



**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR  
CONTRA HIV EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS  
PELA VIA INTRAVAGINAL COM UMA VACINA DE  
ADENOVÍRUS RECOMBINANTE**

**FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2006.**

**ANA PAULA DUARTE DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR CONTRA HIV EM  
CAMUNDONGOS IMUNIZADOS PELA VIA INTRAVAGINAL COM UMA  
VACINA DE ADENOVÍRUS RECOMBINANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto

Florianópolis, fevereiro de 2006.

SOUZA, Ana Paula Duarte de

Avaliação da resposta imune celular contra o HIV em camundongos imunizados pela via intravaginal com uma vacina de adenovírus recombinante / Ana Paula Duarte de Souza. Florianópolis, 2006. 71 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

1. HIV. 2. Vacina. 3. Células T CD8<sup>+</sup>. 4. Trato genital feminino.

*Dedico este trabalho a minha mãe, meu pai, meu irmão e ao meu noivo, pelo apoio incondicional que me concederam durante todo este tempo.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto, pela oportunidade e ajuda em muitos momentos. Principalmente pela convivência, que com certeza contribuiu muito para minha formação profissional e pessoal;

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti, pela grande ajuda nos momentos difíceis;

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade;

Aos Laboratórios de Protozoologia e Virologia Aplicada, pelo uso dos equipamentos;

À Profa. Dra. Margherita Barraco - BEG e a Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentini – BEG, pelo uso de reagentes;

Ao Laboratório de Marcadores Celulares do Hemocentro de Santa Catarina (HEMOSC), especialmente a Renata da Silva e Silvia I.A.C.P. Ferreira, pela aquisição e análise das amostras;

À Profa. Dra. Sônia Gonçalves Carrobrez, por ter me ajudado em inúmeros momentos;

Aos camundongos BALB/c, por darem sua vida em prol deste trabalho;

Ao CNPq, Fapesc e Programa Nacional de DST e AIDS, pelo financiamento;

Às colegas Paula e Camila do Laboratório de Imunologia Aplicada, pelo companheirismo e agradável convivência;

À Claudia Figueredo, pelos bons momentos e muitos almoços;

À todos os colegas do LVA: Carla, Débora, Vanessa, Cris, Juliana, Thiago, Jonas e Jadel e da Proto: Dani, Pati, Milene, Letícia, Tais, Cris e Bibiana pelo convívio agradável nestes dois anos;

Ao Prof. Dr. Flávio Reginatto, por acreditar em mim e me ajudar;

Às amigas Adriana Côrrea, Caroline Heidrich Seibert, Juliana Berka e Vanessa Müller pelos ótimos momentos compartilhados;

À minha prima, Lilian Mortari, por me escutar nos momentos difíceis e felizes e por ter me abrigado por um mês;

À minha amiga Dayse Locatelli, por ter ficado ao meu lado e dividido comigo os piores e melhores momentos destes dois anos de trabalho;

Ao meu noivo, Lucas Sityá, por me esperar e me amar mesmo distante;

À minha Família, por sempre ter acreditado em mim e me apoiado incondicionalmente;

Principalmente à Deus por iluminar meu caminho;

E também àqueles que apesar de não estarem citados, contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC, com auxílios financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Santa Catarina (FAPESC) e Programa Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde.

*“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança”.*

Albert Einstein

## RESUMO

Vacinas contra HIV que estimulem resposta imune de mucosas, especialmente no trato genital feminino, podem ser mais eficazes na prevenção ou contenção da infecção pelo HIV. Adenovírus humano (Ad) do sorotipo 5, que têm sido utilizados como vetores de vacinas contra HIV, apresentam como limitação a pré-existência de anticorpos neutralizantes na população. Para superar este problema foi desenvolvido um Ad recombinante a partir de um vírus de origem símia - AdC6gag. Este estudo avaliou a resposta imune celular específica contra HIV em sítios sistêmicos e de mucosa após a imunização intravaginal de camundongos BALB/c com AdC6gag. Demonstrou-se que imunização intravaginal foi capaz de induzir células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas no trato genital, linfonodos ilíacos e baço. A resposta imune avaliada através da marcação intracelular de IFN- $\gamma$  produzido por células T CD8<sup>+</sup> estimuladas por 5 horas com peptídeo contendo Gag foi demonstrada utilizando-se diferentes doses do vetor, mas a dose de 10<sup>5</sup> PFU de AdC6gag foi capaz de induzir a melhor resposta no trato genital e linfonodos ilíacos 14 dias após a imunização intravaginal. 10<sup>5</sup> e 10<sup>4</sup> PFU de AdC6gag induziram a melhor resposta no baço 7 dias após a imunização. A imunização intravaginal com AdC6gag induziu melhor resposta de células T CD8<sup>+</sup> no trato genital e linfonodos ilíacos que as imunizações intranasal e intramuscular. As frequências de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas estimuladas no trato genital pela imunização intravaginal IV (3,8%) e intranasal IN (0,94%) aumentaram com uma estratégia de dose-reforço IN-IV (27,46%) quando se utilizou 10<sup>5</sup> PFU de AdC6gag. A resposta de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas induzidas com AdC6gag no trato genital e baço é de longa duração, podendo ser detectada 90 dias após a imunização. AdC6gag aumentou a população de células T  $\gamma\delta$  no trato genital após imunização intravaginal com diferentes doses. As mulheres constituem hoje 50% dos indivíduos infectados e 70 a 80 % dos novos casos de HIV ocorrem através de transmissão heterossexual. A indução de células T CD8<sup>+</sup> específicas na mucosa pode ser importante, uma vez que estas células estão implicadas no controle da replicação viral. Este estudo sugere que AdC6gag pode induzir eficientemente células T CD8<sup>+</sup> no trato genital, e que estas frequências podem ser aumentadas com uma estratégia de dose reforço com vias de mucosa distintas.

Palavras chave: HIV, vacinas, células T CD8<sup>+</sup>, trato genital feminino.



## ABSTRACT

HIV vaccine strategies that maximize mucosal immunity, especially in the genital tract, may be more effective at preventing or containing HIV infection. Human adenovirus (Ad) serotype 5, which have been tested as vector in vaccines against HIV, have as a major drawback the pre-existing neutralizing antibodies in the human population. To circumvent this problem, it was developed a recombinant simian Ad – AdC6gag. This study evaluated specific cellular immune response to HIV in systemic and mucosal sites after intravaginal immunization with AdC6gag. We showed that intravaginal immunization with AdC6gag in BALB/c mice induced Gag-specific CD8<sup>+</sup> T cell in genital tract, iliac lymph nodes and spleen. The response measured by intracellular interferon- $\gamma$  staining of CD8<sup>+</sup> T cells stimulated for 5 h with a peptide carrying Gag could be demonstrated using different doses of recombinant virus, but 10<sup>5</sup> PFU of AdC6gag induced the best response in genital tract and iliac lymph nodes 14 days after intravaginal immunization. 10<sup>5</sup> and 10<sup>4</sup> PFU of AdC6gag induced the best response in spleen 7 after the immunization. Intravaginal immunization with AdC6gag could induce the best Gag-specific CD8<sup>+</sup> T cell in the genital tract and iliac lymph node than intranasal and intramuscular immunization. Frequencies of Gag-specific CD8<sup>+</sup> T cells elicited in genital tract by intravaginal-IV (3,8%) and intranasal-IN (0,94%) immunizations increased with a prime-boost strategy IN-IV (27,46%) using 10<sup>5</sup> PFU of AdC6gag. The response of Gag-specific CD8<sup>+</sup> T cell induced with AdC6gag by intravaginal route in genital tract and spleen was long lasting, and could be detected 90 days after immunization. AdC6gag could induce the increase of  $\gamma\delta$  T cells in genital tract after intravaginal immunization with different doses. Women now constitute about 50% of HIV infected individuals and 70 to 80% of all HIV infections results from heterosexual transmission. Inducing mucosal specific CD8<sup>+</sup>T cells could be important because these cells have been related with controlling viral replication. This study suggests that AdC6gag can induce efficient Gag-specific CD8<sup>+</sup> T cells in genital tract, which can be increased with a prime-boost regiment using distinct mucosal routes.

*Key words: HIV, vaccines, CD8<sup>+</sup> T cells, feminine genital tract.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática do HIV.....	3
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática do genoma do HIV.....	4
<b>Figura 3:</b> Avaliação da resposta imune celular 7, 14 ou 30 dias após imunização intravaginal com diferentes doses de AdC6gag.....	26
<b>Figura 4:</b> Cinética da resposta de células T CD8 <sup>+</sup> Gag-específicas no trato genital.....	28
<b>Figura 5:</b> Comparação das vias de imunização intravaginal (IV), intranasal (IN) e intramuscular (IM).....	30
<b>Figura 6:</b> Estratégia de Dose-Reforço.....	32
<b>Figura 7:</b> Resposta de células T CD8 <sup>+</sup> Gag específicas presentes na mucosa vaginal 90 dias após a imunização.....	34
<b>Figura 8:</b> População de células T $\gamma\delta$ no trato genital feminino.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Ad** – Adenovírus

**AdC6gag** - Adenovírus de chimpanzé sorotipo 6 recombinante, expressando o gene *gag* do HIV

**AIDS** – Síndrome da imunodeficiência humana

**DMEM** - Dubelcco's Modified Eagle's Médium

**FITC** - Isotiocianato de fluoresceína

**HIV** – Vírus da imunodeficiência humana

**HSV** – Vírus Herpes simples

**IFN- $\gamma$**  - Interferon gama

**MALT** – Tecido linfóide associado a mucosas – do inglês *mucosal associated lymphoid tissue*

**MHC** – Complexo de histocompatibilidade principal

**MVA** – Vírus Vaccinia Ankara modificado

**NALT** – Tecido linfóide associado à mucosa nasal – do inglês *nasal associated lymphoid tissue*

**NK** – Célula Natural Killer

**PBS** – Tampão fosfato salino

**PE** – Ficoeritrina

**PFU** – Unidades formadoras de placa

**PMA** – Formol Meristato Acetato

**PSA** – Penicilina, Streptomina e Anfotericina B

**SBF** – Soro bovino fetal

**SIV** – Vírus da imunodeficiência símia

**TCR** – Receptor de célula T

**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 O agente etiológico.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Imunidade de mucosas.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Estratégias de vacinas contra HIV.....</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Considerações éticas.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 Modelo animal.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3 Vírus.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4 Peptídeo.....</b>	<b>19</b>
<b>3.5 Imunização de camundongos.....</b>	<b>19</b>
<b>3.6 Coleta das amostras e isolamento dos linfócitos.....</b>	<b>20</b>
<b>3.7 Estimulação das células e marcação intracelular de IFN-<math>\gamma</math>.....</b>	<b>22</b>
<b>3.8 Marcação da população de células T <math>\gamma\delta</math>.....</b>	<b>23</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Dose-resposta e cinética da resposta imune celular.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2 Comparação de diferentes vias de imunização.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Estratégia de dose-reforço.....</b>	<b>31</b>
<b>4.4 Resposta imune de memória.....</b>	<b>33</b>
<b>4.5 Células T <math>\gamma\delta</math>.....</b>	<b>34</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO A – Lista de Soluções.....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Uma vacina eficaz contra vírus da imunodeficiência humana (HIV) tornou-se uma necessidade mundial, uma vez que existem mais de 40 milhões indivíduos soropositivos em todo mundo (UNAIDS/WHO, 2004a) e no Brasil este número chega a aproximadamente 600.000 (BRASIL, 2005). Apesar das estratégias de prevenção existentes, a pandemia do HIV continua sem controle, já que ocorrem por ano cinco milhões de novas infecções. Em 2004, a despeito do grande avanço na terapia antiretroviral, aproximadamente três milhões de pessoas morreram em consequência da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). As mulheres têm sido seriamente acometidas por esta pandemia, visto que elas representam hoje metade dos indivíduos vivendo com HIV no mundo. Na África subsaariana, as mulheres constituem 57% de toda a população infectada e 76% da população HIV positiva entre 15-24 anos. Na maioria das outras regiões, a proporção de mulheres infectadas tem aumentado consideravelmente comparada com anos anteriores e continua crescendo, particularmente na Europa Oriental, Ásia e América Latina, onde mulheres constituíam em torno de 15% dos indivíduos HIV positivos na década de 80, passando para 39% em 2004 (UNAIDS/WHO, 2004a). No Brasil, a percentagem de mulheres infectadas passou de 17% em 1993 para 31% em 2005 (BRASIL, 2005).

Com exceção do compartilhamento de seringas entre usuários de drogas injetáveis, transfusão de hemoderivados contaminados e transmissão vertical, o HIV é transmitido pela mucosa. Transmissão pela mucosa oral pode ocorrer durante o aleitamento materno e durante o sexo oral, já infecções pelas mucosas do reto, vagina e uretra podem ocorrer através de relação sexual desprotegida. A via de transmissão heterossexual, em países em desenvolvimento, é responsável por 70% a 80% dos novos casos de infecção pelo HIV (SHATTOCK; MOORE, 2003), enquanto que em países como o Reino Unido esta proporção chega a 50% nos dias atuais

(UNAIDS/WHO, 2004b). Observa-se no Brasil, que a transmissão heterossexual, entre mulheres maiores de 13 anos, tem representado quase que a totalidade dos novos casos de HIV (BRASIL, 2005).

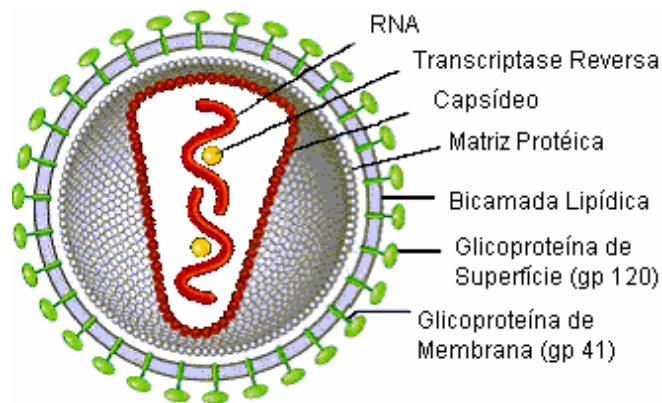
Através do intercuro sexual, as mulheres podem ter duas vezes mais chances de se infectar pelo HIV que seus parceiros homens (ANNAN, 2005). Ao mesmo tempo, a maior parte das mulheres casadas tem assumido um comportamento de risco ao não utilizarem nenhum tipo de proteção com seus cônjuges (UNAIDS/WHO, 2004b). Em alguns países da África, mulheres casadas entre 15-19 anos apresentam maiores índices de infecção pelo HIV que mulheres solteiras sexualmente ativas na mesma faixa etária (GLYNN; CARAEL; AUVERT, et al., 2001). Conseqüentemente, as mulheres têm tido recentemente um particular risco de infecção pelo HIV e o trato genital feminino tornou-se uma importante porta de entrada do vírus (STEVCEVA; STROBER, 2004). Assim sendo, várias estratégias de vacinas atuais contra HIV têm buscado a indução de uma resposta imune específica neste local a fim de alcançar proteção frente à infecção.

### **1. 1 O agente etiológico**

HIV-1, doravante denominado apenas de HIV, e HIV-2 são lentivírus da família Retroviridae e causadores da AIDS. No entanto, HIV-2 é um vírus de menor virulência, sendo encontrado quase que exclusivamente na África. Há uma grande variação gênica entre cepas do HIV e isto ocorre devido a grande taxa de erro da transcriptase reversa, que gera pelo menos uma mutação a cada ciclo viral. Deste modo, análises filogenéticas de amostras virais de vários países revelaram que o HIV pode ser separado em três grupos: M “Major”, O “Outlier” e N “new ou non-M, non-O”. Além disso, o grupo M pode ser ainda dividido em subtipos A, B, C, D, F, G, H,

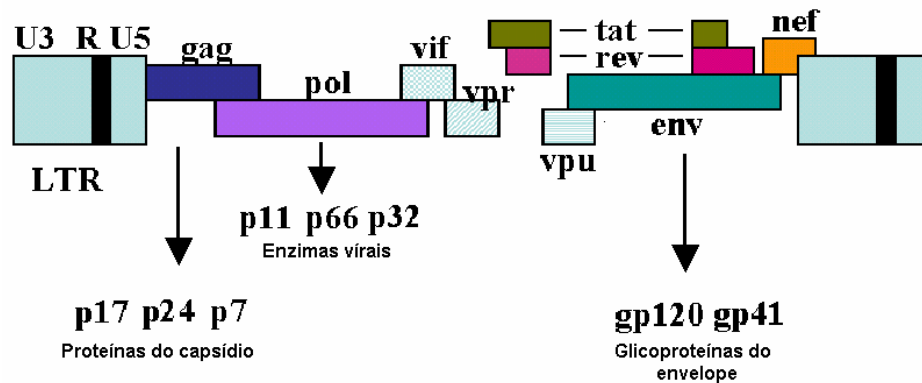
J e K e sua distribuição é muito variada geograficamente (MORGADO; GUIMARAES; GALVAO-CASTRO, 2002).

Cada partícula viral tem um diâmetro de 100 nm e possuem integrados em sua estrutura 72 complexos de glicoproteínas compostos de trímeros de uma glicoproteína externa de 120 kilodaltons (gp120) ligada a uma glicoproteína transmembrana de 41 kilodaltons (gp41) (Figura 1). A gp 120 serve como ligante para as moléculas CD4, presentes em linfócitos T auxiliares, células dendríticas, monócitos, macrófagos, eosinófilos e células da micróglia (SLEASMAN; GOODENOW, 2003; HOFFMANN; ROCKSTROH; KAMPS, 2005). As cepas do HIV são divididas em duas categorias baseadas no co-receptor utilizado durante a infecção das células: “R5” utilizam o receptor de quimiocina CCR5, infectando preferencialmente macrófagos e células dendríticas e “X4” que fazem uso do receptor CXCR4, infectando células T CD4<sup>+</sup>. O envelope viral deriva da membrana plasmática da célula hospedeira e desta forma pode conter outras moléculas presentes na bicamada lipídica, como as pertencentes ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e moléculas de adesão. Ancorada ao envelope viral está uma matriz de proteínas p17 e em seguida encontra-se o capsídeo cônico constituído de proteínas p24.



**Figura 1: Representação esquemática do HIV:** Evidenciando sua organização estrutural. Fonte: <http://bio.classes.ucsc.edu>. Acesso em: 03 jan 2006.

Dentro do capsídio está o genoma do HIV, formado por duas cópias de fita simples de RNA, associado a duas moléculas de transcriptase reversa, uma protease e uma integrase. O genoma do HIV tem aproximadamente 10.000 nucleotídeos e seus genes podem ser classificados em três grupos principais (Figura 2). O primeiro grupo é composto pelos genes estruturais *gag*, *pol* e *env*, que codificam proteínas precursoras que serão clivadas para produzir as proteínas do capsídeo, enzimas necessárias para a replicação e proteínas do envelope viral, respectivamente. O segundo grupo inclui os genes *tat*, *rev* e *nef*, que codificam proteínas regulatórias da expressão gênica. Finalmente, fazem parte do terceiro grupo os genes acessórios *vif*, *vpu* e *vpr*; onde os dois primeiros codificam proteínas necessárias à maturação do vírus e o último codifica um fraco ativador de transcrição (VAISHNAV; WONG-STAAAL, 1991; HOFFMANN; ROCKSTROH; KAMPS, 2005).



**Figura 2: Representação esquemática do genoma do HIV.** Os retângulos identificam os nove genes virais. Da esquerda para direita: *gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *env* e *nef*, os quais apresentam-se flanqueados por duas LTR. Abaixo de cada gene estão indicados seus produtos. Fonte: Modificada de (HOFFMANN, 2005).

## 1.2 Imunidade de mucosas

Em seres humanos o sistema imune de mucosas contribui com 80% de todos os imunócitos do organismo e estas células estão acumuladas ou transitando entre os diversos tecidos linfóides



associados às mucosas (MALT) e seus sítios efetores. A resposta imune nestes locais é governada pela natureza do imunógeno, o tipo de célula apresentadora de antígeno profissional (APC) envolvida e o microambiente presente, podendo ocorrer uma estimulação da resposta imune ou tolerância. As populações celulares envolvidas são fenotipicamente e funcionalmente distintas dos tecidos linfóides sistêmicos, onde além das células T e B residentes, estão presentes células dendríticas, neutrófilos, macrófagos, células natural killer (NK), mastócitos, células T  $\gamma\delta$  e células T<sub>reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005).

O sistema imune presente nas mucosas possui certo grau de compartimentalização e desenvolveu restrições sobre a recirculação de células linfóides. O mecanismo de migração destas células dentro de um mesmo sítio de mucosa ou entre diferentes sítios de mucosa não é completamente compreendido (KUNKEL; BUTCHER, 2002). A migração parece estar relacionada com receptores de quimiocinas e integrinas presentes nas células e a expressão destes receptores é induzida pelo microambiente do tecido onde estas células são diferenciadas em efectoras ou de memória (BELYAKOV; BERZOFSKY, 2004). Estas observações podem explicar a noção de sistema imune de mucosa comum, onde imunócitos ativados em um local migram para um tecido de mucosa remoto preferencialmente a sítios sistêmicos. Porém, em contraste com uma unidade total do sistema de imune presente nas mucosas, compartimentos de mucosa diferentes usam distintos receptores (BELYAKOV; BERZOFSKY, 2004). Como exemplo, a molécula de adesão MadCAM-1 ligante da integrina  $\alpha 4\beta 7$  é encontrada no trato intestinal e não está presente no trato genital. Portanto, a indução da expressão da integrina  $\alpha 4\beta 7$  nos linfócitos T não promove a migração destas células entre estes dois compartimentos de mucosa diferentes (KOZLOWSKI; NEUTRA, 2003), mostrando com isso, que há um particular grau de ligação

entre sítios indutores específicos de mucosas com locais efetores particulares (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005).

A cepa do HIV geralmente envolvida em transmissões pela mucosa é a R5, até mesmo quando o doador possui ambos os vírus (ZHU; MO; WANG, et al., 1993; WOLINSKY; WIKE; KORBER, et al., 1992). Na ausência de ruptura da mucosa do trato genital feminino devido ao trauma, o HIV pode adentrar na lâmina própria durante a transmissão sexual através das células epiteliais ou das células dendríticas. As células epiteliais permitem que o vírus atravesse para a mucosa por transcitose. Este processo ocorre durante o contato entre a superfície apical das células epiteliais da mucosa com as células infectadas transmitidas (BOMSEL, 1997). Os vírus são internalizados pelas células epiteliais em estruturas semelhantes a endossomos, podendo desta forma cruzar a mucosa epitelial e infectar células mononucleares presentes na lamina própria. A transcitose pode ser mediada pela molécula galactosil-ceramida, que alternativamente serve como receptor para o vírus e geralmente está expressa nas linhagens de células HEC-1 localizadas na superfície endometrial (ALFSEN; INIGUEZ; BOUGUYON, et al., 2001). A transmissão e disseminação do HIV através das células dendríticas presentes na mucosa do trato genital, por sua vez, ocorrem com a interação entre a lectina do tipo C “DC-SIGN” (*dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*) presentes nestas células e a gp120 do vírus (GEIJTENBEEK; KWON; TORENSMA, et al., 2000). Em contraste com outros antígenos capturados pelas células dendríticas, o HIV internalizado não é completamente degradado e alguns vírus permanecem no seu estado infeccioso por vários dias (TURVILLE; SANTOS; FRANK, et al., 2004; KWON; GREGORIO; BITTON, et al., 2002). Deste modo, as células dendríticas, sem se infectar, podem transmitir o HIV para células T através de infecção sináptica (MCDONALD; WU; BOHKS, et al., 2003). A sinapse se forma na interface de contato entre a célula dendrítica e a célula T, onde se concentram os vírus e os receptores e co-receptores do

HIV, presentes nestas células, respectivamente (GARCIA; PION; PELCHEN-MATTHEWS, et al., 2005). Um estudo recente demonstrou que células dendríticas presentes na lâmina própria e no epitélio da vagina de mulheres portadoras de HIV assintomáticas na Tailândia são positivas para antígeno p24, indicando que estas células podem ser um importante reservatório viral (PIGUET; BLAUVELT, 2002; BHOOPAT; EIANGLING; RUGPAO, et al., 2001). Do mesmo modo, foi demonstrado que após infecção da mucosa cervical de macacos com o vírus da imunodeficiência símia (SIV), que é um vírus intimamente relacionado ao HIV, células dendríticas subepiteliais são o maior sítio de replicação viral (BELYAKOV; BERZOFSKY, 2004). Estes dois estudos destacaram com isso a importância do trato genital não só como porta de entrada do vírus, mas também como reservatório viral (STEVCEVA; STROBER, 2004).

Além disso, células dendríticas, juntamente com outras células da resposta imune inata, como células T  $\gamma\delta$ , células NK e macrófagos presentes na mucosa do trato genital feminino têm uma crítica função no controle da infecção primária do HIV, pois estas células podem secretar citocinas e quimiocinas, além de apresentarem ações efetoras que podem bloquear a replicação do vírus (LEHNER, 2003). As células T  $\gamma\delta$  possuem o receptor de células T (TCR) formado por cadeias  $\gamma$  e  $\delta$ , diferem das células T  $\alpha\beta$  pelo reconhecimento de antígeno sem a necessidade de MHC e pela resposta a imunógenos não peptídicos, podem lisar as células infectadas pelo HIV ou pelo SIV (WALLACE; BARTZ; CHANG, et al., 1996). Estas células também geram fatores antivirais, tais como RANTES, MIP- $\alpha$  e MIP- $\beta$  que podem prevenir a infecção pelo SIV através da ligação e regulação negativa dos co-receptores CCR5 (LEHNER; MITCHELL; BERGMEIER, et al., 2000).

As células dendríticas têm também outra função importante ao contribuírem para a estimulação de uma resposta imune adaptativa, uma vez que estas células após passarem entre as

células epiteliais da mucosa vaginal e capturarem o HIV, migram para os linfonodos ilíacos que drenam este local e apresentam os antígenos virais para as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (CAMERON; FREUDENTHAL; BARKER, et al., 1992). As células T CD8<sup>+</sup> ativadas voltam para o trato genital para combater a infecção, lisando as células infectadas e produzindo citocinas com atividade antiviral como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Da resposta imune adaptativa também atuam na mucosa vaginal anticorpos do tipo IgA e IgG específicos para o vírus (KOZLOWSKI; NEUTRA, 2003). Entretanto, diferente de muitas outras infecções virais, a resposta imune específica gerada não é capaz de eliminar a infecção pelo HIV.

Uma vez que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> não previnem o início da infecção, para se alcançar proteção esterilizante contra HIV é necessário à indução de anticorpos neutralizantes (GRAHAM, 2002). Devido à dificuldade em induzir anticorpos que neutralizem a grande variedade de isolados virais existentes (BURTON; DESROSIERS; DOMS, et al., 2004), várias linhas de investigação de vacinas contra HIV tem buscado a indução de resposta imune celular específica potente e reativa a muitos antígenos virais. Estudos em primatas não humanos têm mostrado que a resposta imune induzida por estas vacinas de células T CD8<sup>+</sup> pode ser capaz de controlar a propagação do vírus, diminuindo a progressão até a doença e também reduzindo a frequência de transmissão (LETVIN, 2005).

### **1.3 Estratégias de Vacinas contra HIV**

Proteção contra HIV permanece ainda mal definida, dificultando o desenvolvimento de vacinas, que até o momento não mostraram nenhuma eficácia em ensaios clínicos. Há muito tempo já se tem discutido a necessidade da administração de vacinas contra o HIV pelas vias de

mucosa para estimulação de níveis suficientes de resposta imune específica nestes locais (MILLER; MCGHEE; GARDNER, 1993; LEHNER; BERGMEIER; WANG, et al., 1999; FREIHORST; OGRA, 2001). A racionalidade desta abordagem está baseada em padrões de migração de linfócitos e em receptores expressos nestas células (KANTELE; ZIVNY; HAKKINEN, et al., 1999; BRANDTZAEG; BAEKKEVOLD; FARSTAD, et al., 1999). A particular compartimentalização presente em locais do sistema imune de mucosa restringe de certo modo a escolha da via de vacinação para obtenção de uma resposta imune efetiva em sítio específico (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005). Um grande número de estudos tem mostrado que imunizações pela vias de mucosa fornecem uma melhor resposta imune nestes locais que imunizações sistêmicas, inclusive de células T CD8<sup>+</sup> específicas (KOZLOWSKI; NEUTRA, 2003; BERZOFSKY; AHLERS; BELYAKOV, 2001; BELYAKOV; DERBY; AHLERS, et al., 1998) e isto parece ser aplicado à maioria dos tipos de vacinas (STEVCEVA; STROBER, 2004).

Várias vias de imunização têm sido utilizadas para indução de resposta imune nas mucosas, sendo a via oral é mais comum, embora recentemente a via intranasal também esteja sendo estudada, já que utilizando esta via os antígenos não sofrem a ação de enzimas digestivas (LEHNER, 2003). Respostas de células T citotóxicas na mucosa foram demonstradas após imunização oral, nasal, retal ou vaginal (STAATS; BRADNEY; GWINN, et al., 2001; KLAVINSKIS; BERGMEIER; GAO, et al., 1996). Entretanto, há evidências que imunizações locais, ou seja, pelas vias retal e vaginal podem ser necessárias para o desenvolvimento com sucesso de imunidade protetora contra HIV no sítio de entrada do vírus (LEHNER, 2003).

As vacinas que utilizam a via de imunização intravaginal estimulam as células do sistema imune presente da mucosa do trato genital, que é basicamente similar a outras superfícies de mucosas, porém distinto em algumas características. Em camundongos o trato genital feminino em contraste com o sangue periférico e linfonodos, possui altas porcentagens de células T  $\gamma\delta$ , de

15% a 20%, onde 80% destas parecem expressar a molécula CD4. Além disso, nestes animais enquanto que a relação CD4:CD8 é de 3:1 e 6:1 nos linfonodos e sangue periférico, respectivamente, no trato genital somente 1% das células tem a expressão de CD8, alterando esta taxa para 100:1 (FIDEL; WOLF; KUKURUGA, 1996). Em contraste, em mulheres normais, sem sinais de inflamação, os linfócitos T e células apresentadoras de antígenos são mais prevalentes na mucosa cervical que vaginal e os linfócitos intraepiteliais são predominantemente CD8<sup>+</sup> (PUDNEY; QUAYLE; ANDERSON, 2005).

O trato genital feminino não possui associado a ele nenhum tecido linfóide organizado, como o exemplo das placas de Peyer na mucosa do trato gastrointestinal e do tecido linfóide associado à mucosa nasal (NALT) no trato respiratório, onde a resposta imune é iniciada. Entretanto, ensaios de marcação de células T e B com corante PKH26 têm revelado que os linfonodos ilíacos devem funcionar como um sítio indutivo da resposta imune, do qual estas células migram para o sítio efetor (MITCHELL; BERGMEIER; DOYLE, et al., 1998; LEHNER, 2003). O trato genital inferior, ou seja, vulva e vagina têm a habilidade de iniciar uma resposta imune contra vários patógenos transmitidos sexualmente além do HIV, tais como vírus herpes simples (HSV), *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* (MERRIMAN; WOODS; WINTER, et al., 1984; HEDGES; MAYO; MESTECKY, et al., 1999). Porém, para antígenos que não se replicam, a mucosa do trato genital feminino é geralmente considerada por alguns autores como um sítio indutor fraco de resposta imune, induzindo somente uma resposta localizada (WASSEN; SCHON; HOLMGREN, et al., 1996; THAPAR; PARR; PARR, 1990; RUSSELL, 2002; PARR; PARR, 1990; KOZLOWSKI; CU-UVIN; NEUTRA, et al., 1997; HANEBERG; KENDALL; AMERONGEN, et al., 1994). Contudo, diferentes estratégias de vacinas contra HIV e contra outros patógenos têm utilizado a via de imunização intravaginal para indução de resposta imune específica (WANG; DANG; AGADJANYAN, et al., 1997; BOGERS;

BERGMEIER; MA, et al., 2004; BAGARAZZI; BOYER; JAVADIAN, et al., 1999; ABEL; COMPTON; ROURKE, et al., 2003).

Diferentes tipos de vacinas têm sido estudados para induzir resposta imune contra antígenos do HIV, tanto em modelos experimentais, quanto em voluntários sadios e pacientes infectados com vírus (ROBINSON, 2002; LETVIN; BAROUCH; MONTEFIORI, 2002). Os primeiros estudos em vacinas contra o HIV foram feitos em macacos Rhesus utilizando vacinas com a forma atenuada e inativada do SIV. A forma atenuada do SIV, feita através da deleção do gene *nef*, não demonstrou ser segura, quando comparada com a forma inativada do vírus (WHATMORE; COOK; HALL, et al., 1995; MURPHEY-CORB; MARTIN; DAVISON-FAIRBURN, et al., 1989). A partir destes resultados, foi desenvolvida uma forma inativada do HIV, que quando utilizada para imunizar pacientes previamente infectados com vírus foi segura, mas não eficiente em induzir resposta imune (KAHN; CHERNG; MAYER, et al., 2000). O uso de proteína recombinante como imunógeno também foi analisado utilizando a gp120 recombinante do HIV em ensaios com chimpanzés e também em estudos clínicos. Em chimpanzés a gp120 recombinante induziu proteção contra o HIV no desafio, mas os resultados não foram considerados confiáveis, pois o vírus utilizado no desafio possuía as mesmas seqüências de envelope que a gp120 utilizada na vacinação (BERMAN; GREGORY; RIDDLE, et al., 1990). Experimentos com a gp120 em humanos demonstraram tanto a segurança como a ineficácia desta vacina (COHEN, 2003).

Duas abordagens modernas, vacinas de DNA e vetores virais recombinantes, têm sido muito estudadas como vacinas contra HIV. Os genes do HIV mais comumente utilizados em vacinas de DNA e vetores virais são o *env* e o *gag*, havendo estudos pré-clínicos e clínicos já realizados (MACGREGOR; BOYER; UGEN, et al., 1998; AMARA; VILLINGER; ALTMAN, et al., 2001). As vacinas baseadas no gene *env* geralmente buscam a estimulação de uma resposta

de anticorpos e deste modo tem como limitação a grande variabilidade viral. O gene *gag* é geralmente utilizado para estimulação de resposta de células T, devido à proteína Gag ser o primeiro alvo das células T CD8<sup>+</sup> nos pacientes que apresentam evolução lenta da infecção para a AIDS (PONTESILLI; KLEIN; KERKHOF-GARDE, et al., 1998) e também porque é uma das proteínas mais conservadas do HIV. A principal limitação das vacinas de DNA é a dificuldade de obter expressão suficiente do transgene para induzir uma resposta imune adequada. O uso de códons otimizados e adjuvantes tem melhorado a eficiência destas vacinas, mas até o presente momento a dose necessária de DNA para se conseguir uma boa resposta é muito grande e está longe da ideal (ROBINSON, 2002). Além disso, os ensaios clínicos de fase I utilizando vacinas de DNA demonstraram que a sua imunogenicidade em humanos é consideravelmente menor do que em macacos Rhesus (MWAU; CEBERE; SUTTON, et al., 2004; CHEN; SCALA; QUINTO, et al., 2001).

Vários vetores virais têm sido estudados como vacinas: poxvirus, adenovírus, alphavirus, poliovírus e herpesvírus (SOUZA; HAUT; REYES-SANDOVAL, et al., 2005). Quando estes vírus recombinantes contendo genes do HIV são utilizados na vacinação de animais ou homem suscetíveis, resposta imune é gerada contra ambos, vetor e produto do gene inserido. Cada um destes vetores apresenta características únicas, como o tamanho do inserto que podem carregar, o tipo de célula que infecta no hospedeiro e as estratégias utilizadas para escapar do sistema imune (ROBINSON, 2002). Os vetores virais que tiveram mais sucesso nos estudos pré-clínicos foram o vírus da vaccinia ankara modificado (MVA) e adenovírus (Ad) humano do sorotipo 5. Para a realização de ensaios de proteção em modelos animais, visto que o HIV é um vírus que infecta exclusivamente os humanos, foi desenvolvido o vírus da imunodeficiência símia-humana quimérico (SHIV), um vírus que expressa o envelope do HIV e o interior do SIV (LI; LORD; HASELTINE, et al., 1992) e causa em chimpanzés uma patologia semelhante a AIDS. Tanto o



MVA como o Ad humano conferiram proteção contra desafio com feito SHIV 89.6P, que é uma cepa altamente patogênica (SHIVER; FU; CHEN, et al., 2002; AMARA; VILLINGER; ALTMAN, et al., 2001) e ambos estão sendo testados em estudos clínicos (GARBER; SILVESTRI; FEINBERG, 2004).

Os Ad possuem um genoma linear de DNA dupla-fita com 36-38kb e pertencem à família Adenoviridae, a qual é dividida em dois gêneros: *Aviadenovirus*, que infectam aves e *Mastadenovirus* que infectam diferentes espécies de mamíferos, incluindo humanos e macacos. Os Ads isolados de humanos são classificados em 49 sorotipos e têm sido agrupados em seis subgêneros A-F de acordo com diferentes características. Estes vírus podem causar doença respiratória aguda em seres humanos. A partir da imunização de milhares de militares americanos com os Ad dos sorotipos 4 e 7, na prevenção de epidemias de doença respiratória, a popularidade da utilização de Ad como vacinas tornou-se ampla. Nesta imunização foram documentadas a segurança e a ausência de efeitos adversos destes vírus (TOP; GROSSMAN; BARTELLONI, et al., 1971). Embora os sorotipos 4 e 7 tenham sido extensivamente utilizados na vacinação de adultos, algumas variantes destes vírus estão associadas a complicações nas infecções. Já os sorotipos 2 e 5 geralmente não estão relacionados à doença grave, portanto podem ser mais adequados ao uso como vacinas (PINTO; ERTL, 2002). No sorotipo 5 que se concentram os maiores esforços para desenvolver vetores de vacinas para humanos.

O Ad entra nas células através do receptor CAR (receptor de coxsackivirus e adenovírus). A replicação do vírus ocorre em duas etapas, a primeira é controlada pela região E “early” do genoma do vírus, que codifica proteínas reguladoras da transcrição. A segunda etapa é iniciada pela transcrição da região L “late” do genoma, que codifica proteínas estruturais do vírus. A região E é dividida em outras regiões, das quais três delas (E1, E3 e E4) podem ser deletadas do genoma do adenovírus para inserção de material genético externo, formando desta forma vírus

recombinantes. Quando deletado da região E1, a mais freqüentemente utilizada, o adenovírus se torna impossibilitado de se replicar, visto que esta região é essencial para o começo da replicação.

Estes Ad deletados da região E1 podem ser facilmente propagados em células 293 que fornecem as proteínas codificadas pelo gene E1, necessárias para sua replicação (GRAHAM; SMILEY; RUSSELL, et al., 1977). Altos títulos virais podem ser conseguidos deste modo, em torno de  $10^9$  unidades formadoras de placa. Ad humano do tipo 5 recombinante, deletado de E1, foi primeiramente utilizado em terapia gênica. Porém, devido a grande resposta imune induzida contra o vetor e o produto do transgene, foi sugerido seu uso como vetor de vacinas (XIANG; YANG; WILSON, et al., 1996). O uso de Ad em vacinas possui inúmeras vantagens. A principal delas é que este vírus infecta eficientemente células dendríticas, uma das principais células apresentadoras de antígenos para os linfócitos T (BETT; PREVEC; GRAHAM, 1993). Além disso, quando deletados em E1, os Ad não são citopáticos, o que resulta em prolongada expressão do produto do transgene levando a uma maior apresentação do antígeno. Ao mesmo tempo, o genoma do Ad permanece episomal na célula, o que desta forma minimiza os riscos de oncogênese e ativação de genes celulares. Outra vantagem é que o vetor adenoviral pode ser administrado através de diferentes vias de imunização tais como intravaginal, intranasal, oral, intratraqueal, intraperitoneal, intravenosa e intramuscular (PINTO; ERTL, 2002; GALLICHAN; ROSENTHAL, 1995). Vacinas utilizando vetores adenovirais contra diferentes patógenos, além do HIV, tais como HSV, vírus da hepatite B, vírus do papiloma humano, vírus do sarampo, vírus da raiva, Ebola, vírus SARS têm sido testadas demonstrando resultados promissores, tanto em modelos animais como em ensaios clínicos (TSANG; HO; OOI, et al., 2003; SULLIVAN; SANCHEZ; ROLLIN, et al., 2000; SHIVER; FU; CHEN, et al., 2002; PINTO; ERTL, 2002). Resposta imune celular e humoral, sistêmica e de mucosas, tem sido induzida contra os antígenos, independente do modelo animal ou da via de imunização utilizada.

No entanto, apesar dos bons resultados obtidos com este vetor em ensaios de vacinas, existem algumas desvantagens, sendo a principal delas a imunidade pré-existente em seres humanos (FARINA; GAO; XIANG, et al., 2001). Em muitos casos, especialmente em infecções de crianças e adultos jovens, os Ad fica mantido nos tecidos linfóides, que embora tenha uma transcrição limitada pode continuar estimulando uma resposta imune adaptativa (TATSIS; ERTL, 2004). Imunidade pré-existente devido a infecções naturais resulta em títulos de anticorpos neutralizantes sustentados, um dos principais obstáculos para o sucesso da utilização de sorotipos comuns de Ad como o 5 e 2, como vetores de vacinas na população (TATSIS; ERTL, 2004). Os anticorpos neutralizantes, mesmo que em títulos baixos, reduzem a entrada dos Ad recombinantes nas células, incluindo as células apresentadoras de antígenos (FITZGERALD; GAO; REYES-SANDOVAL, et al., 2003). Com isso, diminuem a expressão do produto do transgene, que por sua vez afeta o resultado da resposta imune específica como já foi demonstrado em experimentos com animais (FITZGERALD; GAO; REYES-SANDOVAL, et al., 2003) e em humanos (TATSIS; ERTL, 2004). Nos Estados Unidos aproximadamente 45% da população possui anticorpos neutralizantes contra o Ad (FARINA; GAO; XIANG, et al., 2001) e estima-se que esta porcentagem possa ser ainda maior em países em desenvolvimento, como o Brasil.

Para contornar este problema de imunidade pré-existente na população foi desenvolvido um vetor adenoviral a partir de um Ad de origem símia, isolado de linfonodos mesentéricos de chimpanzés (FARINA; GAO; XIANG, et al., 2001). Este vírus de chimpanzé não circula normalmente na população humana e não possui epitopos para células B que possam ter reação cruzada com os sorotipos comuns de Ad humanos (FITZGERALD; GAO; REYES-SANDOVAL, et al., 2003). Além disso, têm a vantagem de conservar as características de indução de alta resposta imune presentes nos Ad humanos.

O Ad de chimpanzé sorotipo 6 recombinante para *gag* do HIV AdC6*gag* foi capaz de induzir potente resposta de células T CD8<sup>+</sup> específicas quando administrado via intramuscular. Esta resposta pôde ser aumentada com uma dose de reforço com um vírus heterólogo tanto em camundongos como em chimpanzés (REYES-SANDOVAL; FITZGERALD; GRANT, et al., 2004; PINTO; FITZGERALD; GILES-DAVIS, et al., 2003). A utilização de estratégias dose reforço é uma prática muito comum em vacinação e em estudos com vacinas contra HIV vem sendo bastante estudada, tanto com a utilização de vírus heterólogos, quanto com a utilização de duas vias distintas de imunização (VAJDY; SINGH; KAZAZ, et al., 2004; PINTO; FITZGERALD; GAO, et al., 2004). Imunização através da mucosa oral com AdC6*gag* não foi capaz de induzir resposta imune celular contra HIV que pudesse ser detectada no trato gastrointestinal, porém conferiu proteção parcial nos camundongos vacinados em um modelo de desafio utilizando o vírus da vaccinia recombinante para *gag* (PINTO; FITZGERALD; GAO, et al., 2004). Uma vez que a mucosa do trato genital é uma importante porta de entrada do HIV, decidiu-se avaliar a habilidade do AdC6*gag* em induzir resposta de células T CD8<sup>+</sup> específicas neste local quando administrado intravaginalmente. As informações obtidas se somarão as já existentes e poderão justificar a possível utilização deste vetor em futuros ensaios clínicos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta imune celular específica contra HIV induzida através da imunização intravaginal de camundongos com um adenovírus símio recombinante que expressa o gene *gag* do HIV AdC6*gag*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a melhor dose de AdC6*gag* administrado intravaginalmente capaz de induzir resposta imune celular específica contra o antígeno Gag;
- Avaliar a cinética da resposta imune celular específica contra o HIV induzida pelo AdC6*gag* administrado pela via intravaginal;
- Comparar a resposta imune celular induzida pelo AdC6*gag* quando administrado pelas vias intravaginal, intranasal e intramuscular;
- Avaliar a resposta imune induzida pela imunização através da via intranasal seguida de reforço pela via intravaginal;
- Avaliar a duração da resposta imune induzida pelo AdC6*gag* administrado pela via intravaginal;
- Avaliar a população de células T  $\gamma\delta$  presentes no trato genital de camundongos vacinados com AdC6*gag*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), 02 de outubro de 2003 e pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (Protocolo de Pesquisa 250/CEUA e 23080.020837/2003-8/UFSC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

#### 3.2 Modelo animal

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* da linhagem BALB/c, isogênicos, haplótipo H-2k<sup>d</sup>, fêmeas com 6 a 8 semanas de idade. Estes animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Microbiologia e Parasitologia/CCB/UFSC, com água e comida *ad libitum*.

#### 3.3 Vírus

Foi utilizado adenovírus símio do sorotipo 6 que teve a região E1 de seu genoma substituída por uma seqüência códon otimizado que codifica a forma truncada, parcialmente secretada, da proteína Gag p37 (p17 e p24) do HIV subtipo B AdC6gag (PINTO; FITZGERALD; GILES-DAVIS, et al., 2003). Este vírus foi proveniente do Instituto Wistar (Filadélfia, EUA), onde foi produzido em células 293, purificado em gradiente de cloreto de cério e o número de partículas virais determinado por espectrofotometria. Os estoques virais continham aproximadamente  $5 \times 10^{12}$  pv/ml e foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As unidades formadoras de placa

(PFU) foram determinadas a partir da relação 1 PFU = 1000 pv (PINTO; FITZGERALD; GILES-DAVIS, et al., 2003).

### **3.4 Peptídeo**

Peptídeo AMQMLKETI, que contém o epítopo imunodominante da proteína Gag do HIV para o MHC de classe I de camundongos com haplótipo H-2k<sup>d</sup> (DOE; WALKER, 1996), foi sintetizado no Peptide Facility do Instituto Wistar (Filadélfia, EUA), purificado por cromatografia líquida de alta eficiência e sua sequência verificada por espectrofotometria de massa. O peptídeo foi diluído em DMSO (Sigma) a uma concentração de 1 mg/ml e armazenado a -20°C.

### **3.5 Imunização de camundongos**

Grupos de três a cinco camundongos BALB/c foram imunizados utilizando-se três vias diferentes de imunização: intravaginal, intranasal ou intramuscular. Quando os camundongos foram imunizados pela via intravaginal, 5 dias antes do procedimento receberam subcutâneamente 3 mg de acetato de medroxiprogesterona (Depo-Provera, Pharmacia), com a finalidade de normalizar o ciclo estral dos camundongos e possivelmente facilitar a infecção viral neste local. Para a realização das imunizações intravaginal ou intranasal os camundongos foram previamente anestesiados com 3,82 mg de cloridrato de ketamina (Dopalen, Vetbrands) e 0,66 mg de cloridrato de 2 – (2,6 – xilidino) 5,6 – dihidro 4 H 1,3 tiazina (Rompum, Bayer) administrado pela via intraperitoneal. Após a anestesia os camundongos receberam 10 µl

contendo diferentes concentrações de AdC6gag ( $10^3$ ,  $10^4$  ou  $10^5$  PFU) diluído em meio Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Cultilab) com 44 mM  $\text{NaHCO}_3$  (Merck) instilados através de uma pipeta automática na mucosa nasal ou vaginal. A imunização intramuscular, por sua vez, foi feita injetando-se 100  $\mu\text{l}$  contendo as mesmas concentrações de AdC6gag citadas acima, no músculo quadríceps da coxa dos camundongos.

Para realização da estratégia de dose reforço um grupo de camundongos, foi imunizado com  $10^5$  PFU de AdC6gag intranasalmente e 14 dias após recebeu um reforço com a mesma dose de vírus pela via intravaginal. Ao mesmo tempo, dois grupos controles foram inoculados seguindo-se o mesmo protocolo de imunização acima descrito, porém para cada grupo controle uma das doses de AdC6gag foi substituída por PBS. Em um grupo substituiu-se a dose administrada pela via intranasal e no outro se substituiu a dose administrada pela via intravaginal.

### **3.6 Coleta das amostras e isolamento das células**

Células presentes no sangue periférico, baço, linfonodos ilíacos, trato genital e NALT, foram obtidos em diferentes tempos após a imunização. O sangue periférico foi coletado dos camundongos previamente anestesiados através de punção do plexo retro-orbital, com o auxílio de uma pipeta Pasteur em presença de uma solução anticoagulante de EDTA 40 mg/ml (Reagen). O isolamento das células foi realizado após a lise das hemácias utilizando-se Solução de Lise por 5 min à temperatura ambiente, na proporção de 1ml de sangue para 14 ml de Solução de Lise. Em seguida, as células foram centrifugadas a 300 x g por 5 min, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado suspenso em 5 ml de tampão fosfato salino (PBS), sendo este procedimento repetido uma vez.



O baço, linfonodos ilíacos, trato genital (vagina, cérvix, trompas, útero) e NALT foram removidos cirurgicamente após o sacrifício dos camundongos por deslocamento cervical e mantidos em DMEM. O isolamento do NALT foi realizado como previamente descrito (HERITAGE; UNDERDOWN; ARSENAULT, et al., 1997; ASANUMA; THOMPSON; IWASAKI, et al., 1997). Resumidamente, os animais foram decapitados após a exsanguinação e realizou-se a remoção da pele da cabeça, da língua e da mandíbula. Em seguida, a região contendo os dentes incisivos e nostrilas foi removida, sendo realizada nova incisão na região dos olhos. O fragmento restante foi acomodado dorsalmente em placa de petri e o palato removido, revelando o NALT bilateralmente, envolto em tecido colagenoso. A estrutura foi removida com pinças de microcirurgia.

As células provenientes do NALT e dos linfonodos ilíacos foram purificados após maceração das estruturas com a utilização de um pistilo e duas subseqüentes lavagens das células com 5 ml de meio DMEM, centrifugando a 300 x g por 5 min. As células do baço foram obtidas com a maceração deste órgão entre lâminas vidro e posterior decantação da suspensão celular por 5 min à temperatura ambiente. Os esplenócitos foram lavados por duas vezes utilizando-se 10 ml de meio DMEM e centrifugando a 300 x g por 5 min.

Após a sua remoção dos camundongos, o trato genital feminino foi cortado em pedaços de aproximadamente 0,5 cm e o tecido dissociado enzimaticamente com uma solução de meio RPMI 1640 (Cultilab completo), acrescido de 5% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab) e 1% de PSA (100 U/ml de Penicilina, 100 µg/ml de Streptomicina e 0,25 µg/ml de Anfotericina B) (Sigma), contendo 1,37 mg/ml de Colagenase tipo I (Gibco), em um volume final de 2 ml (GHERARDI, PEREZ-JIMENEZ; NAJERA, et al. 2003; JIANG; PATRICK; MOSS, 2005). Esta dissociação foi feita a 37° C, em um recipiente apropriado com esferas de vidro, durante 20 min sob agitação

de 125 rpm. O procedimento foi repetido por três vezes, recolhendo-se o sobrenadante que continha as células ao final de cada ciclo. A dissociação foi feita individualmente para cada trato genital e ao final do procedimento as células foram reunidas em tubo de 50 ml e centrifugadas a 300 x g por 5 min. As células do trato genital foram então suspensas em 8 ml de Percoll 40% e esta suspensão celular foi transferida lentamente com auxílio de uma pipeta Pasteur para dois tubos de 15 ml que continham 2 ml de Percoll 75%. Estes tubos foram então centrifugados a 600 x g durante 20 min a 20°C. A camada da interface entre o Percoll 75% e 40%, onde se encontravam as células mononucleares, foi recolhida e lavada por três vezes com meio RPMI suplementado com 5% de SBF e 1% de PSA.

Ao final de todos os procedimentos, os esplenócitos foram suspensos em 5 ml de DMEM suplementado com 2% de SBF e  $10^{-5}$  M de 2-mercaptoetanol (Gibco) enquanto que as células isoladas do sangue periférico, linfonodos ilíacos, NALT e trato genital foram suspensas em 250  $\mu$ l de DMEM suplementado com 2% de SBF e  $10^{-5}$  M de 2-mercaptoetanol. As células viáveis foram contadas com corante vital azul de Tripán (Vetec) a 2% em câmara de Neubauer.

### **3.7 Estimulação das células e marcação intracelular de IFN- $\gamma$**

As células purificadas como descrito no item anterior foram colocadas em placas de 96 cavidades com fundo em U na concentração de  $10^6$  células por cavidade. Entretanto quando a quantidade de células obtidas não era suficiente, colocou-se uma concentração inferior que variou entre  $10^4$  e  $10^5$  células por cavidade. As células foram estimuladas com 1  $\mu$ g de peptídeo AMQMLKETI e foi utilizado como controle negativo células sem estimulação mantidas nas mesmas condições. Como controle positivo foram utilizados esplenócitos estimulados com 4 ng

de Formol Meristato Acetato (PMA) (Sigma). As estimulações ocorreram na presença de 2 µg de Brefeldina A (GolgiPlug, BD Bioscience Pharmingen), que é um bloqueador do transporte celular, durante 5 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após esta incubação, as células foram centrifugadas a 250 x g por 5 min a 4°C e então marcadas com 0,25 µg de anticorpo anti-CD8 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Bioscience Pharmingen) durante 30 min. Em seguida, foram lavadas por três vezes com 200 µl PBS, centrifugando a 250 x g por 5 min a 4°C, sendo permeabilizadas e fixadas com 100 µl de Cytotfix/Cytoperm (BD Bioscience Pharmingen) durante 20 min. As células foram então lavadas com 200 µl de solução de Perm/Wash (BD Bioscience Pharmingen) e marcadas com 0,1 µg do anticorpo anti-IFN-γ conjugado com ficoeritrina (PE) (BD Bioscience Pharmingen) por 45 min. Após a marcação as células foram lavadas novamente com 200 µl de Perm/Wash e em seguida lavadas com 200 µl de PBS, centrifugando a 250 x g por 5 min a 4°C. As células foram então suspendidas em 500 µl de PBS.

A análise das amostras foi realizada no Laboratório de Marcadores Celulares do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), em citômetro de fluxo, modelo FACSCalibur (Becton Dickinson), totalizando aquisição de até 30.000 eventos, utilizando-se o programa CellQuest (BD Bioscience). Alternativamente, os eventos adquiridos foram analisados utilizando-se software winMDI versão 2.8. O resultado foi expresso como a frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> Gag específicos capazes de produzir IFN-γ mediante estimulação com o peptídeo AMQMLKETI (células duplo-positivas), em relação ao número total de linfócitos T CD8<sup>+</sup> subtraindo-se as frequências encontradas nos controles negativos (PINTO; FITZGERALD; GILES-DAVIS, et al., 2003). Cada experimento foi repetido até três vezes independentemente.

### 3.8 Marcação da população de células T $\gamma\delta$

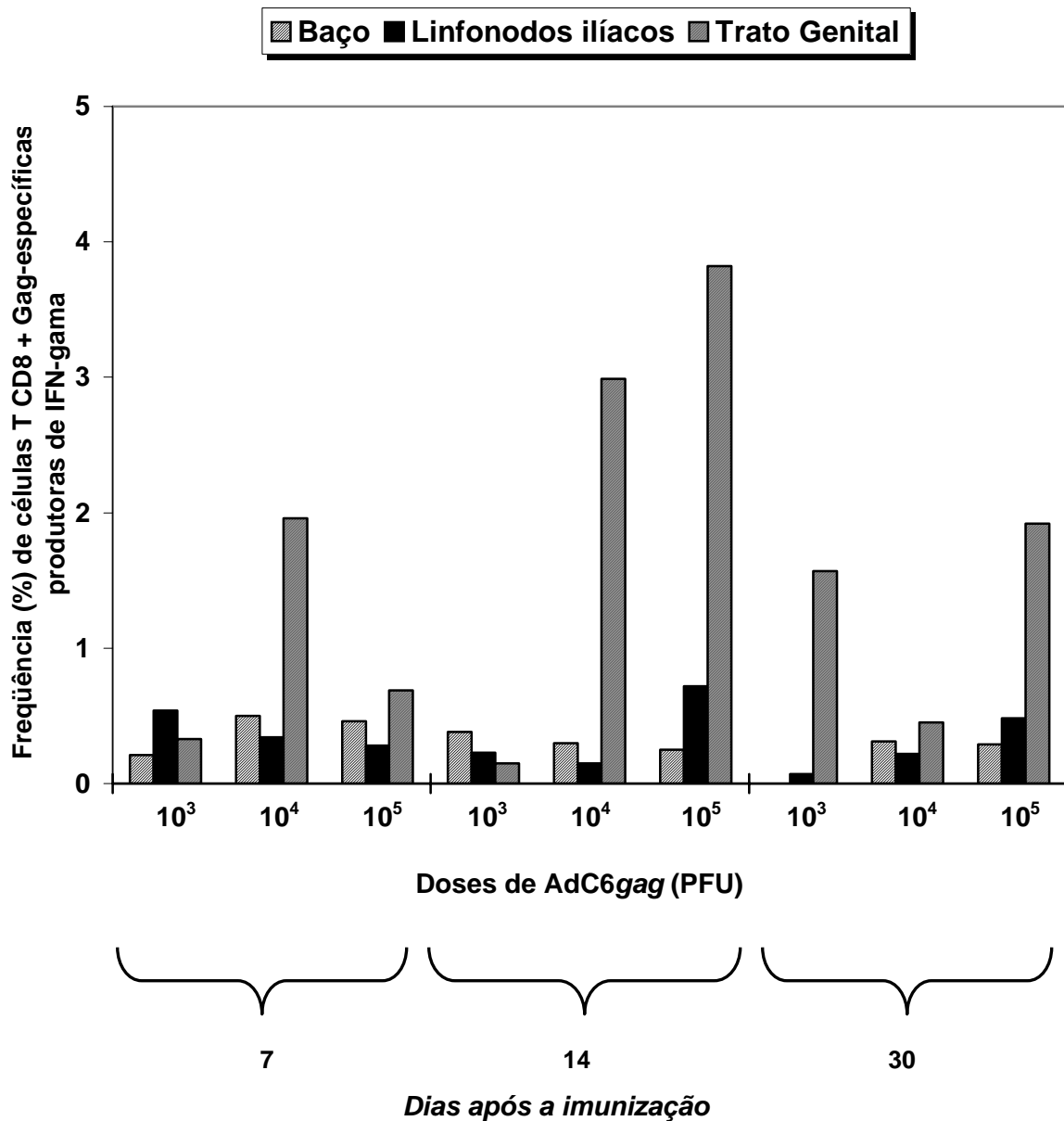
As células purificadas do trato genital, conforme descrito no item 4.6, foram colocadas em placas de 96 cavidades com fundo em U na concentração de  $10^4$  a  $10^5$  células por cavidade e então fixadas com 100  $\mu$ l de paraformaldeído 4% por 20 min a 4° C. Após duas consecutivas lavagens com 200  $\mu$ l de PBS as células foram marcadas simultaneamente com 0,125  $\mu$ g do anticorpo anti-CD3 conjugado com FITC (Pharmlingen) e 0,125  $\mu$ g do anticorpo anti-TCR $\gamma\delta$  conjugado com PE (Caltag Laboratories), durante 1 h a 4°C. As células foram então lavadas duas vezes com 200  $\mu$ l de PBS, centrifugando a 250 x g por 5 min a 4°C. Em seguida, foram suspensas em 500  $\mu$ l de PBS para aquisição no citômetro de fluxo como descrito no item anterior. A análise foi feita primeiramente com a separação das células T de todas as outras células da amostra, através de um *gate* da população CD3 positiva. Foi verificado em seguida, o quanto desta população isolada possuía o TCR com cadeias  $\gamma$  e  $\delta$ , desta forma foi quantificada a frequência de células duplo-positivas, ou seja, positivas para CD3 e TCR $\gamma\delta$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Dose-resposta e cinética da resposta imune celular

Inicialmente determinaram-se parâmetros como a dose-resposta e cinética da resposta imune celular específica induzida pelo AdC6gag. Camundongos fêmeas BALB/c foram imunizados com  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  PFU deste vetor pela via intravaginal 5 dias após da administração subcutânea de acetato de medroxiprogesterona e a resposta imune celular foi avaliada através da marcação intracelular de IFN- $\gamma$  produzido pelas células T CD8<sup>+</sup> estimuladas por 5 h com o peptídeo contendo o epítipo imunodominante de Gag. Detectou-se resposta imune celular Gag-específica no baço, linfonodos ilíacos e trato genital, em diferentes tempos analisados, como demonstrado na Figura 1. A frequência das células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  após a estimulação com PMA variou de 6 a 18%.

No baço a maior resposta de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas foi detectada 7 dias após a imunização dos camundongos com as doses  $10^4$  e  $10^5$  PFU de AdC6gag, onde encontrou-se 0,5% e 0,46% de células produtoras de IFN- $\gamma$ , respectivamente. Após 14 dias da imunização esta resposta diminuiu, permanecendo praticamente a mesma após 30 dias. As frequências de células estimuladas com as doses de  $10^4$  e  $10^5$  PFU de AdC6gag neste órgão foram muito semelhantes em todos os tempos avaliados. No entanto, o pico da resposta imune celular induzida com  $10^3$  PFU de AdC6gag no baço foi detectado 14 dias após a imunização, onde foram encontradas 0,38% de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas e esta resposta então não pôde ser mais detectada 30 dias após a imunização.

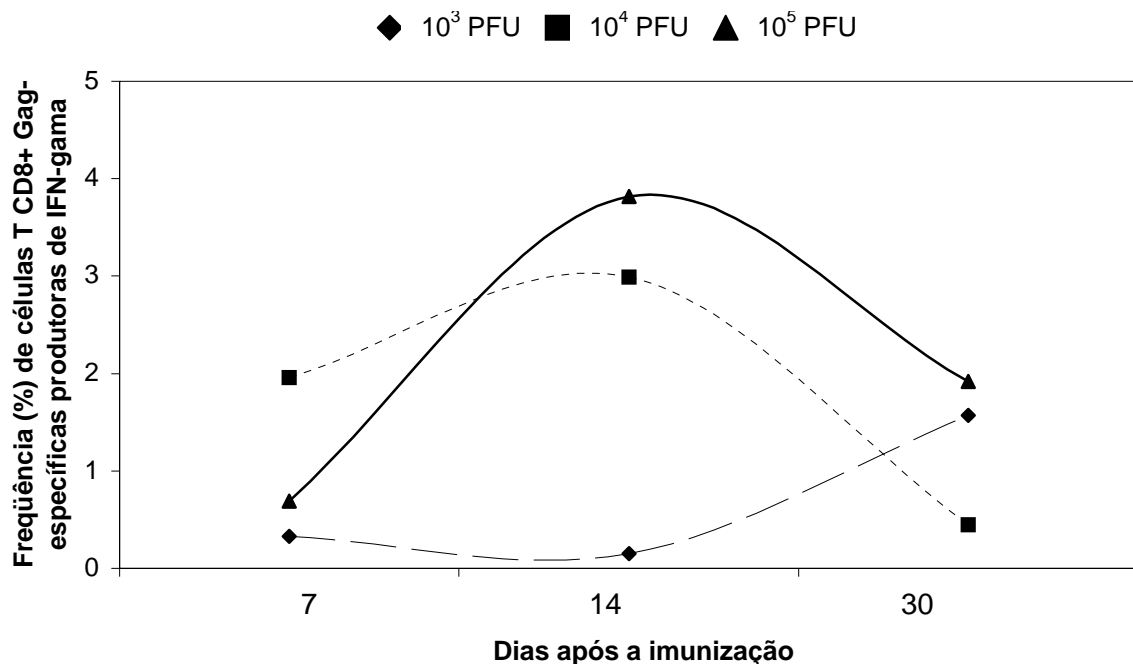


**Figura 1: Avaliação da resposta imune celular 7, 14 ou 30 dias após imunização intravaginal com diferentes doses de AdC6gag.** Camundongos BALB/c fêmeas receberam subcutaneamente 3 mg de acetato de medroxiprogesterona e 5 dias após foram imunizados intravaginalmente com as doses indicadas de AdC6gag. Células do baço, linfonodos ilíacos e trato genital foram coletadas 7, 14 ou 30 dias após a imunização e cultivadas *in vitro* com o peptídeo AMQMLKETI e Brefeldina A por 5 h. As células foram então marcadas com anticorpos anti-CD8-FITC e anti-IFN- $\gamma$ -PE e analisadas por citometria de fluxo. Da frequência de células duplo-positivas, ou seja, células T CD8<sup>+</sup> que produzem IFN- $\gamma$  em relação a toda população células T CD8<sup>+</sup>, subtraiu-se a frequência células T CD8<sup>+</sup> que produzem IFN- $\gamma$  espontaneamente. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

O pico da resposta de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  nos linfonodos ilíacos foi alcançado após sete dias da imunização com as doses testadas 10<sup>3</sup> (0,54%) e 10<sup>4</sup> (0,34%) PFU de AdC6gag, sendo que esta resposta decresce 14 dias após da imunização e 30 dias após sofre um leve aumento. No entanto, imunizando-se com a dose de 10<sup>5</sup> PFU de AdC6gag, a melhor resposta imune nos linfonodos ilíacos foi detectada após 14 dias da imunização, encontrando-se 0,72% de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas e 30 dias após a imunização esta resposta sofre um decréscimo. No trato genital feminino dos camundongos imunizados com AdC6gag o tempo necessário para a indução da melhor resposta de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas foi após 14 dias da imunização intravaginal com as doses de 10<sup>4</sup> (2,99%) e 10<sup>5</sup> (3,82%) PFU de AdC6gag, porém esta resposta diminui 30 dias após a imunização. As doses 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> PFU de AdC6gag induziram uma cinética da resposta imune celular específica muito semelhante neste órgão. Em contraste, vacinando os camundongos com a dose de 10<sup>3</sup> PFU de AdC6gag a melhor resposta de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  no trato genital foi encontrada somente após 30 dias da imunização. A cinética da resposta imune no trato vaginal é mostrada na Figura 2.

Em resumo, a avaliação da dose-resposta induzida pelo AdC6gag administrado intravaginalmente demonstrou que a utilização das doses de 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> PFU deste vetor induz frequências de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas similares no baço, que foram as maiores detectadas neste órgão. Contudo, utilizando-se a dose de 10<sup>5</sup> PFU de AdC6gag induziu-se melhor resposta imune celular específica nos linfonodos ilíacos e trato genital, uma vez que esta dose foi capaz de estimular entre todas as doses analisadas as maiores frequências de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas. Entretanto, avaliando-se a cinética da resposta imune celular específica induzida pelo AdC6gag, pode-se notar que o comportamento da resposta em cada órgão varia conforme a dose

utilizada. No baço, 7 dias após a imunização com AdC6gag, encontra-se o pico da resposta imune celular Gag-específica. Nos linfonodos ilíacos e no trato genital 14 dias após a imunização foi o melhor tempo para indução de resposta imune celular com AdC6gag, uma vez que analisando a resposta neste tempo foram detectadas as maiores frequências de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas.



**Figura 2: Cinética da resposta de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas no trato genital.** Camundongos BALB/c receberam subcutaneamente 3 mg de progesterona e 5 dias após foram imunizados intravaginalmente com as doses indicadas de AdC6gag, sendo sacrificados 7, 14 ou 30 dias após a imunização. Células mononucleares presentes no trato genital foram coletadas, purificadas através de gradientes de Percoll e avaliadas quanto à presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup> que produzem IFN- $\gamma$ , conforme descrito na legenda da Figura 1. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

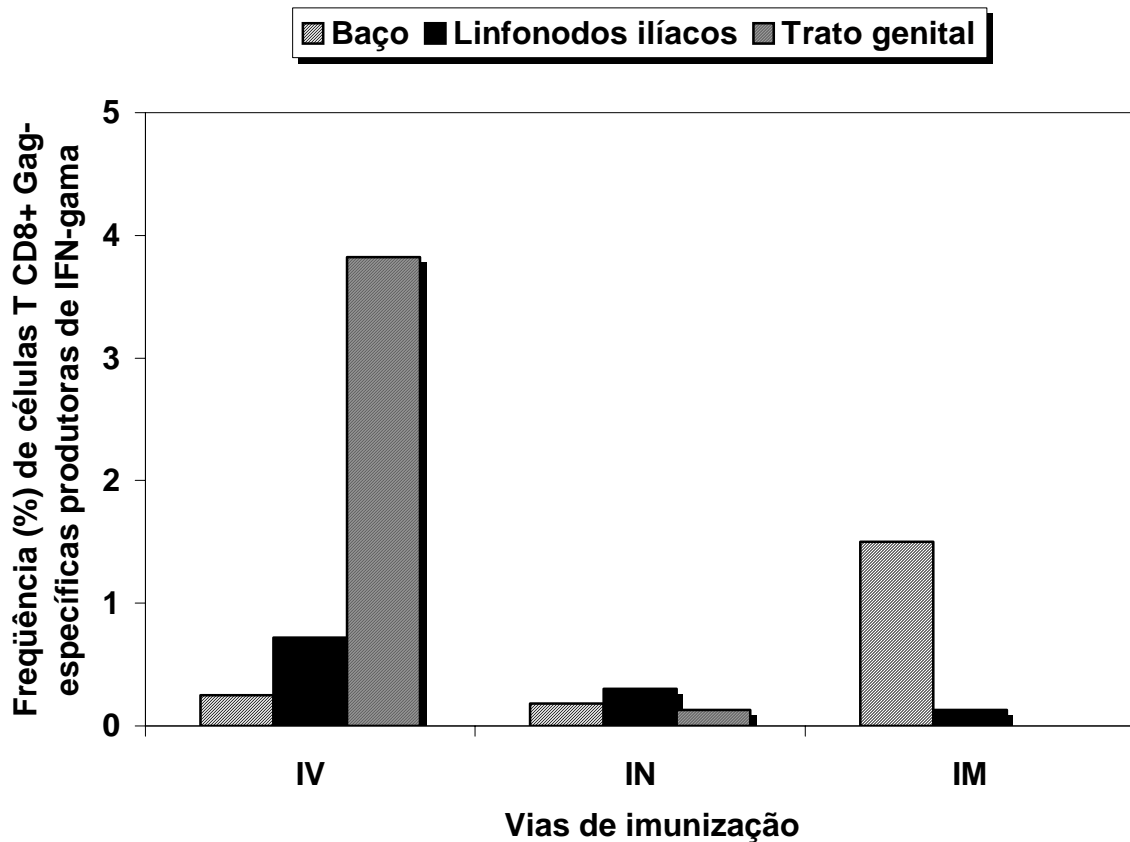
#### 4.2 Comparação de diferentes vias de imunização

A fim de investigar se a via de imunização intravaginal é realmente a melhor via para indução de resposta imune celular específica no trato genital feminino dos camundongos, foi feito



uma comparação da resposta imune estimulada pela administração de *AdC6gag* por diferentes vias de imunização. Camundongos BALB/c foram imunizados com  $10^5$  PFU de *AdC6gag* pelas vias intravaginal, intranasal ou intramuscular e sacrificados 14 dias após as imunizações para a avaliação da frequência de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas no baço, linfonodos ilíacos e trato genital. A dose de  $10^5$  PFU de *AdC6gag* e o tempo de 14 dias foram escolhidos baseando-se nos resultados obtidos anteriormente (Figura 1), onde demonstrou-se que estes foram os melhores tempo e dose para se obter resposta imune no trato genital. Foi observado que a via de imunização intravaginal foi capaz de induzir melhor resposta nos linfonodos ilíacos e trato genital, quando comparado com as vias de imunização intramuscular e intranasal (Figura 3).

Imunização intravaginal estimulou 0,72% e 3,82% de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  nos linfonodos ilíacos e trato genital, respectivamente. A imunização intranasal estimulou frequências de T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas inferiores que a imunização intravaginal, 0.3% nos linfonodos ilíacos e 0.13% no trato genital. Contudo, a imunização intramuscular com *AdC6gag* induziu frequências ainda menores que a via intranasal nos linfonodos ilíacos 0.13%.



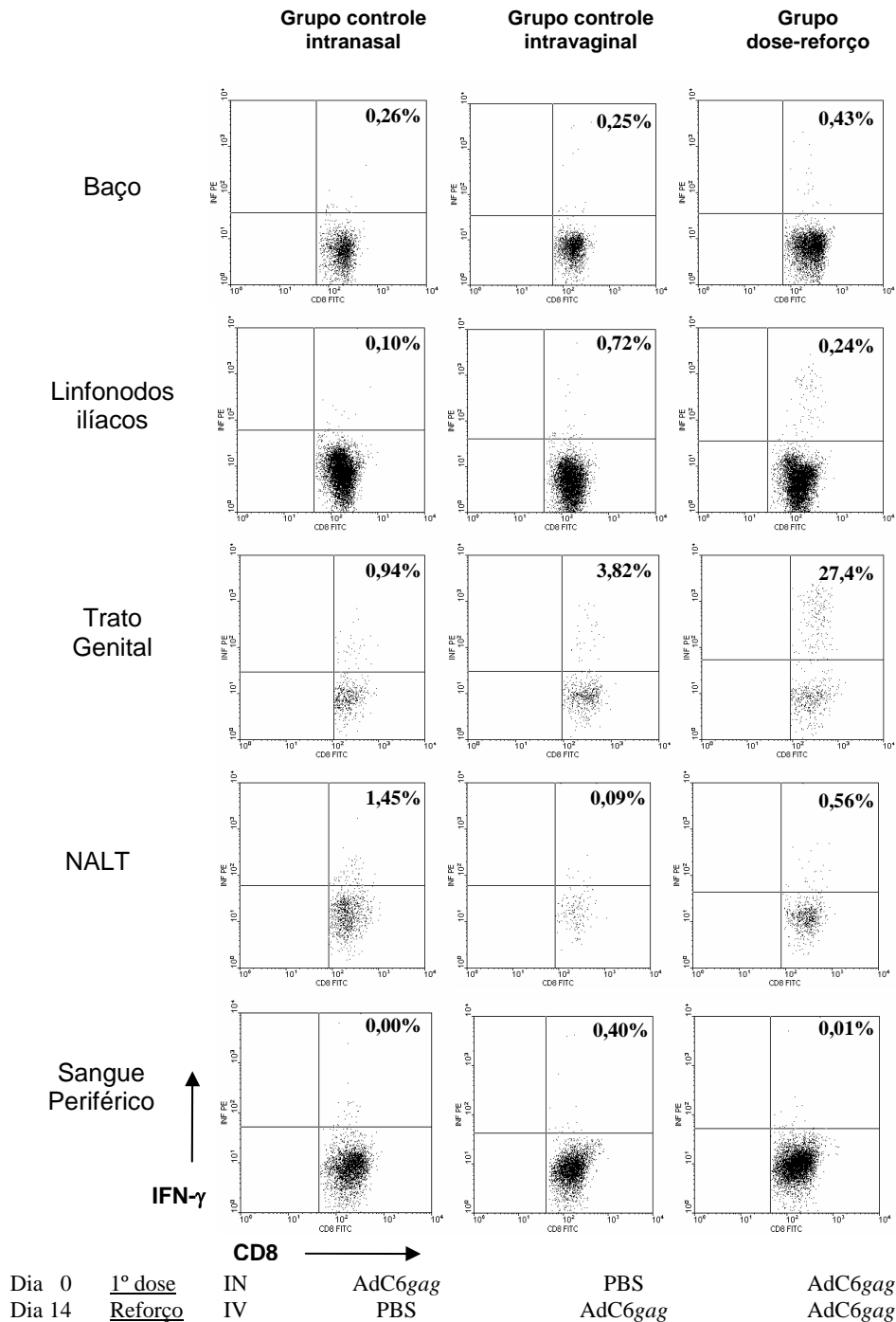
**Figura 3: Comparação das vias de imunização intravaginal (IV), intranasal (IN) e intramuscular (IM).** Camundongos BALB/c foram imunizados pelas vias IV (5 dias após receberem 3 mg de progesterona), IN ou IM com  $10^5$  PFU de AdC6gag e foram sacrificados 14 dias após a imunização. Células do baço, linfonodos ilíacos e trato genital foram coletadas e avaliadas *in vitro* quanto à presença de células T CD8<sup>+</sup> que produzem IFN- $\gamma$ , conforme descrito na legenda da Figura 1. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

Não foi detectada nenhuma resposta no trato genital utilizando-se a via intramuscular com AdC6gag neste tempo e dose estudados, como demonstrado na Figura 3. Porém, a via de imunização intramuscular foi capaz de induzir melhor resposta imune no baço comparado com a via intravaginal e intranasal. Entre a via de imunização intramuscular e intranasal, a última mostrou ser capaz de induzir maior resposta imune celular específica para Gag no trato genital e nos linfonodos ilíacos.

### 4.3 Estratégia de dose-reforço

A fim de aumentar a resposta de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas no trato genital, foi utilizada uma estratégia de dose reforço com duas vias de mucosa distintas, uma intravaginal e outra intranasal, uma vez que ambas demonstraram ser capazes de induzir resposta imune específica neste órgão (Figura 3). Um grupo de camundongos BALB/c, doravante chamado de grupo dose-reforço, foi imunizado com 10<sup>5</sup> PFU de AdC6gag intranasalmente e 14 dias após recebeu um reforço com a mesma dose de vírus pela via intravaginal. Ao mesmo tempo, dois grupos controles foram inoculados seguindo-se o mesmo protocolo de imunização utilizado para o grupo dose-reforço, porém para cada grupo controle uma das doses de AdC6gag foi substituída por PBS. Em um grupo substituiu-se a dose administrada pela via intranasal e no outro se substituiu a dose administrada pela via intravaginal. Todos os grupos receberam subcutaneamente 3 mg de progesterona 5 dias antes das inoculações intravaginais e foram sacrificados 30 dias após a primeira inoculação. A resposta imune celular específica para Gag foi avaliada no baço, linfonodos ilíacos, trato genital, NALT e sangue periférico.

Observou-se que o grupo que recebeu uma dose mais um reforço de AdC6gag em duas vias de mucosa distintas teve a resposta imune celular específica no trato genital aumentada consideravelmente comparada com os grupos controles que receberam somente AdC6gag pela via intravaginal ou intranasal (Figura 4). Foram obtidas 27.4%, 3.82% e 0.94% de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , no grupo dose-reforço, no grupo controle vacinado intravaginalmente e no grupo vacinado somente intranasalmente, respectivamente.



**Figura 4: Estratégia de dose-reforço.** Um grupo de camundongos BALB/c (dose-reforço) foi imunizado com  $10^5$  PFU de AdC6gag pela via intranasal (IN) e 14 dias após recebeu um reforço com a mesma dose de vírus pela via intravaginal (IV). Ao mesmo tempo, dois grupos controles foram imunizados com o mesmo protocolo utilizado para o grupo dose-reforço, porém para cada grupo uma das doses de AdC6gag foi substituída por PBS, conforme indicado na figura. Todos os grupos receberam subcutaneamente 3 mg de progesterona 5 dias antes das inoculações intravaginais e foram sacrificados 30 dias após a primeira inoculação. Células do baço, linfonodos ilíacos, trato genital, NALT e sangue periférico foram coletadas e analisadas quanto à presença de células T CD8<sup>+</sup> que produzem IFN- $\gamma$ , conforme descrito na legenda da Figura 1. A frequência de células duplo-positivas para cada órgão analisado está indicada no quadrante superior direito de cada gráfico. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

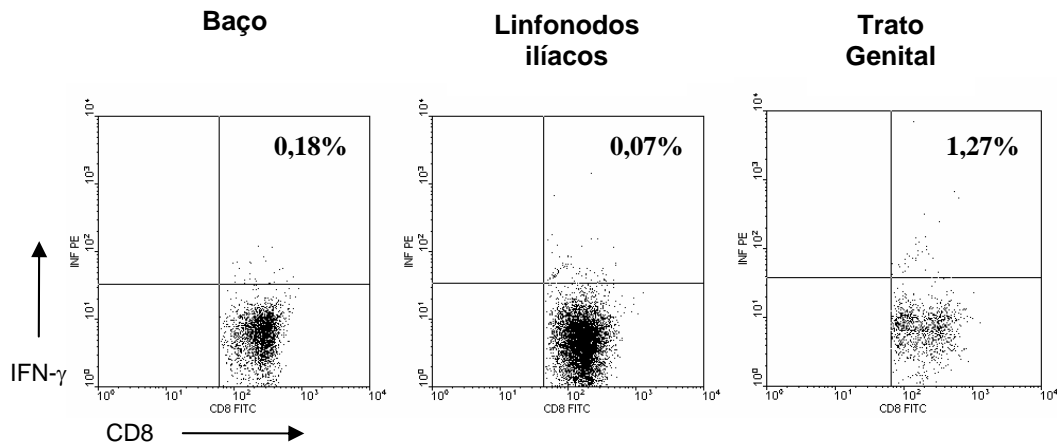
As frequências de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas obtidas no trato genital administrando-se AdC6gag pela via intranasal foram maiores que as encontradas no experimento anterior, provavelmente devido à diferença no tempo em que a resposta foi analisada. A resposta imune celular Gag-específica encontrada no baço também aumentou no grupo dose-reforço em relação aos controles, enquanto que a frequência encontrada nos linfonodos ilíacos diminuiu em relação ao controle imunizado pela via intravaginal. A imunização intranasal foi capaz de induzir 1,45% de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas no NALT, que diminuiu no grupo que recebeu duas doses. Além disso, resposta neste órgão praticamente não foi detectada no grupo que recebeu somente imunização intravaginal. Entretanto, o grupo controle imunizado intravaginalmente com AdC6gag foi capaz de induzir resposta imune celular específica no sangue periférico, que não foi detectada no grupo controle intranasal e esta resposta diminuiu consideravelmente no grupo imunizado com uma dose e um reforço.

#### **4.4 Resposta imune de memória**

Baseando-se no fato que a utilização da dose de 10<sup>3</sup> PFU de AdC6gag pela via intravaginal induziu uma cinética da resposta de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas no trato genital distinta das outras doses, que aumentou progressivamente até a avaliação em 30 dias após a imunização (Figura 2), foi avaliado se esta resposta é duradoura. Camundongos receberam acetato de medroxiprogesterona e após 5 dias foram imunizados com 10<sup>3</sup> PFU de AdC6gag pela via intravaginal e avaliou-se a presença de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas 90 dias após a imunização no baço, linfonodos ilíacos e trato genital. Observou-se que a frequência de células

CD8<sup>+</sup> que produzem IFN- $\gamma$  volta a ser detectada no baço, pois não havia sido detectada 30 dias após a imunização com esta mesma dose Figura 5.

A resposta presente nos linfonodos ilíacos é extremamente baixa e a resposta imune celular específica encontrada no trato genital permanece quase a mesma que a detectada após 30 dias da imunização. Deste modo, conclui-se que AdC6gag utilizado pela via intravaginal é capaz de induzir uma resposta imune de longa duração, quando utilizada a dose 10<sup>3</sup> PFU de AdC6gag, presente principalmente no trato genital, mas detectável também em pequena quantidade no baço.

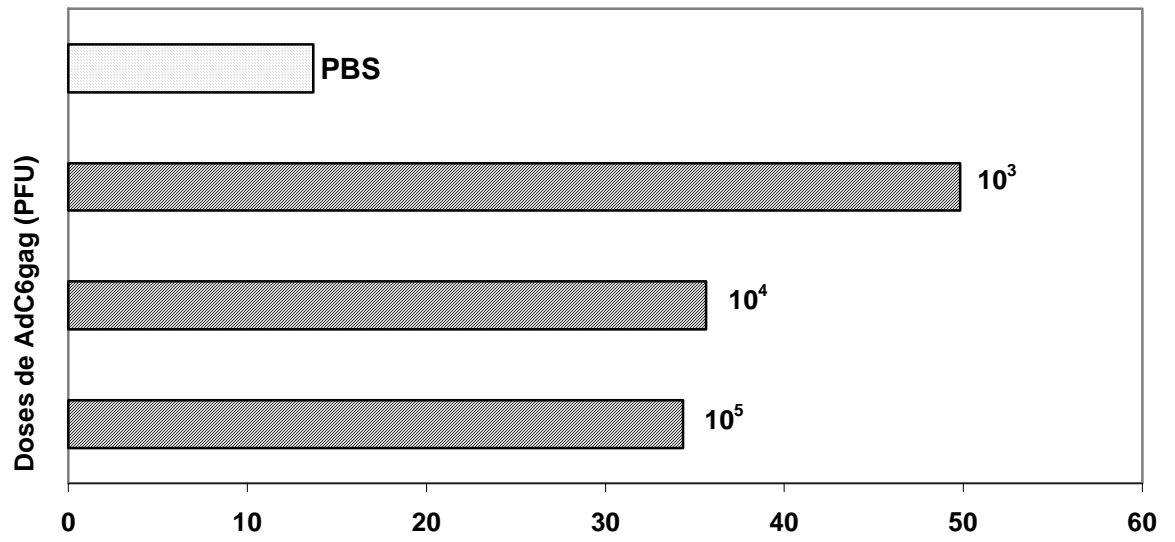


**Figura 5: Resposta de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas presentes na mucosa vaginal 90 dias após a imunização.** Camundongos fêmeas BALB/c receberam subcutâneamente 3 progesterona e após 5 dias foram imunizados intravaginalmente com 10<sup>3</sup> PFU de AdC6gag. 90 dias após a imunização células do baço, linfonodos ilíacos e trato genital foram coletadas e avaliadas quanto à presença de células T CD8<sup>+</sup> que produzem IFN- $\gamma$ , conforme descrito na legenda da figura 1. A freqüência de células duplo-positivas para cada órgão analisado esta indicada no quadrante superior direito de cada gráfico. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

#### 4.5 Células T $\gamma\delta$

As células gama delta tem um papel essencial na resposta imune inata e estão presentes geralmente em grandes quantidades na superfície de mucosas. A fim de avaliar a presença destas células no trato genital feminino dos camundongos vacinados com AdC6gag e o provável

envolvimento destas células na resposta imune induzida por este vetor, foi feito um experimento de marcação com anticorpos anti-CD3, a fim de marcar toda a população de células T, e anti-TCR $\gamma\delta$ , determinando-se a frequência das células possuem o receptor  $\gamma\delta$  nesta população. Estas marcações foram feitas com as células presentes no trato genital de camundongos vacinados com diferentes doses do AdC6gag 14 dias após a imunização. Como demonstrado na Figura 6, todos os grupos vacinados com AdC6gag, independente da dose administrada, possuem a população de células T  $\gamma\delta$  aumentada no trato genital em relação ao grupo de animais não vacinados. O grupo de camundongos que recebeu a dose de  $10^3$  PFU de AdC6gag apresentou maiores frequências de células T  $\gamma\delta$  que os grupos de camundongos imunizados com  $10^4$  e  $10^5$  PFU de AdC6gag (Figura 6). As frequências de células CD3-positivas e  $\gamma\delta$ -positivas foram de 49,83%, 35,64% e 34,33% no trato genital dos camundongos vacinados respectivamente com  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  PFU de AdC6gag, enquanto a frequência desta mesma população celular no grupo de camundongos que recebeu PBS foi de 13,7%.



**Figura 6: População de células T  $\gamma\delta$  no trato genital feminino.** Camundongos fêmeas BALB/c receberam subcutaneamente 3 mg de progesterona e 5 dias após foram inoculados intravaginalmente com as doses indicadas de AdC6gag ou PBS. 14 dias após a imunização células do trato genital foram coletadas, purificadas através de gradiente de Percoll e marcadas com anticorpos anti-CD3-FITC e anti-TCR $\gamma\delta$ -PE. A frequência de células duplo-positiva, ou seja, células que possuem os marcadores CD3 e TCR $\gamma\delta$ , estão demonstradas no gráfico. Estes resultados são representativos de dois experimentos independentes.



## 5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos o número de mulheres infectadas pelo HIV vem crescendo rapidamente de forma preocupante, uma vez que em 1998 as mulheres constituíam 41% dos indivíduos soropositivos em todo o mundo e esta percentagem aumentou para 50% em 2004 (ANNAN, 2005). As estratégias de prevenção existentes não são suficientes para conter o aumento no número de novos casos de HIV entre as mulheres e o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra este vírus parece ser a melhor solução para o controle das novas infecções em longo prazo. Assim sendo, a busca da indução de resposta imune específica protetora no trato genital feminino através de vacina contra HIV ganhou muita importância na conjuntura da pandemia atual.

O desenvolvimento de uma vacina contra este vírus tornou-se um desafio sem precedentes, pois nenhuma eficácia foi demonstrada em ensaios clínicos de testes vacinais até o presente momento. Dentre as diferentes abordagens de vacinas estudadas, as baseadas em vetores recombinante têm demonstrado resultados promissores de estimulação de resposta imune específica, especialmente com a utilização de Ad humano recombinante. Porém, este vetor possui reduzida imunogenicidade em presença de imunidade pré-existente que muitos indivíduos apresentam. Na tentativa de superar esta limitação e manter as características positivas dos Ad como vacinas, um novo vetor adenoviral foi desenvolvido a partir de um Ad isolado de chimpanzé do sorotipo 6 AdC6gag. Uma vez que para obtenção de imunidade esterilizante frente ao HIV é necessária a presença de anticorpos neutralizantes contra o vírus e nenhuma estratégia de vacina já testada alcançou títulos suficientes destes anticorpos (VANNIASINKAM; ERTL, 2005), o AdC6gag é estudado com a finalidade de indução de resposta imune celular específica contra a proteína Gag, uma das mais conservadas deste vírus.

Muitas evidências demonstram a importância da resposta imune celular na infecção do HIV. Na história natural da transmissão sexual deste vírus e do SIV, a infecção sistêmica é estabelecida através dos tecidos linfáticos 2-7 dias após o contágio (ZHANG; SCHULER; ZUPANCIC, et al., 1999; SPIRA; MARX; PATTERSON, et al., 1996) e a produção viral chega ao seu máximo neste tempo e então declina, coincidentemente com o aumento da resposta de células T CD8<sup>+</sup> específicas (REIMANN; TENNER-RACZ; RACZ, et al., 1994; KURODA; SCHMITZ; CHARINI, et al., 1999; KOUP; SAFRIT; CAO, et al., 1994; BORROW; LEWICKI; HAHN, et al., 1994). Semelhante a outros agentes virais, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> têm um papel fundamental na contenção da replicação do HIV (MATANO; SHIBATA; SIEMON, et al., 1998). Um recente estudo sugere que estimulação de células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos infectados pelo HIV *long-term non-progressors* leva a produção de  $\alpha$ -defensinas 1, 2 e 3 que podem inibir a replicação do vírus (ZHANG; YU; HE, et al., 2002). Do mesmo modo, em macacos infectados com o SIV que tiveram as células T citotóxicas totalmente eliminadas *in vivo* a replicação viral não é controlada (SCHMITZ; KURODA; SANTRA, et al., 1999; JIN; BAUER; TUTTLETON, et al., 1999).

Em modelo de infecção intravaginal de macacos com SIV, realizado com a finalidade de determinar a relação da resposta células T CD8<sup>+</sup> específicas com a cinética e magnitude da infecção, notou-se uma demora na geração desta resposta, que pode ser responsável pela falha na contenção da infecção pelo vírus (REYNOLDS; RAKASZ; SKINNER, et al., 2005). Foram detectadas maiores respostas imunes celulares nos tecidos cervico-vaginais e no útero destes macacos, que nos linfonodos que drenam o trato genital, porém todas estas respostas se formaram somente vários dias após o pico da produção viral (REYNOLDS; RAKASZ; SKINNER, et al., 2005). No entanto, a detecção de altas frequências de células T CD8<sup>+</sup> SIV-específicas no trato

genital feminino destes macacos é uma evidência que sugere que vacinas capazes de induzir rapidamente estas células na mucosa do trato genital possam controlar a replicação viral no tecido local antes da disseminação sistêmica (BELYAKOV; BERZOFSKY, 2004) ou até mesmo prevenir a infecção pelo vírus (REYNOLDS; RAKASZ; SKINNER, et al., 2005).

Esta evidência corrobora estudos que demonstraram a presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup> HIV-específicos na mucosa cervical de prostitutas que permaneceram soronegativas mesmo após serem expostas ao HIV (KAUL; PLUMMER; KIMANI, et al., 2000). Algumas destas prostitutas resistentes tornaram-se infectadas 6 anos após a confirmação do contato com o vírus sem subsequente soroconversão, mostrando que esta resistência não é absoluta, possivelmente pelo enfraquecimento da imunidade pré-existente de células T CD8<sup>+</sup> HIV específicas. A infecção pelo HIV nestes grupos de indivíduos tem freqüentemente sido associada a mudanças nas respostas de células T CD8<sup>+</sup> a epítomos específicos. Este achado sugere que uma vacina que induza imunidade protetora no trato genital é um objetivo realista, mas provavelmente constantes reforços ou antígenos persistentes serão necessários para uma proteção prolongada (KAUL; ROWLAND-JONES; KIMANI, et al., 2001). Recentemente também foi demonstrado na secreção da mucosa vaginal destas prostitutas resistentes elevado nível da citocina RANTES, sugerindo que esta citocina esteja envolvida no mecanismo de proteção, bloqueando CCR5 ou atraindo as células T para o trato genital (IQBAL; BALL; KIMANI, et al., 2005).

Outros autores também comprovaram a importância da presença das células T CD8<sup>+</sup> específicas em mucosas; um exemplo disto foi um estudo feito com camundongos, onde estes ficaram parcialmente protegidos contra o desafio do vírus da vaccinia expressando antígenos do HIV devido à estimulação destas células na mucosa e não em locais sistêmicos (BELYAKOV; DERBY; AHLERS, et al., 1998; BELYAKOV; AHLERS; BRANDWEIN, et al., 1998). Além disso, muitos outros estudos de vacinas contra o HIV em modelos animais têm demonstrado a

relevância das células T CD8<sup>+</sup> na mucosa do trato genital (SAKAUE; HIROI; NAKAGAWA, et al., 2003; PEACOCK; NORDONE; JACKSON, et al., 2004; KLAVINSKIS; BERGMEIER; GAO, et al., 1996; JIANG; PATRICK; MOSS, et al., 2005; GHERARDI; PEREZ-JIMENEZ; NAJERA, et al., 2004).

A imunização intravaginal foi escolhida para o presente estudo com a finalidade de indução de células T CD8<sup>+</sup> específicas por ser uma via de mucosa e assim sendo, com sua utilização a probabilidade de se alcançar resposta imune no trato genital feminino é maior, baseando-se na particular compartimentalização existente no sistema imune de mucosas. No entanto, uma vacina ideal contra HIV deve ser capaz de induzir resposta imune protetora de mucosas tanto no trato genital feminino como no masculino, porém homens e mulheres respondem de maneiras distintas às vacinas e estudos sugerem que estratégias de imunização díspares sejam necessárias para cada gênero a fim de alcançar resposta imune específica nos respectivos tratos genitais (PEACOCK; NORDONE; JACKSON, et al., 2004).

As vacinas que utilizam a via de imunização intravaginal estimulam as células do sistema imune presente da mucosa do trato genital e alguns estudos demonstraram que atividade das células T citotóxicas presentes neste local sofrem influência hormonal (WHITE; CRASSI; GIVAN, et al., 1997). Foi comprovado que camundongos são suscetíveis à infecção vaginal pelo vírus HSV durante o diestrus e não durante o estrus (GALLICHAN; ROSENTHAL, 1996), isto pode ser devido à espessura e a permeabilidade do epitélio da vagina, como também pela disponibilidade de receptores virais durante este período (PARR; KEPPLER; MCDERMOTT, et al., 1994). Recentemente foi confirmado também que a transmissão vaginal do SIV aumenta 7.7 vezes em macacos que receberam progesterona subcutaneamente (MARX; SPIRA; GETTIE, et al., 1996). Entretanto, um estudo recente evidenciou que o ciclo menstrual e a menopausa não têm efeito aparente na localização ou quantidade das células T CD8<sup>+</sup> em qualquer tecido do trato

genital inferior (PUDNEY; QUAYLE; ANDERSON, 2005). Assim sendo, para evitar um provável impedimento da infecção das células presentes nas vaginas dos camundongos pelo AdC6gag todos receberam progesterona antes das imunizações intravaginais neste estudo, uniformizando desta forma o ciclo estral de todos os grupos de animais.

O presente trabalho demonstrou que a administração do AdC6gag através da via intravaginal em camundongos BALB/c foi capaz de induzir resposta imune celular específica contra o HIV em locais de mucosa, tais como trato genital e linfonodos ilíacos e também em sítios sistêmicos, como baço e sangue periférico (Figuras 1 e 4). Vários estudos demonstraram a indução de respostas imunes específicas em locais sistêmicos ou de mucosa utilizando-se diferentes estratégias de vacinas pela via intravaginal, tais como vetores bacterianos (DI FABIO; MEDAGLINI; RUSH, et al., 1998), vacinas de DNA (WANG; DANG; AGADJANYAN, et al., 1997; HAMAJIMA; HOSHINO; XIN, et al., 2002; BAGARAZZI; BOYER; JAVADIAN, et al., 1999), proteínas virais com adjuvante (KWANT; ROSENTHAL, 2004; BOGERS; BERGMEIER; MA, et al., 2004) e vetores virais (GHERARDI; PEREZ-JIMENEZ; NAJERA, et al., 2004; GARULLI; KAWAOKA; CASTRUCCI, 2004). Alguns desses estudos demonstraram inclusive que a resposta imune induzida com a utilização de via intravaginal trouxe proteção para os camundongos imunizados (VAJDY; GARDNER; NEIDLEMAN, et al., 2001) e também protegeu macacos contra o desafio de vírus patogênico SIV (BOGERS; BERGMEIER; MA, et al., 2004; ABEL; COMPTON; ROURKE, et al., 2003).

As frequências de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  induzidas pelo AdC6gag no local da imunização, ou seja, no trato genital, foram maiores que as frequências encontradas nos linfonodos ilíacos e no baço (Figura 1). Este perfil da resposta imune induzida por este vetor utilizado pela via intravaginal não foi semelhante ao encontrado quando camundongos foram

imunizados pela mesma via com HSV atenuado, onde a resposta de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  medida por ELISPOT foi maior nos linfonodos ilíacos que no trato genital (MILLIGAN; DUDLEY-MCCLAIN; CHU, et al., 2004). Estes resultados sugerem que as características da resposta induzida com a via intravaginal é dependente do imunógeno utilizado. Em modelo de infecção intravaginal de macacos com SIV, citado anteriormente, a resposta imune de células T CD8<sup>+</sup> específicas detectadas pela marcação intracelular de IFN- $\gamma$  é também consideravelmente maior na vagina e na cérvix que nos linfonodos ilíacos (REYNOLDS; RAKASZ; SKINNER, et al., 2005), demonstrando com isso que a resposta imune induzida por AdC6gag é semelhante à infecção natural do SIV/HIV. Recentes evidências indicam que as células apresentadoras de antígenos residentes no sítio efector podem ativar a diferenciação de células T sem a necessidade de migração para os linfonodos (FERNANDEZ; LOZIER; FLAMENT, et al., 1999; CONSTANT; BROGDON; PIGGOTT, et al., 2002), e este pode ser o provável mecanismo envolvido na obtenção de respostas maiores no trato genital que linfonodos ilíacos pelo AdC6gag administrado intravaginalmente, uma vez que este vetor transduz eficientemente células apresentadoras de antígenos profissionais (VARNAVSKI; SCHLIENGER; BERGELSON, et al., 2003).

Foi possível no presente estudo detectar resposta imune de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas nos camundongos vacinados pela via intravaginal com AdC6gag mesmo utilizando-se doses inferiores àquelas geralmente empregadas em estudos com este vetor (PINTO; FITZGERALD; GILES-DAVIS, et al., 2003; PINTO; FITZGERALD; GAO, et al., 2004). A utilização de doses baixas de imunógeno é de grande relevância, visto que com isto fica diminuída a probabilidade de acontecerem reações adversas à vacina. Apesar das frequências encontradas no baço com a imunização intravaginal serem modestas, foram semelhantes com as

encontradas administrando a mesma dose de AdC6gag por outra via de mucosa, a intranasal, como mostrado na Figura 3. Além disso, a imunização com AdC6gag pela via intravaginal foi capaz de induzir melhor resposta imune celular específica no trato genital e linfonodos ilíacos que as via de imunização intranasal e intramuscular testadas com o mesmo vetor (Figura 3). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Milligan et al. (2004), onde foi demonstrado que imunização intravaginal com o HSV atenuado é capaz de induz melhor resposta celular específica no trato genital e linfonodos ilíacos que imunização intranasal. Escolheu-se comparar a resposta imune induzida pela imunização intravaginal com a imunização intramuscular por ser esta uma via sistêmica tradicionalmente utilizada em vacinação, e com a imunização intranasal foi porque esta é uma via de mucosa, que tem sido descrita por vários autores como capaz de induzir uma resposta imune no trato genital feminino (PEACOCK; NORDONE; JACKSON, et al., 2004; KLAVINSKIS; BARNFIELD; GAO, et al., 1999; JIANG; PATRICK; MOSS, et al., 2005; GHERARDI; PEREZ-JIMENEZ; NAJERA, et al., 2004; GALLICHAN; JOHNSON; GRAHAM, et al., 1993; BERNSTEIN, 2000).

A utilização da imunização intramuscular com AdC6gag não resultou em indução de resposta imune no trato genital na dose e tempo avaliados e isto pode ser devido a propriedades migratórias das células que resultou na não detecção de resposta neste órgão. Comparando-se a capacidade de indução de resposta imune celular específica do AdC6gag administrado pela via intranasal e intramuscular, observa-se somente com a via de imunização intranasal a presença de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas no trato genital. A capacidade da via de imunização intranasal em induzir resposta imune no trato genital feminino, um sítio distante do sítio de indução, ainda não está bem esclarecido, contudo acredita-se que esteja envolvida com a estimulação das células presentes no NALT (ROSENTHAL; GALLICHAN, 1997), que possuem uma função central no desenvolvimento de resposta imune induzida por esta via (KIYONO; FUKUYAMA, 2004).

Entretanto, um estudo demonstrou que administração de Ad humano recombinante pela via intranasal pode levar a infecção do sistema nervoso central por este vírus (LEMIALE; KONG; AKYUREK, et al., 2003), portanto maiores investigações são necessárias para elucidar esta possível neurotoxicidade da aplicação intranasal de Ad.

Demonstrou-se no presente trabalho que as frequências de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas presentes no trato genital dos camundongos vacinados com AdC6gag aumentam consideravelmente quando se administra uma dose do vetor pela via intranasal e um reforço pela via intravaginal, demonstrando com isso a alta vinculação entre estas duas vias de imunização na indução de resposta imune neste órgão. Além disso, a utilização de duas doses consecutivas de AdC6gag por vias distintas de mucosa também foi capaz de aumentar a resposta imune celular específica presente no baço em relação aos controles que receberam apenas uma das doses. Porém, o grupo que recebeu uma dose e um reforço de AdC6gag possui frequências de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas no NALT e linfonodos ilíacos diminuídas em relação aos controles, fato este devido a um provável estímulo recebido por estas células que dirige sua migração destes órgãos para a mucosa trato genital destes animais, uma vez que a frequência das células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas presentes neste local está elevada. O mesmo pode ter ocorrido com as células T CD8<sup>+</sup> produtoras INF- $\gamma$  presentes no sangue periférico neste grupo de animais que recebeu duas doses de vetor, uma vez que as frequências destas células estão aumentadas no grupo controle e são praticamente inexistentes neste grupo.

A utilização de protocolos de imunização com mais de uma dose é muito comum, pois muitas vacinas utilizadas atualmente geralmente fazem uso de esquemas de dose reforço, como exemplo a vacina contra a hepatite B, em que são necessárias três doses para se obter títulos de anticorpos protetores. Do mesmo modo, em estudo de vacinas contra HIV, as estratégias de



dose-reforço tem sido amplamente estudadas, principalmente com a utilização de imunógenos heterólogos (REYES-SANDOVAL; FITZGERALD; GRANT, et al., 2004; PINTO; FITZGERALD; GILES-DAVIS, et al., 2003; GHERARDI; PEREZ-JIMENEZ; NAJERA, et al., 2004) e com a utilização uma via de imunização sistêmica com uma via de mucosa (MCCLUSKIE; WEERATNA; PAYETTE, et al., 2002; LONDONO-ARCILA; FREEMAN; KLEANTHOUS, et al., 2002). Pinto et al. (2003) demonstrou que a resposta imune celular específica presente no baço aumenta consideravelmente com a utilização de imunógenos heterólogos por diferentes estratégias de dose-reforço em camundongos BALB/c. Foram utilizados para os diferentes protocolos de imunização com dose e reforço pela via intramuscular, Ad de origem símia AdC6gag e AdC68gag, Ad humano AdHu5gag, vacina de DNA e vírus da vaccinia, todos contendo a inserção do gene *gag* do HIV. Foi demonstrado neste estudo que quando se utiliza uma dose e um reforço com dois Ad heterólogos a resposta imune encontrada é maior que a encontrada quando se utiliza Ad homólogos e também é muito maior que a encontrada quando é administrada uma dose com vacina de DNA e uma dose subsequente com Ad (PINTO; FITZGERALD; GILES-DAVIS, et al., 2003). Contudo, dose-reforço com Ad heterólogos é capaz de induzir resposta imune celular específica equivalente àquela induzida com a utilização de uma dose com Ad seguida de um reforço do vírus da vaccinia (PINTO; FITZGERALD; GILES-DAVIS, et al., 2003). Estes mesmos Ad recombinantes para *gag* em diferentes combinações de dose e reforço foram estudados posteriormente em chimpanzés, com a adição de mais um Ad de origem símia AdC7gag (REYES-SANDOVAL; FITZGERALD; GRANT, et al., 2004). Utilizou-se neste estudo com chimpanzés três doses pela via intramuscular com diferentes combinações destes Ad, detectando-se diferentes frequências de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas no sangue periférico dos animais analisados após o primeiro reforço. Após 7 e 17 semanas da última imunização todos os animais foram sacrificados e a resposta imune celular foi

detectada em maior quantidade no baço, lavado peritoneal e sangue periférico do que nos linfonodos. Reyes-Sandoval et al. (2004) demonstrou com isso resultados promissores de estudos pré-clínicos, uma vez que a imunização com três doses de Ad em chimpanzé estimulou consideráveis frequências de células efectoras e de memória. Pinto et al. (2004) demonstrou ainda que a utilização de estratégias de dose reforço com duas vias de imunização distintas, sendo uma de mucosa e outra sistêmica, onde AdC6gag foi administrado oralmente seguido de um reforço com vírus da vaccinia recombinante para o mesmo gene pela via intraperitoneal em camundongos BALB/c, é capaz de aumentar a frequência de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas presentes no baço.

Entretanto, estratégias de dose-reforço com duas vias de mucosas distintas, com a finalidade de maximizar a indução de resposta imune específica de mucosas, em estudos de vacinas contra HIV têm sido pouco exploradas. Um estudo recente em camundongos, utilizando-se uma estratégia de dose-reforço com duas vias de imunização de mucosa, intrarectal seguida de intranasal, demonstrou aumento na resposta imune celular específica encontrada no NALT, linfonodos mesentéricos e baço (YOSHIZAWA; MIZUOCHI; OGATA, et al., 2003). A estratégia de dose reforço utilizando duas vias distintas de mucosa com a mesma dose de um vetor adenoviral homólogo demonstrou ser muito eficaz neste modelo estudado no presente trabalho. Dentre as estratégias de vacinas contra o HIV atualmente testadas em ensaios clínicos, a utilização de dose-reforço tem ganho lugar de destaque visto os bons resultados de estimulação de resposta imune celular apresentado (MOORTHY; IMOUKHUEDE; KEATING, et al., 2004; MOORE; HILL, 2004; MCCONKEY; REECE; MOORTHY, et al., 2003).

Neste presente trabalho demonstrou-se também que a resposta imune celular específica para Gag é duradoura, ou seja, pode ser detectada mesmo 90 dias após a imunização intravaginal. Este resultado é de grande relevância, visto que a indução de células de memória é essencial para o desenvolvimento de uma vacina eficaz (Figura 5). Este experimento de memória demonstrou

que as células T CD8<sup>+</sup> Gag-específica, além de permanecer no local da imunização, também podem ser detectadas em menor quantidade no baço, porém praticamente não puderam ser encontradas nos linfonodos ilíacos. Foi demonstrado previamente que a utilização da imunização intravaginal é capaz de produzir resposta duradoura, como descrito em um experimento utilizando-se vírus influenza recombinante para o HIV onde a resposta foi analisada 5 meses após a imunização nos linfonodos ilíacos e no baço (GARULLI; KAWAOKA; CASTRUCCI, 2004).

As células T  $\gamma\delta$  podem ter diferentes funções dependendo do estágio da resposta imune em que elas são ativadas e parecem atuar como um elo entre a resposta imune inata e adaptativa, promovendo o desenvolvimento das células T  $\alpha\beta$  (HAYDAY, 2000; BORN; CADY; JONES-CARSON, et al., 1999). Estas células produzem fatores anti-virais e possuem atividade citotóxica (LEHNER; MITCHELL; BERGMEIER, et al., 2000). Além disso, um recente estudo relatou que células expressando o receptor V $\gamma$ 2V $\delta$ 2, onde as regiões variáveis da cadeia  $\gamma$  e  $\delta$  do TCR são codificadas respectivamente pelas regiões gênicas V $\gamma$ 2 e V $\delta$ 2, também têm características de células apresentadoras de antígenos profissionais como as células dendríticas (BRANDES; WILLIMANN; MOSER, 2005). Desta forma, quando ativadas estas células eficientemente processam antígenos e fornecem sinais co-estimulatórios suficientes para induzir as células T  $\alpha\beta$  virgens para proliferação e diferenciação. No presente estudo foi demonstrado que camundongos vacinados com AdC6gag pela via intravaginal possuem a população de células T  $\gamma\delta$  aumentada no trato genital em relação ao grupo não vacinado, sendo provável que estas células estejam envolvidas na resposta de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas desenvolvida neste local, através da contribuição na formação do microambiente necessário para estimulação destas células. A presença das células T  $\gamma\delta$  pode ser responsável pelo comportamento distinto da cinética da resposta celular específica que a dose de 10<sup>3</sup> PFU de AdC6gag apresenta em relação às outras

doses testadas, uma vez que a população de células T  $\gamma\delta$  está consideravelmente maior no trato genital dos camundongos vacinados com esta dose do que aqueles vacinados com  $10^4$  e  $10^5$  PFU.

A função das células T  $\gamma\delta$  na infecção pelo HIV não tem sido muito estudada. Alguns relatos sugerem que o subgrupo V $\delta$ 1 das células T  $\gamma\delta$ , esteja aumentado nos indivíduos infectados pelo HIV (KOZBOR; HYJEK; WIADERKIEWICZ, et al., 1993; HINZ; WESCH; FRIESE, et al., 1994; BOULLIER; COCHET; POCCIA, et al., 1995; AUTRAN; TRIEBEL; KATLAMA, et al., 1989). Um aumento nas células V $\delta$ 1 co-expressando V $\gamma$ 9, V $\gamma$ 2, V $\gamma$ 3 ou V $\gamma$ 4 também foram relatados (HINZ; WESCH; FRIESE, et al., 1994; BOULLIER; COCHET; POCCIA, et al., 1995). Em contraste, o mais comum subgrupo de células T  $\gamma\delta$  do sangue periférico humano V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 está diminuído em indivíduos soropositivos e podem se tornar anérgicos nestes pacientes (POCCIA; BOULLIER; LECOEUR, et al., 1996). Outras vacinas já demonstraram serem capazes de induzirem o aumento da população de células T  $\gamma\delta$ , tais como canarypox e BCG recombinantes para o HIV, onde foi detectada a população de células T  $\gamma\delta$  específicas no sangue periférico de indivíduos imunizados em ensaios clínicos de fase I (WORKU; GORSE; BELSHE, et al., 2001; HOFT; BROWN; ROODMAN, 1998).

As altas frequências de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas encontradas no trato genital dos camundongos vacinados com AdC6gag utilizando-se uma estratégia de dose-reforço com duas vias de mucosa distintas e a duração da resposta induzida no trato genital feminino são evidências indicando que esta vacina pode ser capaz de induzir uma resposta imune protetora, porém mais estudos serão necessários para comprovar esta informação. Contudo, a habilidade de patógenos evadirem da resposta celular no epítipo alvo e não serem mais reconhecidos pelas células T CD8<sup>+</sup> é uma limitação. O modo mais efetivo de superar o escape de microorganismo da resposta de células T é o uso de antígenos para vacinas suficientemente grandes para que cada indivíduo

vacinado possa reconhecer múltiplos epítomos (ROBINSON; AMARA, 2005). Como o transgene inserido no vetor AdC6gag é pequeno, estando presente somente a forma truncada da proteína, para um eventual ensaio clínico será necessário aumentar o tamanho do inserto no AdC6gag, a fim de prevenir o escape viral da resposta imune celular.

Outra limitação desta nova abordagem de vacinas que visam apenas a indução de células T é a complexidade dos métodos utilizados para medir as células T respondedoras e a falha destes métodos em fornecer uma correlação exata com a proteção. Portanto, outros parâmetros devem ser avaliados além da produção de IFN- $\gamma$  por estas células, uma vez que alguns estudos sugerem que proteção exige a produção de uma resposta de células T polifuncionais, ou seja, que tenham capacidade de produzir diferentes citocinas (PANTALEO; KOUP, 2004). Eticamente não se permite que sejam feitos desafios experimentais em seres humanos com HIV e desta forma há necessidade do desenvolvimento de vacinas utilizando-se modelos animais que podem muitas vezes não representar apuradamente a infecção humana, sugerindo com isso que a determinação da eficácia será determinada praticamente por grandes estudos de fase III.

## 6. CONCLUSÕES

- A utilização de diferentes doses de AdC6gag através da via intravaginal de camundongos foi capaz de induzir resposta imune celular específica no baço, linfonodos ilíacos e trato genital em diferentes tempos analisados;
- A dose de  $10^5$  PFU de AdC6gag foi a melhor dose para induzir resposta imune celular específica no trato genital e linfonodos ilíacos 14 dias após a imunização intravaginal;
- As doses de  $10^4$  e  $10^5$  PFU de AdC6gag foram as melhores doses para induzir resposta imune celular específica no baço 7 dias após a imunização intravaginal;
- As frequências de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas encontradas no trato genital dos camundongos vacinados intravaginalmente com AdC6gag são maiores que as encontradas nos linfonodos ilíacos e baço;
- A imunização com AdC6gag pela via intravaginal foi capaz de induzir melhores respostas de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas no trato genital e linfonodos ilíacos que imunizações com o mesmo vetor pelas vias intranasal ou intramuscular;
- Imunização intranasal com AdC6gag foi capaz de induzir resposta imune celular específica no trato genital feminino dos camundongos;
- Imunização intramuscular com AdC6gag não foi capaz de induzir resposta imune celular específica no trato genital feminino dos camundongos;
- A estratégia com uma dose e um reforço de AdC6gag por duas vias de mucosa distintas aumenta a resposta imune detectadas no trato genital feminino e no baço em relação aos controles que receberam somente uma dose do vetor;

- Através de uma estratégia com uma dose e um reforço de AdC6gag por duas vias de mucosa distintas as respostas imunes celulares específicas detectadas nos linfonodos ilíacos, NALT e sangue periférico diminuem em relação aos controles que receberam somente uma dose do vetor;
- A resposta imune celular Gag-específica induzida pelo AdC6gag foi duradoura no trato genital e no baço, podendo ser detectada neste órgão 90 dias após a imunização intravaginal;
- A população de células T  $\gamma\delta$  no trato genital dos camundongos vacinados com AdC6gag intravaginalmente esta aumentada em relação aos camundongos não vacinados;
- A dose de  $10^3$  PFU de AdC6gag administrada intravaginalmente é a dose capaz de induzir as maiores frequências de células T  $\gamma\delta$  no trato genital.

## 7. PERSPECTIVAS

- Realizar um estudo de desafio utilizando-se o vírus da Vaccinia recombinante, expressando o gene *gag* do HIV nos camundongos vacinados pela via intravaginal com AdC6*gag*.
- Realizar diferentes estratégias de dose e reforço a fim de encontrar um modelo capaz de induzir uma melhor resposta.
- Analisar o fenótipo das células CD8<sup>+</sup> Gag-específica de memória induzidas pelo AdC6*gag* no trato genital.
- Avaliar o subgrupo de células T  $\gamma\delta$  presentes no trato genital após imunização com AdC6*gag* e avaliar a participação destas células na indução da resposta imune mediada por células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas.
- Dosar as quimiocinas MIP e RANTES no trato genital feminino dos camundongos imunizados com AdC6*gag* pela via intravaginal.
- Avaliar a produção de outras citocinas, como IL-2, pelas células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas.



## REFERÊNCIAS

ABEL, K.; COMPTON, L.; ROURKE, T.; MONTEFIORI, D.; LU, D.; ROTHAEUSLER, K.; FRITTS, L.; BOST, K.; MILLER, C. J. Simian-human immunodeficiency virus SHIV89.6-induced protection against intravaginal challenge with pathogenic SIVmac239 is independent of the route of immunization and is associated with a combination of cytotoxic T-lymphocyte and alpha interferon responses. **J Virol**, v. 77, n. 5, p. 3099-3118, 2003.

ALFSEN, A.; INIGUEZ, P.; BOUGUYON, E.; BOMSEL, M. Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1. **J Immunol**, v. 166, n. 10, p. 6257-6265, 2001.

AMARA, R. R.; VILLINGER, F.; ALTMAN, J. D.; LYDY, S. L.; O'NEIL, S. P.; STAPRANS, S. I.; MONTEFIORI, D. C.; XU, Y.; HERNDON, J. G.; WYATT, L. S.; CANDIDO, M. A.; KOZYR, N. L.; EARL, P. L.; SMITH, J. M.; MA, H. L.; GRIMM, B. D.; HULSEY, M. L.; MILLER, J.; MCCLURE, H. M.; MCNICHOLL, J. M.; MOSS, B.; ROBINSON, H. L. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. **Science**, v. 292, n. 5514, p. 69-74, 2001.

ANNAN, K. Why women especially need an AIDS vaccine. International AIDS vaccine initiative. Disponível em: <<http://womenandaids.unaids.org/>>. Acesso em: 27 dez 2005

ASANUMA, H.; THOMPSON, A. H.; IWASAKI, T.; SATO, Y.; INABA, Y.; AIZAWA, C.; KURATA, T.; TAMURA, S. Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue. **J Immunol Methods**, v. 202, n. 2, p. 123-131, 1997.

AUTRAN, B.; TRIEBEL, F.; KATLAMA, C.; ROZENBAUM, W.; HERCEND, T.; DEBRE, P. T cell receptor gamma/delta+ lymphocyte subsets during HIV infection. **Clin Exp Immunol**, v. 75, n. 2, p. 206-210, 1989.

BAGARAZZI, M. L.; BOYER, J. D.; JAVADIAN, M. A.; CHATTERGOON, M. A.; SHAH, A. R.; COHEN, A. D.; BENNETT, M. K.; CICCARELLI, R. B.; UGEN, K. E.; WEINER, D. B. Systemic and mucosal immunity is elicited after both intramuscular and intravaginal delivery of human immunodeficiency virus type 1 DNA plasmid vaccines to pregnant chimpanzees. **J Infect Dis**, v. 180, n. 4, p. 1351-1355, 1999.

BELYAKOV, I. M.; AHLERS, J. D.; BRANDWEIN, B. Y.; EARL, P.; KELSALL, B. L.; MOSS, B.; STROBER, W.; BERZOFSKY, J. A. The importance of local mucosal HIV-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes for resistance to mucosal viral transmission in mice and

enhancement of resistance by local administration of IL-12. **J Clin Invest**, v. 102, n. 12, p. 2072-2081, 1998.

BELYAKOV, I. M.; BERZOFSKY, J. A. Immunobiology of mucosal HIV infection and the basis for development of a new generation of mucosal AIDS vaccines. **Immunity**, v. 20, n. 3, p. 247-253, 2004.

BELYAKOV, I. M.; DERBY, M. A.; AHLERS, J. D.; KELSALL, B. L.; EARL, P.; MOSS, B.; STROBER, W.; BERZOFSKY, J. A. Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 4, p. 1709-1714, 1998.

BERMAN, P. W.; GREGORY, T. J.; RIDDLE, L.; NAKAMURA, G. R.; CHAMPE, M. A.; PORTER, J. P.; WURM, F. M.; HERSHBERG, R. D.; COBB, E. K.; EICHBERG, J. W. Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160. **Nature**, v. 345, n. 6276, p. 622-625, 1990.

BERNSTEIN, D. I. Effect of route of vaccination with vaccinia virus expressing HSV-2 glycoprotein D on protection from genital HSV-2 infection. **Vaccine**, v. 18, n. 14, p. 1351-1358, 2000.

BERZOFSKY, J. A.; AHLERS, J. D.; BELYAKOV, I. M. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 3, p. 209-219, 2001.

BETT, A. J.; PREVEC, L.; GRAHAM, F. L. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. **J Virol**, v. 67, n. 10, p. 5911-5921, 1993.

BHOOPAT, L.; EIANGLING, L.; RUGPAO, S.; FRANKEL, S. S.; WEISSMAN, D.; LEKAWANVIJIT, S.; PETCHJOM, S.; THORNER, P.; BHOOPAT, T. In vivo identification of Langerhans and related dendritic cells infected with HIV-1 subtype E in vaginal mucosa of asymptomatic patients. **Mod Pathol**, v. 14, n. 12, p. 1263-1269, 2001.

BOGERS, W. M.; BERGMEIER, L. A.; MA, J.; OOSTERMEIJER, H.; WANG, Y.; KELLY, C. G.; TEN HAAFT, P.; SINGH, M.; HEENEY, J. L.; LEHNER, T. A novel HIV-CCR5 receptor vaccine strategy in the control of mucosal SIV/HIV infection. **Aids**, v. 18, n. 1, p. 25-36, 2004.

BOMSEL, M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. **Nat Med**, v. 3, n. 1, p. 42-47, 1997.

BORN, W.; CADY, C.; JONES-CARSON, J.; MUKASA, A.; LAHN, M.; O'BRIEN, R. Immunoregulatory functions of gamma delta T cells. **Adv Immunol**, v. 71, n. p. 77-144, 1999.

BORROW, P.; LEWICKI, H.; HAHN, B. H.; SHAW, G. M.; OLDSTONE, M. B. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. **J Virol**, v. 68, n. 9, p. 6103-6110, 1994.

BOULLIER, S.; COCHET, M.; POCCIA, F.; GOUGEON, M. L. CDR3-independent gamma delta V delta 1+ T cell expansion in the peripheral blood of HIV-infected persons. **J Immunol**, v. 154, n. 3, p. 1418-1431, 1995.

BRANDES, M.; WILLIMANN, K.; MOSER, B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. **Science**, v. 309, n. 5732, p. 264-268, 2005.

BRANDTZAEG, P.; BAEKKEVOLD, E. S.; FARSTAD, I. N.; JAHNSEN, F. L.; JOHANSEN, F. E.; NILSEN, E. M.; YAMANAKA, T. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? **Immunol Today**, v. 20, n. 3, p. 141-151, 1999.

BRASIL. Boletim epidemiológico DST/AIDS. Ministério da Saúde - Programa nacional DST/AIDS. Disponível em:<<http://www.aids.gov.br/>>. Acesso em: 27 nov. 2005

BURTON, D. R.; DESROSIERS, R. C.; DOMS, R. W.; KOFF, W. C.; KWONG, P. D.; MOORE, J. P.; NABEL, G. J.; SODROSKI, J.; WILSON, I. A.; WYATT, R. T. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. **Nat Immunol**, v. 5, n. 3, p. 233-236, 2004.

CAMERON, P. U.; FREUDENTHAL, P. S.; BARKER, J. M.; GEZELTER, S.; INABA, K.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. **Science**, v. 257, n. 5068, p. 383-387, 1992.

CHEN, X.; SCALA, G.; QUINTO, I.; LIU, W.; CHUN, T. W.; JUSTEMENT, J. S.; COHEN, O. J.; VANCOTT, T. C.; IWANICKI, M.; LEWIS, M. G.; GREENHOUSE, J.; BARRY, T.; VENZON, D.; FAUCI, A. S. Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage-displayed HIV-1 epitopes. **Nat Med**, v. 7, n. 11, p. 1225-1231, 2001.

COHEN, J. Public health. AIDS vaccine trial produces disappointment and confusion. **Science**, v. 299, n. 5611, p. 1290-1291, 2003.

CONSTANT, S. L.; BROGDON, J. L.; PIGGOTT, D. A.; HERRICK, C. A.; VISINTIN, I.; RUDDLE, N. H.; BOTTOMLY, K. Resident lung antigen-presenting cells have the capacity to promote Th2 T cell differentiation in situ. **J Clin Invest**, v. 110, n. 10, p. 1441-1448, 2002.

DI FABIO, S.; MEDAGLINI, D.; RUSH, C. M.; CORRIAS, F.; PANZINI, G. L.; PACE, M.; VERANI, P.; POZZI, G.; TITTI, F. Vaginal immunization of Cynomolgus monkeys with *Streptococcus gordonii* expressing HIV-1 and HPV 16 antigens. **Vaccine**, v. 16, n. 5, p. 485-492, 1998.

DOE, B.; WALKER, C. M. HIV-1 p24 Gag-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in mice. **Aids**, v. 10, n. 7, p. 793-794, 1996.

FARINA, S. F.; GAO, G. P.; XIANG, Z. Q.; RUX, J. J.; BURNETT, R. M.; ALVIRA, M. R.; MARSH, J.; ERTL, H. C.; WILSON, J. M. Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. **J Virol**, v. 75, n. 23, p. 11603-11613, 2001.

FERNANDEZ, N. C.; LOZIER, A.; FLAMENT, C.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; BELLET, D.; SUTER, M.; PERRICAUDET, M.; TURSZ, T.; MARASKOVSKY, E.; ZITVOGEL, L. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. **Nat Med**, v. 5, n. 4, p. 405-411, 1999.

FIDEL, P. L., JR.; WOLF, N. A.; KUKURUGA, M. A. T lymphocytes in the murine vaginal mucosa are phenotypically distinct from those in the periphery. **Infect Immun**, v. 64, n. 9, p. 3793-3799, 1996.

FITZGERALD, J. C.; GAO, G. P.; REYES-SANDOVAL, A.; PAVLAKIS, G. N.; XIANG, Z. Q.; WLAZLO, A. P.; GILES-DAVIS, W.; WILSON, J. M.; ERTL, H. C. A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 gag. **J Immunol**, v. 170, n. 3, p. 1416-1422, 2003.

FREIHORST, J.; OGRA, P. L. Mucosal immunity and viral infections. **Ann Med**, v. 33, n. 3, p. 172-177, 2001.

GALLICHAN, W. S.; JOHNSON, D. C.; GRAHAM, F. L.; ROSENTHAL, K. L. Mucosal immunity and protection after intranasal immunization with recombinant adenovirus expressing herpes simplex virus glycoprotein B. **J Infect Dis**, v. 168, n. 3, p. 622-629, 1993.

GALLICHAN, W. S.; ROSENTHAL, K. L. Effects of the estrous cycle on local humoral immune responses and protection of intranasally immunized female mice against herpes simplex virus type 2 infection in the genital tract. **Virology**, v. 224, n. 2, p. 487-497, 1996.

GALLICHAN, W. S.; ROSENTHAL, K. L. Specific secretory immune responses in the female genital tract following intranasal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virus. **Vaccine**, v. 13, n. 16, p. 1589-1595, 1995.

GARBER, D. A.; SILVESTRI, G.; FEINBERG, M. B. Prospects for an AIDS vaccine: three big questions, no easy answers. **Lancet Infect Dis**, v. 4, n. 7, p. 397-413, 2004.

GARCIA, E.; PION, M.; PELCHEN-MATTHEWS, A.; COLLINSON, L.; ARRIGHI, J. F.; BLOT, G.; LEUBA, F.; ESCOLA, J. M.; DEMAUREX, N.; MARSH, M.; PIGUET, V. HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. **Traffic**, v. 6, n. 6, p. 488-501, 2005.

GARULLI, B.; KAWAOKA, Y.; CASTRUCCI, M. R. Mucosal and systemic immune responses to a human immunodeficiency virus type 1 epitope induced upon vaginal infection with a recombinant influenza A virus. **J Virol**, v. 78, n. 2, p. 1020-1025, 2004.

GEIJTENBEEK, T. B.; KWON, D. S.; TORENSMA, R.; VAN VLIET, S. J.; VAN DUIJNHOFEN, G. C.; MIDDEL, J.; CORNELISSEN, I. L.; NOTTET, H. S.; KEWALRAMANI, V. N.; LITTMAN, D. R.; FIGDOR, C. G.; VAN KOOYK, Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 587-597, 2000.

GHERARDI, M. M.; PEREZ-JIMENEZ, E.; NAJERA, J. L.; ESTEBAN, M. Induction of HIV immunity in the genital tract after intranasal delivery of a MVA vector: enhanced immunogenicity after DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost immunization schedule. **J Immunol**, v. 172, n. 10, p. 6209-6220, 2004.

GLYNN, J. R.; CARAEL, M.; AUVERT, B.; KAHINDO, M.; CHEGE, J.; MUSONDA, R.; KAONA, F.; BUVE, A. Why do young women have a much higher prevalence of HIV than young men? A study in Kisumu, Kenya and Ndola, Zambia. **Aids**, v. 15 Suppl 4, n. p. S51-60, 2001.

GRAHAM, B. S. Clinical trials of HIV vaccines. **Annu Rev Med**, v. 53, n. p. 207-221, 2002.

GRAHAM, F. L.; SMILEY, J.; RUSSELL, W. C.; NAIRN, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J Gen Virol**, v. 36, n. 1, p. 59-74, 1977.

HAMAJIMA, K.; HOSHINO, Y.; XIN, K. Q.; HAYASHI, F.; TADOKORO, K.; OKUDA, K. Systemic and mucosal immune responses in mice after rectal and vaginal immunization with HIV-DNA vaccine. **Clin Immunol**, v. 102, n. 1, p. 12-18, 2002.

HANEBERG, B.; KENDALL, D.; AMERONGEN, H. M.; APTER, F. M.; KRAEHENBUHL, J. P.; NEUTRA, M. R. Induction of specific immunoglobulin A in the small intestine, colon-rectum, and vagina measured by a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces. **Infect Immun**, v. 62, n. 1, p. 15-23, 1994.

HAYDAY, A. C. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. **Annu Rev Immunol**, v. 18, n. p. 975-1026, 2000.

HEDGES, S. R.; MAYO, M. S.; MESTECKY, J.; HOOK, E. W., 3RD; RUSSELL, M. W. Limited local and systemic antibody responses to *Neisseria gonorrhoeae* during uncomplicated genital infections. **Infect Immun**, v. 67, n. 8, p. 3937-3946, 1999.

HERITAGE, P. L.; UNDERDOWN, B. J.; ARSENAULT, A. L.; SNIDER, D. P.; MCDERMOTT, M. R. Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 156, n. 4 Pt 1, p. 1256-1262, 1997.

HINZ, T.; WESCH, D.; FRIESE, K.; RECKZIEGEL, A.; ARDEN, B.; KABELITZ, D. T cell receptor gamma delta repertoire in HIV-1-infected individuals. **Eur J Immunol**, v. 24, n. 12, p. 3044-3049, 1994.

HOFFMANN, C.; ROCKSTROH, J.; KAMPS, B. HIV Medicine 2005. Flying Publisher. Disponível em: <<http://www.hivmedicine.com/>>. Acesso em: 27/12/2005

HOFT, D. F.; BROWN, R. M.; ROODMAN, S. T. Bacille Calmette-Guerin vaccination enhances human gamma delta T cell responsiveness to mycobacteria suggestive of a memory-like phenotype. **J Immunol**, v. 161, n. 2, p. 1045-1054, 1998.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nat Med**, v. 11, n. 4 Suppl, p. S45-53, 2005.

IQBAL, S. M.; BALL, T. B.; KIMANI, J.; KIAMA, P.; THOTTINGAL, P.; EMBREE, J. E.; FOWKE, K. R.; PLUMMER, F. A. Elevated T cell counts and RANTES expression in the genital mucosa of HIV-1-resistant Kenyan commercial sex workers. **J Infect Dis**, v. 192, n. 5, p. 728-738, 2005.

JIANG, J. Q.; PATRICK, A.; MOSS, R. B.; ROSENTHAL, K. L. CD8+ T-cell-mediated cross-clade protection in the genital tract following intranasal immunization with inactivated human immunodeficiency virus antigen plus CpG oligodeoxynucleotides. **J Virol**, v. 79, n. 1, p. 393-400, 2005.

JIN, X.; BAUER, D. E.; TUTTLETON, S. E.; LEWIN, S.; GETTIE, A.; BLANCHARD, J.; IRWIN, C. E.; SAFRIT, J. T.; MITTLER, J.; WEINBERGER, L.; KOSTRIKIS, L. G.; ZHANG, L.; PERELSON, A. S.; HO, D. D. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. **J Exp Med**, v. 189, n. 6, p. 991-998, 1999.

KAHN, J. O.; CHERNG, D. W.; MAYER, K.; MURRAY, H.; LAGAKOS, S. Evaluation of HIV-1 immunogen, an immunologic modifier, administered to patients infected with HIV having 300 to 549 x 10(6)/L CD4 cell counts: A randomized controlled trial. **Jama**, v. 284, n. 17, p. 2193-2202, 2000.

KANTELE, A.; ZIVNY, J.; HAKKINEN, M.; ELSON, C. O.; MESTECKY, J. Differential homing commitments of antigen-specific T cells after oral or parenteral immunization in humans. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5173-5177, 1999.

KAUL, R.; PLUMMER, F. A.; KIMANI, J.; DONG, T.; KIAMA, P.; ROSTRON, T.; NJAGI, E.; MACDONALD, K. S.; BWAYO, J. J.; MCMICHAEL, A. J.; ROWLAND-JONES, S. L. HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. **J Immunol**, v. 164, n. 3, p. 1602-1611, 2000.

KAUL, R.; ROWLAND-JONES, S. L.; KIMANI, J.; FOWKE, K.; DONG, T.; KIAMA, P.; RUTHERFORD, J.; NJAGI, E.; MWANGI, F.; ROSTRON, T.; ONYANGO, J.; OYUGI, J.; MACDONALD, K. S.; BWAYO, J. J.; PLUMMER, F. A. New insights into HIV-1 specific cytotoxic T-lymphocyte responses in exposed, persistently seronegative Kenyan sex workers. **Immunol Lett**, v. 79, n. 1-2, p. 3-13, 2001.

KIYONO, H.; FUKUYAMA, S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 9, p. 699-710, 2004.

KLAVINSKIS, L. S.; BARNFIELD, C.; GAO, L.; PARKER, S. Intranasal immunization with plasmid DNA-lipid complexes elicits mucosal immunity in the female genital and rectal tracts. **J Immunol**, v. 162, n. 1, p. 254-262, 1999.

KLAVINSKIS, L. S.; BERGMEIER, L. A.; GAO, L.; MITCHELL, E.; WARD, R. G.; LAYTON, G.; BROOKES, R.; MEYERS, N. J.; LEHNER, T. Mucosal or targeted lymph node immunization of macaques with a particulate SIVp27 protein elicits virus-specific CTL in the genito-rectal mucosa and draining lymph nodes. **J Immunol**, v. 157, n. 6, p. 2521-2527, 1996.

KOUP, R. A.; SAFRIT, J. T.; CAO, Y.; ANDREWS, C. A.; MCLEOD, G.; BORKOWSKY, W.; FARTHING, C.; HO, D. D. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. **J Virol**, v. 68, n. 7, p. 4650-4655, 1994.

KOZBOR, D.; HYJEK, E.; WIADERKIEWICZ, R.; KURZAWSKI, G.; LISCHNER, H. W. Analysis of gamma delta+ T cells in peripheral blood of children with perinatal human immunodeficiency virus (HIV) infection. **J Clin Immunol**, v. 13, n. 3, p. 193-203, 1993.

KOZLOWSKI, P. A.; CU-UVIN, S.; NEUTRA, M. R.; FLANIGAN, T. P. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. **Infect Immun**, v. 65, n. 4, p. 1387-1394, 1997.

KOZLOWSKI, P. A.; NEUTRA, M. R. The role of mucosal immunity in prevention of HIV transmission. **Curr Mol Med**, v. 3, n. 3, p. 217-228, 2003.

KUNKEL, E. J.; BUTCHER, E. C. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. **Immunity**, v. 16, n. 1, p. 1-4, 2002.

KURODA, M. J.; SCHMITZ, J. E.; CHARINI, W. A.; NICKERSON, C. E.; LIFTON, M. A.; LORD, C. I.; FORMAN, M. A.; LETVIN, N. L. Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5127-5133, 1999.



KWANT, A.; ROSENTHAL, K. L. Intravaginal immunization with viral subunit protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protective immunity against HSV-2. **Vaccine**, v. 22, n. 23-24, p. 3098-3104, 2004.

KWON, D. S.; GREGORIO, G.; BITTON, N.; HENDRICKSON, W. A.; LITTMAN, D. R. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. **Immunity**, v. 16, n. 1, p. 135-144, 2002.

LEHNER, T. Innate and adaptive mucosal immunity in protection against HIV infection. **Vaccine**, v. 21 Suppl 2, n. p. S68-76, 2003.

LEHNER, T.; BERGMEIER, L.; WANG, Y.; TAO, L.; MITCHELL, E. A rational basis for mucosal vaccination against HIV infection. **Immunol Rev**, v. 170, n. p. 183-196, 1999.

LEHNER, T.; MITCHELL, E.; BERGMEIER, L.; SINGH, M.; SPALLEK, R.; CRANAGE, M.; HALL, G.; DENNIS, M.; VILLINGER, F.; WANG, Y. The role of gammadelta T cells in generating antiviral factors and beta-chemokines in protection against mucosal simian immunodeficiency virus infection. **Eur J Immunol**, v. 30, n. 8, p. 2245-2256, 2000.

LEMIALE, F.; KONG, W. P.; AKYUREK, L. M.; LING, X.; HUANG, Y.; CHAKRABARTI, B. K.; ECKHAUS, M.; NABEL, G. J. Enhanced mucosal immunoglobulin A response of intranasal adenoviral vector human immunodeficiency virus vaccine and localization in the central nervous system. **J Virol**, v. 77, n. 18, p. 10078-10087, 2003.

LETVIN, N. L. Progress toward an HIV vaccine. **Annu Rev Med**, v. 56, n. p. 213-223, 2005.

LETVIN, N. L.; BAROUCH, D. H.; MONTEFIORI, D. C. Prospects for vaccine protection against HIV-1 infection and AIDS. **Annu Rev Immunol**, v. 20, n. p. 73-99, 2002.

LI, J.; LORD, C. I.; HASELTINE, W.; LETVIN, N. L.; SODROSKI, J. Infection of cynomolgus monkeys with a chimeric HIV-1/SIVmac virus that expresses the HIV-1 envelope glycoproteins. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 5, n. 7, p. 639-646, 1992.

LONDONO-ARCILA, P.; FREEMAN, D.; KLEANTHOUS, H.; O'DOWD, A. M.; LEWIS, S.; TURNER, A. K.; REES, E. L.; TIBBITTS, T. J.; GREENWOOD, J.; MONATH, T. P.; DARSLEY, M. J. Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi expressing urease effectively immunizes mice against *Helicobacter pylori* challenge as part of a heterologous mucosal priming-parenteral boosting vaccination regimen. **Infect Immun**, v. 70, n. 9, p. 5096-5106, 2002.

MACGREGOR, R. R.; BOYER, J. D.; UGEN, K. E.; LACY, K. E.; GLUCKMAN, S. J.; BAGARAZZI, M. L.; CHATTERGOON, M. A.; BAINE, Y.; HIGGINS, T. J.; CICCARELLI, R. B.; CONEY, L. R.; GINSBERG, R. S.; WEINER, D. B. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. **J Infect Dis**, v. 178, n. 1, p. 92-100, 1998.

MARX, P. A.; SPIRA, A. I.; GETTIE, A.; DAILEY, P. J.; VEAZEY, R. S.; LACKNER, A. A.; MAHONEY, C. J.; MILLER, C. J.; CLAYPOOL, L. E.; HO, D. D.; ALEXANDER, N. J. Progesterone implants enhance SIV vaginal transmission and early virus load. **Nat Med**, v. 2, n. 10, p. 1084-1089, 1996.

MATANO, T.; SHIBATA, R.; SIEMON, C.; CONNORS, M.; LANE, H. C.; MARTIN, M. A. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. **J Virol**, v. 72, n. 1, p. 164-169, 1998.

MCCLUSKIE, M. J.; WEERATNA, R. D.; PAYETTE, P. J.; DAVIS, H. L. Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 32, n. 3, p. 179-185, 2002.

MCCONKEY, S. J.; REECE, W. H.; MOORTHY, V. S.; WEBSTER, D.; DUNACHIE, S.; BUTCHER, G.; VUOLA, J. M.; BLANCHARD, T. J.; GOTHARD, P.; WATKINS, K.; HANNAN, C. M.; EVERAERE, S.; BROWN, K.; KESTER, K. E.; CUMMINGS, J.; WILLIAMS, J.; HEPPNER, D. G.; PATHAN, A.; FLANAGAN, K.; ARULANANTHAM, N.; ROBERTS, M. T.; ROY, M.; SMITH, G. L.; SCHNEIDER, J.; PETO, T.; SINDEN, R. E.; GILBERT, S. C.; HILL, A. V. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 729-735, 2003.

MCDONALD, D.; WU, L.; BOHKS, S. M.; KEWALRAMANI, V. N.; UNUTMAZ, D.; HOPE, T. J. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. **Science**, v. 300, n. 5623, p. 1295-1297, 2003.

MERRIMAN, H.; WOODS, S.; WINTER, C.; FAHNLANDER, A.; COREY, L. Secretory IgA antibody in cervicovaginal secretions from women with genital infection due to herpes simplex virus. **J Infect Dis**, v. 149, n. 4, p. 505-510, 1984.

MILLER, C. J.; MCGHEE, J. R.; GARDNER, M. B. Mucosal immunity, HIV transmission, and AIDS. **Lab Invest**, v. 68, n. 2, p. 129-145, 1993.

MILLIGAN, G. N.; DUDLEY-MCCLAIN, K. L.; CHU, C. F.; YOUNG, C. G. Efficacy of genital T cell responses to herpes simplex virus type 2 resulting from immunization of the nasal mucosa. **Virology**, v. 318, n. 2, p. 507-515, 2004.

MITCHELL, E. A.; BERGMEIER, L. A.; DOYLE, C.; BROOKES, R.; HUSSAIN, L. A.; WANG, Y.; LEHNER, T. Homing of mononuclear cells from iliac lymph nodes to the genital and rectal mucosa in non-human primates. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 10, p. 3066-3074, 1998.

MOORE, A. C.; HILL, A. V. Progress in DNA-based heterologous prime-boost immunization strategies for malaria. **Immunol Rev**, v. 199, n. p. 126-143, 2004.

MOORTHY, V. S.; IMOUKHUEDE, E. B.; KEATING, S.; PINDER, M.; WEBSTER, D.; SKINNER, M. A.; GILBERT, S. C.; WALRAVEN, G.; HILL, A. V. Phase 1 evaluation of 3 highly immunogenic prime-boost regimens, including a 12-month reboosting vaccination, for malaria vaccination in Gambian men. **J Infect Dis**, v. 189, n. 12, p. 2213-2219, 2004.

MORGADO, M. G.; GUIMARAES, M. L.; GALVAO-CASTRO, B. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development - a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 143-150, 2002.

MURPHEY-CORB, M.; MARTIN, L. N.; DAVISON-FAIRBURN, B.; MONTELARO, R. C.; MILLER, M.; WEST, M.; OHKAWA, S.; BASKIN, G. B.; ZHANG, J. Y.; PUTNEY, S. D.; ET AL. A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. **Science**, v. 246, n. 4935, p. 1293-1297, 1989.

MWAU, M.; CEBERE, I.; SUTTON, J.; CHIKOTI, P.; WINSTONE, N.; WEE, E. G.; BEATTIE, T.; CHEN, Y. H.; DORRELL, L.; MCSHANE, H.; SCHMIDT, C.; BROOKS, M.; PATEL, S.; ROBERTS, J.; CONLON, C.; ROWLAND-JONES, S. L.; BWAYO, J. J.; MCMICHAEL, A. J.; HANKE, T. A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans. **J Gen Virol**, v. 85, n. Pt 4, p. 911-919, 2004.

PANTALEO, G.; KOUP, R. A. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. **Nat Med**, v. 10, n. 8, p. 806-810, 2004.

PARR, E. L.; PARR, M. B. A comparison of antibody titres in mouse uterine fluid after immunization by several routes, and the effect of the uterus on antibody titres in vaginal fluid. **J Reprod Fertil**, v. 89, n. 2, p. 619-625, 1990.

PARR, M. B.; KEPPLER, L.; MCDERMOTT, M. R.; DREW, M. D.; BOZZOLA, J. J.; PARR, E. L. A mouse model for studies of mucosal immunity to vaginal infection by herpes simplex virus type 2. **Lab Invest**, v. 70, n. 3, p. 369-380, 1994.

PEACOCK, J. W.; NORDONE, S. K.; JACKSON, S. S.; LIAO, H. X.; LETVIN, N. L.; YAFAL, A. G.; GRITZ, L.; MAZZARA, G. P.; HAYNES, B. F.; STAATS, H. F. Gender differences in human immunodeficiency virus type 1-specific CD8 responses in the reproductive tract and colon following nasal peptide priming and modified vaccinia virus Ankara boosting. **J Virol**, v. 78, n. 23, p. 13163-13172, 2004.

PIGUET, V.; BLAUVELT, A. Essential roles for dendritic cells in the pathogenesis and potential treatment of HIV disease. **J Invest Dermatol**, v. 119, n. 2, p. 365-369, 2002.

PINTO, A. R.; ERTL, H. C. Genetically modified adenoviruses as recombinant vaccines. **Current Topics in Virology**, v. 2, n. p. 70-84, 2002.

PINTO, A. R.; FITZGERALD, J. C.; GAO, G. P.; WILSON, J. M.; ERTL, H. C. Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen upon oral immunization of mice with a simian E1-deleted adenoviral vector. **Vaccine**, v. 22, n. 5-6, p. 697-703, 2004.

PINTO, A. R.; FITZGERALD, J. C.; GILES-DAVIS, W.; GAO, G. P.; WILSON, J. M.; ERTL, H. C. Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen through a prime boost regimen with heterologous E1-deleted adenoviral vaccine carriers. **J Immunol**, v. 171, n. 12, p. 6774-6779, 2003.

POCCIA, F.; BOULLIER, S.; LECOEUR, H.; COCHET, M.; POQUET, Y.; COLIZZI, V.; FOURNIE, J. J.; GOUGEON, M. L. Peripheral V gamma 9/V delta 2 T cell deletion and anergy to nonpeptidic mycobacterial antigens in asymptomatic HIV-1-infected persons. **J Immunol**, v. 157, n. 1, p. 449-461, 1996.

PONTESILLI, O.; KLEIN, M. R.; KERKHOF-GARDE, S. R.; PAKKER, N. G.; DE WOLF, F.; SCHUITEMAKER, H.; MIEDEMA, F. Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte responses: a predominant gag-specific response is associated with nonprogressive infection. **J Infect Dis**, v. 178, n. 4, p. 1008-1018, 1998.

PUDNEY, J.; QUAYLE, A. J.; ANDERSON, D. J. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. **Biol Reprod**, v. 73, n. 6, p. 1253-1263, 2005.

REIMANN, K. A.; TENNER-RACZ, K.; RACZ, P.; MONTEFIORI, D. C.; YASUTOMI, Y.; LIN, W.; RANSIL, B. J.; LETVIN, N. L. Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. **J Virol**, v. 68, n. 4, p. 2362-2370, 1994.

REYES-SANDOVAL, A.; FITZGERALD, J. C.; GRANT, R.; ROY, S.; XIANG, Z. Q.; LI, Y.; GAO, G. P.; WILSON, J. M.; ERTL, H. C. Human immunodeficiency virus type 1-specific immune responses in primates upon sequential immunization with adenoviral vaccine carriers of human and simian serotypes. **J Virol**, v. 78, n. 14, p. 7392-7399, 2004.

REYNOLDS, M. R.; RAKASZ, E.; SKINNER, P. J.; WHITE, C.; ABEL, K.; MA, Z. M.; COMPTON, L.; NAPOE, G.; WILSON, N.; MILLER, C. J.; HAASE, A.; WATKINS, D. I. CD8<sup>+</sup> T-lymphocyte response to major immunodominant epitopes after vaginal exposure to simian immunodeficiency virus: too late and too little. **J Virol**, v. 79, n. 14, p. 9228-9235, 2005.

ROBINSON, H. L. New hope for an AIDS vaccine. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 4, p. 239-250, 2002.

ROBINSON, H. L.; AMARA, R. R. T cell vaccines for microbial infections. **Nat Med**, v. 11, n. 4 Suppl, p. S25-32, 2005.

ROSENTHAL, K. L.; GALLICHAN, W. S. Challenges for vaccination against sexually-transmitted diseases: induction and long-term maintenance of mucosal immune responses in the female genital tract. **Semin Immunol**, v. 9, n. 5, p. 303-314, 1997.

RUSSELL, M. W. Immunization for protection of the reproductive tract: a review. **Am J Reprod Immunol**, v. 47, n. 5, p. 265-268, 2002.

SAKAUE, G.; HIROI, T.; NAKAGAWA, Y.; SOMEYA, K.; IWATANI, K.; SAWA, Y.; TAKAHASHI, H.; HONDA, M.; KUNISAWA, J.; KIYONO, H. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160-encapsulated hemagglutinating virus of Japan-liposome induces antigen-specific CTLs and neutralizing antibody responses. **J Immunol**, v. 170, n. 1, p. 495-502, 2003.

SCHMITZ, J. E.; KURODA, M. J.; SANTRA, S.; SASSEVILLE, V. G.; SIMON, M. A.; LIFTON, M. A.; RACZ, P.; TENNER-RACZ, K.; DALESANDRO, M.; SCALLON, B. J.; GHRAYEB, J.; FORMAN, M. A.; MONTEFIORI, D. C.; RIEBER, E. P.; LETVIN, N. L.; REIMANN, K. A. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. **Science**, v. 283, n. 5403, p. 857-860, 1999.

SHATTOCK, R. J.; MOORE, J. P. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. **Nat Rev Microbiol**, v. 1, n. 1, p. 25-34, 2003.

SHIVER, J. W.; FU, T. M.; CHEN, L.; CASIMIRO, D. R.; DAVIES, M. E.; EVANS, R. K.; ZHANG, Z. Q.; SIMON, A. J.; TRIGONA, W. L.; DUBEY, S. A.; HUANG, L.; HARRIS, V. A.; LONG, R. S.; LIANG, X.; HANDT, L.; SCHLEIF, W. A.; ZHU, L.; FREED, D. C.; PERSAUD, N. V.; GUAN, L.; PUNT, K. S.; TANG, A.; CHEN, M.; WILSON, K. A.; COLLINS, K. B.; HEIDECKER, G. J.; FERNANDEZ, V. R.; PERRY, H. C.; JOYCE, J. G.; GRIMM, K. M.; COOK, J. C.; KELLER, P. M.; KRESOCK, D. S.; MACH, H.; TROUTMAN, R. D.; ISOPI, L. A.; WILLIAMS, D. M.; XU, Z.; BOHANNON, K. E.; VOLKIN, D. B.; MONTEFIORI, D. C.; MIURA, A.; KRIVULKA, G. R.; LIFTON, M. A.; KURODA, M. J.; SCHMITZ, J. E.; LETVIN, N. L.; CAULFIELD, M. J.; BETT, A. J.; YOUIL, R.; KASLOW, D. C.; EMINI, E. A. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. **Nature**, v. 415, n. 6869, p. 331-335, 2002.

SLEASMAN, J. W.; GOODENOW, M. M. 13. HIV-1 infection. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, n. 2 Suppl, p. S582-592, 2003.

SOUZA, A. P.; HAUT, L.; REYES-SANDOVAL, A.; PINTO, A. R. Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 4, p. 509-522, 2005.

SPIRA, A. I.; MARX, P. A.; PATTERSON, B. K.; MAHONEY, J.; KOUP, R. A.; WOLINSKY, S. M.; HO, D. D. Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. **J Exp Med**, v. 183, n. 1, p. 215-225, 1996.

STAATS, H. F.; BRADNEY, C. P.; GWINN, W. M.; JACKSON, S. S.; SEMPOWSKI, G. D.; LIAO, H. X.; LETVIN, N. L.; HAYNES, B. F. Cytokine requirements for induction of systemic and mucosal CTL after nasal immunization. **J Immunol**, v. 167, n. 9, p. 5386-5394, 2001.

STEVCEVA, L.; STROBER, W. Mucosal HIV vaccines: where are we now? **Curr HIV Res**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2004.

SULLIVAN, N. J.; SANCHEZ, A.; ROLLIN, P. E.; YANG, Z. Y.; NABEL, G. J. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. **Nature**, v. 408, n. 6812, p. 605-609, 2000.

TATSIS, N.; ERTL, H. C. Adenoviruses as vaccine vectors. **Mol Ther**, v. 10, n. 4, p. 616-629, 2004.

THAPAR, M. A.; PARR, E. L.; PARR, M. B. The effect of adjuvants on antibody titers in mouse vaginal fluid after intravaginal immunization. **J Reprod Immunol**, v. 17, n. 3, p. 207-216, 1990.

TOP, F. H., JR.; GROSSMAN, R. A.; BARTELLONI, P. J.; SEGAL, H. E.; DUDDING, B. A.; RUSSELL, P. K.; BUESCHER, E. L. Immunization with live types 7 and 4 adenovirus vaccines. I. Safety, infectivity, antigenicity, and potency of adenovirus type 7 vaccine in humans. **J Infect Dis**, v. 124, n. 2, p. 148-154, 1971.

TSANG, K. W.; HO, P. L.; OOI, G. C.; YEE, W. K.; WANG, T.; CHAN-YEUNG, M.; LAM, W. K.; SETO, W. H.; YAM, L. Y.; CHEUNG, T. M.; WONG, P. C.; LAM, B.; IP, M. S.; CHAN, J.; YUEN, K. Y.; LAI, K. N. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. **N Engl J Med**, v. 348, n. 20, p. 1977-1985, 2003.

TURVILLE, S. G.; SANTOS, J. J.; FRANK, I.; CAMERON, P. U.; WILKINSON, J.; MIRANDA-SAKSENA, M.; DABLE, J.; STOSSEL, H.; ROMANI, N.; PIATAK, M., JR.; LIFSON, J. D.; POPE, M.; CUNNINGHAM, A. L. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. **Blood**, v. 103, n. 6, p. 2170-2179, 2004.

UNAIDS/WHO. AIDS epidemic update: December 2004. Disponível em:<<http://www.unaids.org/>>. Acesso em: 20 nov. 2005

UNAIDS/WHO. Report on global AIDS epidemic: July 2004. Disponível em:<<http://www.unaids.org/>>. Acesso em: 27 dez. 2005

VAISHNAV, Y. N.; WONG-STAAAL, F. The biochemistry of AIDS. **Annu Rev Biochem**, v. 60, n. p. 577-630, 1991.

VAJDY, M.; GARDNER, J.; NEIDLEMAN, J.; CUADRA, L.; GREER, C.; PERRI, S.; O'HAGAN, D.; POLO, J. M. Human immunodeficiency virus type 1 Gag-specific vaginal

immunity and protection after local immunizations with sindbis virus-based replicon particles. **J Infect Dis**, v. 184, n. 12, p. 1613-1616, 2001.

VAJDY, M.; SINGH, M.; KAZAZ, J.; SOENAWAN, E.; UGOZZOLI, M.; ZHOU, F.; SRIVASTAVA, I.; BIN, Q.; BARNETT, S.; DONNELLY, J.; LUCIW, P.; ADAMSON, L.; MONTEFIORI, D.; O'HAGAN, D. T. Mucosal and systemic anti-HIV responses in rhesus macaques following combinations of intranasal and parenteral immunizations. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 20, n. 11, p. 1269-1281, 2004.

VANNIASINKAM, T.; ERTL, H. C. Adenoviral gene delivery for HIV-1 vaccination. **Curr Gene Ther**, v. 5, n. 2, p. 203-212, 2005.

VARNAVSKI, A. N.; SCHLIENGER, K.; BERGELSON, J. M.; GAO, G. P.; WILSON, J. M. Efficient transduction of human monocyte-derived dendritic cells by chimpanzee-derived adenoviral vector. **Hum Gene Ther**, v. 14, n. 6, p. 533-544, 2003.

WALLACE, M.; BARTZ, S. R.; CHANG, W. L.; MACKENZIE, D. A.; PAUZA, C. D.; MALKOVSKY, M. Gamma delta T lymphocyte responses to HIV. **Clin Exp Immunol**, v. 103, n. 2, p. 177-184, 1996.

WANG, B.; DANG, K.; AGADJANYAN, M. G.; SRIKANTAN, V.; LI, F.; UGEN, K. E.; BOYER, J.; MERVA, M.; WILLIAMS, W. V.; WEINER, D. B. Mucosal immunization with a DNA vaccine induces immune responses against HIV-1 at a mucosal site. **Vaccine**, v. 15, n. 8, p. 821-825, 1997.

WASSEN, L.; SCHON, K.; HOLMGREN, J.; JERTBORN, M.; LYCKE, N. Local intravaginal vaccination of the female genital tract. **Scand J Immunol**, v. 44, n. 4, p. 408-414, 1996.

WHATMORE, A. M.; COOK, N.; HALL, G. A.; SHARPE, S.; RUD, E. W.; CRANAGE, M. P. Repair and evolution of nef in vivo modulates simian immunodeficiency virus virulence. **J Virol**, v. 69, n. 8, p. 5117-5123, 1995.

WHITE, H. D.; CRASSI, K. M.; GIVAN, A. L.; STERN, J. E.; GONZALEZ, J. L.; MEMOLI, V. A.; GREEN, W. R.; WIRA, C. R. CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CTL activity within the human female reproductive tract: influence of stage of the menstrual cycle and menopause. **J Immunol**, v. 158, n. 6, p. 3017-3027, 1997.



WOLINSKY, S. M.; WIKE, C. M.; KORBER, B. T.; HUTTO, C.; PARKS, W. P.; ROSENBLUM, L. L.; KUNSTMAN, K. J.; FURTADO, M. R.; MUNOZ, J. L. Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. **Science**, v. 255, n. 5048, p. 1134-1137, 1992.

WORKU, S.; GORSE, G. J.; BELSHE, R. B.; HOFT, D. F. Canarypox vaccines induce antigen-specific human gammadelta T cells capable of interferon-gamma production. **J Infect Dis**, v. 184, n. 5, p. 525-532, 2001.

XIANG, Z. Q.; YANG, Y.; WILSON, J. M.; ERTL, H. C. A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. **Virology**, v. 219, n. 1, p. 220-227, 1996.

YOSHIZAWA, I.; MIZUOCHI, T.; OGATA, A.; MURAKAMI, M.; YAGITA, H.; TAKAHASHI, Y.; TAKEMORI, T.; TSUNETSUGU-YOKOTA, Y. Studies on the generation and maintenance of mucosal cytotoxic T lymphocytes against human immunodeficiency virus type 1 Gag in mice. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 19, n. 6, p. 469-479, 2003.

ZHANG, L.; YU, W.; HE, T.; YU, J.; CAFFREY, R. E.; DALMASSO, E. A.; FU, S.; PHAM, T.; MEI, J.; HO, J. J.; ZHANG, W.; LOPEZ, P.; HO, D. D. Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. **Science**, v. 298, n. 5595, p. 995-1000, 2002.

ZHANG, Z.; SCHULER, T.; ZUPANCIC, M.; WIETGREFE, S.; STASKUS, K. A.; REIMANN, K. A.; REINHART, T. A.; ROGAN, M.; CAVERT, W.; MILLER, C. J.; VEAZEY, R. S.; NOTERMANS, D.; LITTLE, S.; DANNER, S. A.; RICHMAN, D. D.; HAVLIR, D.; WONG, J.; JORDAN, H. L.; SCHACKER, T. W.; RACZ, P.; TENNER-RACZ, K.; LETVIN, N. L.; WOLINSKY, S.; HAASE, A. T. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. **Science**, v. 286, n. 5443, p. 1353-1357, 1999.

ZHU, T.; MO, H.; WANG, N.; NAM, D. S.; CAO, Y.; KOUP, R. A.; HO, D. D. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. **Science**, v. 261, n. 5125, p. 1179-1181, 1993.

## ANEXO A - Lista de soluções

### 1. Solução de lise

168,06 mM	NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de amônio	(Fluka)
9,98 mM	KHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de potássio	(Synth)
0,09 mM	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> K <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O	Ácido etilenodiaminotetracético	(Reagen)

### 2. Tampão fosfato salino – PBS

150,0 mM	NaCl	Cloreto de sódio	(USB)
1,7 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Fosfato de sódio monobásico	(Biotec)
9,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio dibásico	(Biotec)

### 3. RPMI 1640 completo

10,3 g	RPMI 1640		(Cultilab)
23,8 mM	NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio	(Merck)
2,0 mM	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	L-glutamina	(Sigma)
1,0 mM	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> Na	Ácido Pirúvico	(Sigma)
4,82 mM	HO <sub>3</sub> S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> )(CH <sub>2</sub> )OH	HEPES	(USB)

### 4. Solução Salina Balanceada de Hank livre de Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> – HBSS

5,40 mM	KCl	Cloreto de potássio	(Reagen)
0,44 mM	NaHCO <sub>3</sub>	Fosfato monobásico de potássio	(Reagen)
140,00 mM	NaCl	Cloreto de sódio	(USB)
15,70 mM	NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio	(Merck)
5,60 mM	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	D-Glucose	(Sigma)
0,34 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Fosfato dibásico de sódio	(Reagen)

### 5. Percoll

Percoll 100%: 1 parte de HBSS 10 X mais 9 partes de Percoll (LGC biotecnologia).

Percoll 40%: Percoll 100% diluído em meio RPMI suplementado com 2% de SBF.

**Percoll 75%: Percoll 100% diluído em meio RPMI suplementado com 2% de SBF.**

### 6. Paraformaldeído 4%

4 g de paraformaldeído (Sigma)