiple HIV CD4 Epitopes Elicits Vigorous Polyfunctional, Long-Lived CD4 and CD8 T Cell Responses. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16921, 2011. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21347287 >.

ROSA, D. S. *et al.* Multiple Approaches for Increasing the Immunogenicity of an Epitope-Based Anti-HIV Vaccine. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 31, n. 11, p. 1077-88, Nov 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26149745> >.

ROSENBERG, E. S., Billingsley, J. M., Caliendo, A. M., Boswell, S. L., *et al.* Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. **Science**, v. 278, n. 5342, p. 1447-50, Nov 21 1997. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9367954 >.

RUANE, D. *et al.* A dendritic cell targeted vaccine induces long-term HIV-specific immunity within the gastrointestinal tract. **Mucosal Immunol**, Jan 6 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26732678> >.

SALEMI, M. *et al.* Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. **FASEB J**, v. 15, n. 2, p. 276-8, Feb 2001. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11156935 >.

SALUJA, S. S. *et al.* Targeting human dendritic cells via DEC-205 using PLGA nanoparticles leads to enhanced cross-presentation of a melanoma-associated antigen. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 5231-46, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25419128> >.

SCHEID, J. F. *et al.* Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. **Nature**, v. 458, n. 7238, p. 636-40, Apr 2 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287373> >.

SCHEID, J. F. *et al.* Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. **Science**, v. 333, n. 6049, p. 1633-7, Sep 16 2011. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21764753 >.

SCHOOFS, T. *et al.* HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. **Science**, v. 352, n. 6288, p. 997-1001, May 20 2016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27199429> >.

SEKALY, R. P. The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? **J Exp Med**, v. 205, n. 1, p. 7-12, Jan 21 2008. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18195078 >.

SHEDLOCK, D. J., Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. **Science**, v. 300, n. 5617, p. 337-9, Apr 11 2003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12690201 >.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 3, p. 151-61, Mar 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11913066 >.

SHORTMAN, K.; NAIK, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 1, p. 19-30, Jan 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17170756 >.

SILVA-SANCHEZ, A. *et al.* ESAT-6 Targeting to DEC205+ Antigen Presenting Cells Induces Specific-T Cell Responses against ESAT-6 and Reduces Pulmonary Infection with Virulent Mycobacterium tuberculosis. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0124828, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25915045> >.

SIMON, V.; HO, D. D. HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy. **Nat Rev Microbiol**, v. 1, n. 3, p. 181-90, Dec 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15035022> >.

SIMON, V.; HO, D. D.; ABDOL KARIM, Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. **Lancet**, v. 368, n. 9534, p. 489-504, Aug 5 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16890836 >.

SOARES, H. *et al.* A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. **J Exp Med**, v. 204, n. 5, p. 1095-106, May 14 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17438065 >.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J Exp Med**, v. 137, n. 5, p. 1142-62, May 1 1973. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4573839>.

STEINMAN, R. M.; IDOYAGA, J. Features of the dendritic cell lineage. **Immunol Rev**, v. 234, n. 1, p. 5-17, Mar 2010. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20193008>.

STYLIANOU, E. *et al.* Exploring the vaccine potential of Dec-205 targeting in Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **Vaccine**, v. 29, n. 12, p. 2279-86, Mar 9 2011. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21272603>>.

TACKEN, P. J. *et al.* Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 10, p. 790-802, Oct 2007. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17853902>>.

TEWARI, K. *et al.* Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4+ T cell responses to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein (CSP) and alphaDEC-CSP in non human primates. **Vaccine**, v. 28, n. 45, p. 7256-66, Oct 21 2010. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20846528>.

TRUMPFHELLER, C. *et al.* The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 7, p. 2574-9, Feb 19 2008. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18256187>.

TRUMPFHELLER, C. *et al.* Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. **J Exp Med**, v. 203, n. 3, p. 607-17, Mar 20 2006. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16505141>.

UNAIDS/WHO. Report on the global AIDS epidemic. 2014.

VACCARI, M. *et al.* CD4+ T-cell loss and delayed expression of modulators of immune responses at mucosal sites of vaccinated macaques following SIV(mac251) infection. **Mucosal Immunol**, v. 1, n. 6, p. 497-507, Nov 2008. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079217>>.

VAN HEUVERSWYN, F. *et al.* Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. **Nature**, v. 444, n. 7116, p. 164, Nov 9 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17093443 >.

VILLADANGOS, J. A.; SCHNORRER, P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 7, p. 543-55, Jul 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17589544 >.

VON GEGERFELT, A. *et al.* Emergence of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic CD4+ T cells and increased humoral responses correlate with control of rebounding viremia in CD8-depleted macaques infected with Rev-independent live-attenuated simian immunodeficiency virus. **J Immunol**, v. 185, n. 6, p. 3348-58, Sep 15 2010. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20702730 >.

VREMEC, D. *et al.* CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. **J Immunol**, v. 164, n. 6, p. 2978-86, Mar 15 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10706685 >.

WALKER, L. M.; BURTON, D. R. Rational antibody-based HIV-1 vaccine design: current approaches and future directions. **Curr Opin Immunol**, v. 22, n. 3, p. 358-66, Jun 2010. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20299194 >.

WALKER, L. M. *et al.* Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 466-70, Sep 22 2011. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21849977 >.

WATKINS, D. I. The hope for an HIV vaccine based on induction of CD8+ T lymphocytes--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 2, p. 119-29, Mar 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425263> >.

WATKINS, D. I. *et al.* Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. **Nat Med**, v. 14, n. 6, p. 617-21, Jun 2008. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18535579 >.

WEDRYCHOWICZ, H. Antiparasitic DNA vaccines in 21st century. **Acta Parasitol**, v. 60, n. 2, p. 179-89, Jun 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26203983> >.

WILSON, N. A. *et al.* Vaccine-induced cellular responses control simian immunodeficiency virus replication after heterologous challenge. **J Virol**, v. 83, n. 13, p. 6508-21, Jul 2009.

Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19403685 >.

WOODLAND, D. L. Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. **Trends Immunol**, v. 25, n. 2, p. 98-104, Feb 2004. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102369> >.

WYAND, M. S. *et al.* Protection by live, attenuated simian immunodeficiency virus against heterologous challenge. **J Virol**, v. 73, n. 10, p. 8356-63, Oct 1999. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10482586 >.

YAMAMOTO, T. *et al.* Polyfunctional CD4+ T-cell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection. **J Virol**, v. 83, n. 11, p. 5514-24, Jun 2009. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19297503> >.