

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

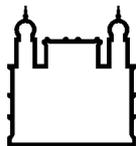
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

CONSTRUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA
DE VÍRUS RECOMBINANTES DE FEBRE AMARELA VACINAL 17D,
QUE EXPRESSAM O FATOR DE INFECTIVIDADE VIRAL (VIF) DO
VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA SÍMIA SIVMAC239.

STEPHANIE OLIVEIRA DIAZ DA CRUZ

Rio de Janeiro

2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

STEPHANIE OLIVEIRA DIAZ DA CRUZ

Construção, caracterização biológica e imunológica de vírus recombinantes de vírus vacinal 17D, que expressam o fator de infectividade viral (Vif) do vírus da imunodeficiência símia SIVmac239.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof. Dr^a. Myrna C. Bonaldo

RIO DE JANEIRO

2019

II

Oliveira Diaz da Cruz, Stephanie.

Construção, caracterização biológica e imunológica de vírus recombinantes de vírus vacinal 17D, que expressam o fator de infectividade viral (Vif) do vírus da imunodeficiência símia SIVmac239. / Stephanie Oliveira Diaz da Cruz. - Rio de Janeiro, 2019.

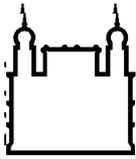
154 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientadora: Myrna Cristina Bonaldo.

Bibliografia: f. 122-132

1. Virus da febre amarela 17D. 2. Vacinas recombinantes. 3. Vacinas contra HIV. 4. Fator de infectividade viral (Vif). I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

STEPHANIE OLIVEIRA DIAZ DA CRUZ

CONSTRUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DE VÍRUS RECOMBINANTES DE VÍRUS DE FEBRE AMARELA 17D, QUE EXPRESSAM O FATOR DE INFECTIVIDADE VIRAL (VIF) DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA SÍMIA SIVMAC239.

ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Myrna C. Bonaldo

Aprovada em: 30/08/2019

EXAMINADORES:

Prof^a. Dra. Paula Mello de Luca (IOC/Fiocruz) – Presidente

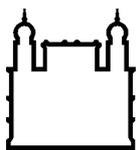
Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado (IOC/Fiocruz)

Prof^a. Dra. Luciana Barros de Arruda (UFRJ)

Prof^a. Dra. Priscilla Christina Olsen (UFRJ)

Prof^a. Dra. Simone Moraes da Costa (IOC/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 30 de agosto de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

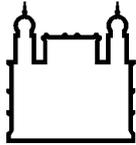
CONSTRUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DE VÍRUS RECOMBINANTE DE VÍRUS VACINAL DA FEBRE AMARELA 17D, QUE EXPRESSAM O FATOR DE INFECTIVIDADE VIRAL (VIF) DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA SÍMIA SIVMAC239.

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Stephanie Oliveira Diaz da Cruz

O desenvolvimento de uma vacina segura e eficiente contra o HIV é considerada uma ótima medida/estratégia para controlar a epidemia mundial do HIV. Este projeto visou construir e avaliar a imunogenicidade dos vírus da febre amarela recombinante da vacina 17D que expressam antígenos do fator de infectividade viral (Vif) do vírus da imunodeficiência símia SIVmac239. O vírus da vacina da febre amarela 17D tem sido usado como vetor de protótipos de vacinas por ser um imunógeno robusto e seguro. Nosso objetivo foi avaliar vírus recombinantes da febre amarela 17D que carregam fragmentos de genes Vif (HIV/SIV), e que foram construídos com a tecnologia do clone infeccioso e a inserção do gene de Vif na região intergênica E/NS1 do genoma do vírus vacinal da febre amarela 17D. Verificamos anteriormente que o vírus recombinante FA/Vif 1-110 original era geneticamente instável, perdendo completamente o fragmento Vif 1-110 até à quinta passagem em série em células Vero. Nós alcançamos a estabilidade genética quando deletamos a região N-terminal de Vif, que provavelmente estava interferindo na replicação do vírus da FA 17D. Chamamos de FA/Vif 42-110, o vírus que sofreu a deleção do N-terminal, e que é geneticamente estável. Mas também construímos o FA/Vif 1-110 variante, que possui o mesmo fragmento do FA/Vif 1-110 original, porém é mais estável devido as mudanças realizadas na plataforma de expressão da proteína heteróloga. Incluímos nas primeiras investigações de imunogenicidade, o FA/Vif 102-214 construído anteriormente. Nós hipotetizamos que a estabilidade genética viral poderia aumentar a imunogenicidade viral. Assim, realizamos duas imunizações em camundongos C57BL/6 com os vírus FA/Vif para a avaliação da imunogenicidade em relação à formação de células T de memória contra o vírus da FA e Vif, e indução de anticorpos neutralizantes contra o vírus da FA, gerados pelas imunizações. O vírus FA/Vif 1-110 variante e o FA/Vif 42-110 se apresentaram como bons indutores de resposta celular, porém o FA/Vif 42-110 apresentou a menor média de título de anticorpos neutralizantes. O vírus FA/Vif 102-214 apresentou bons resultados de resposta imune celular e humoral, apesar de não ter sido avaliado dentro da resposta imune celular específica. O vírus FA/Vif 1-110 variante conseguiu uma boa indução da resposta celular e humoral, e o vírus FA/Vif 1-110 original parece promissor segundo os nossos dados de resposta celular de memória efetora, apesar de ter apresentado uma média baixa de títulos de anticorpos neutralizantes. De maneira geral, os vírus FA/Vif induzem diferentes braços de resposta imune, sendo uns mais indutores de resposta celular que humoral e vice-versa. Com os vírus FA/Vif apresentando essas características em relação a resposta imune, não conseguimos relacionar a estabilidade genética com imunogenicidade, mas uma estratégia promissora para abranger os dois tipos de resposta, seria o uso de formulações virais, utilizando dois ou mais vírus FA/Vif no regime vacinal.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CONSTRUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DE VÍRUS RECOMBINANTE DE VÍRUS VACINAL DA FEBRE AMARELA 17D, QUE EXPRESSAM O FATOR DE INFECTIVIDADE VIRAL (VIF) DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA SÍMIA SIVMAC239.

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Stephanie Oliveira Diaz da Cruz

The development of a safe and efficient HIV vaccine is considered a great measure/strategy to control the worldwide HIV epidemic. This project aimed to construct and evaluate the immunogenicity of recombinant 17D vaccine yellow fever viruses that express viral infectivity factor (Vif) antigens of simian immunodeficiency virus SIVmac239. The yellow fever 17D vaccine virus has been used as a vector for vaccine prototypes for being a robust and safe immunogen. Our goal was to evaluate yellow fever 17D recombinant viruses bearing fragments of Vif (HIV/SIV) genes that were constructed with the infectious clone technology and the gene insertion in the E/NS1 intergenic region of the yellow fever 17D vaccine virus genome. We verified previously that the recombinant virus YF/Vif 1-110 original was genetically unstable, completely losing the Vif 1-110 fragment until the fifth serial passage in Vero cells. We achieved genetic stability when we deleted the Vif N-terminal domain, which was probably interfering in the yellow fever 17 D virus replication. We called YF/Vif 42-110 the virus that suffered the deletion, which is genetically stable. We also constructed the virus YF/Vif 1-110 variant, which has the same Vif fragment as YF/Vif 1-110 original but is more stable due to the changes we have made in the heterologous protein expression platform. We have included in the first block of immunogenicity evaluation the virus YF/Vif 102-214, constructed previously. We hypothesized if the viral genetic stability could increase viral immunogenicity. Hence, we immunized C57BL/6 mice with two doses of the recombinant YF/Vif viruses, to evaluate the immunogenicity through the formation of memory T cells against the YF virus and Vif, and induction of neutralizing antibodies against YF virus, generated by the immunizations. The YF/Vif 1-110 variant and YF/Vif 42-110 viruses were good inducers of cellular response, but YF/Vif 42-110 showed the lowest titers of neutralizing antibody. The YF/Vif 102-214 showed good cellular and humoral response results, although it was not evaluated for specific cellular responses. The YF/Vif 1-110 variant induced a good cellular and humoral response, and the YF/Vif 1-110 original virus seemed promising according to our effector memory T cell response data, although showed low titers of neutralizing antibodies. In general, YF/Vif viruses induced different branches of immune response, where some are better inducers of cellular than humoral response and vice versa. With the YF/Vif viruses presenting these immune response features, we could not relate the genetic stability with immunogenicity, but a promising strategy for addressing both types of immune response would be to use viral formulations using two or more YF/Vif virus in the vaccination regimen.

Agradecimentos

O caminho profissional que tenho trilhado, tem sido atípico e desafiador. A mudança de área profissional, foi abrupta, mas extremamente satisfatória. Nessa nova jornada, encontrei pessoas e lugares, que despertaram novos interesses e a busca de respostas. É incrível poder mergulhar em novos conhecimentos, e sentir que essa experiência de quatro anos, me trouxe uma "bagagem" científica de valor imensurável. Muitas pessoas contribuíram para a conclusão dessa tese. Foi um trabalho de muitas mãos, e eu sou extremamente grata por todo apoio e ajuda dessas pessoas, que também fazem parte da minha estória.

Agradeço à minha família, especialmente à minha mãe, por ter acreditado, e compreendido esse desejo de seguir por um novo caminho. Espero estar retribuindo todo o investimento educacional e emocional de meus pais. Ao meu marido, que batalhou comigo lado a lado, também construindo a sua vida profissional, e segurando a minha mão quando foi preciso, porque a vida não para. Eu não poderia ter alguém melhor ao meu lado, nos momentos mais difíceis e nos mais felizes.

Agradeço à minha orientadora, Dr^a. Myrna Bonaldo, a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus - LABMOF. Muito obrigada por ter me recebido, e acreditado no meu potencial. Agradeço à Dr^a. Ana Cristina Nogueira, coorientadora deste projeto de tese, pelas discussões imunológicas do projeto e dos resultados, sempre muito pertinentes e interessantes. À equipe do LABMOF, que são mais que colegas de trabalho, são realmente amigos, que anseiam o meu sucesso, e estão sempre prontos para ajudar. Em biologia molecular; Alexandre Araújo, Ieda Ribeiro, Nathália Furtado e Marta Pereira; que também auxiliaram nos experimentos com modelo animal; onde pude também contar com Iasmim Mello, Lidiane Menezes, Marta Pereira, Déberli Fernandes e Noemia Lima. À equipe técnica de Clara, Lidiane Menezes, Juliana Ribeiro, Matheus Grilo e Elaine Evangelista, que trabalharam em prol de todo laboratório, e que fizeram possível todos os experimentos. Não posso deixar de mencionar, as nossas discussões sobre imunologia e estatística, e por isso, agradecer mais uma vez, as amigas Nathália Furtado, Iasmim Mello e a Ieda Ribeiro.

Agradeço à colaboradora Dr^a. Elen Mello de Souza, que me acompanhou nos primeiros passos e me ensinou na prática, citometria de fluxo. Agradeço também a forte parceria com a plataforma de citometria de fluxo do Pavilhão Leônidas Deane. Ao Dr. Álvaro Bertho, coordenador da plataforma, e à tecnologista Thaize Quiroga e Vanessa Costa, a minha imensa gratidão, pela disposição em ajudar e discutir resultados, e pelo uso do citômetro do laboratório de Imunoparasitologia. Às amigas Nathália Rocha e Alinne Renzetti, todo o meu

reconhecimento. Os ensaios de citometria de fluxo não seriam possíveis sem a ajuda de vocês. Agradeço também a plataforma de citometria de fluxo do Pavilhão Cardoso Fontes, especialmente as tecnologistas Cynthia Cascabulho e Daniela Beghini.

Agradeço à toda equipe do biotério do Pavilhão Leônidas Deane, que trabalhou para manter a qualidade dos nossos experimentos, mesmo nas situações mais adversas. Toda gratidão ao laboratório de Patologia, pelo treinamento em punção cardíaca em camundongos, administrado pelo Dr. Marcelo Pelajo, e a ajuda da Marcia Terra e Juliane Siqueira nos experimentos com modelo animal. Agradeço ao Dr. Josué da Costa Lima Júnior, pela orientação nas análises de predição de epítomos, e a Dr^a. Paula De Luca pela orientação com a teoria e prática do CBA (*Cytometric Bead Array*).

“Um cientista não é aquele que dá as respostas certas, e sim
aquele que faz as perguntas certas” Claude Lévi-Strauss

Índice

1. Introdução	1
1.1. A epidemia global de HIV/AIDS	2
1.1.1. O vírus e o ciclo de replicação	3
1.1.2. Patogenia	9
1.1.3. Desenvolvimento de vacinas contra o HIV	11
1.2. A vacina da febre amarela 17D	12
1.2.1. Resposta imunológica ao vírus da febre amarela vacinal 17D	17
1.2.2. O uso do vírus vacinal da febre amarela 17D como vetor de epítomos heterólogos	20
1.2.2.1. Vírus quiméricos de FA 17D	21
1.2.2.2. Vírus recombinantes de FA 17D.....	23
1.2.3. Resultados preliminares de vírus recombinantes de FA 17D/Vif	28
1.3. Justificativa	29
2. Objetivos	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. Material e métodos	32
3.1 Certificados.....	32
3.2 Cultura de células	32
3.3 Construção dos vírus recombinantes de febre amarela vacinal 17D/Vif.....	33
3.4 Extração de RNA e reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR).....	35
3.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	35
3.6 Sequenciamento nucleotídico.....	36
3.7 Titulação viral	36
3.7.1 Titulação dos inóculos virais preparados para a imunização	37
3.8 Produção de estoques virais (2P).....	38

3.9	Infecção viral em células Vero para teste de estabilidade genética e curvas de proliferação.....	38
3.10	Vírus vacinal da febre amarela 17DD.....	39
3.11	Experimentos com animais	39
3.12	Citometria de fluxo	42
3.12.1	Processamento dos baços dos camundongos e marcação de moléculas de superfície por citometria de fluxo	42
3.12.2	Detecção <i>in vivo</i> de células T de memória	43
3.12.3	Imunofenotipagem de células T ativadas e T de memória após estímulo <i>in vitro</i> com peptídeo do vírus FA 17D e peptídeos de Vif.....	46
3.12.3.1	Peptídeos do vírus da FA 17D e de Vif.....	46
3.12.3.2	Anticorpos monoclonais utilizados na avaliação da resposta celular específica contra o vírus da FA 17D e Vif	50
3.12.4	Detecção das citocinas secretadas no sobrenadante da cultura das células estimuladas <i>in vitro</i> com peptídeo de FA 17D e peptídeos de Vif.....	55
3.13	Teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT).....	56
3.14	Análise estatística	59
4.	Resultados.....	60
4.1	Construção dos vírus recombinantes de FA/Vif	60
4.2	Caracterização biológica e genética dos vírus recombinantes de FA/Vif	61
4.2.1	Titulação dos estoques virais.....	61
4.2.2	Estabilidade genética dos vírus recombinantes de FA/Vif.....	62
4.2.3	Proliferação viral em células Vero	63
4.3	Avaliação da imunogenicidade em camundongos C57BL/6 dos vírus recombinantes FA/Vif.....	65
4.3.1	Determinação do número total de esplenócitos e do número absoluto de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ dos grupos imunizados com os vírus recombinantes de FA/Vif.....	65
4.3.2	Detecção <i>in vivo</i> de células T de memória após as imunizações com os vírus recombinantes FA/Vif	68
4.3.2.1	Determinação do número absoluto e porcentagem de células T de memória nos grupos imunizados com os vírus recombinantes FA/Vif	69

4.3.2.2	Detecção da população de células T de memória central nos grupos imunizados com FA/Vif.....	70
4.3.2.3	Detecção da população de células T de memória efetora nos grupos imunizados com FA/Vif.....	73
4.3.3	Avaliação da resposta celular específica contra o vírus da febre amarela 17D e o fator de infectividade viral (Vif) de SIVmac239, nos grupos imunizados com FA/Vif ...	76
4.3.3.1	Detecção de células T de camundongos imunizados com os vírus FA/Vif, que foram ativadas e proliferaram após estímulo <i>in vitro</i>	76
4.3.3.2	Determinação de células T de memória de camundongos imunizados com os vírus FA/Vif após estímulo <i>in vitro</i>	82
4.3.3.3	Detecção das citocinas secretadas pelos esplenócitos dos camundongos imunizados com os vírus FA/Vif após estímulo <i>in vitro</i>	87
4.3.4	Indução de anticorpos neutralizantes para o vírus da febre amarela em camundongos imunizados com os vírus recombinantes de FA/Vif	92
5.	<i>Discussão</i>	100
6.	<i>Conclusões</i>	119
7.	<i>Perspectivas</i>	121
	<i>Referências</i>.....	122
	<i>ANEXO I – Lista de meios e soluções</i>.....	133
	<i>ANEXO II – Figuras e tabelas suplementares</i>	137

Índice de figuras

<i>Figura 1.1 - Desenho esquemático de uma partícula de HIV interagindo com uma célula hospedeira.</i>	4
<i>Figura 1.2 - Genoma do HIV.</i>	5
<i>Figura 1.3 - Replicação do HIV.</i>	7
<i>Figura 1.4 - Relação entre APOBEC3G, Vif, apresentação por MHC e resposta de células T citotóxicas.</i>	9
<i>Figura 1.5 - Linhagens da vacina FA 17D e subcepas derivadas, considerando somente a produção atual de vacinas 17D.</i>	14
<i>Figura 1.6 - Resposta imune ao vírus FA 17D.</i>	18
<i>Figura 1.7 - Representação esquemática de um vírus quimérico de FA 17D como vetor carreando genes de envelope de um outro vírus.</i>	22
<i>Figura 1.8 - Inserção de sequências heterólogas no genoma do vírus FA 17D.</i>	23
<i>Figura 1.9 - Esquema da expressão de genes heterólogos inseridos entre os genes das proteínas E e NS1 de FA 17D.</i>	25
<i>Figura 1.10 - Elementos utilizados para construção dos vírus FA 17D recombinantes nas diferentes plataformas de expressão.</i>	28
<i>Figura 3.1 - Fluxograma da obtenção de cDNA infeccioso recombinante.</i>	34
<i>Figura 3.2 - Cronograma de imunização com vírus FA vacinal 17DD e recombinantes FA/Vif.</i>	40
<i>Figura 3.3 - Estratégia de gates para a imunofenotipagem das células T de memória central e T de memória efetora, dos ensaios de detecção in vivo de células T de memória.</i>	45
<i>Figura 3.4 - Estratégia de gates para a imunofenotipagem das células T ativadas, após estímulo in vitro com peptídeo de FA 17D e peptídeos de Vif.</i>	51
<i>Figura 3.5 - Estratégia de gates para a imunofenotipagem das células T de memória central e T de memória efetora que proliferaram, após estímulo in vitro com peptídeo de FA 17D e peptídeos de Vif.</i>	54
<i>Figura 3.6 - Esquema simplificado do protocolo do Cytometric Bead Array (CBA).</i>	55
<i>Figura 3.7 - Diluição seriada dos soros para PRNT.</i>	57
<i>Figura 3.8 - Cálculo de título de anticorpos neutralizantes.</i>	58
<i>Figura 4.1 - Representação das construções dos cassetes de expressão de Vif.</i>	61
<i>Figura 4.2 - Análise da estabilidade genética dos vírus recombinantes FA/Vif após passagem seriada em células Vero.</i>	63
<i>Figura 4.3 - Proliferação viral em células Vero ao longo do tempo.</i>	64

<i>Figura 4.4 - Determinação do número total de esplenócitos e do número absoluto de células T CD4⁺ e T CD8⁺ dos grupos imunizados com vírus recombinantes de FA/Vif.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 4.5 - Razão de células T CD4⁺ e T CD8⁺ dentro dos grupos de camundongos imunizados e naïve.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 4.6 - Determinação do número absoluto e porcentagem de células T de memória nos grupos imunizados com FA/Vif.</i>	<i>70</i>
<i>Figura 4.7 - Detecção da população de células T de memória central nos grupos imunizados com FA/Vif.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 4.8 - Detecção da população de células T de memória efetora dos grupos imunizados com FA/Vif.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 4.9 - Detecção de células T ativadas e que proliferaram após estímulo in vitro com peptídeo ATLTYRML do vírus da FA 17D.</i>	<i>78</i>
<i>Figura 4.10 - Overlays representativos para a identificação da região de proliferação celular (CFSE^{low}).</i>	<i>79</i>
<i>Figura 4.11 - Detecção de células T ativadas e que proliferaram após estímulo in vitro com pool de peptídeos de Vif 41-107.</i>	<i>80</i>
<i>Figura 4.12 - Detecção de células T ativadas e que proliferaram após estímulo in vitro com pool de peptídeos de Vif 1-51.</i>	<i>81</i>
<i>Figura 4.13 - Determinação de células T de memória de camundongos imunizados com os vírus FA/Vif após estímulo in vitro com o peptídeo ATLTYRML do vírus de FA 17D.</i>	<i>83</i>
<i>Figura 4.14 - Determinação de células T de memória de camundongos imunizados com os vírus FA/Vif após estímulo in vitro com o pool de peptídeos de Vif 41-107.</i>	<i>85</i>
<i>Figura 4.15 - Determinação de células T de memória de camundongos imunizados com os vírus FA/Vif após estímulo in vitro com o pool de peptídeos de Vif 1-51.</i>	<i>87</i>
<i>Figura 4.16 - Detecção de citocinas secretadas pelos esplenócitos no sobrenadante da cultura celular, após estímulo in vitro com peptídeo ATLTYRML do vírus da FA 17D.</i>	<i>89</i>
<i>Figura 4.17 - Detecção de citocinas secretadas pelos esplenócitos no sobrenadante da cultura celular, após estímulo in vitro com o pool de peptídeos de Vif 41-107.</i>	<i>91</i>
<i>Figura 4.18 - Detecção de citocinas secretadas pelos esplenócitos no sobrenadante da cultura celular, após estímulo in vitro com pool de peptídeos de Vif 1-51.</i>	<i>92</i>
<i>Figura 4.19 - Indução de anticorpos neutralizantes para o vírus FA nos grupos de animais imunizados.....</i>	<i>93</i>

Índice de tabelas

<i>Tabela 3.1 - Oligonucleotídeos utilizados para o RT-PCR.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabela 3.2 - Grupos experimentais e número total de camundongos utilizados.</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 3.3 - Resultados das análises de predição de imunogenicidade MHC I e ligação a T CD4⁺ e T CD8⁺ dos peptídeos de Vif, realizadas na plataforma IEDB (Immune Epitope Database).</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 4.1- Títulos dos vírus FA/Vif e controle vacinal FA 17DD.</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 4.2 - Média e desvio padrão dos títulos virais (em log₁₀ PFU/mL) obtidos para cada vírus durante a cinética de proliferação viral em célula Vero.</i>	<i>64</i>
<i>Tabela 4.3 - Títulos de anticorpos neutralizantes contra o vírus FA 17DD induzidos pela imunização de camundongos com os vírus recombinantes FA/Vif.</i>	<i>94</i>
<i>Tabela 4.4 – Resumo dos resultados encontrados na caracterização biológica e genética dos vírus FA/Vif, e detecção in vivo de células T de memória nos grupos em relação aos controles naïve, mock e FA 17DD.</i>	<i>95</i>
<i>Tabela 4.5 – Resumo dos resultados encontrados nos grupos na indução de células T ativadas e de memória, após estímulo com peptídeo do vírus de FA 17D em relação aos controles naïve não estimulado, naïve e mock e FA 17DD, e anticorpos neutralizantes contra o vírus de FA.</i>	<i>96</i>
<i>Tabela 4.6 - Resumo dos resultados encontrados nos grupos na indução de células T ativadas e de memória, após estímulo com o pool de peptídeos de Vif 41-107 em relação aos controles naïve não estimulado, naïve e mock e FA 17DD.</i>	<i>97</i>
<i>Tabela 4.7 - Resumo dos resultados encontrados nos grupos a indução de células T ativadas e de memória, após estímulo com o pool de peptídeos de Vif 1-51 em relação aos controles naïve não estimulado, naïve e mock e FA 17DD.</i>	<i>98</i>
<i>Tabela 4.8 - Resumo dos resultados encontrados nos grupos na secreção de citocinas após estímulos com peptídeo do vírus de FA 17D e pools de Vif em relação aos controles naïve não estimulado, naïve e mock e FA 17DD.</i>	<i>99</i>

Lista de siglas e abreviaturas

APOBEC3G	<i>Apolipoprotein B-editing catalitic polypeptide 3G</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CMC	Carboximetil celulose
CPE	Efeito citopático
CCR5	Receptor de quimiocina tipo 5
CXCR4	Receptor de quimiocina tipo 4
DENV	Vírus da dengue
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFP	Proteína verde fluorescente melhorada (do inglês, <i>Enhanced green fluorescent protein</i>)
FA	Febre amarela
GFP	Proteína verde fluorescente (do inglês, <i>Green fluorescent protein</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano de classe II
HTNV	<i>HIV Vaccine Trials Network</i>
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IFN	Interferon
Kb	Quilobases
LTR	Repetições terminais longas
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MOI	Multiplicidade de infecção (relação vírus/células)
NK	Células <i>natural killers</i>
NS	Proteínas não estruturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PFU	Unidades formadoras de placas
PRNT	Teste de neutralização por redução de placas
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
TAE	Tampão acetato tris-EDTA
TGN	Rede trans do Golgi
TLR	Receptores Toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
UPR	Resposta a proteínas mal enoveladas
VFA	Vírus da febre amarela
Vif	Fator de infectividade viral do HIV e SIV

1. Introdução

O desenvolvimento de uma vacina segura e eficiente contra o HIV é considerado uma ótima medida/estratégia para controlar a epidemia mundial do HIV. Este projeto visa construir e avaliar a imunogenicidade dos vírus da febre amarela recombinante vacinal 17D, que expressam antígenos do fator de infectividade viral (Vif) do vírus da imunodeficiência símia SIVmac239. O vírus vacinal da FA 17D tem sido usado como vetor de protótipos de vacinas por ser um imunógeno robusto e seguro. Testamos vírus recombinantes do vírus vacinal da febre amarela 17D carreando fragmentos de genes Vif (HIV/SIV) que foram construídos com a tecnologia do clone infeccioso, e a inserção dos genes de Vif na região intergênica E/NS1 do genoma do vírus FA 17D.

O conceito de expressão de antígenos SIV/HIV no vírus da febre amarela vacinal 17D foi estabelecido originalmente pelo nosso grupo de pesquisa. Foram construídos anteriormente a este projeto de tese, vírus recombinantes do vírus da febre amarela 17D expressando as proteínas de HIV/SIV Gag, Nef e Vif. Em um estudo do nosso grupo em colaboração com o Dr. David Watkins da Universidade de Miami, demonstrou-se que macacos vacinados com um regime de *prime* e *boost* com vírus recombinantes FA 17D/SIV, e também recombinantes de Adenovirus tipo 5 expressando os minigenes Vif e Nef, puderam controlar a infecção viral após desafio com o vírus clonal SIV mac239, que é altamente patogênico, apresentando uma alta frequência de células T CD8⁺ dirigidos a epítomos de Vif e Nef (1). Devido a esse resultado promissor em relação a resposta imune celular contra Vif, nosso grupo aprimorou a plataforma de expressão da proteína heteróloga, buscando a estabilidade genética desses vírus recombinantes, e objetivando a melhora da sua imunogenicidade, e construiu novos vírus recombinantes de FA 17D/Vif neste projeto de tese.

A proteína Vif é codificada pelo genoma do HIV-1 e expressa na fase tardia do ciclo de replicação por um mecanismo dependente de Rev. Na célula, localiza-se predominantemente no citoplasma, mas também é encontrada no núcleo (2) e associada a membranas celulares. Vif é vital para neutralizar uma potente via antiviral do hospedeiro, mediada pela enzima celular APOBEC3G ou A3G (*Apolipoprotein B-editing catalitic polypeptide 3G*). A replicação de partículas virais produzidas na ausência de Vif é inativada eficientemente pela A3G. Esta enzima é um membro da família de desaminases de citidinas (enzimas que modificam/editam ácidos nucleicos), que promove mutações no DNA viral gerado por transcrição reversa, resultando em um vírion não competente (3). Pela sua importante função, Vif é uma proteína viral altamente expressa pela célula hospedeira infectada, já que quando imobiliza a enzima A3G do hospedeiro, forma um complexo que é direcionado para a degradação via proteossoma,

onde ela também é degradada e os seus peptídeos são apresentados na superfície celular por moléculas de MHC de classe I, gerando uma resposta TCD8⁺ Vif específica. Essa resposta imune celular está relacionada com o controle da replicação viral (4), entretanto, mecanismos de escape viral, promovem mutações nos epítomos imunodominantes de Vif, tornando difícil a formação dessa resposta específica (5).

Quando utilizamos diferentes fragmentos do gene de Vif para a construção dos vírus recombinantes FA 17D/Vif, podemos induzir uma resposta imune contra diferentes epítomos de Vif, além da resposta contra o vírus da FA 17D, o nosso vetor. Ou seja, um vírus recombinante seria capaz de induzir dois tipos diferentes de resposta imune; contra FA e Vif.

1.1. A epidemia global de HIV/AIDS

O HIV continua sendo um grande problema de saúde pública mundial, com mais de 35 milhões de mortes até o momento. Em 2016, um milhão de pessoas morreram por causas relacionadas ao HIV em todo o mundo. Em 2018, existiam 37,9 milhões de pessoas em todo o mundo vivendo com HIV (6). A África Subsaariana é a região mais afetada, com 25,6 (23,1-28,5) milhões de pessoas vivendo com HIV em 2015. A região também é responsável por dois terços do total global de novas infecções pelo vírus (7).

No Brasil, em 2017, foram diagnosticados 42.420 novos casos de HIV e 37.791 casos de AIDS com uma taxa de detecção de 18,3/100.000 habitantes (2017), totalizando, no período de 1980 a junho de 2018, 982.129 casos de AIDS detectados no país. No período de 2000 até junho de 2018, foram notificadas 116.292 gestantes infectadas com HIV, das quais 7.882 no ano de 2017, com uma taxa de detecção de 2,8/1.000 nascidos vivos (8).

A distribuição proporcional dos casos de AIDS identificados de 1980 até junho de 2018 no Brasil, mostra uma concentração nas regiões Sudeste e Sul, correspondendo cada qual a 51,8% e 20,0% do total de casos; as regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste correspondem a 15,8%, 6,4% e 6,1% do total dos casos, respectivamente. Nos últimos cinco anos (2013 a 2017), a região Norte apresentou uma média de 4,4 mil casos ao ano; o Nordeste, 9,0 mil; o Sudeste, 16,1 mil; o Sul, 8,2 mil; e o Centro-Oeste, 2,9 mil (8).

Medicamentos antirretrovirais eficazes podem controlar o vírus e ajudar a prevenir a transmissão para que as pessoas com HIV, e aqueles em risco substancial, possam aproveitar uma vida saudável e produtiva. Exemplos disso são as estratégias de profilaxia de pré-exposição (PrEP), disponíveis para evitar a infecção por HIV. Entre 2000 e 2016, o número de novas infecções por HIV caiu 39% e as mortes relacionadas ao HIV caíram em um terço, com 13,1 milhões de vidas salvas devido à terapia antirretroviral no mesmo período (9).

A população infectada é dependente da terapia antirretroviral (TARV) que suprime a replicação do vírus, previne o desenvolvimento da AIDS e reduz o risco de transmissão. Entretanto, a TARV não é uma cura, e prover tratamento durante toda a vida dos indivíduos infectados não é uma tarefa fácil de ser atingida. Tratamentos diários podem ser desafiadores e levar a interrupção da aderência, resultando no aumento da carga viral e progressão potencial em AIDS. Além disso, um em cada dez indivíduos que recebem TARV, tem reportado efeitos adversos devido a vários fatores, como as complexas interações entre as drogas e a sua toxicidade (9).

Grandes progressos foram alcançados no diagnóstico e tratamento, e os esforços de prevenção evitaram milhões de novas infecções. No entanto, o ritmo do progresso não corresponde à ambição global. O número de novas infecções por HIV não está caindo na velocidade necessária. Algumas regiões foram abandonadas e os recursos financeiros são insuficientes. Além disso, uma em cada quatro pessoas vivendo com HIV não sabe que vive com o vírus, o que a impede de tomar decisões informadas sobre prevenção, tratamento e outros serviços de assistência e apoio (10).

1.1.1. O vírus e o ciclo de replicação

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) pertence ao gênero Lentivírus da família Retroviridae, subfamília Orthoretrovirinae. Com base em características genéticas e diferenças nos antígenos virais, o HIV é classificado nos tipos 1 e 2 (HIV-1, HIV-2). Os vírus da imunodeficiência dos primatas não humanos (vírus da imunodeficiência símia, SIV) também são agrupados ao gênero Lentivírus. Análises epidemiológicas e filogenéticas atualmente disponíveis implicam que o HIV foi introduzido na população em torno de 1920 a 1940. O HIV-1 evoluiu de vírus de chimpanzés da África Central (SIVcpz) e HIV-2 de macacos Sooty mangabeys da África Ocidental (SIVsm) (11-13).

Os subtipos de HIV-1 são classificados com base na análise filogenética e são distribuídos nos principais grupos (M), *outlier* (O) e não-M/não-O (N). O mais prevalente é o grupo M, que é dividido em subtipos (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J, K) e formas recombinantes circulantes (CRFs) que são híbridos entre diferentes subtipos. A maioria das amostras de HIV-1 que foram testadas se enquadram em um conjunto definido de subtipos. No entanto, um pequeno número de amostras de HIV-1 contém genomas com regiões de múltiplos subtipos; essas formas recombinantes circulantes são encontradas em áreas geográficas onde coexistem múltiplos subtipos do vírus. Essas amostras híbridas são produtos de eventos de

recombinação que ocorrem no HIV-1. No caso de dois subtipos diferentes infectarem uma única célula, um vírus em mosaico pode ser gerado, incluindo regiões de cada um dos dois subtipos (14). A África Equatorial apresenta uma grande diversidade de variantes dos grupos N e O. Todos os subtipos do grupo M e vários CRFs co-circulam nos Camarões, na Guiné Equatorial, no Gabão e na República Democrática do Congo. No Brasil, o subtipo B é o mais prevalente, seguido pelo F, C e CRFs (15, 16).

A partícula viral do HIV-1 é esférica, composta de uma membrana bicamada lipídica, possui uma matriz proteica (composta pela proteína p17), capsídeo viral (composto pela proteína p24), nucleocapsídeo (composto pelas proteínas p7/p9), duas fitas simples de RNA genômico (ambas de sentido positivo, com 9,2 Kb de extensão) e as enzimas virais (transcriptase reversa, integrase e protease) (Figura 1.1) (17).

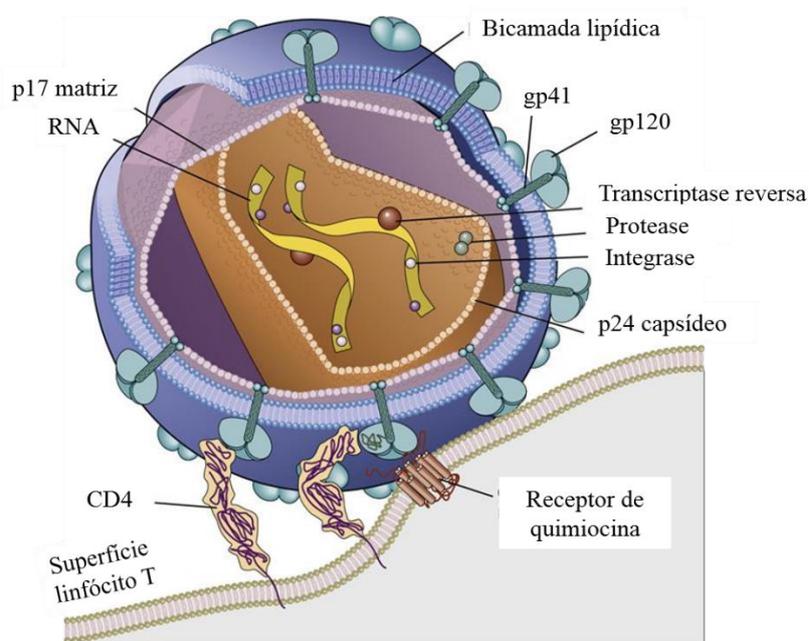


Figura 1.1 - Desenho esquemático de uma partícula de HIV interagindo com uma célula hospedeira.

Estruturas do HIV: membrana lipídica, matriz proteica (constituída pela proteína p17), capsídeo (constituída pela proteína p24), glicoproteínas (no desenho; gp 120 e gp 41), enzimas (no desenho; transcriptase reversa, protease e integrase), RNA viral. Estruturas da célula T hospedeira: receptor CD4 e receptor de quimiocina. Adaptado de Abbas e cols. (2012) (18).

O genoma do HIV-1 é composto por três genes estruturais, os genes Gag, Pol e Env. Além dos genes estruturais, o seu genoma contém um conjunto de genes acessórios e reguladores que controlam a replicação do vírus: os genes Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev e Nef (Figura 1.2) (17, 19). De modo geral, esses genes controlam a replicação do HIV-1, seja ativando a transcrição do seu genoma (gene Tat), promovendo a exportação do RNA mensageiro viral do

núcleo para o citoplasma (gene Rev) ou potencializando a infectividade dos vírions e a liberação dos mesmos para fora da célula infectada (Vif e Vpu) (17, 20, 21).

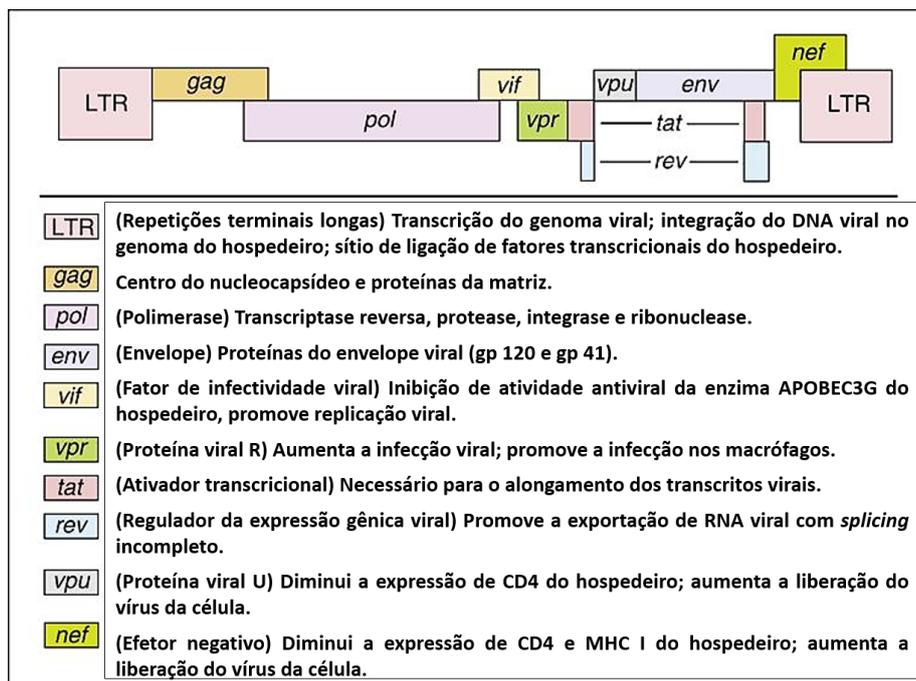


Figura 1.2 - Genoma do HIV.

Genes do HIV e suas respectivas funções. Adaptado de Abbas e cols. (2012) (18).

As regiões LTR (Repetições Terminais Longas) estão localizadas nas duas extremidades do genoma dos retrovírus e são importantes para a regulação da transcrição dos provírus (moléculas de DNA virais produzidas por transcrição reversa e integradas nas células do hospedeiro). O gene Pol, por sua vez, codifica as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase. Estas enzimas são produzidas como uma poliproteína Gag-Pol precursora que posteriormente é processada e clivada pela protease viral. O gene Gag codifica as proteínas que compõem o capsídeo viral, uma proteína precursora de 55 kDa a qual, durante a replicação do vírus, é clivada pela protease viral, dando origem às proteínas p24, p17, p7 e p6 (21).

O HIV-1 infecta diferentes células como linfócitos T CD4⁺, macrófagos e células dendríticas. A infecção se inicia pela interação da glicoproteína de superfície gp120 ao receptor CD4 na superfície celular, o que muda a conformação estrutural de gp120 e aumenta sua afinidade pelo co-receptor CCR5 ou CXCR4, formando um complexo. Posteriormente, mudanças conformacionais na glicoproteína transmembranar gp41 permitem que essa se insira na membrana celular e promova a fusão ao envelope viral. É essa fusão que permite o acesso do centro viral ao citoplasma (22).

Após esta etapa ocorre o desnudamento viral, e liberação do genoma no citoplasma sendo este seguido pela transcrição reversa do RNA viral, pela ação da enzima transcriptase

reversa (23). A transcrição reversa é a capacidade de converter os genomas de RNA em DNA dupla-fita, sendo essa uma das características que definem os retrovírus. Durante o processo de transcrição reversa, o DNA viral recém-formado fica associado ao complexo de transcrição reversa. A transcrição reversa pode introduzir erros no genoma viral a cada ciclo de replicação, contribuindo para a alta diversidade genética do vírus (24). O DNA viral é em seguida transportado para o núcleo, como parte do complexo de pré-integração composto por proteínas virais e celulares. No núcleo, o DNA será integrado ao genoma celular pela enzima integrase. Esse DNA integrado, chamado provírus, se comporta como um gene celular que poderá ser transcrito em RNAm, pela maquinaria celular (22).

A regulação da síntese de RNA é realizada pelas LTR, inseridas nas terminações do DNA integrado durante a transcrição reversa. A região 5' da LTR serve como promotora da transcrição viral, enquanto a região 3' auxilia na poliadenilação do RNA transcrito. Os RNAs transcritos são exportados do núcleo para o citoplasma, onde serão traduzidos em proteínas virais que farão parte das novas partículas virais. As novas partículas virais são liberadas por brotamento e são capazes de infectar novas células somente após o processo de maturação. Esse processo ocorre no meio extracelular, após processamento proteolítico das proteínas Gag e Pol pela ação da protease viral (Figura 1.3) (25, 26).

Rapidamente, células T CD4⁺ ativadas infectadas, assim como partículas virais livres, se espalham pelo organismo. Em uma semana, linfócitos T citotóxicos específicos contra HIV são produzidos, seguido de anticorpos. Entretanto, as proteínas virais já sofreram mutação e com isso os vírus escaparam da neutralização por anticorpos. A infecção por HIV então se perpetua de maneira crônica (27). Células como macrófagos e células dendríticas, são infectadas pelo HIV, porém são resistentes ao efeito citopático causado pelo vírus, e como não morrem, se tornam um reservatório para o HIV (18).

Alguns vírus como o HIV-1, escapam da defesa imunológica e evoluem para infecção crônica. Como consequência, o *pool* de células T CD8⁺ específicas contra o HIV persiste durante a infecção e se torna disfuncional. Esse processo é chamado de exaustão de células T CD8⁺, que é caracterizado por perda de diferentes funções, incluindo a capacidade de proliferar, matar células alvo (expressão de moléculas citotóxicas) e diminuição da produção de IL-2, TNF e IFN γ (28, 29). Quando as células T CD8⁺ específicas contra o HIV foram estudadas com relação às características disfuncionais, concluiu-se que essas células na maioria dos indivíduos HIV positivos, possuem polifuncionalidade pobre (30), e um fenótipo imaturo ou de maturação distorcida (31).

As redes transcricionais têm sido relacionadas à exaustão de células T CD8⁺ após infecção por LCMV-13 (Lymphocytic choriomeningitis virus) em camundongos (32), e

também células T CD8⁺ específicas contra o HIV que expressam especificamente PD-1 (33) e CD160 (33). Wherry e cols. observaram em modelo murino, que um perfil de exaustão após a infecção por LCMV-13 está associado a uma relação inversa entre T-bet e Eomes (34, 35). Um estudo mostrou que indivíduos HIV positivos não-produtores de longo prazo, retinham alta expressão de T-bet nas células T CD8⁺ HIV específicas (36).

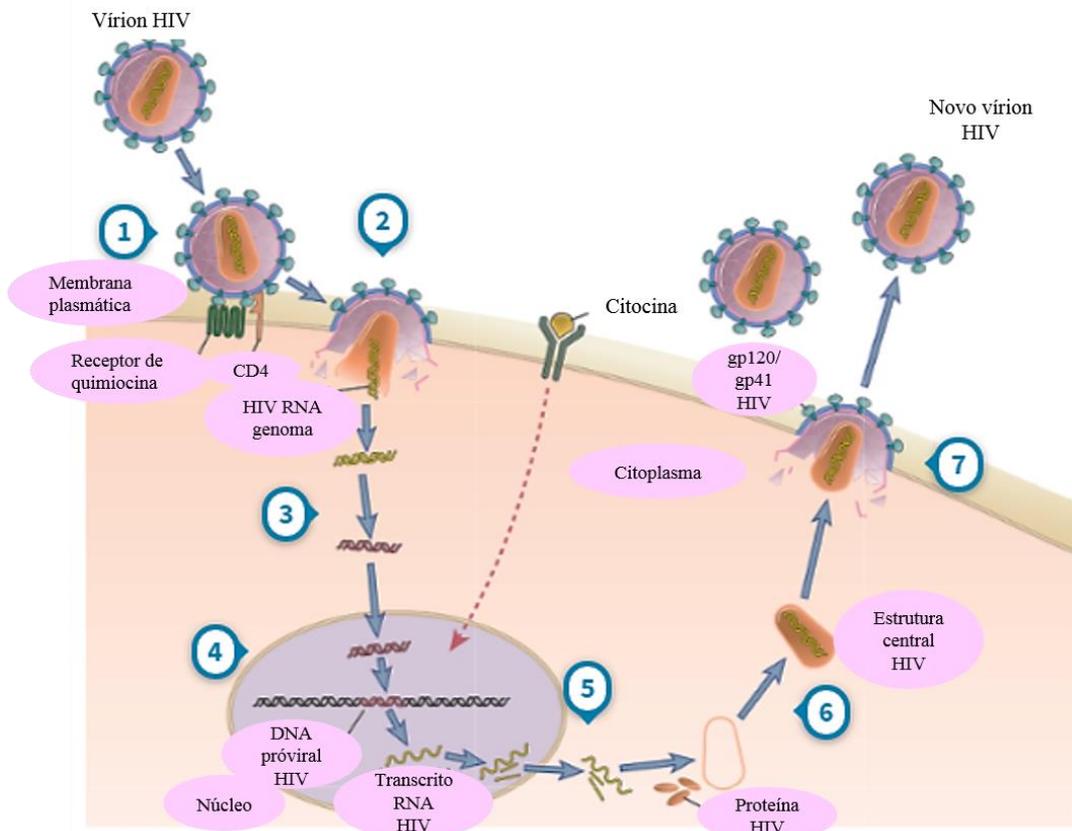


Figura 1.3 - Replicação do HIV.

Etapas da replicação do HIV: (1) Vírion ligando-se aos receptores de CD4 e de quimiocina; (2) Fusão da membrana do HIV com a da célula; entrada do genoma viral no citoplasma; (3) Transcriptase reversa medeia síntese de RNA proviral; (4) Integração do provírus no genoma da célula; (5) Ativação da célula por citocina; transcrição do genoma do HIV; transporte de RNAs *spliced* e *unspliced* para o citoplasma; (6) Síntese de proteínas do HIV; montagem da estrutura central do vírion; (7) Expressão de gp120/gp41 na superfície da células; brotamento do vírion maduro. Adaptado de Abbas e cols. (2012) (18).

O gene Vif, que codifica a proteína Vif, é o nosso alvo de estudo como antígeno heterólogo nos vírus recombinantes de FA 17D. Essa proteína é essencial para a replicação do vírus em células humanas como linfócitos T CD4⁺ e macrófagos, que são as principais células-alvo do HIV, que quando infectadas pelo vírus mutado HIV-1 com deleção de Vif (Δ Vif), produzem novas partículas virais não infecciosas (3, 37). De fato, Vif é vital para neutralizar

uma potente via antiviral do hospedeiro. Partículas virais produzidas sem Vif, são inativadas pela via de resposta imune inata.

Em 2002, Sheehy e cols. descobriram que uma proteína celular é o alvo de Vif (38); a subunidade 3G da deaminase do RNAm da apolipoproteína B - APOBEC3G ou A3G (*Apolipoprotein B-editing catalitic polypeptide 3G*) inicialmente conhecida como CEM-15 (39-41). Essa enzima é um membro da família de deaminases de citidinas (enzimas que modificam/editam ácidos nucleicos), e o seu nome foi-lhe atribuído pela homologia considerável com a primeira enzima desta família (APOBEC1) (3, 42).

A A3G e outros membros da família, tem como alvo o DNA de fita simples gerado por transcrição reversa, onde removem um grupo amina de uma citosina na cadeia negativa de cDNA, que é convertida em uracil, levando assim a uma mutação guanina para adenina na fita positiva de DNA. Essas mutações têm consequências importantes para o genoma viral, já que 20% de todas as mutações resultam em *stop* códons. Esses códons podem levar a uma abundância de proteínas truncadas no retículo endoplasmático, e assim manter um grande suprimento de peptídeos para a ligação a moléculas de MHC-I e indução de respostas de células T CD8⁺ (Figura 1.4) (43).

Ao se expressar A3G em células permissivas, essas adquirem um fenótipo não-permissivo, o que revelou que essa deaminase é o fator antiviral cuja expressão natural está restrita às células não-permissivas, e que permite inativar o HIV-1. Portanto, a proteína viral Vif é crucial para proteger o vírus da atividade antiviral da A3G, permitindo assim que o vírus replique em células que expressam esse fator de restrição (3, 37).

Estudos em primatas não humanos sugerem que a variação alélica nos genes de MHC de classe I e nas células T CD8⁺ que se ligam aos produtos do gene de MHC de classe I, possuem uma função crítica no controle da infecção por SIV e HIV (44, 45). Pela importância das células T CD8⁺ no controle da replicação viral, esforços tem sido feitos para se caracterizar epítomos restritos a MHC de classe I associados com respostas de células T CD8⁺ que controlam infecção. Muitos laboratórios trabalharam arduamente para mapear epítomos restritos a SIV por diferentes alelos de MCH de classe I, e identificar os epítomos associados com o controle da viremia. Entretanto, a hierarquia da imunodominância da resposta celular T CD8⁺ protetora, é complexa e a sua eficácia depende da ativação, potência, *fitness* viral e nos alelos de MHC de classe I expressos (4). O mapeamento dos alelos de MCH de classe I e dos epítomos que eles se ligam no contexto dos macacos controladores de elite, tem mostrado que as células T CD8⁺ nesses macacos parece focar na proteína Vif de SIV. Epítomos de Vif são apresentados por inúmeros alelos de MCH de classe I, incluindo aqueles que estão associados com o controle de elite espontâneo de SIV (Mamu-B*17 and Mamu-B*08) (4).

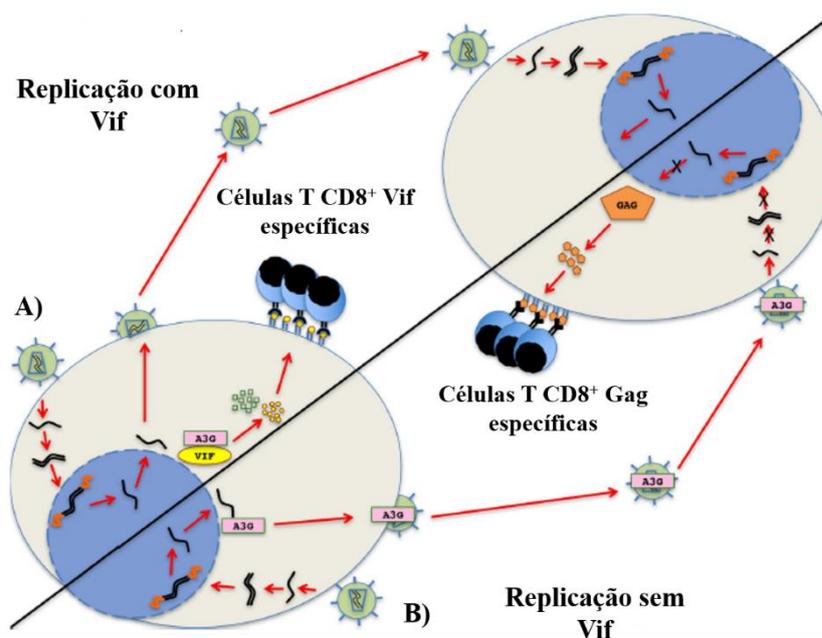


Figura 1.4 - Relação entre APOBEC3G, Vif, apresentação por MHC e resposta de células T citotóxicas.

Na presença de Vif: (A) Degradação proteossomal do complexo Vif/A3G limita a incorporação da A3G nos progenitores de vírion, evitando a hipermutação durante a infecção celular subsequente. Essa degradação proteossomal pode levar a um aumento da apresentação de epítopos de Vif por moléculas MHC-I e a resposta Vif específica de células T citotóxicas. A resposta de células T Vif específica pode ser a chave do controle da infecção HIV/SIV, se alvejarem as células que evadem a atividade da AG3. Na ausência de Vif: (B) A A3G é incorporada nos progenitores de vírion. Na infecção de células posteriormente, a A3G causa mutações durante a transcrição reversa do RNA viral, que resulta na replicação de vírus não competente. Adaptado de Silver e cols. (2017) (4).

1.1.2. Patogenia

O principal alvo do HIV, são as células T CD4⁺. A entrada do vírus ocorre por interações com o receptor CD4 e os co-receptores de quimiocinas; CCR5 ou CXCR4. Outras células expressando CD4 e receptores de quimiocinas também estão infectadas, como células T CD4⁺ em repouso, monócitos, macrófagos e células dendríticas. A infecção de células independente do receptor CD4 pelo HIV, pode acontecer em astrócitos e células epiteliais renais. Muitas proteínas hospedeiras interagem com proteínas do HIV ou o seu DNA, para restringir ou promover a replicação do vírus em tipos específicos de células (46).

A transmissão do HIV através das membranas mucosas é geralmente estabelecida por um vírus fundador, que tem propriedades fenotípicas únicas incluindo o uso de CCR5 em vez de CXCR4 para entrada, interações com células dendríticas e resistência ao interferon- α . A infecção do vírus fundador é seguida por um rápido aumento na replicação do HIV e, em seguida, uma indução impressionante de citocinas inflamatórias e quimiocinas, o que é um

contraste gritante com a resposta inicial mínima em outras infecções virais crônicas, como hepatite B ou hepatite C (46).

Nas primeiras semanas de infecção, os níveis de anticorpos séricos para as proteínas do HIV normalmente não são suficientemente elevados para permitir o diagnóstico de infecção por ensaio imunoenzimático (ELISA) e immunoblot, mas níveis elevados de RNA do HIV são facilmente detectáveis em plasma. Durante essas primeiras semanas de infecção, há uma profunda destruição de células de memória CCR5⁺ CD4⁺ no tecido intestinal nas infecções por SIV e HIV, mas curiosamente, sintomas gastrointestinais não são comuns durante esse período da infecção pelo HIV (47).

A viremia geralmente diminui à medida que os sintomas de infecção aguda se resolvem e um “ponto de ajuste” é estabelecido. Nos controladores de elite, os níveis de vírus no plasma são tipicamente abaixo dos níveis de detecção por ensaios comerciais (40 cópias / mL). Com a resolução dos sintomas, a pessoa infectada pelo HIV pode ficar completamente sem sinais ou sintomas de doença, mas ainda apresentar a depleção progressiva das células T CD4⁺ na circulação e nos linfonodos (48). A maioria das pessoas não apresentará um quadro de AIDS até que a contagem de células T CD4⁺ circulante seja de 200 células / mL ou menos. Porém, a magnitude da viremia é um preditor incompleto do ritmo de progressão da doença, enquanto marcadores de ativação sistêmica imune são preditores úteis do risco de progressão da doença (49).

As complicações clínicas da infecção pelo HIV não tratada, tipicamente envolvem complicações infecciosas ou neoplásicas, reflexivas da profunda deficiência da resposta imune mediada por células T. Assim, infecções atribuídas a organismos como *Pneumocystis jirovecii*, micobactérias, citomegalovírus, *Toxoplasma gondii*, e *Cryptococcus*, bem como a ocorrência de malignidades relacionadas a patógenos virais como sarcoma de Kaposi, e neoplasias como o linfoma não-Hodgkin; são comuns. Com a efetiva supressão da replicação do HIV após a administração da terapia anti-retroviral, a função imunológica normalmente melhora e os riscos para essas complicações que ameaçam a vida diminuem (48). Na era atual, e com acesso a uma combinação eficaz de terapias anti-retrovirais, a sobrevida prevista do paciente infectado pelo HIV pode se aproximar da população em geral, se o tratamento for iniciado precocemente (50).

1.1.3. Desenvolvimento de vacinas contra o HIV

Fazer com que a profilaxia pré-exposição (PrEP) se torne mais acessível a população, e desenvolver uma vacina contra o HIV, são as duas medidas chave para interromper o ciclo de transmissão do vírus. Até o momento, entretanto, de todas as vacinas testadas em macacos rhesus, modelo animal para HIV, somente uma foi capaz de induzir proteção completa (*sterile immunity*) contra SIV, em 50% dos macacos, após desafio. Essa estratégia vacinal utilizou o Adenovírus tipo 26 (Ad26) como vetor, expressando Gag, Env e Pol como *priming*, seguido de um *boost* com a proteína de envelope gp 140 purificada (51). Em humanos, entre mais de 100 protótipos vacinais (52), a RV144 HIV de 2009, foi a única capaz de produzir uma proteção modesta de 32% e proteção de curto prazo de 3 anos (53), enquanto todas as outras vacinas produziram resultados negativos nos ensaios clínicos.

A HIV Vaccine Trials Network (HVTN) é a maior colaboração internacional multidisciplinar financiada pelo setor público, facilitando o desenvolvimento de vacinas para prevenir HIV/AIDS. A HVTN conduz ensaios clínicos para avaliar experimentalmente, a segurança e imunogenicidade das vacinas. O ensaio clínico HVTN 505 (2009 a 2013), testou uma vacina de DNA (Gag, Env, Nef e Pol) como *priming*, seguida por um *boost* com vírus recombinantes de Adenovírus tipo 5 (Ad5) expressando Gag, Env e Pol (54). As imunizações cessaram em 2013 porque os resultados iniciais mostraram que a vacina era ineficiente em prevenir a infecção por HIV e diminuir a carga viral entre os participantes que se tornaram infectados pelo vírus (55).

Existem dois ensaios clínicos em andamento; HVTN 702 e HVTN 705. O HVTN 702 testa condições utilizadas nos ensaios da RV144 da Tailândia, porém com os imunógenos do subtipo C para serem utilizados em uma coorte da África do Sul. Um *boost* a mais tem sido utilizado para ajudar a manter a resposta humoral. O segundo ensaio clínico em andamento, HVTN 705, testa o Adenovírus tipo 26 (Ad26) com quatro sequências mosaico da proteína gp140 do subtipo C, seguido de um *boost* com a gp140 trimérica, para proteger mulheres da África subsaariana de 18-35 anos (56).

Uma outra estratégia ainda nos estágios iniciais de ensaios clínicos, envolve o teste de imunizações sequenciais com diferentes variantes das proteínas do HIV-1, com o objetivo de controlar e guiar a maturação de uma linhagem de anticorpos através da geração de anticorpos amplamente neutralizantes (bNAbs). Ainda podemos citar as outras abordagens que serão utilizadas, que envolvem adjuvantes alternativos ou formulações inovadoras, utilizando nanopartículas e lipossomos, assim como imunização intranasal para aumentar a imunidade de mucosa (57).

Vírus recombinantes expressando antígenos do HIV tem sido utilizados nos estudos de protótipos vacinais; como o Adenovírus tipo 5 (Ad5) no STEP trial (HVNT 504), Adenovírus tipo 26 (Ad26) no ensaio clínico HTNV 705, e canarypox no RV144. O vírus vacinal da FA 17D também tem sido utilizado como vetor para proteínas heterólogas do HIV/SIV. Estudos em macacos rhesus têm demonstrado que esse vetor é um bom indutor de resposta imune celular contra o SIV, sendo preferencialmente utilizado como *prime* em regimes vacinais (58, 59). A combinação de diferentes vetores vacinais em regimes *prime* e *boost*, que estimulem respostas imunes potentes tanto celular quanto humoral é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de uma vacina eficaz. No entanto, o antígeno ideal a ser expresso por tais vetores ainda necessita maiores esclarecimentos.

O emprego de vetores virais no desenvolvimento de novas vacinas recombinantes é fundamentado nas boas características de proteção e imunogenicidade de vacinas vivas atenuadas comerciais, a partir das quais estas plataformas virais de expressão são originadas. Neste sentido, a vacina FA 17D (VFA 17D) é considerada uma das mais eficazes disponíveis no momento. Diferentes abordagens técnicas são possíveis baseadas no uso da plataforma de expressão do genoma do vírus FA 17D e variarão de acordo com o antígeno a ser expresso. As plataformas virais desenvolvidas até recentemente não permitiam a introdução de sequências heterólogas maiores que 50 pb, sem o comprometimento da estrutura e replicação do vírus. Em função disto, nosso grupo desenvolveu uma nova abordagem que permite a expressão de cassetes proteicos na região intergênica E/NS1. Até o momento, foram obtidos por esta metodologia vírus FA 17D um fragmento de 120 aminoácidos da proteína Asp-2 de *Trypanosoma cruzi*, vírus recombinantes para fragmentos dos genes Gag, Vif e Nef de SIV, os fragmentos 19 kDa da proteína MSP-1 de *Plasmodium falciparum* e *P.vivax* e o antígeno de câncer testicular NY-ESO-1.

1.2. A vacina da febre amarela 17D

Em 1901, Walter Reed comprovou a etiologia viral da febre amarela e sua transmissão através de mosquitos, como postulado anteriormente pelo pesquisador cubano Carlos Juan Finlay (60, 61). Em 1927, Adrian Stokes isolou pela primeira vez o agente causador da febre amarela, a partir do sangue de um indivíduo infectado, um africano chamado Asibi. A cepa viral resultante deste isolamento, que recebeu o mesmo nome, é utilizada até hoje em diversas pesquisas e possibilitou o desenvolvimento de uma forma mais eficaz de combate à doença: uma vacina (62). Após o estabelecimento da cepa viral Asibi por Stokes e cols. (1928) e de uma

cepa francesa no mesmo ano, iniciaram-se as pesquisas na busca de uma vacina na Inglaterra, nos Estados Unidos, no Oeste da África e no Brasil (63).

Max Theiler em 1937 (64, 65) foi capaz de atenuar empiricamente o vírus selvagem, isolado por Adrian Stokes (66), desenvolvendo então a vacina contra febre amarela constituída pela cepa viva atenuada, chamada de 17D. Theiler submeteu esta cepa selvagem a 18 passagens consecutivas em tecidos embrionários de camundongo, 58 passagens em tecido embrionário de galinha e 128 passagens em tecidos embrionários de galinha denervados na tentativa de reduzir o neurotropismo viral. Testes em animais demonstraram que após as passagens seriadas em diferentes sistemas de cultivo, o vírus havia perdido o viscerotropismo, o neurotropismo e a capacidade de se replicar em mosquitos (67).

Desta linhagem viral atenuada foi feito cultivo seriado neste último sistema, dando origem à linhagem 17D na passagem 180, que foi posteriormente passada independentemente produzindo as subcepas 17DD e 17D-204 nas passagens 195 e 204, respectivamente. A cepa 17DD foi novamente cultivada até a passagem 243 e sofreu mais 43 passagens em embriões de galinha para chegar ao lote semente vacinal (passagem 286) utilizado para a produção da vacina no Brasil (68), Bio-Manguinhos/Fiocruz. A cepa 17D 204 foi passada novamente e deu origem à cepa Colômbia 88, que originou as cepas atualmente utilizadas para a produção de vacinas na França (passagem 234) e nos Estados Unidos (passagem 235) (Figura 1.5) (69-71).

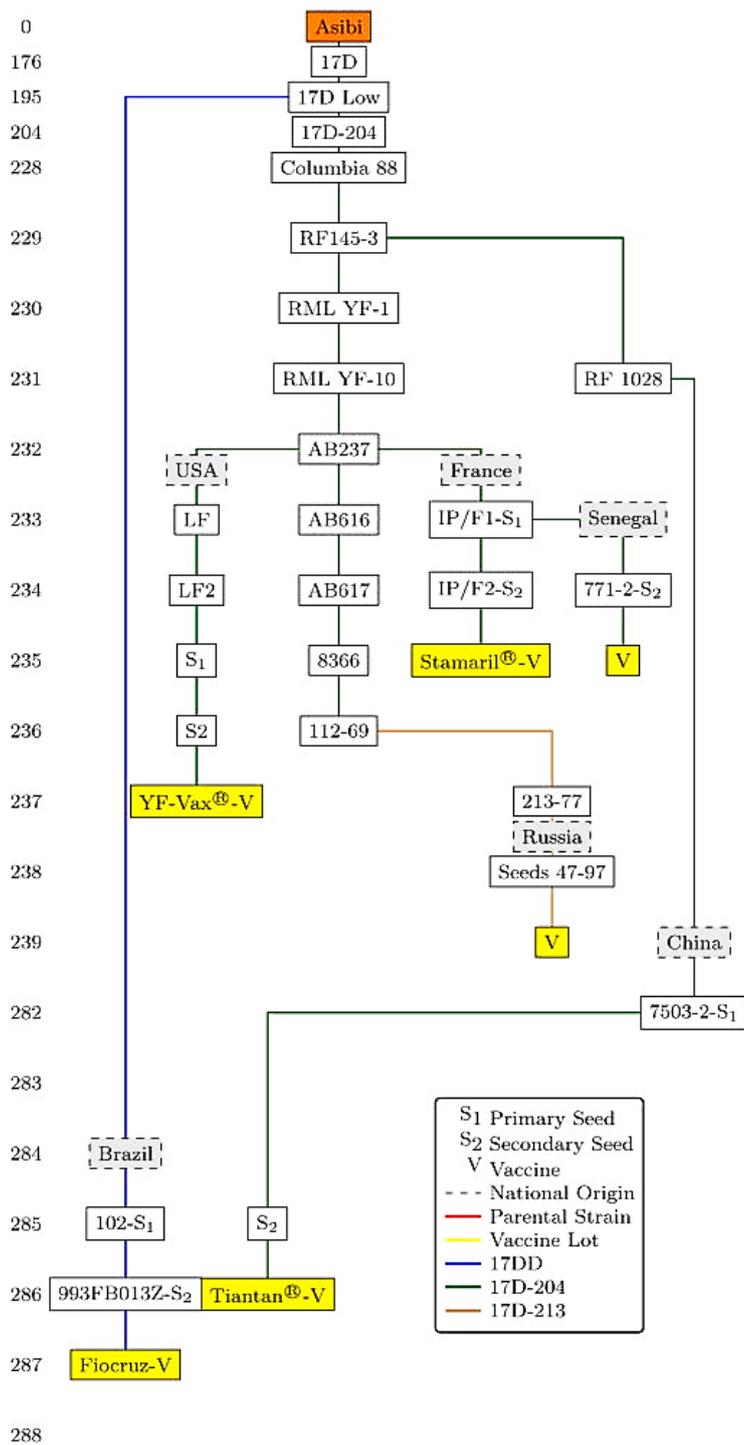


Figura 1.5 - Linhagens da vacina FA 17D e subcepas derivadas, considerando somente a produção atual de vacinas 17D.

Subcepas 17DD, 17D-204 e 17D-213 estão mostradas nas linhas em azul, verde e marrom, respectivamente. (S1) Lote semente primário; (S2) Lote semente secundário; (V) Lote final da vacina. Monath (2013), OMS (2010) (72, 73).

A última grande epidemia urbana em território brasileiro ocorreu em 1929 na cidade do Rio de Janeiro. Já os últimos casos urbanos reconhecidos foram reportados no município de Sena Madureira, no Estado do Acre e ocorreram em 1942. A necessidade de controlar tão grave problema de saúde pública acelerou as etapas de ensaio clínico e, tão logo foi constatada sua capacidade imunogênica, a nova vacina foi testada em 100 voluntários humanos da Fundação Rockefeller, em Nova York (74).

Em janeiro de 1937 a vacina foi trazida ao Brasil por Hugh H. Smith para a realização de pesquisas posteriores. Em março daquele ano, passou a ser fabricada no Instituto Oswaldo Cruz, hoje Bio-Manguinhos e, nesse mesmo ano, foi usada pela primeira vez em larga escala no Município de Varginha, em Minas Gerais, estendendo-se posteriormente para outros municípios recém-afetados pela febre amarela silvestre. Em seis meses foram vacinadas 38.077 pessoas (75, 76). Essa campanha foi um marco em termos de logística, registro, controle e técnicas de vacinação em grande escala (77).

Atualmente a vacina contra febre amarela é produzida por 6 centros: Instituto Pasteur em Dakar, no Senegal; Sanofi Pasteur, nos Estados Unidos e na França; Federal State Unitary Enterprise of Chumakov, na Rússia; Beijing Tiantan Biological Products Co. Ltda., na China; e Bio-Manguinhos (Fiocruz), no Brasil. Este último representa o maior produtor mundial e o único a utilizar a subcepa 17DD. A vacina é produzida através do sistema de lote semente para assegurar sua estabilidade genética e segurança. Cada lote semente é submetido a testes de neurotropismo e viscerotropismo em primatas antes de ser liberado para a população (78). Estima-se que mais de 540 milhões de doses da vacina 17D já tenham sido aplicadas em todo o mundo, mostrando excelentes níveis de segurança e eficácia. Esta tem sido considerada uma das mais seguras e eficientes vacinas desenvolvidas até hoje. Devido ao grande sucesso desta vacina, Max Theiler venceu o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, em 1951 (79).

A comparação entre todas as sequências completas de genomas dos vírus vacinais derivados da cepa 17D (em um total de 13, sendo 9 derivados de 17D 204 e 4 de 17DD) atualmente disponíveis, mostram uma homologia de 99,2% entre eles. Um total de 84 mudanças nucleotídicas foram observadas ao longo destes genomas, das quais 29 resultaram em mudanças de aminoácidos, principalmente localizadas na proteína de Envelope (E) (70). Em relação às bases da atenuação/virulência destas cepas, comparando-se os genomas da cepa selvagem Asibi com os de 17D 204, 17DD e 17D 213 (uma outra cepa vacinal obtida por passagens adicionais da cepa 17D 204 livre de leucovírus) demonstraram que havia 48 mutações comuns aos vírus vacinais e que não existiam no vírus Asibi, e que, portanto, poderiam estar relacionadas à atenuação (80).

Em 1988 a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendou a inclusão da vacina de febre amarela nos programas de imunização de rotina para crianças a partir de 6 meses de idade nos países com risco da doença e iniciou campanhas de vacinação em massa, recomendando a vacinação a cada 10 anos (81). Após um encontro do “Strategic Advisory Group of Experts on Immunization”, em 2013, a OMS determinou que não é necessário revacinação de indivíduos imunocompetentes (82), devido a diversos estudos que constataram que uma única dose da vacina pode conferir proteção por toda a vida (83). Entretanto, esta definição ainda é contraditória, pois já foi demonstrado que em alguns indivíduos vacinados o nível de anticorpos neutralizantes contra febre amarela pode se tornar indetectável. Nestes casos, uma segunda dose desta vacina poderia trazer benefícios (84, 85).

Como medida de emergência, a dose fracionada da vacina da febre amarela já foi utilizada em campanhas de vacinação em massa para ajudar a controlar possíveis surtos em casos onde o fornecimento de vacina é limitado. A medida foi adotada como estratégia para controlar os surtos de febre amarela em Angola e na República Democrática do Congo. Em 2016, o Grupo Consultivo Estratégico de Especialistas da OMS (SAGE) sobre Imunização revisou evidências existentes e concluiu que o fracionamento da vacina produzida em Bio-Manguinhos/Fiocruz na proporção de um quinto da dose padrão poderia ser uma opção segura e eficaz para o controle de surtos urbanos em situação de escassez de vacina.

A dose fracionada é uma parte da dose padrão da vacina da febre amarela, que confere proteção similar. Estudos mostram que a vacina de febre amarela, administrada até com um 1/5 da dose padrão é segura e fornece imunidade à doença. Dessa forma, o princípio de eficácia mantém-se o mesmo. Estudos recentes de duração da imunidade com a vacina de febre amarela de Bio-Manguinhos/Fiocruz sustenta a proteção similar à dose padrão e dão suporte à proposta de fracionamento da dose da vacina, demonstrando que a proporção de soroprotégidos é semelhante à da dose padrão, por pelo menos oito anos (86-88).

Os efeitos adversos da vacina FA 17D são raros. As taxas desses eventos pós-imunização, com algum comprometimento de fígado, rins ou sistema nervoso, levando à hospitalização, estão entre 0,4 e 0,8 para cada 100 mil pessoas vacinadas. O risco é maior para pessoas com mais de 60 anos e pessoas imunocomprometidas (que só devem ser vacinadas após avaliação de risco-benefício) (89).

1.2.1. Resposta imunológica ao vírus da febre amarela vacinal 17D

A vacina contra febre amarela é considerada uma das mais eficazes vacinas desenvolvidas até hoje, promovendo, com apenas uma dose, proteção em mais de 90% dos indivíduos vacinados (90). O correlato de proteção é a presença de anticorpos neutralizantes, mensuráveis pelo teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT, do inglês *plaque reduction neutralization test*) (91). A produção de anticorpos neutralizantes é rápida, iniciando-se a partir de 7 dias pós-vacinação, e pode proteger por mais de 40 anos ou por toda a vida (84, 92). O mecanismo de indução desta rápida e duradoura resposta imune tem sido intensamente estudado e evidências apontam para a importância de uma forte estimulação da resposta imune inata como responsável pela indução da robusta resposta imune adaptativa humoral e celular (Figura 1.6) (93).

A vacinação com o vírus FA 17D resulta em uma infecção viral aguda, onde a replicação viral tem o seu pico em 5 a 7 dias e é indetectável no dia 14. Anticorpos neutralizantes IgM são rapidamente induzidos e tem o seu pico em 2 semanas antes de declinar, mas persistem por pelo menos 18 meses. Anticorpos neutralizantes IgG são produzidos mais lentamente e podem persistir por até 40 anos. A resposta de células T CD8⁺ aparece rapidamente após a imunização, com o pico em 15 dias e declina chegando a níveis perto do normal no dia 30, e ocorre uma rápida resposta de células T CD4⁺ com uma mistura de T *helper* 1 (T_H1) e T *helper* 2 (T_H2) (94-96) (Figura 1.6 A).

A replicação viral induz uma forte resposta imune inata nas primeiras duas semanas pós-vacinação, com ativação de diferentes subtipos de células dendríticas (mieloide e plasmocitoide) através de múltiplos receptores de reconhecimento de patógenos como receptores tipo-Toll (TLRs), RIG-I (gene indutor de ácido retinóico-I) e MDA5 (gene associado a diferenciação de melanoma-5). A estimulação através de múltiplos TLRs resulta em uma resposta imune balanceada T_H1 e T_H2 (94, 97). A estimulação de TLR de células dendríticas plasmocitoides induz a ativação da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR; também conhecido como FRAP1), e os seus mediadores *downstream*; proteína ribossomal S6 quinase beta-1 e beta-2, que medeiam a fosforilação do fator de regulação 7 de interferon (IRF7). Esse evento leva a indução de interferons tipo I (IFNs), como o IFN- α , que ativa células T CD8⁺ (93, 98) (Figura 1.6 B).

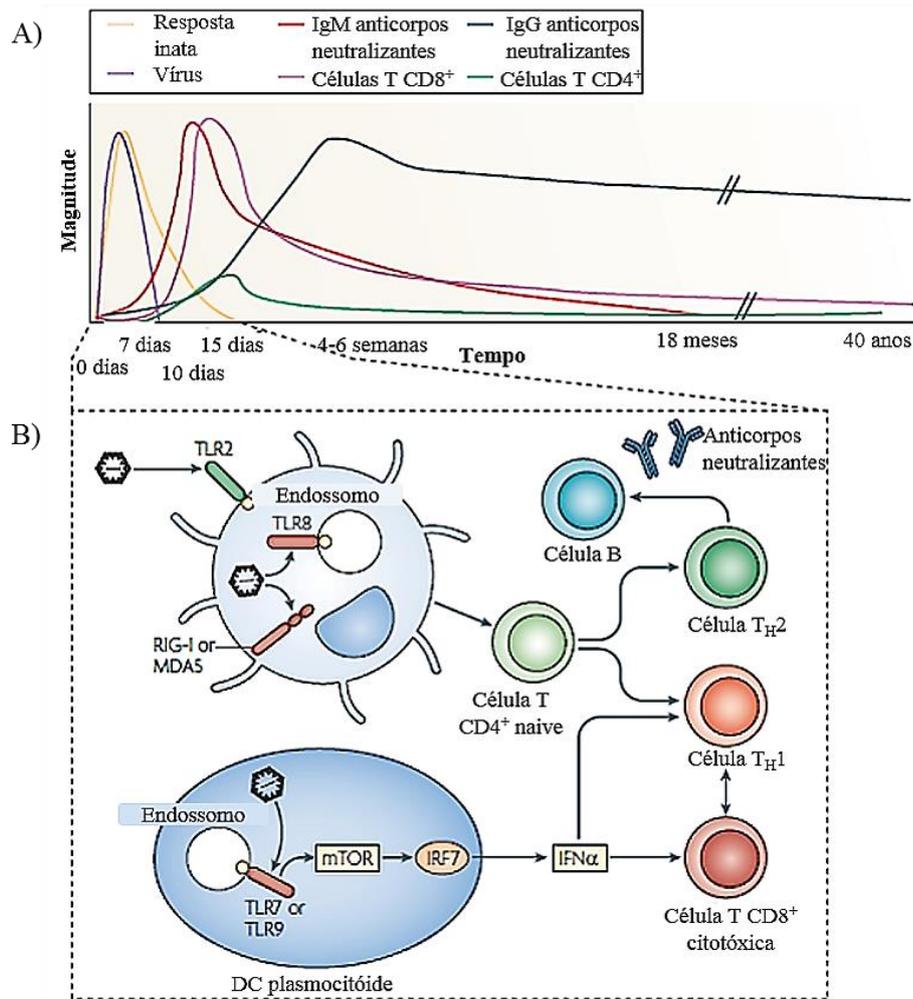


Figura 1.6 - Resposta imune ao vírus FA 17D.

(A) Picos de resposta imune celular e humoral após imunização com o vírus FA 17D; (B) Reconhecimento do vírus FA 17D através de múltiplos receptores *Toll-like*, resultando em uma resposta imune TH1 e TH2 balanceada. Adaptado de Pulendran (2009) (93).

A imunidade inata é responsável pelo controle inicial da infecção pelo vírus da febre amarela e induz imunidade adaptativa celular T e B com a formação de células de memória (99). Martins e cols. estudaram 10 indivíduos saudáveis que foram vacinados com o vírus FA 17DD. Ativação de neutrófilos foi observada com aumento de expressão de CD28 nos dias 7 e 15 pós-vacinação, e aumento de expressão de CD23 no dia 30 pós-vacinação. Eosinófilos também foram ativados com aumento de expressão de CD28 e antígeno leucocitário humano (HLA)-DR no dia 30 pós-vacinação. No dia 7, houve um aumento na frequência de monócitos ativados (CD14⁺ CD16^{high}), e no dia 7 e 15 de monócitos pró-inflamatórios (CD14⁺ CD16⁺ HLA-DR⁺⁺). Células *natural killers* (NK) ativadas (CD3⁻CD16⁻CD56⁺) diminuíram no dia 7, provavelmente como resultado de um efeito regulatório, que também se manifestou em aumento da expressão de receptor de IL-10 nos dias 15 e 30 pós-vacinação (99).

A ativação e modulação do sistema imune pela resposta inata ocorre simultaneamente, como indicado pela correlação positiva entre os níveis de neutrófilos CD28 e expressão do receptor de IL-10. As células NK possuem um papel central na resposta inicial ao antígeno da vacina, controlando viremia e contribuindo para a maturação de células dendríticas. Essas células são responsáveis pelo aumento da expressão de receptores *Toll-like* 3 e 9 na presença de IL-12; e adicionalmente, depois do contato com a vacina FA 17DD, ocorre um aumento na expressão de CD38 e CD16 na superfície das células NK, o que caracteriza a intensificação de atividade citotóxica (100).

Campi-Azevedo e cols. compararam o perfil de citocinas produzidos pelas células da imunidade inata depois da imunização em crianças com os vírus FA 17D-213/77 e FA 17DD. Um perfil proeminente pró-inflamatório com altos níveis de IL-2 e TNF- α produzidas por neutrófilos e monócitos foi observado com a vacina FA 17DD. Enquanto a vacina FA 17D-213/77 apresentou um perfil com tendência regulatória, com alta expressão de IL-4 e IL-10 por neutrófilos (101).

Com relação à indução de resposta adaptativa celular, a vacina FA 17D é considerada como potente indutora de resposta imune de célula T CD4⁺ como T CD8⁺, particularmente contra proteínas estruturais (102, 103). Também no estudo de Martins e cols., foi demonstrado que indivíduos saudáveis quando submetidos à imunização com a cepa 17DD, apresentam inicialmente ativação das células T CD4⁺ (sete dias após imunização), produzindo citocinas T_H1, sendo relacionadas com maiores níveis de anticorpos neutralizantes; seguida pelas células CD19⁺ (linfócitos B), que são ativadas 15 dias após imunização e, por último, as células T CD8⁺ (ativadas 30 dias após a vacinação) (102). No sétimo dia pós-vacinação, também é possível encontrar células T específicas que produzem IL-4, o que é condizente com a capacidade do vírus vacinal FA 17D, de induzir perfis mistos de citocinas, consequência de seu reconhecimento via múltiplos receptores *Toll-like* (94, 96, 102, 104).

Os estudos acerca da imunidade conferida pela vacina 17D apontam que são os anticorpos neutralizantes, produzidos principalmente contra a proteína de envelope (E), os responsáveis pela proteção dos hospedeiros expostos à infecção natural e apontam o fator transcricional TNFRSF17 como 100% preditor da produção de anticorpos neutralizantes contra o vírus (92). Anticorpos contra a proteína não estrutural NS1 também parecem ser capazes de mediar a proteção em camundongos e macacos (105, 106).

Células T CD8⁺ humanas que respondem ao vírus FA 17D, reconhecem epítomos das proteínas E, NS1, NS2B e NS3. Um estudo em humanos confirmou o aumento de células T CD8⁺ efectoras após a imunização com o vírus FA 17D, onde eles monitoraram a expressão dos marcadores de ativação CD38, HLA-DR e Ki67, e a diminuição da expressão da proteína BCL-

2 nas células T no sangue periférico. O pico da resposta T CD8⁺ foi observada no dia 15 pós-imunização, quando 4-13% das células T CD8⁺ periféricas co-expressaram CD38 e HLA-DR. A imunização induziu expansão massiva da população de células T CD8⁺ ativadas, que diminuiu após 15 dias, retornando a níveis normais no dia 30 pós-imunização, e nesse ponto, as células perdem o fenótipo efetor, com a redução da expressão de Ki67, e se diferenciam em células de memória expressando BCL-2, CD127 e CD45RA (93).

As células T CD8⁺ de memória humanas são classificadas de acordo com a expressão de CD45RA e CCR7, em células de memória central (CD45RA⁻ CCR7⁺), de memória efetora (CD45RA⁻ CCR7⁻) e células efectoras terminalmente diferenciadas (CD45RA⁺ CCR7⁻). As células T CD8⁺ possuem várias funções, inclusive a de ação citotóxica direta e secreção de citocinas antivirais, como IFN- γ , TNF- α , IL-2 e proteína inflamatória de macrófago (MIP-1a) (107). A função citotóxica se dá pela ação das moléculas perforina e granzima A e B (107). Essas células adquirem potencial citotóxico no dia 12 pós-imunização, que continua até 6 meses. Adicionalmente, uma única dose da vacina é capaz de gerar células T CD8⁺ de memória por 5-10 anos, independente da reexposição aos antígenos virais (108).

Os níveis das citocinas regulatórias aumentam gradualmente, com pico no dia 30 pós-imunização (IL-4 e IL-5; a exceção é a IL-10, que aumenta no dia 3 e declina no dia 5, e apresenta outro aumento entre os dias 6 e 7). O declínio dos níveis de IL-10 durante o pico de viremia permite o desenvolvimento e maturação das células apresentadoras de antígenos e aumenta a expressão de moléculas MHC (109).

Uma única dose da vacina FA 17D induz amplo espectro de resposta imune, incluindo resposta T citotóxica, um perfil balanceado T_H1 e T_H2, e anticorpos neutralizantes que podem persistir por mais de 30 anos. O mecanismo de proteção está diretamente relacionado aos anticorpos neutralizantes, apesar das células T citotóxicas também serem importantes (110).

1.2.2. O uso do vírus vacinal da febre amarela 17D como vetor de epítopos heterólogos

O vírus vacinal da FA 17D é uma das vacinas mais bem-sucedidas até a presente data. Possui uma metodologia de produção bem definida e eficiente, com controle de qualidade com testes de neurovirulência em macacos, induz imunidade por até 35-40 anos, tem baixo custo e é dose única. Com essas características, esse vírus se tornou interessante para ser utilizado com vetor de expressão de antígenos heterólogos, o que pode levar ao desenvolvimento de novas vacinas (111).

1.2.2.1. Vírus quiméricos de FA 17D

Para o desenvolvimento de novas vacinas baseadas no vírus da FA 17D como vetor, é necessário compreender o seu genoma. Esse consiste em uma fita simples positiva de RNA com aproximadamente 11 kb de comprimento, codificando uma única poliproteína precursora. Essa poliproteína é processada por proteases celulares e virais, gerando as proteínas estruturais virais que compõe a partícula viral, nomeadas de capsídeo (C), membrana (M) e seu precursor (prM), e envelope (E). Além das proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, que possuem diferentes funções na replicação viral (112).

O desenvolvimento da tecnologia do clone infeccioso permitiu a manipulação genética de vírus para a introdução de modificações gênicas, deleções ou inserções de novos genes. A primeira abordagem desenvolvida para a utilização do vírus FA 17D como vetor foi a troca dos genes que codificam as proteínas prM e E pelos genes das mesmas proteínas de outros flavivírus, utilizando-se assim o arcabouço atenuado do vírus da febre amarela para induzir anticorpos para o outro flavivírus em questão (Figura 1.7) (111, 113). Os genes do vírus da FA 17D prM e E foram substituídos pelos genes correspondentes do vírus da encefalite japonesa (JEV), do vírus do Oeste do Nilo (WNV), dos vírus da dengue (DENV) e outros. Essa abordagem foi possível, em parte, pela similaridade dos genes dos flavivírus e também porque as proteínas codificadas por esses genes são funcionalmente essenciais para a proliferação (114). O desenvolvimento destas vacinas quiméricas só foi possível graças à obtenção de plasmídeos contendo o genoma inteiro do vírus FA 17D. Estes plasmídeos puderam ser manipulados e transcritos *in vitro*, gerando RNAs virais infecciosos, que após transfectados em células suscetíveis, permitiam a recuperação de partículas virais íntegras (115).

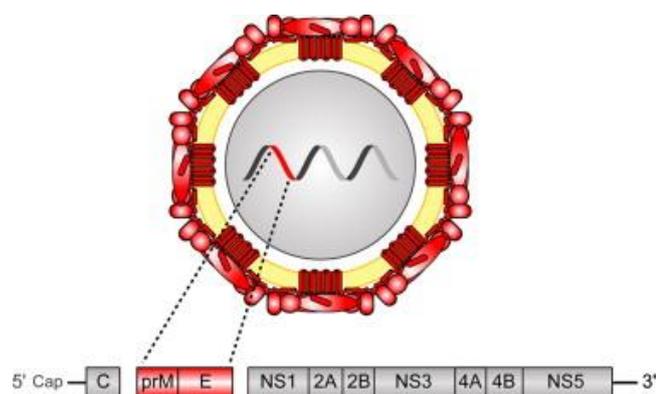


Figura 1.7 - Representação esquemática de um vírus quimérico de FA 17D como vetor carregando genes de envelope de um outro vírus.

As sequências que codificam as proteínas prM e E do vírus alvo da vacina são inseridos no genoma de FA 17D, substituindo os genes prM e E originais, resultando em uma partícula viral quimérica coberta pelas proteínas de envelope heterólogas (vermelho). Heinz (2012) (113).

Chambers e cols. (116) em 1999 construíram um vírus quimérico contendo as proteínas de envelope da cepa atenuada SA14-14-2 do vírus da encefalite japonesa (JEV) e o restante do genoma do vírus FA 17D, que foi desenvolvido como vacina por Guirakhoo e cols., que também foram os primeiros a construírem o vírus quimérico FA 17D com o gene de envelope do vírus da dengue tipo 2 (DENV-2) (117). Nosso grupo também investigou o potencial vacinal de vírus quiméricos de FA 17D e DENV, demonstrando a sua capacidade de indução de anticorpos neutralizantes em modelo murino e primatas não-humanos, e que esses vírus exibem maior grau de atenuação que o FA 17D (118-120).

Uma vacina quimérica contra o vírus da encefalite japonesa (JEV) foi desenvolvida pela Sanofi Pasteur, utilizando o vírus da FA17D como vetor, substituindo os genes que codificam as proteínas prM e E pelos genes do vírus da Encefalite Japonesa (ChimeriVax/Imojev). Estudos clínicos revelaram excelente imunogenicidade sem problemas com a segurança e a vacina foi então licenciada na Austrália (111, 121, 122).

A Sanofi Pasteur também desenvolveu a vacina ChimeriVax-DEN, contendo proteínas de envelope do vírus da dengue no vírus da FA 17D como vetor, em uma formulação tetravalente contendo vírus quiméricos para cada sorotipo de dengue, também chamada CYD-TDV. Esta vacina demonstrou altos níveis de imunogenicidade e segurança nos testes clínicos de fase I e II e encontra-se atualmente em fase III. Porém, estudos clínicos de fase IIb e III realizados na Ásia e América Latina reportaram que apesar de boa proteção contra os sorotipos 1, 3 e 4, a vacina apresentou limitado grau de proteção para o sorotipo 2, o mais prevalente (123, 124). Posteriormente, depois de uma avaliação dos dados de ensaios clínicos, a Sanofi alertou em 29 de novembro de 2017, que a vacina pode aumentar o risco de dengue severa, em circunstâncias específicas. Em indivíduos soronegativos antes da imunização, a vacina parece

umentar o grau de severidade da doença, em uma infecção posterior pelo vírus da dengue (125).

Utilizando a mesma plataforma das vacinas ChimeriVax, onde os genes prM e E do vírus da FA 17D são substituídos por genes heterólogos, a Sanofi Pasteur está desenvolvendo a ChimeriVax-Zika, onde os resultados em modelo murino já foram publicados em 2018. Os autores concluíram que esse candidato vacinal é altamente atenuado, mantendo forte imunogenicidade e habilidade de se replicar em células Vero, e sugerem que a próxima etapa será avaliar a vacina em outros modelos animais, como primatas não-humanos, e que posteriormente será avaliada se está apta para estudos clínicos em humanos e produção em escala comercial (126).

1.2.2.2. Vírus recombinantes de FA 17D

A segunda abordagem do uso do vírus FA 17D como vetor foi a inserção de sequências pequenas codificando epítomos de antígenos no seu genoma, em sítios intragênicos ou intergênicos (Figura 1.8). O sistema vetorial com esse vírus, também foi desenvolvido para a expressão de fragmentos maiores de genes, onde três alternativas de expressão de polipeptídeos foram estabelecidos: (1) a inserção de genes heterólogos na região intergênica E/NS1, (2) inserção no gene de capsídeo (C), e (3) a criação de moléculas bicistrônicas de RNA viral (114).

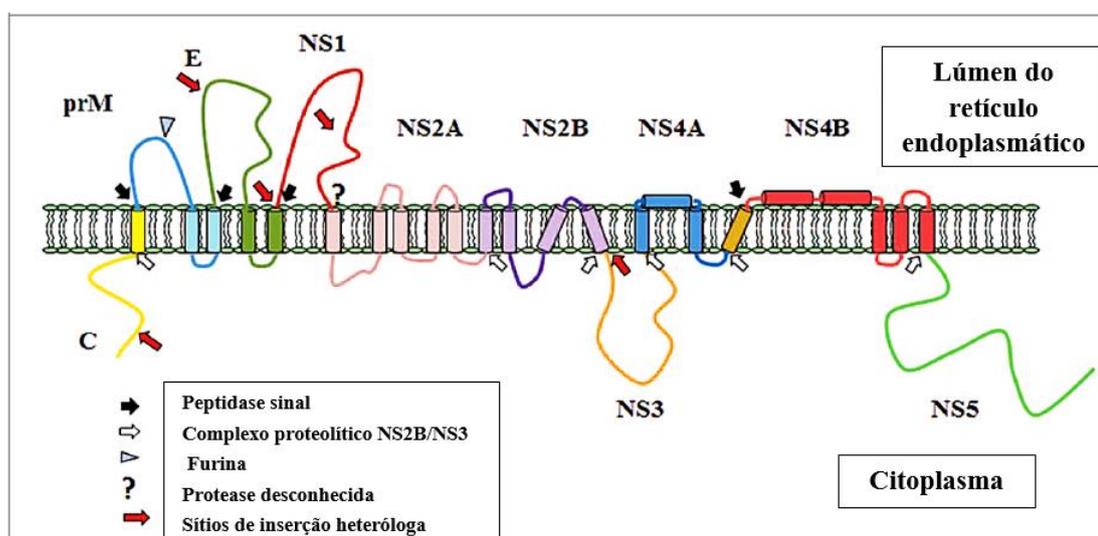


Figura 1.8 - Inserção de sequências heterólogas no genoma do vírus FA 17D.

Arranjo topológico das proteínas do vírus FA 17D e as regiões em que foi possível expressar sequências heterólogas, indicadas pelas setas vermelhas. No lado citoplasmático, as proteínas virais são processadas pelo complexo proteolítico NS2B/NS3 (setas brancas), e no lado do retículo endoplasmático pelas peptidases sinal, furina, e proteases desconhecidas que clivam o carboxi-terminal de NS1. Adaptado de Bonaldo e cols. (2014) (114).

McAllister e cols. (2000) foram os primeiros a utilizar a abordagem de expressão de epítomos pequenos no vetor FA 17D (127). Nesse estudo, um epítomo pequeno imunodominante de células T citotóxicas de ovalbumina (SIINFEKL) foi expresso na junção dos genes NS2B e NS3. Entretanto, a sequência heteróloga clonada nas junções de NS2A-NS2B, NS3-NS4A, e NS4A-NS4B não permitiram a recuperação de vírus viável. A mesma estratégia de clonagem foi empregada em um outro estudo, para expressar epítomos de células T CD8⁺ de *Plasmodium yoelli* (128). Esse estudo demonstrou que os vírus recombinantes de FA 17D protegeram os camundongos imunizados contra desafio letal com o parasita da malária. Porém, em dois estudos de Nogueira e cols. (2011 e 2013), que avaliaram a capacidade de diferentes recombinantes de FA 17D em induzir resposta imune protetora contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, expressando epítomos TEWETGQI de ASP-2 (proteína 2 de superfície de amastigotas) entre NS2B e NS3, houve somente proteção parcial depois do desafio com *T.cruzi* (129, 130).

Uma outra estratégia onde se utiliza o vírus FA 17D como vetor para antígenos heterólogos, é a expressão de epítomos na proteína E. Nosso laboratório inseriu um epítomo imunodominante para células B, de uma proteína de superfície do protozoário *Plasmodium falciparum* no *loop fg* da proteína E do vírus FA 17D. Uma das maiores preocupações em se inserir epítomos na proteína E, é o fato dela ser o alvo principal para a resposta de neutralização humoral. Ela possui epítomos de hemaglutinação e neutralização, e medeia reconhecimento celular por receptores e a entrada na célula. Contudo, o *loop fg* da proteína E está localizado no domínio II, distante do domínio III, onde se localiza o receptor de reconhecimento celular, e por isso, não alteraria sua atenuação para humanos e macacos (131). A expressão de epítomos na proteína E é uma abordagem interessante, já que essa proteína induz resposta imune dominante de MCH de classe I e II (103, 132, 133).

Uma das possibilidades de expressar sequências heterólogas mais longas, em geral até 2 kb, no genoma do vírus FA 17D, consiste na inserção entre os genes que codificam as proteínas E e NS1. Essa estratégia se deve ao fato de que na organização genômica de flavivírus, a região intergênia E/NS1 representa a mudança funcional de genes estruturais e não estruturais, e por isso, inserções heterólogas longas podem ser mais bem acomodadas nessa região, induzindo menores distúrbios no ciclo viral, em relação a outros sítios. O primeiro gene a ser inserido com esta metodologia foi o da proteína fluorescente EGFP (*enhanced green fluorescent protein*).

Em uma primeira abordagem, os primeiros 9 aminoácidos da proteína NS1 foram duplicados no C-terminal da proteína heteróloga, garantindo assim a clivagem adequada pela peptidase sinal celular presente no lúmen do retículo endoplasmático. Além disto os últimos

100 aminoácidos da proteína E, referentes à haste âncora (HA) completa, foram duplicados na extremidade N-terminal do inserto para garantir a correta topologia de membrana da poliproteína precursora e mantendo assim o peptídeo sinal de translocação da proteína NS1 (Figura 1.9). Estes motivos foram fusionados a proteína heteróloga para que a poliproteína viral fosse corretamente expressa e processada, além de permitir a correta localização das proteínas virais ao longo da membrana do retículo endoplasmático.

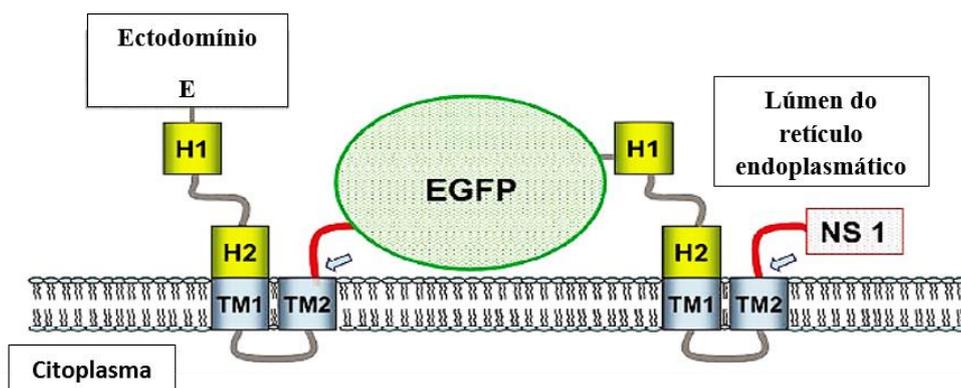


Figura 1.9 - Esquema da expressão de genes heterólogos inseridos entre os genes das proteínas E e NS1 de FA 17D.

Topologia dos elementos haste-âncora (H1, CS, H2, TM1 e TM2) da proteína E e C-terminal da NS1 duplicados, flanqueando a proteína heteróloga, em relação à membrana do retículo endoplasmático durante a síntese da poliproteína precursora viral. As setas azuis indicam os sítios de clivagem pela peptidase sinal celular no lúmen do retículo endoplasmático. Adaptado de Bonaldo e cols. (2007) (134).

Nosso grupo construiu e regenerou vírus da FA 17D e FA 17D/DENV-4 expressando o gene da proteína fluorescente EGFP, entre E e NS1; metodologia que gerou uma patente em outubro de 2005 (134). Os vírus foram caracterizados quanto a expressão do inserto heterólogo, estabilidade genética e imunogenicidade. Durante o estudo foi demonstrado que a proteína heteróloga ficava retida no retículo endoplasmático, porém esta construção gerou vírus recombinantes estáveis até pelo menos a décima passagem em cultura de células Vero e capazes de induzir produção de anticorpos específicos para o vírus FA e para a GFP. Apesar de alcançado aceitável grau de estabilidade genética, estes vírus recombinantes apresentavam cinética de replicação mais lenta que o vírus parental, o que poderia comprometer sua imunogenicidade. O desenvolvimento desta metodologia permitiu o estabelecimento de uma colaboração com o grupo do Dr. David Watkins, hoje na Universidade de Miami, para utilizar o vírus da FA 17D como vetor de genes do HIV. Vírus recombinantes do vírus FA 17D expressando proteínas do vírus da imunodeficiência símia (SIV) foram construídos e avaliados

quanto a sua imunogenicidade em camundongos e macacos rhesus (*Macaca mulatta*) (seção 1.2.3).

Com o objetivo de alcançar maiores taxas de replicação viral e maior grau de estabilidade genética dos vírus recombinantes, nosso grupo realizou as seguintes alterações na metodologia para o uso do vírus FA 17D como vetor de insertos heterólogos: 1) substituição do plasmídeo E200 utilizado para geração do molde de cDNA pelo plasmídeo pG1/2, por sua maior semelhança genética ao vírus parental FA 17DD (135); 2) redução do tamanho da haste âncora (HA) introduzida na proteína recombinante; 3) substituição da HA da proteína recombinante por uma sequência homóloga de outro flavivírus, no caso, a HA da proteína E do DENV-4. Estas modificações na estrutura do vetor deram origem ao que denominamos plataforma I de expressão.

O tamanho do inserto é um fator importante para a estabilidade genética dos vírus recombinantes (136). Além disto, insertos maiores tendem a retardar o ciclo replicativo viral. Baseado nestas observações, nosso grupo experimentou reduzir o tamanho da HA duplicada no C-terminal da proteína recombinante. Para isto, foram deletados os domínios H1 e CS da HA, mas mantidos os domínios H2, TM1 e TM2, pois estes seriam considerados essenciais para a estabilidade estrutural da proteína heteróloga durante a síntese e processamento da poliproteína precursora viral (137). Além disto, a diminuição da identidade genética entre as porções HA duplicadas no vírus recombinante também foi adotada visando a construção de vírus recombinantes mais estáveis. Para isto, o elemento HA da proteína E de FA duplicado ao C-terminal da proteína recombinante foi substituído pela sequência homóloga do DENV-4. Com isto, pretendia-se evitar possíveis pareamentos errôneos dos intermediários de RNA dupla-fita formados durante o processo replicativo viral, o que resultaria em variantes virais sem a inserção, que prevaleceriam sobre a população viral contendo o inserto.

A duplicação da região HA da proteína E fusionada ao C-terminal da EGFP acarretou sua ancoragem à membrana do RE. Através de estudos de colocalização da EGFP com diferentes organelas celulares foi determinado que a proteína GFP é expressa somente no RE, onde ficaria retida e provavelmente seguiria para a via de degradação associada ao RE (ERAD, do inglês *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*) (138, 139). No interior do retículo, estes peptídeos podem ser ligados a moléculas de MHC de classe I e, então, apresentados na superfície celular para ativação de células T CD8⁺ (140). Assim, a expressão de antígenos exógenos por este sistema em que a proteína ficaria retida no retículo endoplasmático seria favorável para o desenvolvimento de uma vacina baseada em resposta imune celular.

O direcionamento da proteína recombinante para outros compartimentos intracelulares como lisossoma ou para o aparelho de Golgi, seguindo para a via de secreção seria interessante

para o desenvolvimento de uma vacina que estimulasse diversas vias de apresentação do antígeno. Além disto, um antígeno solúvel secretado da célula poderia se dispersar melhor pelo organismo do indivíduo vacinado, ativar células B para indução de resposta imune humoral, e ainda ser fagocitado por células apresentadoras de antígeno, que potencializaria a sua capacidade imunogênica. Neste sentido, nosso grupo desenvolveu uma segunda plataforma de expressão de proteínas heterólogas na região intergênica E/NS1 do vírus FA 17D em que a proteína recombinante seria direcionada para a via secretora da célula infectada, que denominamos de plataforma II.

Basicamente, as mudanças introduzidas em relação à plataforma I consistem na introdução de dois domínios funcionais flanqueando a proteína heteróloga: 1) um domínio de N-glicosilação; 2) um domínio de clivagem proteolítica ou de separação do domínio HA (derivado da proteína E do DENV-4), que retém a proteína recombinante associada à membrana do RE (Figura 1.10). O motivo de N-glicosilação, fusionado ao N-terminal da proteína recombinante, foi adicionado com o objetivo de melhorar a estabilidade da proteína expressa. Sabe-se que, em células de mamíferos, a maioria das proteínas sintetizadas no RE é glicosilada. Os N-glicanos modificam propriedades físico-químicas das proteínas, fornecendo-lhes grupos hidrofílicos não carregados que aumentam a solubilidade da proteína, o que auxilia no seu enovelamento e estabilização (141).

Para romper a retenção à membrana do retículo endoplasmático foi introduzido um sítio de clivagem pela protease do tipo furina na porção C-terminal da proteína recombinante, que a separaria do elemento de ancoragem HA. Furina é uma proteína convertase que atua principalmente na rede *trans*-Golgi e é responsável pelo processamento proteolítico de diversas proteínas celulares que contêm a sequência consenso R-X-[R/K]-R (142).

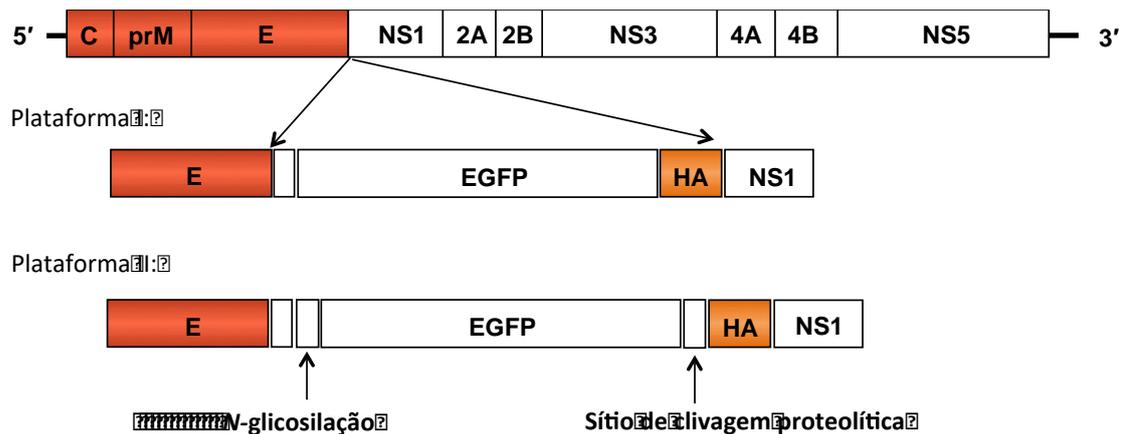


Figura 1.10 - Elementos utilizados para construção dos vírus FA 17D recombinantes nas diferentes plataformas de expressão.

O genoma do vírus FA 17D é mostrado com os genes codificantes para as proteínas estruturais em vermelho e os genes das proteínas não estruturais em azul. Na plataforma I a sequência heteróloga, neste caso a EGFP, era fusionada no N-terminal aos primeiros nove aminoácidos da proteína NS1 e no seu C-terminal à porção HA da proteína E do DENV-4. Na plataforma II, foram introduzidos novos elementos funcionais: um domínio de N-glicosilação e um domínio de clivagem proteolítica, flanqueando a proteína heteróloga.

Os vírus recombinantes de FA 17D do nosso estudo, expressam a proteína heteróloga Vif (fator de infectividade viral) do vírus da imunodeficiência símia SIVmac239. Durante o final da década de 80, observou-se que o vírus da imunodeficiência símia (SIV), um lentivírus, da mesma família do HIV, quando inoculado experimentalmente em macacos rhesus (*Macaca mulatta*), causa uma doença fatal semelhante à AIDS, demonstrando-se como um bom modelo animal para se acompanhar a evolução da doença. A semelhança antigênica, genética, morfológica e funcional entre o HIV-1 e o SIV, como também similaridades entre o sistema imune de macacos rhesus e seres humanos, tem sugerido que uma vacina protetora contra a infecção e a doença causada pelo SIV em macacos, poderá servir de modelo para a construção de uma vacina, a partir do HIV, protetora para seres humanos (143).

1.2.3. Resultados preliminares de vírus recombinantes de FA 17D/Vif

Em 2013, o nosso grupo em colaboração com Dr. David Watkins da Universidade de Miami, construiu e avaliou a imunogenicidade de vírus recombinantes de FA/SIV (Gag, Nef e Vif), em macaco rhesus. Os vírus recombinantes de FA/Vif possuíam fragmentos 1-110 de Vif; que chamamos de FA/Vif 1-110 original, e 102-214 (porção amino e carboxi-terminal), que chamamos de FA/Vif 102-214 (59). Esses vírus foram construídos na plataforma I de expressão da proteína heteróloga, anteriormente descrita, e os insertos clonados na junção da proteína E e

NS1. As proteínas recombinantes são liberadas no lúmen do retículo endoplasmático via a ação de peptidases do hospedeiro.

Nosso grupo optou por gerar vírus recombinantes de FA com fragmentos da proteína de Vif, e não utilizar toda a *ORF*, porque insertos grandes podem tornar o vírus recombinante instável (59). Além disso, utilizar fragmentos de antígenos para vacinas, em vez de toda a proteína, pode ajudar a ultrapassar a barreira de imunodominância de epítomos, e assim aumentar o repertório de resposta de célula T induzida pela vacina (144, 145).

A evidência encontrada nesse estudo de 2013, foi que os vírus recombinantes FA/SIV se replicaram *in vivo*, porém induziram baixos níveis de resposta celular SIV-específica. Administrando um *boost* com vírus recombinantes de Adenovírus tipo 5 (Ad5) como vetor; com proteínas de SIV, foi possível obter robusta expansão de células SIV-específicas, particularmente aquelas que tinham como alvo Vif.

A capacidade de indução de robusta resposta de células T CD8⁺ é mantida em vírus FA 17D recombinantes, inclusive para células específicas aos antígenos heterólogos expressos nesse vetor (58, 59, 94, 146). Mudd e cols. (2012) demonstraram que células T CD8⁺ Vif e Nef específicas, induzidas pela vacina FA/SIV, podem controlar a replicação de um vírus altamente patogênico em modelo animal de controladores de elite associados a MHC-I (1).

Apesar da robusta resposta imune estimulada por estes vírus, combinados com outras doses vacinais constituídas de outro vetor viral, após o desafio com SIV, estas vacinas foram capazes de controlar a viremia durante a fase crônica, mas não se mostraram eficazes em bloquear a infecção (1).

Os resultados promissores com os vírus FA/Vif (1, 59), impulsionaram a nossa pesquisa na direção da construção de novos vírus recombinantes de FA/Vif, onde postulamos que o aprimoramento da estabilidade genética desses vírus, resultaria no aumento de sua imunogenicidade.

1.3. Justificativa

Nessa tese pretendemos avaliar a imunogenicidade de vírus recombinantes de FA/Vif, investigando se o aumento da estabilidade genética dos vírus FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110 construídos nesse projeto, de fato está relacionado a maior indução de resposta imune celular e humoral; comparando esses vírus com os construídos anteriormente ao projeto; FA/Vif 1-110 original e FA/Vif 102-214. Além disso, ainda podemos relacionar os resultados obtidos com a plataforma de expressão da proteína heteróloga, em que esses vírus foram construídos,

uma vez que os novos vírus recombinantes FA/Vif dessa tese foram construídos na plataforma II de expressão, enquanto os anteriores, na plataforma I.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o uso de Vif de SIVmac239 como antígeno heterólogo na plataforma vacinal do vírus da febre amarela 17D.

2.2 Objetivos específicos

1. Construir vírus recombinantes de vírus vacinal da FA 17D expressando o fator de infectividade viral (Vif) do vírus da imunodeficiência símia SIVmac239, em uma plataforma aprimorada de expressão da proteína heteróloga.
2. Caracterizar as propriedades biológicas dos vírus FA 17D recombinantes expressando Vif de SIV, analisando sua curva de crescimento em cultura de células Vero e a estabilidade genética, após passagens seriadas nessas células.
3. Avaliar a imunogenicidade dos vírus recombinantes FA/Vif, analisando sua capacidade de indução de anticorpos neutralizantes contra o vírus da FA 17D e a resposta imune celular contra epítopo desse vírus e do antígeno heterólogo Vif, em camundongos da linhagem C57BL/6.

3. Material e métodos

3.1 Certificados

As etapas de construção e clonagem de genomas virais em *Escherichia coli*, obtenção de moldes de cDNA dos vírus recombinantes FA/Vif e caracterização desses vírus foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus (LABMOF), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular na unidade IOC da FIOCRUZ. Este laboratório obteve junto à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança a licença para trabalhar com Organismos Geneticamente Modificados (OGM) nível 2 (CTNBio – CQB 0105/99).

Os experimentos com camundongos estão certificados pela CEUA da Fiocruz com protocolo (CEUA/IOC-046-2015) e licença L-001/2016 intitulado “Construção e avaliação de vírus vacinais da Febre Amarela 17D recombinantes, que expressam antígenos do vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) e vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)”, sob a responsabilidade de Myrna C. Bonaldo.

3.2 Cultura de células

Os experimentos *in vitro* foram realizados em cultura de células Vero, uma linhagem celular derivada do epitélio renal de macacos verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*), obtidas da Coleção Americana de Culturas e Depósitos. O LABMOF mantém um estoque destas células congeladas em nitrogênio líquido, que são frequentemente descongeladas e propagadas em meio de cultura Earle's 199 contendo 5% de NaHCO₃, 40 µg/mL de gentamicina, suplementado com 5 % de soro fetal bovino (meio Earle's 199 completo, ANEXO I), mantidas em estufa com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. A cada 3-4 dias as células são tripsinizadas com solução de tripsina/EDTA 0,05 % (Gibco) e incubadas por 5 min a 37°C na estufa, seguido de inativação da tripsina com igual volume de meio Earle's 199 completo. As células são então diluídas 1:4 e passadas para novas garrafas de cultura de 150 cm² ou contadas em câmara de Neubauer para preparação dos frascos e placas a serem utilizados nos experimentos.

3.3 Construção dos vírus recombinantes de febre amarela vacinal 17D/Vif

A construção dos vírus recombinantes de FA/Vif, foi realizada através de clonagem molecular de genes sintéticos de Vif no plasmídeo pT3, na região intergênica E/NS1 do genoma do vírus da FA 17D. A inserção de genes heterólogos entres os genes E e NS1 do genoma de FA seria interessante por esta região representar uma transição na organização funcional do genoma, isto é, os genes situados ao lado 5'-terminal codificam as proteínas estruturais do vírion, enquanto na região 3'-terminal situam-se os genes codificantes das proteínas não-estruturais. Portanto, postulou-se que uma inserção nesta região minimizaria perturbações na estrutura morfológica da partícula e na cinética de replicação viral. Os genes sintéticos de Vif foram desenhados com otimização de códons para a frequência de uso do vírus FA 17D pela GenScript.

Os dois plasmídeos são fusionados, respeitando a integridade genômica do vírus FA 17D, através de tratamento com enzimas de restrição, gerando o cDNA molde do genoma viral. O construto resultante é transcrito *in vitro*, gerando o RNA genômico. Finalmente, o RNA transcrito é transfectado por eletroporação em células Vero para posterior recuperação de partículas virais infecciosas (Figura 3.1).

A primeira etapa da construção de cDNA molde é o tratamento com as enzimas de restrição *Nsi* I e *Sal* I (Promega), que tem sítios únicos em ambos os plasmídeos, em uma reação com duração de 3 horas a 37 °C. Os fragmentos de interesse são ligados pela reação com a enzima *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs) com 200 ng do plasmídeo pG1.2 e 300 ng do plasmídeo pT3, que ocorre durante a noite a 4 °C. O DNA circular resultante é tratado com a enzima *Xho* I (Promega), que está presente em sítio único no cDNA molde, durante 3 horas a 37 °C para linearização e exposição do sítio promotor de transcrição SP6. Finalmente, a última etapa antes da transfecção em células Vero para posterior regeneração de vírus é a transcrição *in vitro* com a *SP6 RNA Polymerase (mMESSAGE mMACHINE kit, Ambion)*, segundo as instruções do fabricante. Todas as etapas da construção de clones infecciosos são analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (m/v) (seção 3.5).

A etapa de regeneração de vírus a partir do cDNA molde consiste na transfecção de células Vero com o transcrito do cDNA molde. As células Vero foram dissociadas dos frascos de cultura com tripsina e lavadas com PBS-DEPC (ANEXO I). Em seguida, foram eletroporadas com o RNA transcrito pelo equipamento *Gene PulserXCell* (Bio-Rad), sob as seguintes condições: voltagem de 200 V; capacitância de 850 mf; resistência ∞; cubeta de 4 mm. As células que passaram pelo pulso elétrico foram incubadas por 10 minutos em gelo úmido e, finalmente, semeadas com densidade de 40.000 células/cm² em frascos de cultura de

25 cm² com 12 mL de meio Earle's 199 completo (ANEXO I). Os frascos de cultura foram mantidos em estufa a 37 °C, com ambiente úmido e 5 % de CO₂ até aparecimento de efeito citopático (CPE, do inglês *cytopathic effect*). O sobrenadante deste cultivo celular, denominado 1P (primeira passagem), foi coletado e armazenado a -80 °C. Os vírus 1P foram amplificados por infecção de novas células Vero, gerando uma suspensão viral de segunda passagem (2P), que foi utilizada para os experimentos posteriores. Utilizamos o plasmídeo G1/2T3 como controle na transfecção, e o vírus G1/2T3 como controle no teste de estabilidade genética (plasmídeo e vírus vazio sem inserto de Vif).

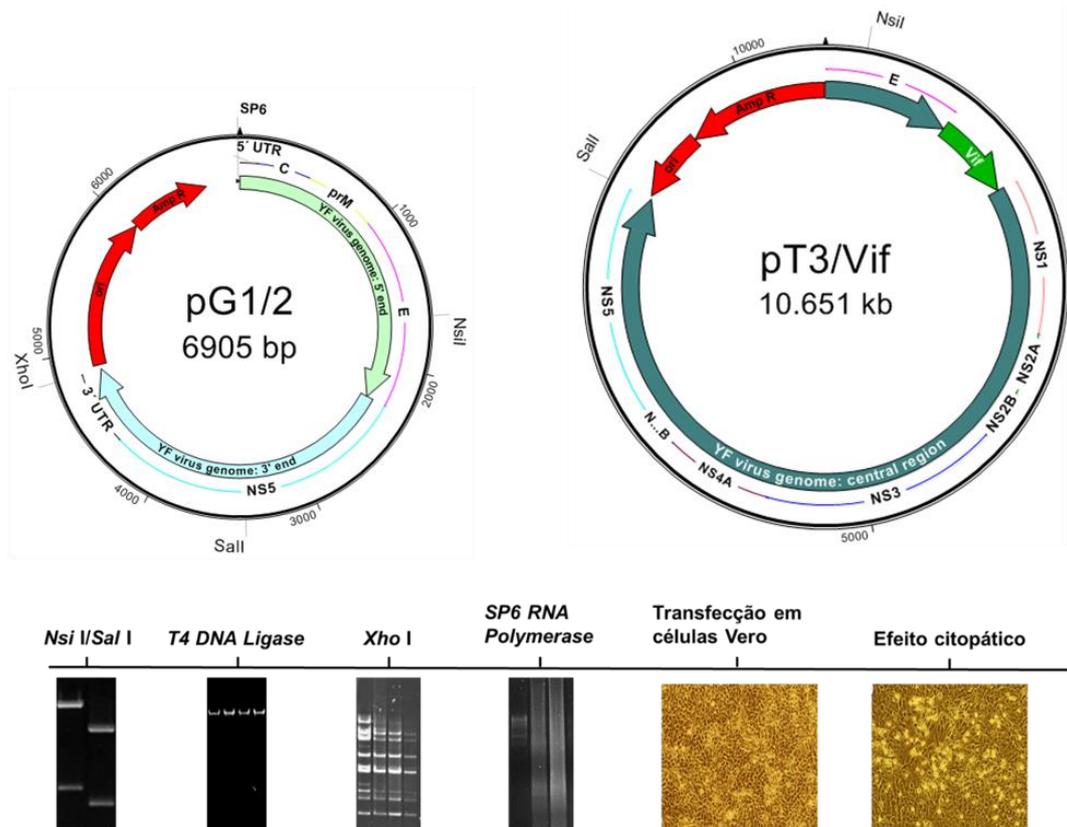


Figura 3.1 - Fluxograma da obtenção de cDNA infeccioso recombinante.

Os plasmídeos pG1.2/T3 e pT3/Vif foram tratados com as enzimas de restrição *Nsi* I e *Sal* I e os fragmentos com maior peso molecular de ambos os plasmídeos foram ligados para compor o cDNA genômico viral em um único plasmídeo. Portanto, após a digestão com as enzimas de restrição *Nsi* I e *Sal* I, o fragmento do pG1.2 contendo os genes plasmidiais e as extremidades do genoma, e o fragmento do pT3/GFP carregando a parte central do genoma foram ligados pela enzima *T4 DNA Ligase*. O DNA circular resultante foi tratado com a enzima de restrição *Xho* I para linearizar o DNA e expor o sítio promotor para a transcrição *in vitro*. A transcrição foi realizada pela enzima *SP6 RNA Polymerase* e o RNA transcrito foi transfectado em células Vero por eletroporação. O surgimento de efeito citopático após 72 a 96 horas de incubação indica regeneração de partículas virais infectivas. O perfil eletroforético de cada etapa após tratamento enzimático do cDNA e o aspecto da monocamada de células Vero pós transfecção estão representados na parte inferior da figura.

3.4 Extração de RNA e reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR)

O RNA viral foi extraído a partir do sobrenadante de cultura de células Vero infectadas, utilizando-se o *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA eluído foi em um volume de 60 uL e congelado a -80° C em alíquotas de 20 uL para evitar repetidos ciclos de congelamento-descongelamento.

Para a detecção do RNA genômico viral e seu sequenciamento, o RNA viral extraído foi submetido à reação de RT-PCR para amplificação da região que contém o sítio de inserção E/NS1. A síntese da fita de cDNA foi realizada pela transcriptase reversa M-MLV (Promega) ou *Superscript III* (Invitrogen) a partir de 4 µL do RNA, sob as condições recomendadas pelo fabricante da enzima, utilizando-se o oligonucleotídeo reverso RG 440 descrito na Tabela 3.1.

Para a reação de PCR, 4µL do cDNA ou 1 µL de plasmídeo foram utilizados como molde para amplificação utilizando-se *GoTaq Green Master Mix* (Promega) e os oligonucleotídeos descritos na Tabela 3.1, sob as condições estabelecidas pelo fabricante. Resumidamente, o molde de cDNA foi desnaturado por aquecimento a 95° C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação do DNA a 95° C por 40 seg, anelamento dos oligonucleotídeos a 55° C por 40 seg e extensão da fita de DNA pela polimerase a 72° C por 90 seg. Para extensão final das fitas de DNA a reação foi incubada a 72° C por 10 min e então deixada a 4° C ou congelada até o momento da análise por eletroforese.

Tabela 3.1 - Oligonucleotídeos utilizados para o RT-PCR

Oligo-nucleotídeo	Sequência (5' → 3')	Posição de ligação no genoma do vírus FA 17D
RG 440 (-)	AACCATACTGCAGACCATCCCGAA	2772 - 2795
RG 444 (+)	ACGTCTCACTTACCAGTGGCACAA	2122 - 2145

3.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os plasmídeos e fragmentos de DNA foram diluídos em tampão de amostra 6X (ANEXO I), aplicados ao gel de agarose 0,8 % (ANEXO I) em tampão TAE 1 X (ANEXO I) e submetidos a eletroforese com 85 volts por 2 h. Para controle do tamanho dos fragmentos foram aplicados, paralelamente às amostras, os marcadores 1Kb Plus (Invitrogen) para análise de produtos de PCR ou o DNA do bacteriófago *Lambda* clivado com *Hind III* (Promega) para

análise de plasmídeos. Os géis foram corados em solução 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Bio-Rad) (ANEXO I), seguido de lavagem com água, e as bandas foram visualizadas e fotografadas através do fotodocumentador Gel-Doc XR (Bio-Rad), utilizando-se o programa *Image Lab*.

3.6 Sequenciamento nucleotídico

Para a confirmação da identidade e integridade dos vírus recombinantes FA/Vif obtidos, realizamos sequenciamento nucleotídico, onde os produtos amplificados nas reações de PCR previamente analisados por eletroforese, foram purificados utilizando-se o *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o *BigDye Terminator v31 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). Foram empregados os mesmos oligonucleotídeos descritos para a reação de PCR e, adicionalmente, o RG 19 (-) GGGAGTCAACTGAATTTAGGC (complementar à região genômica 2.619 – 2.639 do vírus FA 17D), que se liga a uma região interna a este fragmento de PCR. As reações de sequenciamento foram preparadas em placas de 96 poços no LABMOF e a leitura foi realizada pela plataforma multiusuário de sequenciamento de DNA (RPT01A) da FIOCRUZ (PDTIS). As sequências obtidas foram analisadas no programa *SeqMan* (DNASar Lasergene 8), alinhando-se estas com as sequências do vírus FA recombinante contendo o inserto esperado.

3.7 Titulação viral

Para a realização dos ensaios *in vitro*, os vírus foram titulados por contagem de placas de lise (147). A titulação por ensaio de placas é uma técnica utilizada para quantificar partículas virais infecciosas. A técnica consiste na quantificação de placas de lise formadas por partículas virais a partir de uma diluição seriada das suspensões virais de interesse.

As alíquotas de suspensões virais foram descongeladas lentamente em gelo e diluídas seriadamente com fator 10 em meio Earle's 199 completo. As diluições 10^{-1} a 10^{-6} foram utilizadas nas titulações. Monocamadas de células Vero foram preparadas na véspera em placas de 24 poços com densidade de 50.000 células/cm², cultivadas em meio Earle's 199 completo. Os sobrenadantes das culturas foram totalmente removidos com auxílio de bomba de vácuo e 100 µL das diluições virais foram inoculadas em duplicata na placa de 24 poços. As células foram incubadas por 1 h a 37 °C em estufa de 5 % de CO₂ com agitação leve a cada 15 min. Após este período de adsorção viral, o excesso de líquido foi removido do sobrenadante e a

monocamada foi coberta com 1 mL por poço, de 2,4 % CMC (Carboximetilcelulose, Sigma) em meio Earle's 199 contendo 5 % de NaHCO₃, 40 µg/mL de gentamicina, suplementado com 5 % de soro fetal bovino. Após incubação por 7 dias a 37 °C em estufa de CO₂, as placas foram fixadas com solução de formaldeído a 10 %, lavadas com água e coradas com solução de cristal violeta a 0,4 %.

O número de placas de lise de duas diluições foi contado e o título do vírus foi determinado de acordo com a seguinte fórmula:

$$T = M \times ID \times FC$$

onde:

T = título expresso em PFU/mL (do inglês, *Plaque Forming Unit*)

M = média do n° de placas de lise contadas em uma determinada diluição;

ID = Inverso do fator de diluição onde as placas de lise foram contadas;

FC = fator de correção do inóculo para mL. Como o inóculo corresponde a 100 µL, que é a décima parte de 1 mL, FC = 10.

O título de cada estoque viral é dado pela média entre três experimentos independentes de titulação, em que o desvio padrão dos títulos expressos em log₁₀ é menor do que 1.

3.7.1 Titulação dos inóculos virais preparados para a imunização

Simultaneamente à imunização, realizamos a titulação dos inóculos preparados para a imunização nos camundongos, o que chamamos de controle dos inóculos, para confirmar a dose administrada nos animais. Células Vero foram semeadas em placas de 6 poços com densidade de 50.000 células/cm² no dia anterior ao controle de inóculo. Após o preparo do inóculo, 100 µL foram utilizados para obter três diluições com o objetivo de infectar com 200 PFU, 100 PFU e 50 PFU respectivamente por poço, em duplicata, em uma placa de 6 poços. O sobrenadante da cultura de células de cada poço foi removido e 200 µL de suspensão viral com 50, 100 ou 200 PFU foi adicionado aos respectivos poços das replicatas. As placas foram incubadas em estufa de atmosfera úmida, com 5 % de CO₂, a 37 °C por 1 hora com agitação a cada 10 minutos para evitar o ressecamento dos poços. Após o tempo de infecção, as diluições virais foram descartadas e 3 mL de meio CMC completo (ANEXO I) foram adicionados aos poços e então, as placas foram mantidas na estufa por 7 dias. Ao final do tempo de incubação, as células foram

fixadas com formaldeído 10,0 % (v/v) (ANEXO I) e, após 24 horas, coradas com cristal violeta 0,04 % (v/v) (ANEXO I). As placas de lise formadas foram contadas para cada duplicata, e a média foi utilizada para verificar a dose administrada aos animais em PFU.

3.8 Produção de estoques virais (2P)

Produzimos estoques virais de segunda passagem em células Vero, para utilizarmos nos experimentos. Monocamadas de células Vero foram preparadas na véspera em frascos de cultura de 150 cm² com densidade de 62.500 células/cm² e cultivadas em meio Earle's 199 completo. O inóculo viral foi preparado a partir do vírus FA 17DD reconstituído da vacina ou de 3 mL dos vírus recombinantes coletados da cultura de células transfectadas (1P), completado para volume final de 5 mL com meio Earle's 199 completo. O sobrenadante do frasco de cultura previamente preparado foi totalmente removido e as células são cobertas com 5 mL da suspensão viral. As células foram incubadas por 1 h a 37 °C em estufa de 5 % de CO₂ com agitação leve a cada 15 min. Após este período de adsorção viral, o frasco foi preenchido com meio Earle's 199 completo para volume final de 80 mL e incubado a 37 °C em estufa de 5 % de CO₂ até o aparecimento de CPE (48 a 72 h). O sobrenadante foi então coletado, centrifugado a 700 g por 10 min a 4 °C para remoção de debris celulares, e congelado em alíquotas de 500 uL e 1 mL a -80 °C.

3.9 Infecção viral em células Vero para teste de estabilidade genética e curvas de proliferação

Para o teste de estabilidade genética dos vírus recombinantes de FA/Vif, e curvas de proliferação viral, monocamadas de células Vero foram preparadas na véspera com densidade de 62.500 células/cm², em frascos de cultura de 25 cm², cultivadas em meio Earle's 199 completo, e a monocamada foi infectada com suspensão viral obtida por diluição do estoque 2P para MOI de 0,02 através da fórmula:

$$\text{MOI} = \frac{\text{título viral (PFU/mL)} \times \text{volume}}{\text{número total de células}}$$

O sobrenadante da monocamada foi removido e 1 mL da suspensão viral foi adicionada. Após incubação por 1 h com agitação leve a cada 15 min, as células foram incubadas a 37 °C em estufa de 5 % de CO₂ durante 72 h.

As curvas de proliferação foram construídas a partir da quantificação de PFU recolhidas no sobrenadante de cada cultura celular infectada pelos vírus recombinantes e controle. Após a infecção das células, alíquotas do sobrenadante foram coletadas a cada 24 horas até um período total de 120 horas. A quantificação de partículas virais infecciosas foi realizada por titulação por ensaio de placas (seção 3.8). As curvas de proliferação foram realizadas em triplicata para validação estatística.

Para avaliar a estabilidade genética dos insertos heterólogos, submetemos os vírus recombinantes a duas séries independentes de passagens (PA e PB) em cultura de células Vero, a partir do estoque viral 2P, com MOI de aproximadamente 0,02. Nas passagens 5, 10, 15 e 20 extraímos o RNA viral do sobrenadante da cultura e o submetemos a RT-PCR para amplificação de um fragmento contendo a região do inserto. O vírus G1/2T3 sem inserto de Vif foi utilizado como controle e gera uma banda de 674 pb. Os vírus recombinantes contendo o inserto íntegro geram bandas de 1373 pb (FA/Vif 1-110 variante), 1307 pb (FA/Vif 42-110), e os construídos anteriormente ao meu projeto, bandas de 1298 pb (FA/Vif 1-110 original) e 1307 (FA/Vif 102-214).

3.10 Vírus vacinal da febre amarela 17DD

O vírus FA 17DD utilizado como controle nos ensaios *in vitro* e nas imunizações, é derivado da vacina, produzida em doses na forma liofilizada por Bio-Manguinhos – FIOCRUZ. Após reconstituição em 1 mL de meio Earle's 199 completo, este vírus foi diluído para volume final de 5 mL e este inóculo é utilizado para infectar células Vero para produção do estoque viral. Utilizamos esse vírus como controle nos ensaios para investigar resposta imune celular e humoral.

3.11 Experimentos com animais

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 4 a 5 semanas de idade, foram fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp (CEMIB, Campinas-SP). Os animais foram mantidos no biotério do Pavilhão Leônidas Deane (FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ) em microisoladores, devidamente alimentados e hidratados. Os experimentos de imunização, sangria e coleta de baços foram realizados nas salas de experimentação deste biotério e são descritos a seguir.

As imunizações com os vírus recombinantes FA/Vif, com o vacinal FA 17DD e mock (somente meio de cultura Earle's 199 sem soro fetal bovino e gentamicina), foram realizadas no coxim plantar das duas patas traseiras, injetando-se 30 μ L do inóculo em cada pata, através de seringa de insulina com agulha de dimensões 8 mm x 0,3 mm (comprimento x diâmetro; BD Ultra-Fine II). Foram administradas duas doses do inóculo, contendo 10^5 PFU do vírus FA 17DD ou vírus recombinante FA/Vif, com intervalo de 15 dias entre as doses. Quinze dias após a segunda dose, os camundongos foram anestesiados com administração intraperitoneal de uma formulação composta por cloridrato de quetamina (75,4 mg/mL) e cloridrato de xilazina (3,9 mg/mL). Após a perda de reflexo dos camundongos, o sangue foi coletado por punção cardíaca com seringa de 50 unidades (500 μ L) e agulha de 8 mm x 0,3 mm (comprimento x diâmetro; BD Ultra-Fine II), e dispensado em Eppendorfs de 1,5 mL. Posteriormente, ainda dentro da cabine de segurança biológica, realizamos o deslocamento cervical para a coleta dos baços, que foram armazenados em um tubo Falcon de 15 mL, contendo 3 mL de meio RPMI 10% de soro fetal bovino (ANEXO I), e mantidos no gelo até a coleta do baço do último camundongo (Figura 3.2). O tempo de coleta após imunização foi determinado pelo pico da resposta de célula T, após imunização, segundo a literatura (93) (Figura 3.2). O sangue extraído foi processado como descrito na seção 3.13 para obtenção do soro para o teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT) e o baço para citometria de fluxo (seção 3.12). Todos os experimentos foram regulamentados e autorizados pelo Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA) sob a licença L-001/2016 da FIOCRUZ.

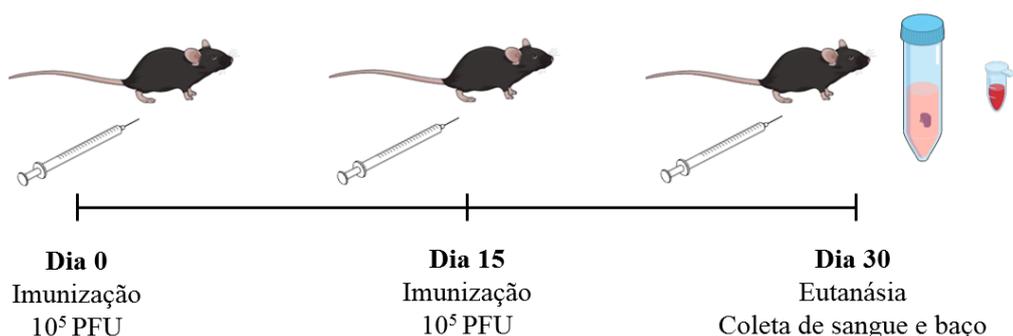


Figura 3.2 - Cronograma de imunização com vírus FA vacinal 17DD e recombinantes FA/Vif.

Camundongos C57BL/6 foram imunizados com regime vacinal de duas doses de 10^5 PFU e intervalo de 15 dias. Após 15 dias da última dose, os animais foram eutanasiados para a coleta de sangue e baço, que foram utilizados na titulação de anticorpos e citometria de fluxo, respectivamente.

Realizamos experimentos com grupos controle naïve, mock e o vírus vacinal FA 17DD, e os vírus recombinantes de FA 17D recombinantes para Vif. No experimento de detecção *in vivo* de células T de memória após as imunizações, que será descrito posteriormente, trabalhamos com um total de doze camundongos, que não foram imunizados ou manipulados até a coleta do baço, que denominamos de grupo naïve, quinze para o grupo FA/Vif 102-214 e vinte para os demais grupos. Foram realizados quatro experimentos, onde nos três primeiros, o FA/Vif 102-214 estava presente, e no quarto, removemos esse grupo para adicionar o naïve. Devido às limitações experimentais do número de camundongos processados por blocos experimentais, trabalhamos sempre com seis grupos no total. Achamos importante ter a resposta de *background* do grupo naïve, e como o vírus FA/Vif 102-214 carrega um fragmento de Vif não relacionado aos demais vírus recombinantes, removemos esse grupo no último experimento, para a inserção do grupo naïve.

Em um segundo bloco de experimentos de citometria de fluxo, onde estimulamos os esplenócitos obtidos dos camundongos imunizados *in vivo*, com peptídeo do vírus da FA 17D e *pools* de peptídeos de Vif, imunofenotipamos as células T de memória, e coletamos o sobrenadante para a análise de citocinas por *Cytometric Bead Array* (CBA), para investigar a resposta celular específica; onde o grupo FA/Vif 102-214 não estava presente, e mantivemos o grupo naïve para todos os ensaios. Foram quatro experimentos, onde trabalhamos com o *pool* de esplenócitos de 5 camundongos por grupo, em duplicata, diferente dos ensaios de detecção *in vivo* de células T memória, onde trabalhamos com os camundongos individualmente (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Grupos experimentais e número total de camundongos utilizados.

Grupos	Número de camundongos detecção <i>in vivo</i> de memória	Número de camundongos resposta específica
Naïve	12	20
Mock	20	20
FA 17DD	20	20
FA/Vif 1-110 original	20	20
FA/Vif 1-110 variante	20	20
FA/Vif 42-110	20	20
FA/Vif 102-214	15	-

3.12 Citometria de fluxo

Utilizamos a citometria de fluxo para a análise quantitativa da indução de células T de memória após as imunizações com os vírus recombinantes de FA/Vif, que comparamos com os controles FA 17DD, mock e naïve. Essa técnica foi utilizada tanto nos ensaios de detecção *in vivo* de células T de memória, como também nos ensaios de detecção de resposta celular específica contra o vírus da FA 17D e Vif. Nesse último, após a incubação esplenócitos obtidos de camundongos imunizados com peptídeos do vírus da FA 17D e Vif, as células foram imunofetipadas, e coletamos o sobrenadante para a análise da secreção das citocinas utilizando o *Cytometric Bead Array* (CBA).

3.12.1 Processamento dos baços dos camundongos e marcação de moléculas de superfície por citometria de fluxo

Os camundongos foram anestesiados pela via intraperitoneal, como citado na seção 3.11, e após a perda de reflexos, realizamos punção cardíaca para a coleta de sangue para o PRNT (seção 3.13). Os animais perderam os sinais vitais pela hipovolemia da punção cardíaca, mas nós realizamos deslocamento cervical, para nos certificar que não haveria sofrimento durante a coleta de baço. Na cabine de segurança biológica, coletamos o baço com o auxílio de um kit cirúrgico de pinça e tesoura autoclavados, e armazenamos em um tubo Falcon de 15 mL estéril com 3 mL de meio RPMI 10% de soro fetal bovino. Os baços foram mantidos em banho de gelo até o seu processamento.

Na cabine de segurança do NB2 do nosso laboratório, em uma placa de cultura de 6 poços, vertemos o conteúdo dos Falcons nos poços, sendo um Falcon/baço por poço, identificado previamente, de acordo com o seu grupo experimental. Com auxílio do êmbolo de seringas de 5 mL (extremidade contrária ao êmbolo), maceramos os órgãos separando os debris (cápsula do baço e gordura). Recuperamos a suspensão dos esplenócitos com pipeta (os 3 mL), transferindo para os mesmos tubos Falcon de 15 mL. Centrifugamos os tubos a 392 g por 10 minutos em centrífuga a 4°C, descartamos o sobrenadante após a centrifugação e lisamos as hemácias com 2 mL de solução de lise diluída a 1X (ANEXO I) por cinco minutos no gelo.

Logo após, adicionamos 6 mL de PBS 1X para neutralizar a solução de lise, centrifugamos os tubos a 392 g por 10 minutos em centrífuga a 4°C, descartamos o sobrenadante, ressuspendemos o *pellet* em 3 mL de solução de bloqueio (ANEXO I), e mantivemos no gelo por 30 minutos. Contamos as células durante a incubação no gelo, com o

contador automático Countess (Invitrogen). Realizamos uma diluição 1:40 (117 uL de meio RPMI 10 % SFB + 3 uL de suspensão celular), e pipetamos 10 uL dessa diluição 1:40 em 10 uL de tripan blue para adicionar na lâmina de contagem. Após o bloqueio, pipetamos 2×10^6 células por poço para a imunofenotipagem, em uma placa de 96 poços, já contendo 200 uL de PBS 1X nos poços que receberam as células. Centrifugamos a placa a 392 g por 5 minutos a 4 °C, vertemos e ressuspendemos as células em 20 uL do *pool* de anticorpos contra moléculas de superfície celular descritos nas secções 3.12.2 e 3.12.3.2, e incubamos durante 60 minutos.

Após a incubação com os anticorpos, centrifugamos a placa a 392 g por 5 minutos a 4 °C e ressuspendemos o *pellet* em 200 uL de PBS 1X (2 vezes). Centrifugamos a placa novamente a 392 g por 5 minutos a 4 °C e ressuspendemos o *pellet* em 150 uL de paraformaldeído 1% por 20 minutos a 4 °C, para a fixação das células. Finalmente, centrifugamos a placa a 392 g por 5 minutos em centrífuga a 4 °C e ressuspendemos o *pellet* em 200 uL de PBS 1X, e em um tubo de citometria colocamos 100 uL de PBS 1X e transferimos os 200 uL de cada poço da placa, para cada respectivo tubo. Cobrimos com papel alumínio e fizemos a aquisição das amostras no citômetro de fluxo MoFlo Astrios Cell Sorter (Beckman Coulter Life Sciences), nos experimentos de detecção *in vivo* de células T de memória. Nos experimentos de resposta celular específica a epítomos do vírus do FA 17D e Vif, onde incubamos as células com estímulos (seção 3.12.3), as células não foram fixadas com paraformaldeído, e a aquisição das amostras foi realizada no mesmo dia após as 18-19 horas de incubação, no citômetro Cytotflex (Beckman Coulter Life Sciences).

3.12.2 Detecção *in vivo* de células T de memória

Nessa etapa, o nosso objetivo foi investigar *in vivo*, a geração de células T de memória pelas imunizações com os vírus FA/Vif, comparando com os controles naïve, mock e FA 17DD. Os esplenócitos gerados do processamento da seção 3.12.1 foram marcados com anticorpos monoclonais murinos, combinando-se oito cores simultaneamente nos ensaios de citometria de fluxo. Nós optamos pelo painel com os anticorpos a seguir: anti-CD3 Alexa Flúor 700, anti-CD4 APC/Cy7, anti-CD8 PE-Cy7, CD44 Alexa Flúor 488, CD127 PE, CCR7 ou CD197 PE/Dazzle 594, CD62L PerCP/Cy5.5, isotipo controle PE e o marcador de viabilidade Zombie violet, todos obtidos da Biolegend.

Em todo ensaio, realizamos os seguintes controles de citometria de fluxo: duas amostras sem a marcação com os anticorpos, para a configuração da morfologia das células no citômetro; duas amostras de controle de morte, para determinar a região de células vivas e mortas, e assim

a viabilidade de cada amostra experimental, onde levamos células em Eppendorf para um termobloco a 65 °C por 20 minutos para a obtenção desse controle; os controles de compensação, onde marcamos células em um poço com um anticorpo somente, e fazemos isso para todos os anticorpos, trabalhando, portanto, com uma amostra de compensação por anticorpo; e uma amostra marcada com o isotipo controle somente, para nos certificarmos de que não houve marcação inespecífica. Realizamos somente em um ensaio, amostras do controle FMO (*fluorescence minus one*), pelo grande volume de anticorpos utilizado para a confecção desse controle. Os controles de FMO são amostras que auxiliam a definição dos *gates* de cada marcador, onde em um tubo adicionamos todos os anticorpos do painel menos um, e fazemos isso para todos os marcadores. Os dados da aquisição no citômetro de fluxo, foram analisados posteriormente no *software* Summit 6.0.4.

Para analisar as populações de células T de memória, definimos a seguinte estratégia de *gates*: realizamos a exclusão de *doublets*, e dentro do *gate* dos *singlets*, analisamos os linfócitos. Como nosso interesse eram as células T, e por isso fizemos o *gate* na população de células CD3⁺ vivas dentro da região de linfócitos, e em seguida, em CD4⁺ e CD8⁺. A partir daqui a análise foi realizada para células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, separadamente. Células T de memória são CD44^{high}CD127^{high}, e para definirmos memória central e efetora, adicionamos os marcadores CCR7 e CD62L, onde o fenótipo CD3⁺CD4⁺CD44^{high}CD127^{high}CCR7^{high}CD62L^{high} e CD3⁺CD8⁺CD44^{high}CD127^{high}CCR7^{high}CD62L^{high} indica células T de memória central, e CD3⁺CD4⁺CD44^{high}CD127^{high}CCR7^{low}CD62L^{low} e CD3⁺CD8⁺CD44^{high}CD127^{high}CCR7^{low}CD62L^{low} células T de memória efetora (Figura 3.3) (148-150).

Os vírus recombinantes FA/Vif aparecem nos gráficos identificados somente pelo seu fragmento de Vif, para maior clareza na apresentação dos dados. Devido às limitações experimentais do número de camundongos processados por blocos experimentais, realizamos somente três ensaios com o vírus recombinante FA/Vif 102-214, para que pudéssemos inserir grupos de camundongos naïve, e por este ser um vírus de fragmento de Vif não relacionado aos outros.

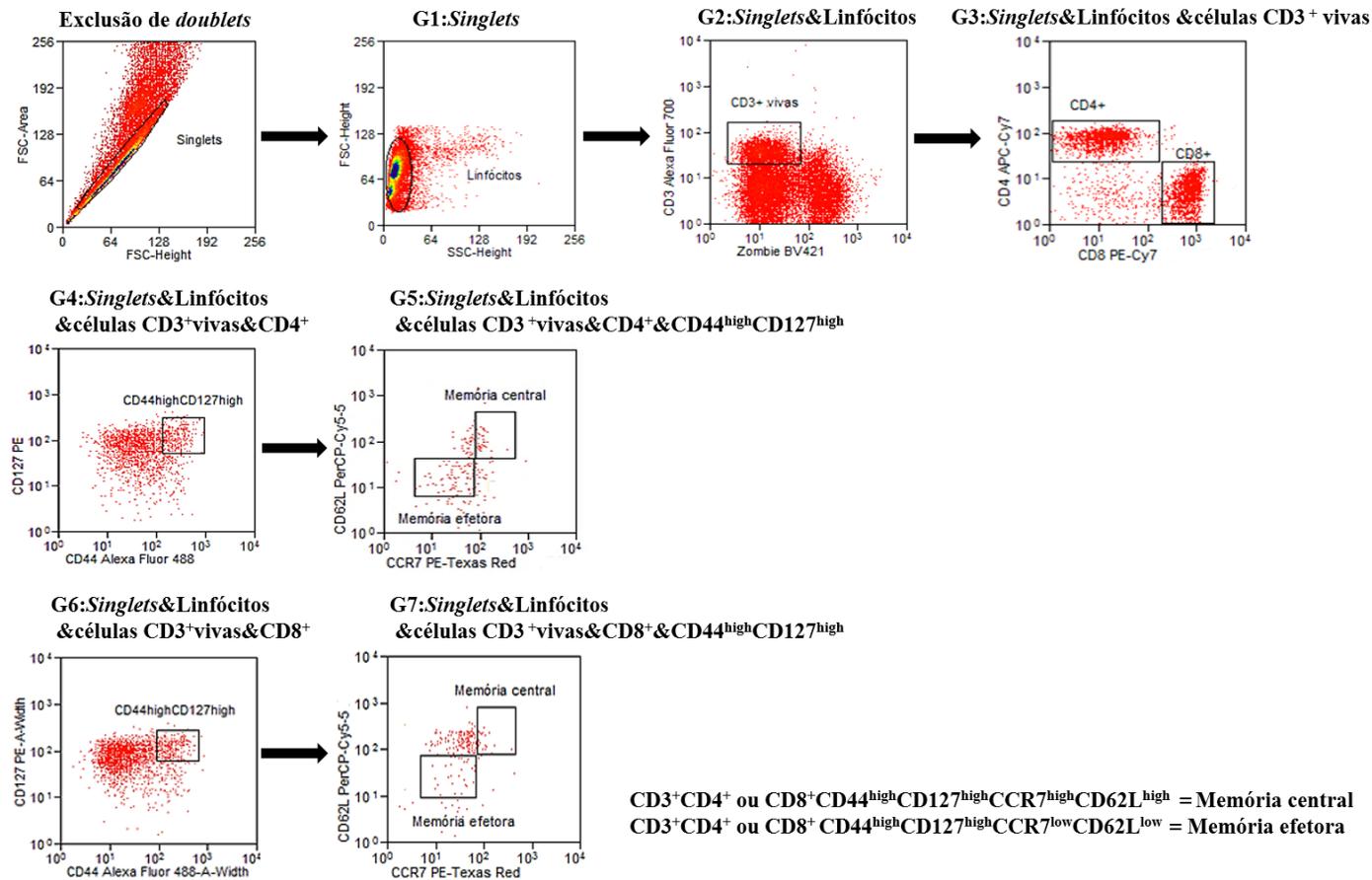


Figura 3.3 - Estratégia de *gates* para a imunofenotipagem das células T de memória central e T de memória efetora, dos ensaios de detecção *in vivo* de células T de memória.

O texto acima de cada dot plot diz dentro de que populações realizamos os gates. Os dot plots representam: Exclusão de doublets - exclusão de eventos que não eram uma única célula; ou seja, a análise foi realizada dentro dos *singlets*. (G1: *Singlets*) - fizemos um *gate* na região de linfócitos, somente nos eventos *singlets*. (G2: *Singlets & Linfócitos*) - dentro de linfócitos, analisamos as células CD3⁺ vivas (CD3⁺Zombie negativas). (G3: *Singlets & Linfócitos & células CD3⁺ vivas*) - dentro das células CD3⁺ vivas, analisamos as células CD4⁺ e CD8⁺. (G4: *Singlets & Linfócitos & células CD3⁺ vivas & CD4⁺*) – nas células T CD4⁺, investigamos as células de memória CD44^{high}CD127^{high}. (G5: *Singlets & Linfócitos & células CD3⁺ vivas & CD4⁺ & CD44^{high}CD127^{high}*) – e finalmente discriminamos as células T de memória central - CD44^{high}CD127^{high}CCR7^{high}CD62L^{high} e células T de memória efetora CD44^{high}CD127^{high}CCR7^{low}CD62L^{low}. A mesma análise foi adotada em G6 e G7 para as células T CD8⁺.

3.12.3 Imunofenotipagem de células T ativadas e T de memória após estímulo *in vitro* com peptídeo do vírus FA 17D e peptídeos de Vif

Para avaliar se as células obtidas de camundongos imunizados responderiam especificamente aos estímulos do vírus da FA e Vif, processamos os baços dos camundongos como descrito na seção 3.12.1, contamos as células e pipetamos 4×10^5 células por camundongo, fazendo um *pool* dos cinco camundongos por grupo, e, portanto, 2×10^6 células por poço, em duplicata, e incubamos com por 18-19 horas a 37 °C e 5 % CO₂ com os peptídeos e condições experimentais descritos na seção 3.12.3.1. Após a incubação, centrifugamos a placa com as células estimuladas, coletamos e congelamos o sobrenadante para posterior análise de citocinas (seção 3.12.3), e imunofenotipamos as células T ativadas e T de memória (Tabela A1 ANEXO II).

Utilizamos forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) e ionomicina para estimular as células do grupo naïve e mock, como controle positivo da técnica, nas concentrações de 5 ng/mL e 100 ng/mL, respectivamente. Como trabalhamos com *pools* de células de cinco camundongos por grupo e não individualmente, os resultados das análises são mostrados em porcentagem somente.

Em paralelo a preparação da placa com os estímulos, fizemos para todos os ensaios, um controle zero hora, onde utilizamos as células do grupo FA 17DD marcadas com CFSE (marcador de proliferação). Essa amostra foi usada nas análises de proliferação, onde sobreposamos a amostra zero hora (a população mãe) e as amostras que ficaram incubadas por 18-19 horas com os estímulos, para definir a população que proliferou (gerações) (seção 3.12.3.2).

3.12.3.1 Peptídeos do vírus da FA 17D e de Vif

O peptídeo ATLYRML da proteína NS3, posições 268-275 do vírus FA 17D, foi utilizado para mensurar a resposta de células T contra os vírus recombinantes FA/Vif, e essa resposta foi comparada com os controles naïve, mock e FA 17DD. O peptídeo ATLYRML foi descrito em estudos anteriores como epítipo imonodominante para a linhagem C57BL/6 (151). Um *set* de 51 peptídeos de Vif, correspondente a proteína completa de Vif do vírus SIVmac239, foi doado pelo NIH AIDS reagents program ao nosso laboratório. Esses peptídeos de 15 aminoácidos fazem uma sobreposição de onze aminoácidos, uns com os outros. Utilizando a ferramenta de imunogenicidade de MHC de classe I da plataforma de predição de epítomos do IEDB (Immune Epitope Database), selecionamos dez peptídeos, dentro do fragmento de 41-111 da proteína de Vif, que seriam os mais

imunogênicos, de acordo com o resultado da análise do IEDB, para a linhagem de camundongos C57BL/6.

Os peptídeos foram selecionados dentro do fragmento 41-111 da proteína de Vif, porque ele é comum a todos os vírus recombinantes FA/Vif. Também analisamos a probabilidade de ligação desses peptídeos a moléculas de MHC de classe I e MHC de classe II. Na Tabela 3.3, a coluna que antecede o *percentile rank* de ligação a T CD8⁺, corresponde a sequência do peptídeo avaliado, que se ligaria a molécula de MHC de classe I, já que a sua fenda suporta somente de 8 a 11 aminoácidos, enquanto a MHC de classe II, de 12 a 16 aminoácidos.

A análise de predição de imunogenicidade de MHC de classe I, indica a possibilidade de um peptídeo ser imunogênico. Os *scores* positivos indicam que são mais prováveis de serem reconhecidos por células T CD8⁺ e induzir resposta imune. Todos os peptídeos imunogênicos, serão provavelmente bons ligadores a moléculas MHC de classe I, mas o contrário não é verdadeiro. Por esse motivo, adotamos a análise de imunogenicidade de MHC de classe I, para selecionar 10 peptídeos do fragmento 41-111 da proteína de Vif. Para análise de predição de ligação de peptídeos a moléculas de MHC I ou II, um valor pequeno de *percentile rank* indica alta afinidade. As análises de ligação a MHC I ou II, e imunogenicidade; são independentes. Chamamos o *pool* dos dez peptídeos do fragmento de Vif 41-111, de *pool* Vif 41-107, porque o último peptídeo selecionado do *pool*, corresponde ao peptídeo com aminoácidos da posição 93 a 107 na proteína. O peptídeo na posição de 97 a 111, não era imunogênico de acordo com a predição de imunogenicidade MHC I (possui *score negativo*).

Após os dois primeiros experimentos com o *pool* de Vif 41-107, observamos que ele não era muito eficiente em induzir resposta celular, e por isso resolvemos fazer um outro *pool* de peptídeos mas com o fragmento 1-51 da proteína de Vif, porque achamos que poderíamos estar perdendo a resposta de algum epítipo desse fragmento, apesar de que na análise de imunogenicidade, muitos peptídeos desse fragmento, apresentaram *score* negativo, indicando não serem tão imunogênicos quanto os peptídeos do *pool* de Vif 41-107. Mostramos na Tabela 3.3, o resultado das análises na plataforma IEDB, onde em azul estão os peptídeos do *pool* de Vif 1-51, e em verde os do *pool* de Vif 41-107. Importante dizer que antes de optarmos por adotar o *pool* de Vif 1-51, algumas condições foram testadas para melhorar a eficiência do *pool* de Vif 41-107.

Os peptídeos de Vif foram solubilizados em uma solução de 50 % acetonitrila filtrada em água ultrapura destilada DNase/RNase-free da Thermo Fisher Scientific, na cabine de segurança biológica, e a concentração final dos *pools* de Vif dentro dos poços foi de 20 uM. A concentração

inicial testada foi de 10 uM, sugerida pelo laboratório do Dr. David Watkins, pela experiência com esses peptídeos, porém em experimentos com macaco rhesus. Dobramos essa concentração na tentativa de melhorar a sua eficiência. Testamos a concentração de 30 uM, mas obtivemos muita resposta inespecífica nos grupos de controle negativo, e por isso adotamos a de 20 uM para todos os experimentos aqui apresentados. Em relação ao peptídeo ATLYRML do vírus da FA 17D, o nosso laboratório já havia trabalhado com ele em um projeto de mestrado e doutorado, onde obtivemos uma boa indução de resposta celular. Inicialmente utilizamos a concentração de 2 uM, mas também dobramos essa concentração e os resultados apresentados são com a concentração de 4 uM dentro dos poços.

Tabela 3.3 - Resultados das análises de predição de imunogenicidade MHC I e ligação a T CD4⁺ e T CD8⁺ dos peptídeos de Vif, realizadas na plataforma IEDB (Immune Epitope Database).

<i>Pool</i>	<i>Peptídeo</i>	<i>Posição em Vif</i>	<i>Imunogenicidade</i>	<i>Ligação a T CD4⁺</i>	<i>Ligação a T CD8⁺</i>	
			<i>MHC I</i>		<i>Peptídeo</i>	<i>Percentile rank</i>
			<i>Score</i>	<i>Percentile rank</i>		<i>Percentile rank</i>
Vif 1-51	MEEEKRWIAVPTWR	1-15	0.59997	23.55	MEEEKRWIAV	30
	KRWIAVPTWRIPERL	5-19	0.76072	25.25	RWIAVPTWRI	34.5
	AVPTWRIPERLERWH	9-23	0.77441	56.19	GWAWWTCSR	13.45
	WRIPERLERWHSLIK	13-27	0.26121	82.16	PERLERWHSL	48
	ERLERWHSLIKYLKY	17-31	-0.12599	79.18	ERWHSLIKYL	11
	RWHSLIKYLKYKTKD	21-35	-0.56141	85.23	IKYLKYKTKD	16.6
	LIKYLKYKTKDLQKV	25-39	-0.68292	56.18	KYLKYKTKDL	7.6
	LKYKTKDLQKVCYVP	29-43	-0.48195	48.70	KYKTKDLQKV	20.75
	TKDLQKVCYVPHFKV	33-47	-0.35021	63.81	TKDLQKVCYV	31.5
	QKVCYVPHFKVGWAW	37-51	0.41235	35.88	KVCYVPHFKV	5.95
Vif 41-107	YVPHFKVGAWWTCS	41-55	0.64732	30.93	YVPHFKVGWA	20
	FKVGAWWTCSR	45-59	0.77072	18.86	AWWTCSR	17.85
	WAWWTCSR	50-63	0.23611	23.31	WAWWTCSR	12.45
	TCSR	53-63	0.26926	47.08	IFPLQEGSHL	9.15
	LQEGSHLEVQGYWHL	61-75	0.29926	74.45	LEVQGYWHLT	65.5
	SHLEVQGYWHLTPEK	65-79	0.34453	55.72	QGYWHLTPEK	23.5
	VQGYWHLTPEKGWLS	69-83	0.27304	36.09	VQGYWHLTPE	32.25
	PEKGWLSTYAVRITW	77-91	0.26602	14.02	EKGWLSTYAV	25
	YAVRITWYSKNFWD	85-99	0.59740	51.07	VRITWYSKNF	7.2
	SKNFWDVTPNYADI	93-107	0.50500	11.50	KNFWDVTPN	21.25

3.12.3.2 Anticorpos monoclonais utilizados na avaliação da resposta celular específica contra o vírus da FA 17D e Vif

Foram utilizados anticorpos monoclonais murinos, combinando-se nove cores simultaneamente nos ensaios de citometria de fluxo para a avaliação da resposta celular específica. Utilizamos o painel com os anticorpos a seguir: anti-CD3 Alexa Flúor 700, anti-CD4 APC/Cy7, anti-CD8 PE-Cy7, anti-CD69 PE, CD44 Alexa Flúor 488, CCR7 ou CD197 PE/Dazzle 594, CD62L PerCP/Cy5.5, isotipo controle PE, o marcador de proliferação CFSE FITC e o marcador de viabilidade Zombie violet, todos obtidos da Biolegend, com exceção do CFSE que é da Thermo Fisher Scientific. Os dados da aquisição no citômetro de fluxo, foram analisados posteriormente no Cytexpert 2.3, e as porcentagens das populações celulares de interesse foram plotadas em gráficos.

A marcação com o CFSE (*CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester*) foi realizada logo após a pipetagem das células nos poços, antes de adicionar os peptídeos nos seus respectivos poços, para incubar a placa. Como estimulamos as células, adotamos esse marcador de proliferação, para distinguir as populações celulares que proliferaram (fenótipo CFSE^{low}), após a incubação com os estímulos do vírus de FA e Vif. O CFSE se liga covalentemente a moléculas intracelulares, e quando as células se dividem, a progenitora fica com a metade das moléculas do CFSE, e por isso, cada divisão celular pode ser avaliada pelo decréscimo de fluorescência. A ativação celular após a incubação com os peptídeos foi analisada através da marcação com o CD69.

A estratégia de *gates* para a definição da população de células T ativadas (CD69⁺) foi a seguinte: realizamos a exclusão de *doublets*, e dentro do *gate* dos *singlets*, fizemos um *gate* em linfócitos. Nosso interesse são as células T, e por isso fizemos o *gate* na população de células CD3⁺ vivas dentro de linfócitos, e em seguida, em CD4⁺ e CD8⁺. Dentro dessas duas populações, definimos com uma região em histograma, com o auxílio de controles positivos (PMA/ionomicina), e negativos (células não estimuladas e isotipo controle), as células T ativadas, utilizando o marcador CD69 (Figura 3.4).

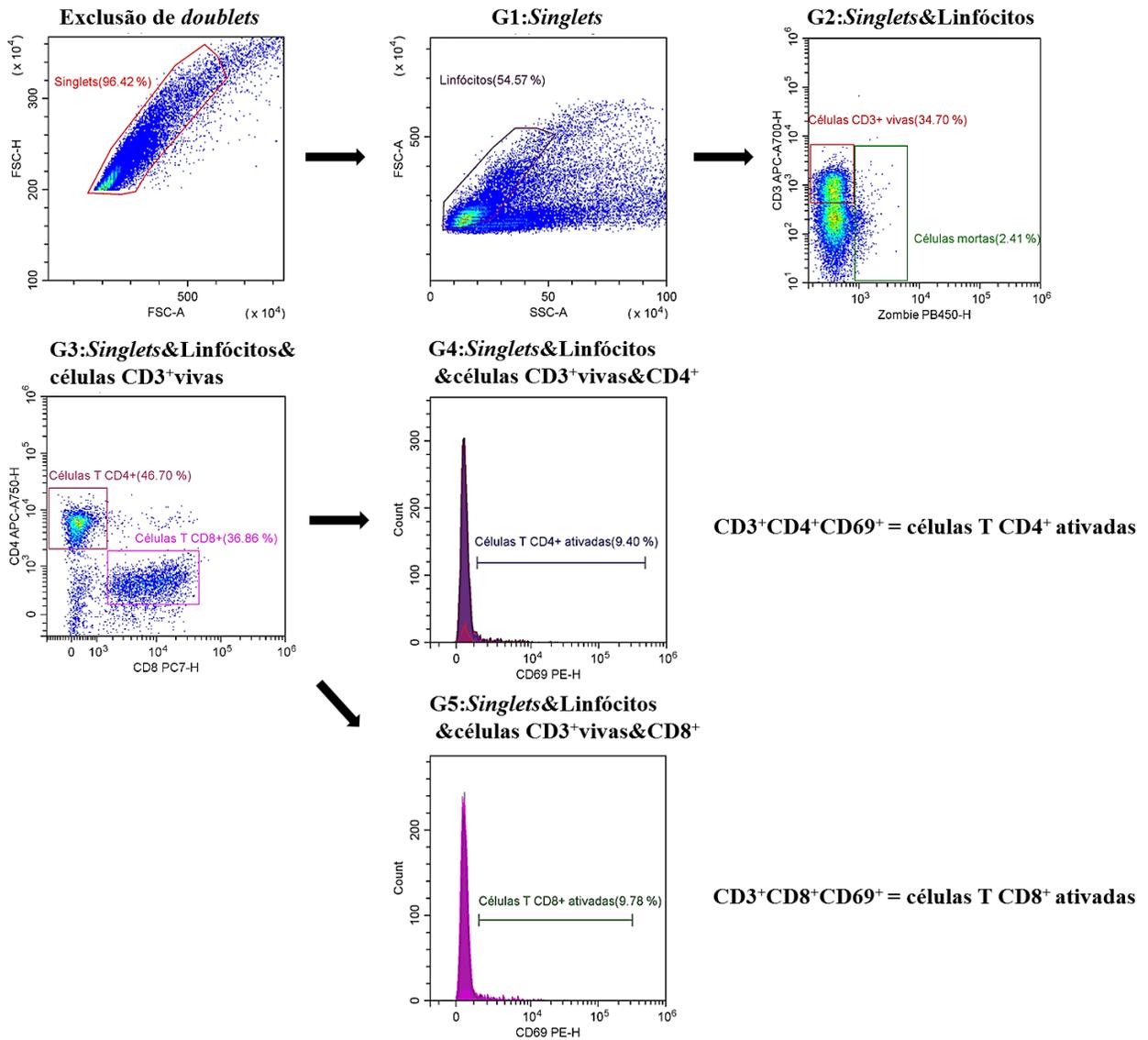
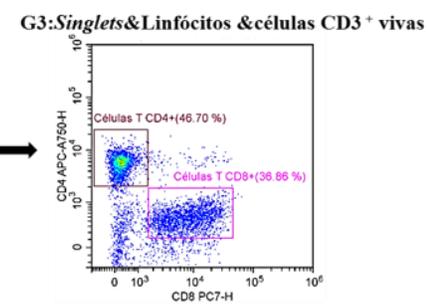
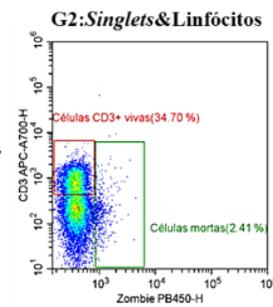
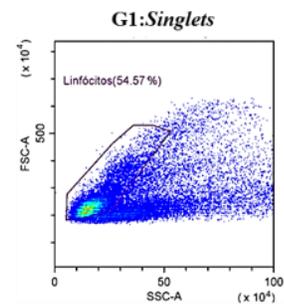
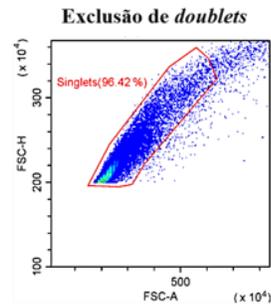


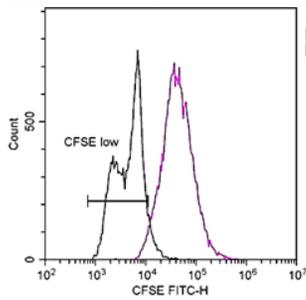
Figura 3.4 - Estratégia de *gates* para a imunofenotipagem das células T ativadas, após estímulo *in vitro* com peptídeo de FA 17D e peptídeos de Vif.

O texto acima de cada *dot plot* ou histograma diz dentro de que populações realizamos os *gates*. Os *dot plots* representam: Exclusão de *doublets* - exclusão de eventos que não eram uma única célula; ou seja, a análise foi realizada dentro dos *singlets*. (G1: *Singlets*) - fizemos um *gate* na região de linfócitos, somente nos eventos *singlets*. (G2: *Singlets & Linfócitos*) - dentro de linfócitos, analisamos as células CD3⁺ vivas (CD3⁺Zombie negativas). (G3: *Singlets & Linfócitos & células CD3+ vivas*) - dentro das células CD3⁺ vivas, analisamos as células CD4⁺ e CD8⁺. (G4: *Singlets & Linfócitos & células CD3+ vivas & CD4+*) – nas células T CD4⁺, investigamos as células CD69⁺. (G5: *Singlets & Linfócitos & células CD3+ vivas & CD8+*) – nas células T CD8⁺, investigamos as células CD69⁺.

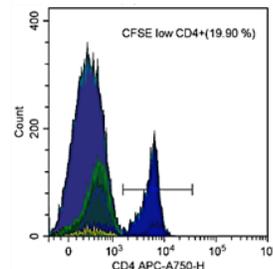
Com uma sobreposição da amostra zero hora com as amostras que foram incubadas por 18-19 horas com os estímulos, estabelecemos a região da população celular que proliferou dentro de células CD3⁺ vivas (*gate* citado acima), que são as células CFSE^{low}. A partir das células CFSE^{low}, investigamos dentro das células T CD4⁺ e T CD8⁺, a população CD44^{high}, e em seguida, para definirmos memória central e efetora, adicionamos os marcadores CCR7 e CD62L, com os fenótipos finais de CFSE^{low}CD3⁺CD4⁺CD44^{high}CCR7^{high}CD62L^{high} e CFSE^{low}CD3⁺CD8⁺CD44^{high}CCR7^{high}CD62L^{high} indicando células T de memória central que proliferaram, e CFSE^{low}CD3⁺CD4⁺CD44^{high}CCR7^{low}CD62L^{low} e CFSE^{low}CD3⁺CD8⁺CD44^{high}CCR7^{low}CD62L^{low} células T de memória efetora que proliferaram (Figura 3.5).



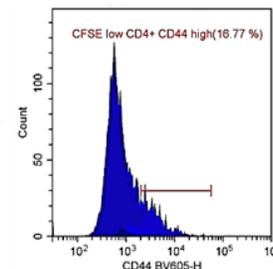
G4: Singlets & Linfócitos & células CD3+ vivas



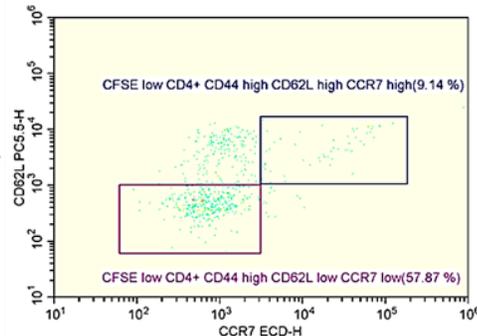
G5: Singlets & Linfócitos & células CD3+ vivas & CFSE^{low}



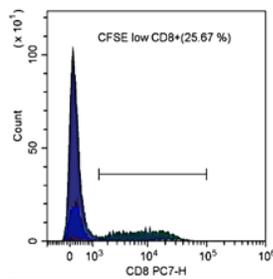
G6: Singlets & Linfócitos & células CD3+ vivas & CFSE^{low} & CD4+



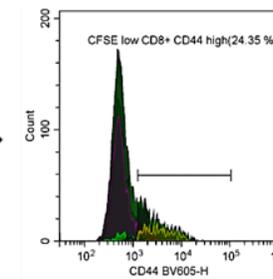
G7: Singlets & Linfócitos & células CD3+ vivas & CFSE^{low} & CD4+ & CD44^{high}



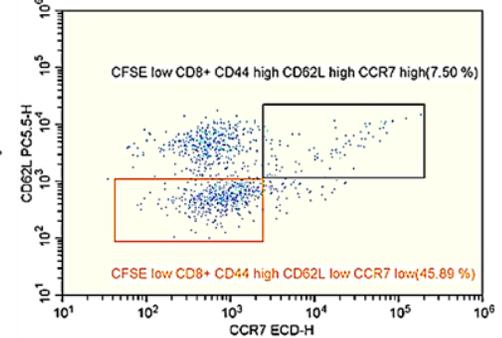
G8: Singlets & Linfócitos & células CD3+ vivas & CFSE^{low}



G9: Singlets & Linfócitos & células CD3+ vivas & CFSE^{low} & CD8+



G10: Singlets & Linfócitos & células CD3+ vivas & CFSE^{low} & CD8+ & CD44^{high}



CFSE^{low}CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺CD44^{high}CCR7^{high}CD62L^{high}
Memória central

CFSE^{low}CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺CD44^{high}CCR7^{low}CD62L^{low}
Memória efetora

Figura 3.5 - Estratégia de *gates* para a imunofenotipagem das células T de memória central e T de memória efetora que proliferaram, após estímulo *in vitro* com peptídeo de FA 17D e peptídeos de Vif.

O texto acima de cada *dot plot* ou histograma diz dentro de que populações realizamos os *gates*. Os *dot plots* representam: Exclusão de *doublets* - exclusão de eventos que não eram uma única célula; ou seja, a análise foi realizada dentro dos *singlets*. (G1: *Singlets*) - fizemos um *gate* na região de linfócitos, somente nos eventos *singlets*. (G2: *Singlets&Linfócitos*) - dentro de linfócitos, analisamos as células CD3⁺ vivas (CD3⁺Zombie negativas). (G3: *Singlets&Linfócitos&células CD3⁺ vivas*) - dentro das células CD3⁺ vivas, analisamos as células CD4⁺ e CD8⁺. (G4: *Singlets&Linfócitos&células CD3⁺ vivas*) – também nas células T vivas, investigamos as células que proliferaram - CFSE^{low}. (G5: *Singlets&Linfócitos&células CD3⁺ vivas& CFSE^{low}*) – e as T CD4⁺ que proliferaram; (G6: *Singlets&Linfócitos&células CD3⁺ vivas& CFSE^{low} CD4⁺ CD44^{high}*) – e as células T CD4⁺CD44^{high} que proliferaram; (G7: *Singlets&Linfócitos&células CD3⁺ vivas& CFSE^{low} CD4⁺ CD44^{high}*) - e finalmente as células T CD4⁺ de memória central e memória efetora que proliferaram - CFSE^{low}CD44^{high}CCR7^{high}CD62L^{high} e células T de memória efetora CFSE^{low}CD44^{high}CCR7^{low}CD62L^{low}, respectivamente. (G8: *Singlets&Linfócitos&células CD3⁺ vivas& CFSE^{low}*) – células T CD8⁺ que proliferaram; (G9: *Singlets&Linfócitos&células CD3⁺ vivas& CFSE^{low} CD8⁺*) – e as células T CD8⁺CD44^{high} que proliferaram; (G10: *Singlets&Linfócitos&células CD3⁺ vivas& CFSE^{low} CD4⁺ CD44^{high}*) - e as células T CD8⁺ de memória central e memória efetora que proliferaram - CFSE^{low}CD44^{high}CCR7^{high}CD62L^{high} e células T de memória efetora CFSE^{low}CD44^{high}CCR7^{low}CD62L^{low}, respectivamente.

3.12.4 Detecção das citocinas secretadas no sobrenadante da cultura das células estimuladas *in vitro* com peptídeo de FA 17D e peptídeos de Vif

Além da imunofenotipagem das células T ativadas e T de memória, para avaliar a especificidade de resposta celular dentro dos grupos imunizados com FA/Vif, também investigamos a secreção de citocinas no sobrenadante da cultura celular, após 18-19 horas de incubação com peptídeo do vírus FA 17D e peptídeos de Vif. Utilizamos o kit *Cytometric Bead Array* (CBA) *Mouse* T_H1/T_H2 *cytokine*, que nos permite a avaliação de múltiplos analitos simultaneamente em uma mesma amostra, utilizando pequeno volume dela. Nesse kit, cinco populações de *beads* com distintas intensidades de fluorescência, foram cobertas com anticorpos de captura específicos para proteínas de IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ e TNF- α . Essa mistura de *beads* de captura foi combinada com amostras da curva padrão do kit e com as nossas amostras teste, e incubadas com anticorpos de detecção conjugados a PE, formando complexos sanduíches. A intensidade da fluorescência do PE de cada complexo revela a concentração de uma determinada citocina (Figura 3.6). As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur da plataforma de citometria de fluxo do Pavilhão Cardoso Fontes, e a análise realizada no *software* FCAP Array.

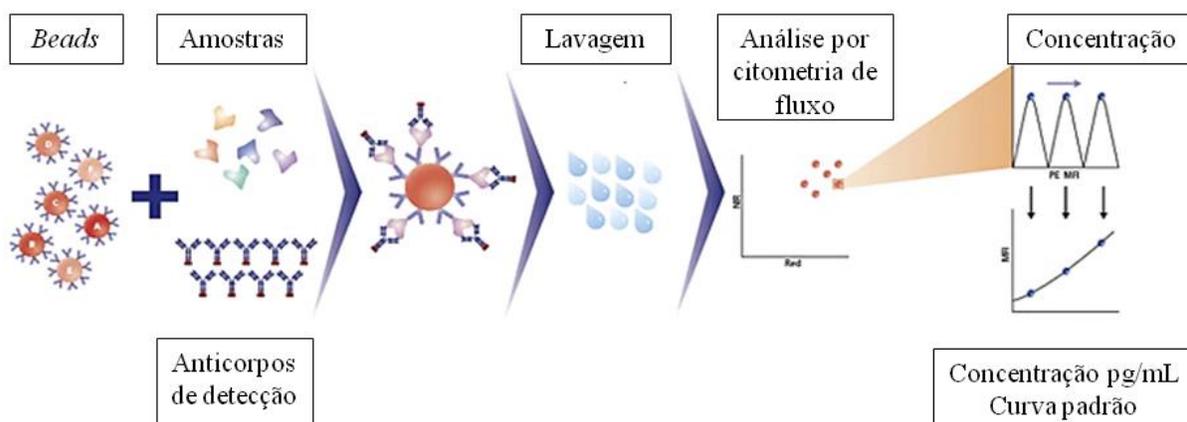


Figura 3.6 - Esquema simplificado do protocolo do Cytometric Bead Array (CBA).

As *beads* de captura conjugadas a diferentes anticorpos são misturadas as amostras, e posteriormente a anticorpos de detecção conjugados a PE, formando um sistema sanduíche. Após incubação e lavagem, as amostras são adquiridas em citômetro de fluxo, utilizando o canal FL-2. O *software* FCAP Array define a região de cada citocina e determina a mediana da intensidade de fluorescência. A concentração das citocinas é determinada de acordo com a curva padrão.

3.13 Teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT).

O *Plaque Reduction Neutralization Test* (PRNT) foi utilizado para quantificar o título de anticorpos neutralizantes para FA presentes nos soros dos camundongos imunizados. O teste baseia-se na capacidade de neutralização do vírus da FA 17DD pelos anticorpos presentes nos soros dos camundongos imunizados.

Inicialmente, os soros foram diluídos em placas de cultura de 96 poços de fundo chato (MICROTEST Tissue Culture Plate, Falcon) com meio diluente (ANEXO I) por diluição seriada de fator 2, iniciando em 1:10 até 1:1280 (Figura 3.7). O meio diluente foi distribuído em 50 µL em todos os poços das placas, exceto na linha H, onde o volume de meio diluente foi de 90 µL. Aos poços da linha H, foram adicionados 10 µL dos soros a serem testados segundo os desenhos das placas. Então a diluição seriada foi realizada transferindo 50 µL entre as linhas das placas, iniciando da linha H e terminando na linha A. Os 50 µL finais depois da transferência para a linha A são descartados. O soro fetal bovino (Gibco) foi utilizado como controle negativo em cada placa e o resultado do título de anticorpos neutralizantes foi baseado na quantificação de placas de lise desses poços.

O vírus vacinal da FA 17DD foi diluído em 1:7000 com meio diluente (ANEXO I) e 50 µL da suspensão foi adicionado aos poços. A concentração final de partículas virais infectivas após a diluição 1:7000 é de 1500 PFU/mL, resultando na distribuição de 75 PFU por poço. As placas foram incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora, para a etapa de neutralização. Em seguida, células Vero foram dissociadas por tripsinização de um frasco de cultura, preparado previamente como descrito na seção 3.7 e distribuídas com densidade de $1,6 \times 10^5$ células/poço. As placas foram incubadas por 3 horas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5 % CO₂, durante as quais as células aderiram aos poços e foram infectadas pelas partículas virais que não foram neutralizadas. Ao término da incubação, o sobrenadante dos poços foi retirado e substituído por 100 µL de meio CMC completo (ANEXO I). As placas foram mantidas na estufa durante 7 dias, após os quais, as células foram fixadas com 150 µL de formaldeído 10,0 % (v/v) (ANEXO I) durante 3 horas e coradas com cristal violeta 0,04 % (v/v) (ANEXO I) por 30 minutos.

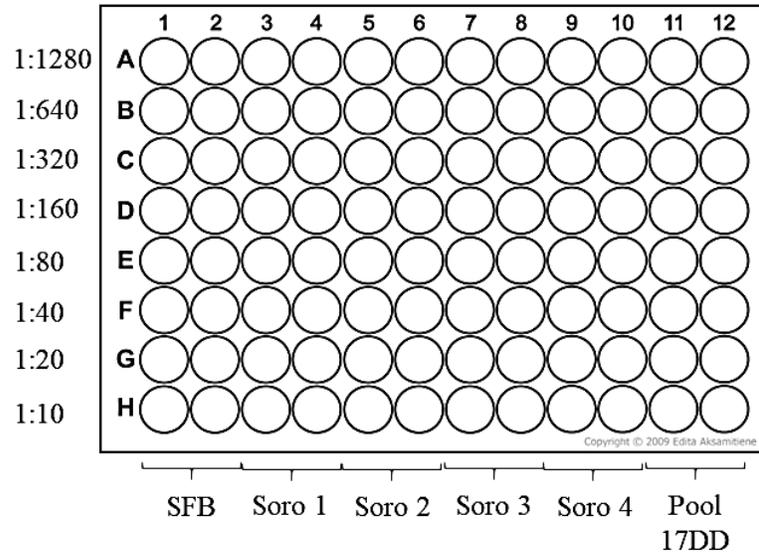


Figura 3.7 - Diluição seriada dos soros para PRNT.

Os soros dos camundongos foram testados individualmente. Como controle negativo, foi utilizado o soro fetal bovino (SFB) e como controle positivo, um *pool* dos soros dos camundongos imunizados com o vírus da FA 17DD. A diluição seriada dos soros foi realizada a partir de uma diluição inicial de 1:10 na linha H das placas, seguida de diluições 1:2 até a linha A.

As placas de lise formadas foram contadas e, a partir da média de placas nos poços do controle negativo SFB, foi estabelecida a quantidade de placas que representam o limiar de neutralização de 50 % das PFU presentes no sistema (Figura 3.8 A). As diluições dos soros com contagens de placas de lise que abrangem o limiar são utilizadas para prever a diluição exata na qual os soros neutralizam 50 % das PFU (Figura 3.8 B). Esse cálculo é realizado pela fórmula PREVISÃO da ferramenta *Excel*, que interpreta os dados das contagens como uma função dependente das diluições dos soros (Figura 3.8 C). Esta previsão é utilizada para funções lineares, por isso, os fatores de diluição são transformados em logaritmos com base de 10 para os cálculos de títulos. Consequentemente, os títulos obtidos estarão representados em logaritmo com base de 10 e devem ser calculados utilizando o inverso do logaritmo, segundo a equação abaixo:

Título de anticorpos a partir da previsão

$$Título = 10^{previsão}$$

A figura 3.8 apresenta um exemplo de cálculo de título de anticorpos neutralizantes do soro X pela técnica de PRNT. Os títulos de camundongos do mesmo grupo foram utilizados para cálculo de média e erro médio padrão, que são parâmetros utilizados para análise comparativa.

A)

SFB	SFB	Soro X	Soro X	Diluição	Log ₁₀ (diluição)
16	21	24	29	1280	3,107
25	28	26	29	640	2,806
29	32	30	25	320	2,505
19	28	19	23	160	2,204
28	30	14	27	80	1,903
27	28	15	15	40	1,602
20	27	3	11	20	1,301
20	16	2	7	10	1,000

Média SFB: 24,63

50 %: 12,31

B)

Log ₁₀ (diluição)	Nº de placas	Previsão	Média	Título
1,602	15	1,534642	1,4672	29,32
1,301	3			
1,602	15	1,399805		
1,301	11			

C)

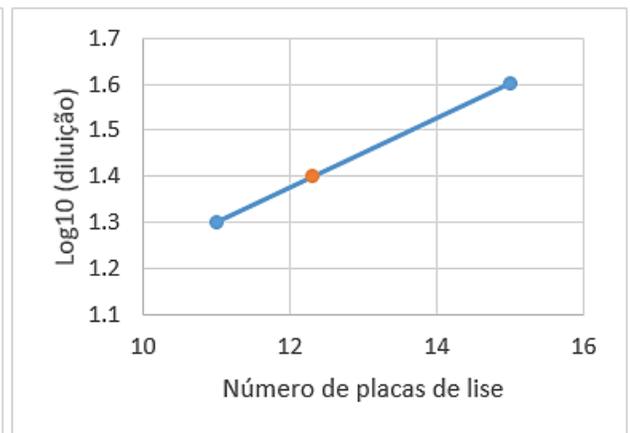
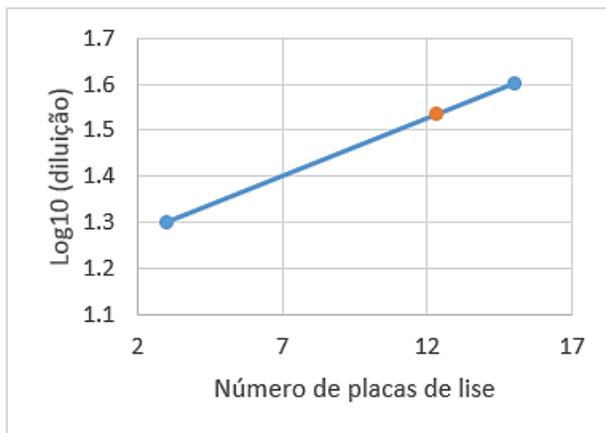


Figura 3.8 - Cálculo de título de anticorpos neutralizantes.

(A) Contagem de placas de lise dos poços do controle negativo SFB e do soro X, e determinação do limiar de neutralização de 50 % de PFU. (B) Cálculo do título de anticorpos neutralizantes no soro X. (C) Gráficos ilustrando a interpretação da fórmula PREVISÃO do Excel. Esses gráficos não são gerados durante a análise. Foram obtidos apenas para ilustrar o racional do cálculo dos títulos. Os pontos em azul, que determinam a reta, representam os títulos conhecidos, obtidos pelas contagens de placas de lise. O ponto laranja representa o título resultante da aplicação da fórmula, portanto, o título de anticorpos neutralizantes presentes no soro X.

3.14 Análise estatística

Para avaliação dos resultados por análise estatística, os dados obtidos foram exportados para arquivos de *Excel* (Microsoft Office) para montagem das tabelas e posteriormente analisados estatisticamente com auxílio do programa *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software Inc).

Os resultados da detecção *in vivo* das células T de memória foram analisados estatisticamente dentro dos grupos, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As populações de células T foram analisadas tanto em porcentagem e quanto em número absoluto. A análise de camundongos *outliers* foi realizada pela análise dos respectivos números absolutos de células T CD4⁺ e T CD8⁺ dentro de cada grupo imunizado ou controle com a análise Box-and-Whiskers Plot com pós-teste de Tukey. Encontramos somente dois camundongos *outliers*, que foram identificados no número absoluto de células T CD4⁺, que estavam no grupo do vírus FA/Vif 1-110 original. Removemos esses animais de toda a análise dos dados de citometria de fluxo, inclusive da imunofenotipagem de células T de memória. Utilizamos gráficos de dispersão com mediana para a análise desses resultados.

Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, onde as células provenientes do baço de camundongos imunizados foram estimuladas com peptídeos do vírus da FA 17D e Vif, foram analisados estatisticamente dentro dos grupos, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Com os resultados do PRNT, realizamos os testes de normalidade D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk, seguida da análise de Thompson-Tau para a remoção dos *outliers*. A seguir, os dados processados foram analisados pelo teste one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett, para comparar o grupo controle vacinado com o vírus FA 17DD com aqueles imunizados com os vírus recombinantes FA/Vif. Para investigar a diferença entre os grupos foi empregado pós-teste de Bonferroni.

4. Resultados

4.1 Construção dos vírus recombinantes de FA/Vif

Nosso grupo desenvolveu uma estratégia alternativa para inserção de fragmentos entre a proteína E e NS1 do genoma do vírus da febre amarela vacinal 17D, como citado na seção 3.3. Os vírus FA/Vif 1-110 original e FA/Vif 102-214 construídos anteriormente ao meu projeto, mas que foram utilizados nos ensaios, foram construídos na plataforma I de expressão da proteína heteróloga. O vírus FA/Vif 1-110 original é instável geneticamente, perdendo o inserto de Vif na quinta passagem seriada em células Vero, enquanto o FA/Vif 102-214 é estável até a décima quinta passagem.

Com o objetivo de aprimorar a plataforma de expressão da proteína heteróloga, foram introduzidas alterações no cassete de expressão de Vif, que denominamos de plataforma II. Basicamente, as mudanças introduzidas em relação à plataforma I consistem na introdução de dois domínios funcionais flanqueando a proteína heteróloga: 1) um domínio de N-glicosilação derivado da glicoproteína G do vírus da raiva, para direcionar as proteínas para secreção, 2) um domínio de clivagem proteolítica por furina derivado do fator von Willebrand humano, flanqueando a sequência de aminoácidos da proteína heteróloga, ou de separação do domínio haste âncora (HA derivado da proteína E do DENV-4), que retém a proteína recombinante associada à membrana do RE, além dos domínios presentes na plataforma I (Figura 4.1).

Assim foram obtidos os vírus recombinantes FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110, buscando melhorar a estabilidade genética e a imunogenicidade, utilizando o mesmo fragmento de Vif 1-110 do vírus FA/Vif 1-110 original (Figura 4.1). Postulamos que o sítio de ligação a RNA de lentivírus, na região N-terminal de Vif (152), poderia estar se ligando ao RNA genômico do vírus de febre amarela, levando a distúrbios nos processos em que RNA genômico está envolvido durante o ciclo de replicação viral. Vários resíduos dessa região foram mutados, e também o N-terminal foi deletado, e dessa maneira, novos vírus recombinantes foram construídos, com o objetivo de obtermos um vírus mais estável geneticamente (Figura A1 ANEXO II). O FA/Vif 42-110, que sofreu a deleção de todo o N-terminal de Vif, é estável geneticamente até a vigésima passagem seriada em células Vero.

Os vírus recombinantes de FA/Vif foram construídos com a tecnologia do clone infeccioso,

respeitando a integridade genômica do vírus da febre amarela vacinal 17D, como descrito na seção 3.7, para obtenção de um cDNA molde do genoma viral. O construto resultante é transcrito *in vitro*, gerando o RNA genômico. Finalmente, o RNA transcrito é transfectado por eletroporação em células Vero. Após a transfecção dos transcritos de RNA, ambos os vírus, FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110, foram obtidos após cerca de uma semana com a detecção do efeito citopático (CPE) nas culturas de células Vero.



Figura 4.1 - Representação das construções dos cassetes de expressão de Vif.

Representação dos cassetes de expressão de Vif dos vírus recombinantes utilizados, que foram inseridos na região intergênica E/NS1 do genoma de febre amarela 17D, com os elementos discriminados em cores diferentes e símbolos. Em rosa escuro, o N-terminal da proteína NS1, em rosa claro e amarelo; os espaçadores, e em azul, a haste âncora do vírus da dengue tipo-4. A estrela e o triângulo rosa invertido, representam os elementos inseridos na plataforma II de expressão; motivo de N-glicosilação e clivagem de furina, respectivamente. O tamanho do cassete de Vif de cada vírus recombinante é mostrado no lado direito de sua representação.

4.2 Caracterização biológica e genética dos vírus recombinantes de FA/Vif

4.2.1 Titulação dos estoques virais

Após a obtenção dos vírus recombinantes de FA/Vif, realizamos um estoque de segunda passagem em células Vero dos vírus recombinantes de FA/Vif, de modo a disponibilizar amostras tituladas, sequenciadas e homogêneas para toda a experimentação desta tese. Todos os vírus

recombinantes tiveram seu genoma completo totalmente sequenciado para avaliar a integridade da construção desenhada, e estes não apresentaram quaisquer alterações genéticas. Os vírus recombinantes construídos anteriormente ao projeto foram retitulados, e confirmados por sequenciamento. Os títulos dos estoques virais de trabalho, obtidos da média de três titulações independentes, encontram-se na tabela abaixo.

Tabela 4.1- Títulos dos vírus FA/Vif e controle vacinal FA 17DD.

	Título PFU/mL
FA 17DD	5,86 x 10 ⁶
FA/Vif 1-110 original	3,40 x 10 ⁶
FA/Vif 1-110 variante	3,10 x 10 ⁶
FA/Vif 42-110	1,90 x 10 ⁶
FA/Vif 102-214	4,30 x 10 ⁶

4.2.2 Estabilidade genética dos vírus recombinantes de FA/Vif

Para avaliar a estabilidade genética do inserto heterólogo nas diferentes construções virais, submetemos os vírus recombinantes a duas séries independentes de passagens (PA e PB) em cultura de células Vero, a partir do estoque viral 2P, com MOI de aproximadamente 0,02. Nas passagens 5, 10, 15 e 20 extraímos o RNA viral do sobrenadante da cultura e o submetemos a RT-PCR para amplificação de um fragmento contendo a região do inserto. O vírus da plataforma viral G1/2T3 sem inserto, foi utilizado como controle e gera uma banda de 674 pares de base (ver seção 3.7).

Observou-se que o FA/Vif 1-110 original era instável geneticamente. O amplicon íntegro de 1298 pb contendo o inserto Vif 1-110, após cinco passagens seriadas é detectado como uma banda majoritária de 674 pb, o que indica a perda total do inserto heterólogo (Figura 4.2 A), o que foi confirmado por sequenciamento nucleotídico. Enquanto o vírus com o fragmento 102-214 de Vif, manteve o inserto até a décima quinta passagem, como é evidenciado pela presença de amplicon de migração correspondente ao esperado de 1307 pb (Figura 4.2 A e B). Os novos vírus FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110 na plataforma II de expressão da proteína heteróloga, são mais estáveis que o vírus FA/Vif 1-110 original.

O vírus recombinante FA/Vif 1-110 variante, que possui o mesmo fragmento do FA/Vif 1-110 original, perde o inserto na décima passagem seriada em células Vero. Essa perda foi observada na passagem 10A e na 10B (Figura 4.2 C), com a detecção de bandas menores que o tamanho

esperado do amplicon contendo a inserção íntegra, que seria de 1373 pb. O vírus recombinante FA/Vif 42-110 apresentou-se o mais estável dos construtos, pois é estável até a vigésima passagem (Figura 4.2 D, décima passagem e Figura A2 – ANEXO II, vigésima passagem), sendo assim detectado o amplicon completo de 1253 pb.

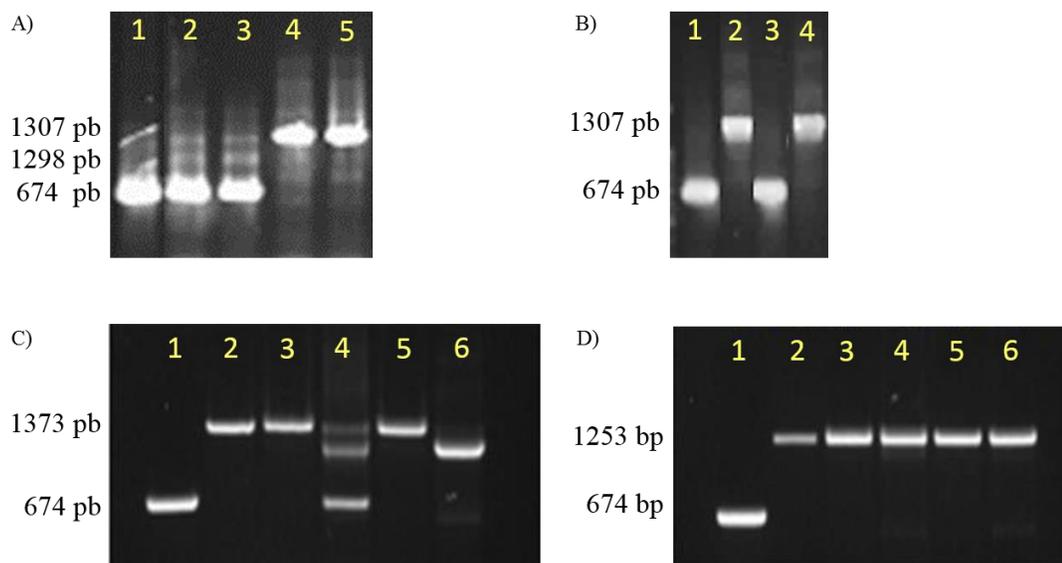


Figura 4.2 - Análise da estabilidade genética dos vírus recombinantes FA/Vif após passagem seriada em células Vero.

Amplicons contendo as inserções heterólogas foram analisados por eletroforese (seção 3.5). (A) Perfil obtido após quinta passagem seriada, com os canais: (1) vírus G1/2T3; (2) e (3) vírus FA/Vif 1-110 original; passagens 5A e 5B, respectivamente; (4) e (5) vírus FA/Vif 102-214, passagens 5A e 5B. (B) Perfil obtido após a décima quinta passagem seriada em célula, canais: (1) e (3) vírus G1/2T3; (2) e (4) FA/Vif 102-214; passagens 15A e 15B respectivamente. (C) (1) vírus G1/2T3; e os canais de (2) a (6) correspondem ao vírus FA/Vif 1-110 variante; onde (2) perfil da passagem 2P do vírus, (3) passagem 5A, (4) passagem 10A, (5) passagem 5B e (6) passagem 10B. (D) (1) vírus G1/2T3; e os canais de (2) a (6) correspondem ao vírus FA/Vif 42-110; onde (2) perfil da passagem 2P do vírus, (3) passagem 5A, (4) passagem 10A, (5) passagem 5B e (6) passagem 10B.

4.2.3 Proliferação viral em células Vero

Para melhor caracterizar comparativamente os construtos virais, células Vero foram infectadas com o vírus controle FA 17DD e os vírus recombinantes FA/Vif, gerados pela tecnologia do clone infeccioso, que são os vírus FA/Vif 1-110 original, FA/Vif 1-110 variante, FA/Vif 42-110 e FA/Vif 102-214. Em uma primeira etapa, foi realizado o teste Shapiro-Wilk, que confirmou que os dados de infecção em 72 horas eram normais (três titulações independentes), e por isso,

realizamos o pós-teste de Dunnett, comparando o vírus controle FA/17DD e os vírus recombinantes FA/Vif, usando intervalo de confiança de 90 %. O gráfico e a tabela mostram a média e o desvio padrão de três experimentos diferentes (Figura 4.3 e Tabela 4.2).

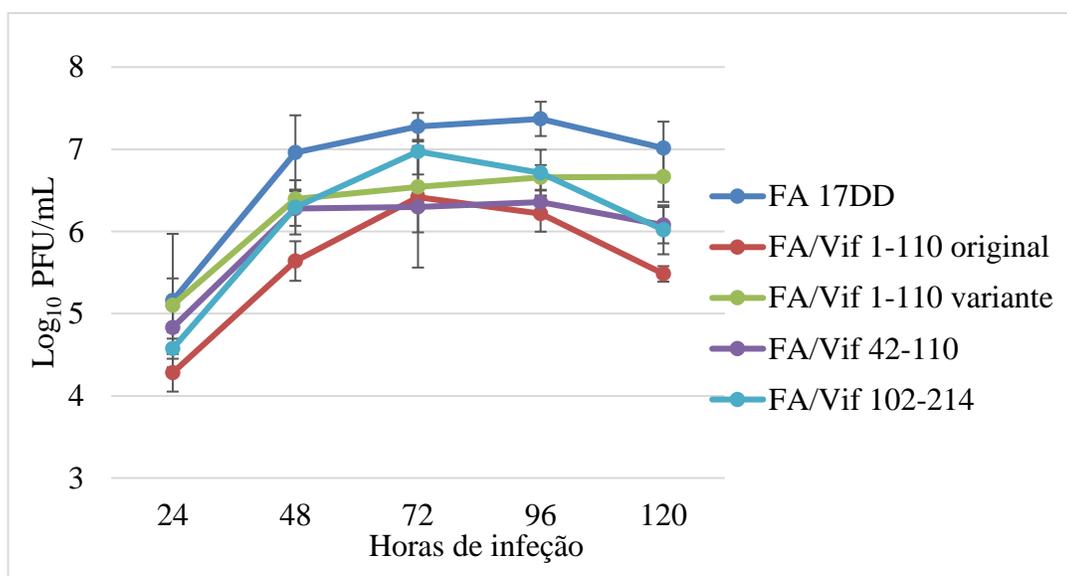


Figura 4.3 - Proliferação viral em células Vero ao longo do tempo.

Culturas de células Vero foram infectadas com os vírus recombinantes de FA/Vif e o controle FA 17DD utilizando MOI de 0,02. A cada dia foi retirada uma alíquota do sobrenadante das culturas infectadas, que foi titulada. Os pontos indicados no gráfico representam as médias dos títulos virais expressos em \log_{10} PFU/mL com o desvio padrão, obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Os dados foram analisados com teste one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett, comparando o controle FA 17DD com os vírus recombinantes de FA/Vif.

Tabela 4.2 - Média e desvio padrão dos títulos virais (em \log_{10} PFU/mL) obtidos para cada vírus durante a cinética de proliferação viral em célula Vero.

		24h	48h	72h	96h	120h
	FA 17DD	5,15 ± 0,81	6,95 ± 0,45	7,27 ± 0,16	7,36 ± 0,20	7,01 ± 0,32
	FA/Vif 1-110 original	4,28 ± 0,24	5,64 ± 0,24	6,41 ± 0,04	6,21 ± 0,21	5,48 ± 0,09
Vero	FA/Vif 1-110 variante	5,10 ± 0,32	6,39 ± 0,11	6,54 ± 0,55	6,65 ± 0,15	6,66 ± 0,30
	FA/Vif 42-110	4,82 ± 0,31	6,27 ± 0,21	6,29 ± 0,73	6,35 ± 0,14	6,07 ± 0,22
	FA/Vif 102-214	4,57 ± 0,12	6,29 ± 0,33	6,97 ± 0,28	6,71 ± 0,28	6,02 ± 0,29

Todos os vírus recombinantes FA/Vif apresentaram uma menor proliferação viral em relação ao vírus controle FA 17DD. O que mais se aproximou ao vírus vacinal da FA 17DD, em relação ao perfil de proliferação viral, foi o FA/Vif 102-214. O pico de proliferação viral de todos os vírus estudados foi em 72 horas (quando a quantificação de partículas virais no sobrenadante

atingiu um máximo ao longo dos 5 dias pós infecção), e por isso realizamos a análise estatística nesse ponto da curva. Depois de 96 horas de infecção, observa-se uma queda de proliferação, com exceção do vírus FA/Vif 1-110 variante, que mantém um platô entre 96 e 120 horas.

Foi encontrada diferença estatística entre o vírus vacinal controle 17DD e o FA/Vif 1-110 original em 72 horas de infecção; com *p*-valor de 0,01, sendo este o vírus recombinante com menor taxa de crescimento, e o FA/Vif 102-214 com a maior taxa de crescimento. Em 48 horas de infecção, o vírus FA 17DD apresentou vinte e duas vezes mais partículas virais infectivas que o FA/Vif 1-110 original, e em 72 horas de infecção; aproximadamente sete vezes mais partículas. A diferença entre o FA 17DD e o FA/Vif 1-110 variante em 48 horas, é de aproximadamente quatro vezes mais, e em 72 horas; de seis vezes mais partículas virais infectivas. Já com o FA/Vif 42-110, é de aproximadamente quatro vezes em 48 horas de infecção, e de dez vezes mais partículas virais infectivas em 72 horas. O FA/Vif 102-214, que apresentou a menor diferença com o 17DD, apresentou aproximadamente quatro vezes menos em 48 horas, e duas vezes menos partículas virais infectivas em 72 horas de infecção.

Embora o perfil de proliferação em células Vero dos três vírus FA/Vif (1-110 original, 1-110 variante e 42-110) sejam similares, houve um incremento nas taxas de proliferação viral dos novos vírus construídos em relação ao FA/Vif 1-110 original, principalmente quando comparados nas primeiras 72 horas de infecção.

4.3 Avaliação da imunogenicidade em camundongos C57BL/6 dos vírus recombinantes FA/Vif

Nesta etapa do trabalho de tese, pretendia-se determinar se os vírus recombinantes FA/Vif são imunogênicos e se são igualmente indutores de resposta imune para o vírus FA 17DD e para o antígeno Vif de SIV. Basicamente, fizemos estudos em que se caracteriza a resposta celular por células T e pela indução de anticorpos neutralizantes, como veremos a seguir.

4.3.1 Determinação do número total de esplenócitos e do número absoluto de células T CD4⁺ e T CD8⁺ dos grupos imunizados com os vírus recombinantes de FA/Vif

Nessa primeira etapa, para avaliar se as imunizações com os vírus recombinantes de FA/Vif induziram algum tipo de alteração celular nos camundongos, determinamos a contagem total de

esplenócitos e do número absoluto de células T CD4⁺ e T CD8⁺, e comparamos com os grupos controle naïve, mock e FA 17DD. Observamos que o grupo do vírus recombinante FA/Vif 1-110 variante, tem um aumento de celularidade, dispersão; no número total de esplenócitos, em relação aos outros grupos, apresentando a maior mediana entre os grupos experimentais. Encontramos diferença significativa entre o FA 17DD e esse recombinante, com *p*-valor de 0,04, representada em asterisco na Figura 4.4 A. Não houve diferença entre os outros grupos, na contagem total de esplenócitos (Figura 4.4 A).

Analizamos as populações celulares T CD4⁺ e T CD8⁺ dessas amostras de esplenócitos, na etapa seguinte, buscando avaliar se houve diferença no número dessas populações, entre os grupos FA/Vif e controles, após as imunizações. Nas células T CD4⁺, encontramos diferença significativa entre o grupo naïve e todos os outros grupos, onde essa foi maior com o FA/Vif 1-110 variante; com *p*-valor de 0,03. Existe uma tendência de se observar os maiores valores de células T CD4⁺ nos grupos imunizados com os vírus recombinantes FA/Vif, com exceção do grupo FA/Vif 1-110 original. O grupo FA/Vif 1-110 variante apresentou o mesmo perfil de grande dispersão observado no número de esplenócitos, também no número absoluto de células T CD4⁺, e apresentou valores significativamente maiores que o FA/Vif 1-110 original (*p*-valor de 0,03) (Figura 4.4 B). Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, quanto ao número absoluto de células T CD8⁺, consistentemente, o FA/Vif 1-110 variante apresentou a maior dispersão entre todos os grupos, também nessa população avaliada (Figura 4.4 C).

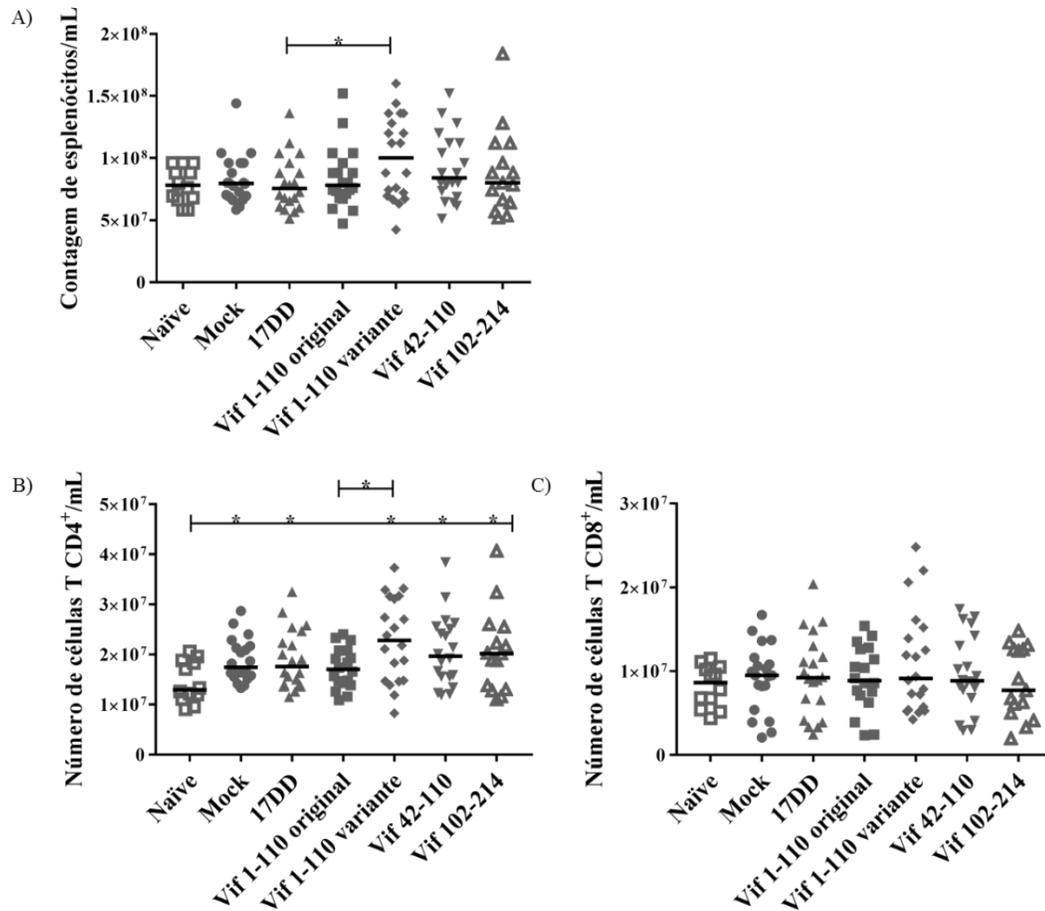


Figura 4.4 - Determinação do número total de esplenócitos e do número absoluto de células T CD4⁺ e T CD8⁺ dos grupos imunizados com vírus recombinantes de FA/Vif.

Os dados são apresentados em gráficos de dispersão com mediana do número de células T. (A) Contagem total de esplenócitos por camundongo. (B) Número absoluto de células T CD4⁺ e (C) número absoluto de células T CD8⁺. Através da análise com o *software* Summit, obtivemos a porcentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺, e então calculamos o número absoluto dessas populações de cada camundongo, utilizando a sua contagem de esplenócitos - porcentagem de T CD4⁺ ou T CD8⁺ x número de esplenócitos/100. Os asteriscos nos gráficos indicam a diferença significativa encontrada entre os grupos, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

A contribuição relativa de células T CD4⁺ e T CD8⁺ por grupo experimental foi também avaliada, com o objetivo de investigarmos alterações na razão dessas populações celulares, após as imunizações. Analisamos as razões de células T CD4⁺ e T CD8⁺ dentro dos grupos, para comparar as porcentagens com que cada valor dessas populações contribui para um total. O gráfico é plotado com a mediana dessas populações em cada grupo, sem os *outliers*. O resultado é muito semelhante aos dos gráficos de número absoluto de células T CD4⁺ e T CD8⁺. Observa-se no grupo do vírus recombinante FA/Vif 1-110 variante, um aumento de células T CD4⁺ em relação aos outros grupos.

Os grupos de FA/Vif apresentam uma tendência de aumento de células T CD4⁺, com exceção do FA/Vif original (Figura 4.5).

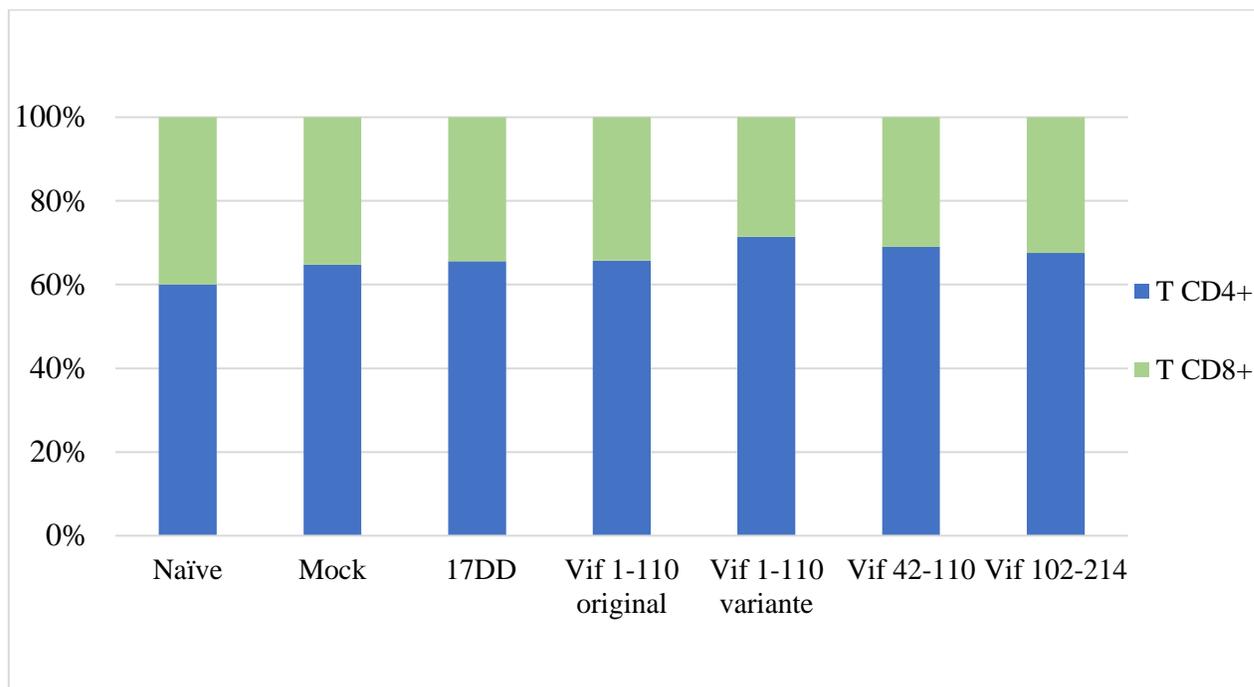


Figura 4.5 - Razão de células T CD4⁺ e T CD8⁺ dentro dos grupos de camundongos imunizados e naïve.

Gráfico de colunas 100% empilhada, mostrando a razão do número de células T CD4⁺ e T CD8⁺ dentro de cada grupo, através da mediana dessas células nos grupos controle e vírus recombinantes.

4.3.2 Detecção *in vivo* de células T de memória após as imunizações com os vírus recombinantes FA/Vif

Com o objetivo de se avaliar a capacidade de geração de células T de memória, após as imunizações com os vírus FA/Vif, populações de células T foram analisadas quanto ao seu número absoluto e porcentagem. Populações de células T CD4⁺, T CD8⁺, T CD4⁺ de memória e T CD8⁺ de memória foram caracterizadas pela expressão dos marcadores de moléculas de superfície CD3, CD4, CD8, CD44, CD127, CCR7, CD62L e o marcador de viabilidade Zombie Violet.

4.3.2.1 Determinação do número absoluto e porcentagem de células T de memória nos grupos imunizados com os vírus recombinantes FA/Vif

Com as populações de células T CD4⁺ e T CD8⁺ já definidas e analisadas dentro dos grupos, utilizamos os anticorpos específicos contra CD44 e CD127 para imunofenotipar células T de memória, que apresentam o fenótipo CD44^{high}CD127^{high}. Esses marcadores estão relacionados à migração/adesão celular e manutenção/sobrevivência de células T de memória, respectivamente. Os resultados estão em número absoluto e porcentagem das populações de interesse.

Todos os grupos experimentais apresentaram o número absoluto de células T CD4⁺ de memória (CD44^{high}CD127^{high}), significativamente maior que o do grupo naíve (*p*-valores de 0,01 a 0,03), com exceção do FA/Vif 102-214. Não há diferença significativa entre os grupos que receberam vírus recombinantes, o FA 17DD e o mock (Figura 4.6 A). No número absoluto de células T CD8⁺ de memória (CD44^{high}CD127^{high}), os grupos experimentais apresentam valores significativamente maiores que o do grupo naíve, com exceção do mock e FA/Vif 102-214, porém a diferença foi maior com o FA/Vif 1-110 variante, com *p*-valor de 0,0092. A diferença entre naíve e mock é limítrofe, com *p*-valor de 0,0570 (Figura 4.6 B). A associação destas análises indicaria que o vírus FA/Vif 1-110 variante tenderia a exibir uma frequência maior de células T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória, dentro nas nossas condições experimentais.

Ao se estabelecer a porcentagem das células T CD4⁺ de memória, observamos que não houve diferença significativa entre os grupos, mas os vírus recombinantes apresentaram animais imunizados com maiores valores e dispersão que os grupos controles (Figura 4.6 C). A diferença significativa encontrada na análise da frequência das células T CD8⁺ de memória, entre o grupo naíve e os demais, foi muito maior que em seu número absoluto, com *p*-valor menor que 0,0001 para todos os grupos (Figura 4.6 D). Não houve diferença entre os grupos de vírus nas populações de memória, e o mock se manteve semelhante a esses grupos.

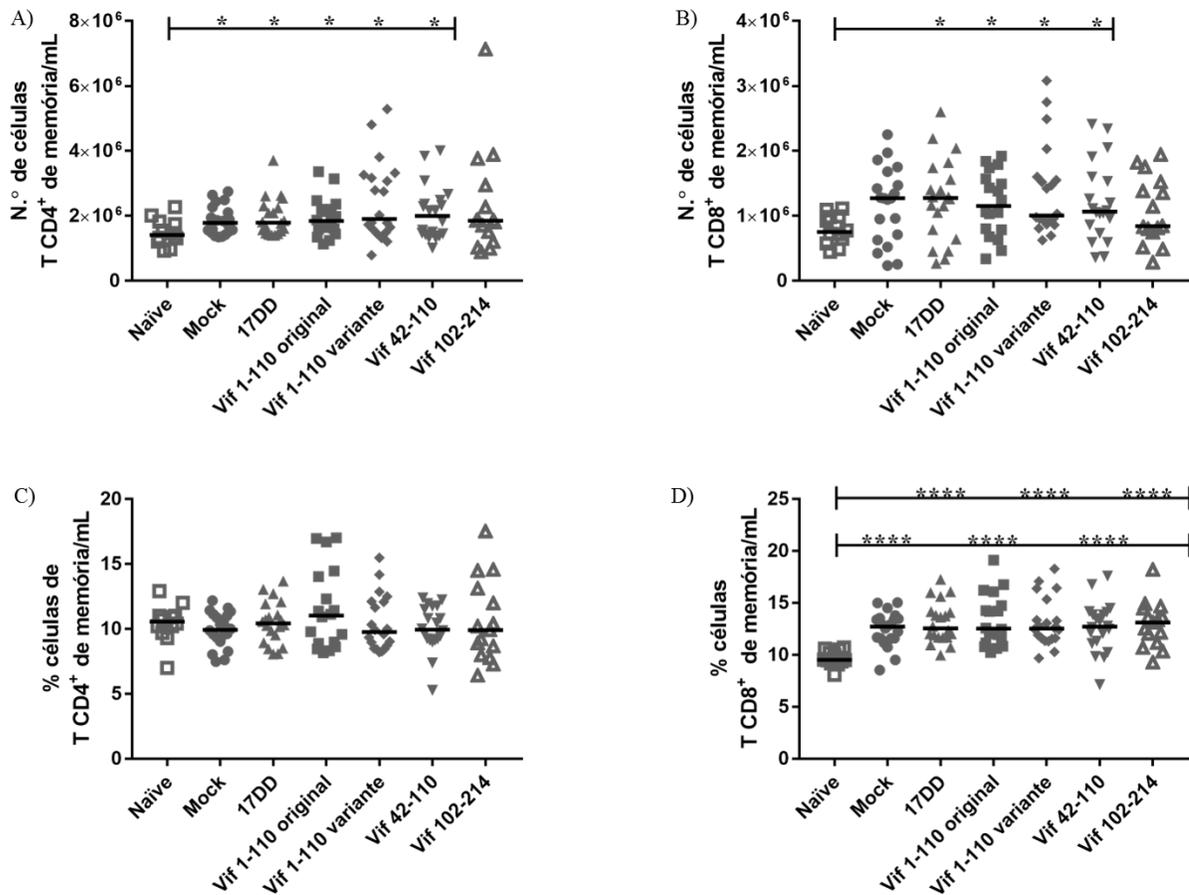


Figura 4.6 - Determinação do número absoluto e porcentagem de células T de memória nos grupos imunizados com FA/Vif.

Os dados são apresentados em gráficos de dispersão com mediana do número absoluto e porcentagem de células T de memória, que foram imunofenotipadas em T CD4⁺CD44^{high}CD127^{high} e T CD8⁺CD44^{high}CD127^{high} e quantificadas pelo seu número absoluto (A e B, respectivamente) ou porcentagem (C e D, respectivamente). Através da análise com o *software* Summit, obtivemos a porcentagem de células T CD4⁺ de memória e T CD8⁺ de memória, e então calculamos o número absoluto dessas populações de cada camundongo, utilizando o número de células T CD4⁺ e T CD8⁺ - porcentagem de T CD4⁺ de memória ou T CD8⁺ de memória x número de células T CD4⁺ ou T CD8⁺/100. Os asteriscos nos gráficos indicam a diferença significativa encontrada entre os grupos, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

4.3.2.2 Detecção da população de células T de memória central nos grupos imunizados com FA/Vif

A avaliação das subpopulações de células T de memória, geradas após imunização, é importante para prever quão eficiente a resposta imune celular foi contra o patógeno da vacina,

especialmente pelas células T memória efetora, que conferem proteção imediata, circulando ou residente nos tecidos. A resposta de “re-chamada” é conferida pelas células T de memória central, que patrulham as áreas de tecidos linfoides secundários, onde elas podem rapidamente proliferar depois do encontro com o antígeno apresentado por células dendríticas.

Assim, com o objetivo de identificar as populações de células T de memória central e efetora, utilizamos os marcadores de superfície celular CCR7 e CD62L, juntamente com CD44 e CD127. O CCR7 com a L-selectina CD62L, medeiam a migração das células T para órgãos linfoides secundários, via vênulas do endotélio alto. As células T de memória central possuem o fenótipo $CD44^{high}CD127^{high}CCR7^{high}CD62L^{high}$, enquanto as de memória efetora são imunofenotipadas como $CD44^{high}CD127^{high}CCR7^{low}CD62L^{low}$.

No número de T $CD4^{+}$ de memória central, notamos que os grupos imunizados apresentaram valores significativamente maiores que o do grupo naïve, sendo que foi maior com o mock, FA 17DD e FA/Vif 1-110 original (p -valor menor que 0,0001). O p -valor da diferença do naïve com FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110 foi de exatamente 0,0001, e com FA/Vif 102-214 de 0,0051 (Figura 4.7 A). Mais uma vez, se detecta uma tendência de animais que foram imunizados com os vírus FA/Vif 1-110 variante de apresentarem um número superior de células T $CD4^{+}$, aqui no caso, de memória central, embora não observamos diferença significativa entre os grupos imunizados. Para as células T $CD8^{+}$ de memória central em seu número, observamos que os grupos mock, FA 17DD e FA/Vif 1-110 variante, apresentaram valores significativamente maiores que o naïve (p -valores de 0,01 a 0,04) (Figura 4.7 B). Não encontramos nenhuma diferença significativa entre os grupos imunizados no número de células T $CD8^{+}$ de memória central.

Quando analisamos a porcentagem das células T $CD4^{+}$ de memória central, encontramos resultados semelhantes entre o grupo naïve e os outros grupos em relação aos obtidos na análise de número, porém, também observamos diferença significativa entre FA/Vif 1-110 original e FA/Vif 42-110 (Figura 4.7 C). O grupo mock nos dados de células T $CD8^{+}$ de memória central, principalmente na porcentagem dessa população, apresentou mediana maior que todos os outros grupos, resultado que também foi observado posteriormente em outra análise de imunofenotipagem e detecção de citocinas secretadas pelos esplenócitos de camundongos imunizados (seção 4.3.3.5). Na frequência das células T $CD8^{+}$ de memória central, encontramos diferença significativa entre o grupo mock, que apresentou valores significativamente mais altos que todos os vírus de FA/Vif, com p -valores entre 0,01 e 0,04. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os vírus (Figura 4.7 D).

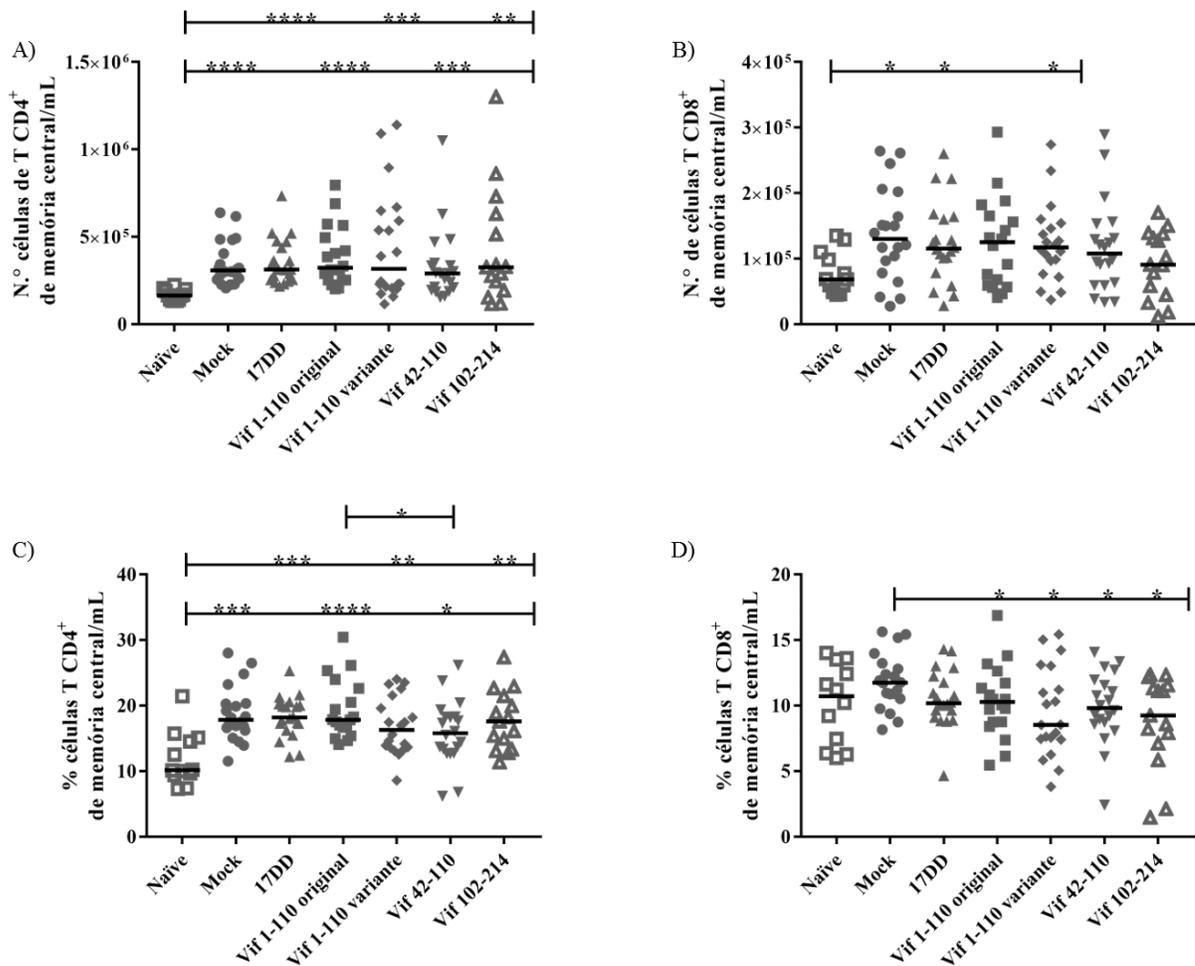


Figura 4.7 - Detecção da população de células T de memória central nos grupos imunizados com FA/Vif.

Os dados são apresentados em gráficos de dispersão com mediana do número absoluto e porcentagem de células T de memória central, que foram imunofenotipadas em T CD4⁺ CD44^{high}CD127^{high}CCR7^{high}CD62L^{high} e T CD8⁺CD44^{high}CD127^{high}CCR7^{high}CD62L^{high} e quantificadas pelo seu número absoluto (A e B, respectivamente) ou porcentagem (C e D, respectivamente). Através da análise com o *software* Summit, obtivemos a porcentagem de células T CD4⁺ de memória central e T CD8⁺ de memória central, e então calculamos o número absoluto dessas populações de cada camundongo, utilizando o número de células T CD4⁺ de memória e T CD8⁺ de memória - porcentagem de T CD4⁺ de memória central ou T CD8⁺ de memória central x número de células T CD4⁺ de memória ou T CD8⁺ de memória/100. Os asteriscos nos gráficos indicam a diferença significativa encontrada entre os grupos, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

4.3.2.3 Detecção da população de células T de memória efetora nos grupos imunizados com FA/Vif

As células T de memória efetora foram imunofenotipadas como células T CD4⁺CD44^{high}CD127^{high}CCR7^{low}CD62L^{low} e células T CD8⁺CD44^{high}CD127^{high}CCR7^{low}CD62L^{low}. No número absoluto de células T CD4⁺ de memória efetora, os grupos imunizados apresentaram valores significativamente maiores que o grupo naïve, especialmente quando comparadas às observadas nos dados de memória central, em todos os grupos FA/Vif (seção 4.3.2.2). Animais imunizados apresentaram maiores números de células T efetoras quando comparados ao grupo naïve, embora não tenhamos observado diferença significativa entre o grupo mock e os grupos que receberam os inóculos virais. Os grupos FA 17DD, FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110, apresentaram os maiores valores em relação ao grupo naïve (*p*-valor de 0,0001). Mais uma vez, observa-se uma tendência de maior dispersão para valores superiores de células T CD4⁺ de memória efetora no grupo FA/Vif 1-110 variante, mas também nos grupos FA/Vif 42-110 e FA/Vif 102-214 que apresentaram valores mais altos do número de células T CD4⁺ efetoras (Figura 4.8 A).

No número absoluto de células T CD8⁺ de memória efetora, observamos valores ainda mais altos nos grupos imunizados em relação ao grupo naïve, e pela primeira vez, observamos diferença significativa do grupo mock com grupos de FA/Vif. O grupo FA/Vif 1-110 variante apresentou alguns valores que foram duas vezes maiores que os encontrados no grupo FA 17DD, mantendo aqui também, o seu perfil de maior dispersão em relação aos outros grupos (Figura 4.8 B).

A porcentagem de células T CD4⁺ de memória efetora é significativamente superior nos grupos imunizados em relação ao grupo naïve (Figura 4.8 C), mas também observamos uma maior porcentagem destas células no grupo FA/Vif 42-110 quando comparado ao grupo mock (*p*-valor de 0,01). O grupo FA/Vif 42-110 também apresentou o maior valor mediano de células T CD4⁺ de memória efetora, quando comparado com o valor determinado para o grupo FA/Vif 1-110 original e FA/Vif 1-110 variante, *p*-valores de 0,001 e 0,04 respectivamente; e apresentou *p*-valor limítrofe de 0,0524 com FA 17DD (Figura 4.8 C). Os grupos FA/Vif 42-110, FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 102-214, apresentaram em alguns animais imunizados, cerca de 10% de células T CD4⁺ de memória efetora a mais que nos observados no grupo FA/Vif 1-110 original (Figura 4.8 C).

Os grupos imunizados apresentaram valores significativamente maiores que o grupo naïve, com *p*-valor menor que 0,0001, na porcentagem de células T CD8⁺ de memória efetora; e todos os grupos de FA/Vif apresentaram medianas maiores que o grupo mock, com diferença significativa. O grupo do vírus FA/Vif 42-110 também se destacou nesse parâmetro, apresentando diferença

significativa com o grupo FA 17DD e com p -valor limítrofe de 0,0511 com FA/Vif 1-110 original. O grupo FA/Vif 102-214 apresentou valores significativamente maiores que FA 17DD e o FA/Vif 1-110 original; e o grupo FA/Vif 1-110 variante apresentou p -valor limítrofe de 0,0524 com FA 17DD (Figura 4.8 D). Os grupos de vírus recombinantes FA/Vif 1-110 variante, FA/Vif 42-110 e FA/Vif 102-214, no parâmetro de células T de memória efetora, se destacaram dentre os grupos imunizados. Os grupos FA/Vif 42-110, FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 102-214, apresentaram em alguns animais imunizados, cerca de 20% de células T CD4⁺ de memória efetora a mais que nos observados no grupo FA 17DD e FA/Vif 1-110 original (Figura 4.8 D).

Nos dados de porcentagem de células T de memória efetora, observamos diferença significativa entre os grupos de FA/Vif; e também entre grupos de FA/Vif e o grupo FA 17DD, onde os recombinantes apresentaram valores maiores de porcentagem dessa população, o que fez com que esse parâmetro fosse o mais discriminativo dos que foram analisados nos ensaios de detecção *in vivo* de células T de memória, o que posteriormente também notamos na análise das células nos ensaios de resposta específica ao vírus da febre amarela e a Vif, e de forma geral, especialmente nas células T CD8⁺ (seção 4.3.3.2).

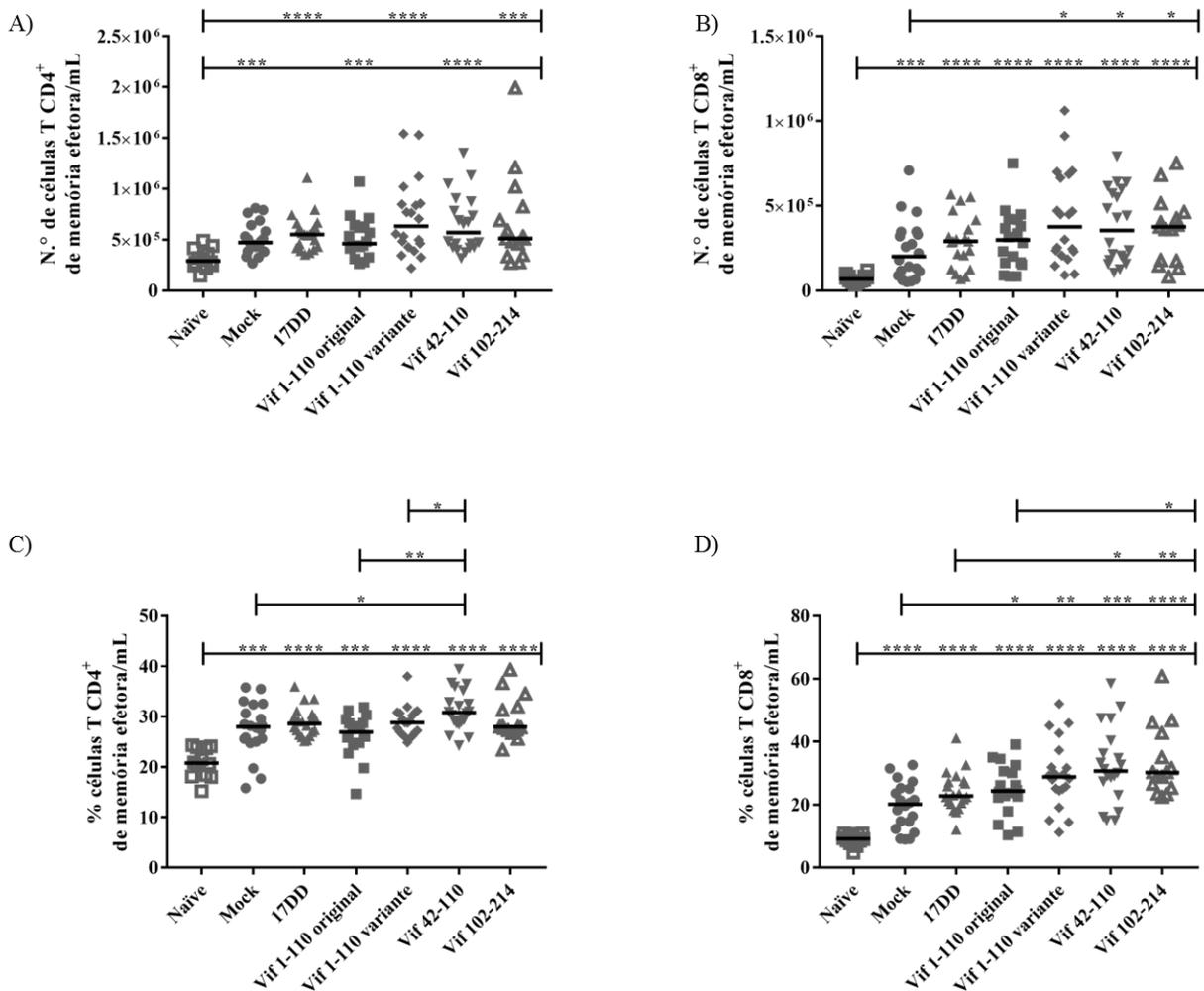


Figura 4.8 - Detecção da população de células T de memória efetora dos grupos imunizados com FA/Vif.

Os dados são apresentados em gráficos de dispersão com mediana do número absoluto e porcentagem de células T de memória efetora, que foram imunofenotipadas em T CD4⁺ CD44^{high}CD127^{high}CCR7^{low}CD62L^{low} e T CD8⁺CD44^{high}CD127^{high}CCR7^{low}CD62L^{low} e quantificadas pelo seu número absoluto (A e B, respectivamente) ou porcentagem (C e D, respectivamente). Através da análise com o *software* Summit, obtivemos a porcentagem de células T CD4⁺ de memória efetora e T CD8⁺ de memória efetora, e então calculamos o número absoluto dessas populações de cada camundongo, utilizando o número de células T CD4⁺ de memória e T CD8⁺ de memória - porcentagem de T CD4⁺ de memória efetora ou T CD8⁺ de memória efetora x número de células T CD4⁺ de memória ou T CD8⁺ de memória/100. Os asteriscos nos gráficos indicam a diferença significativa encontrada entre os grupos, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

4.3.3 Avaliação da resposta celular específica contra o vírus da febre amarela 17D e o fator de infectividade viral (Vif) de SIVmac239, nos grupos imunizados com FA/Vif

Nessa etapa, com o objetivo de analisarmos a resposta celular específica ao vírus da FA e ao antígeno de Vif, após as imunizações com os vírus recombinantes FA/Vif, pesquisou-se a resposta celular específica aos estímulos de FA 17D e Vif, através da caracterização da expressão de moléculas de superfície, síntese de citocinas, proliferação celular, e diferenciação em células efetoras e de memória.

Os esplenócitos dos camundongos imunizados foram estimulados *in vitro* (*pools* de esplenócitos por grupo) com o peptídeo da FA 17D ATLTYRML e dois *pools* com dez peptídeos de Vif, correspondentes aos fragmentos de Vif, posição de 1 a 51 e de 41 a 107 (GenBank *accession number* M33262). Avaliamos a ativação de células T, proliferação celular de linfócitos e especificamente de células T de memória (central e efetora), e a produção de citocinas no sobrenadante da cultura celular. Realizamos dois experimentos com o peptídeo do vírus da FA 17D e com o *pool* de Vif 41-107, e três com Vif 1-51. Após a incubação, as células foram imunofenotipadas com um painel de ativação de células T, memória, proliferação e viabilidade, correspondentes aos marcadores CD3, CD4, CD8, CD69, CD44, CCR7, CD62L, CFSE e o Zombie Violet, respectivamente. A análise foi estendida para a detecção de citocinas T_{H1} e T_{H2} no sobrenadante da cultura das células estimuladas.

4.3.3.1 Detecção de células T de camundongos imunizados com os vírus FA/Vif, que foram ativadas e proliferaram após estímulo *in vitro*

Esplenócitos dos grupos controles naïve e mock foram inespecificamente ativados e proliferaram na presença de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) e ionomicina, compostos que ativam células T pela via da proteína quinase C (PCK), “omitindo” a necessidade de estimulação via receptor de superfície, e também causam a liberação de cálcio, necessário para a sinalização NFAT (fator nuclear de células T ativadas), respectivamente. Esses grupos não foram incluídos na análise estatística, por serem controles da técnica e não da experimentação em si. Eles mostram que as células que utilizamos respondem à estímulos.

Quando estimulamos as células com o peptídeo ATLTYRML da proteína NS3 do vírus da FA 17D, não encontramos qualquer diferença significativa entre os grupos, na porcentagem de

células T CD4⁺ ativadas (T CD4⁺CD69⁺), porém observamos maior frequência dessa população em todos os grupos que foram imunizados com vírus, em relação aos controles negativos naïve não-estimulado, naïve e mock estimulados com peptídeo do vírus da febre amarela. Os *p*-valores da diferença do grupo FA/Vif 42-110 com os grupos mock e naïve são limítrofes; de 0,0571 (Figura 4.9 A).

Já nas células T CD8⁺ ativadas (T CD4⁺CD69⁺), a diferença na porcentagem dessa população nos grupos de vírus em relação aos controles negativos, é mais evidente. Os grupos FA 17DD, FA/Vif 1-110 original e FA/Vif 42-110 apresentaram valores significativamente maiores que o grupo mock, embora o *p*-valor da diferença do grupo FA 17DD e naïve seja limítrofe; de 0,0571. Dentre os grupos de recombinantes FA/Vif, nas células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas, o grupo FA/Vif 1-110 original, se mostrou com maior porcentagem dessas populações, porém mais perceptível em células T CD8⁺ ativadas (Figura 4.9 B).

As células quando estimuladas *in vitro*, são ativadas e sofrem expansão clonal, isto é, proliferação celular. Utilizamos o marcador de proliferação CFSE, para avaliar quão eficientes foram os estímulos, avaliando as células CD3⁺ vivas. As células que proliferaram possuem o fenótipo CFSE^{low}. Esplenócitos dos grupos controles naïve e mock foram inespecificamente ativados e proliferaram na presença de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) e ionomicina (controles da técnica). Esses controles serão mostrados em todas as populações estudadas a partir dessa seção. A Figura 4.10 é uma sobreposição representativa da população que proliferou (CFSE^{low}) em todos os grupos com os estímulos do vírus de FA 17D e Vif, com os controles.

Com o estímulo do peptídeo do vírus da FA 17D ATLYRML, todos os grupos de vírus apresentaram maior frequência de células em proliferação que os controles negativos, mas especialmente o grupo do vírus recombinante FA/Vif 1-110 variante e em seguida o FA/Vif 42-110. O grupo do vírus recombinante FA/Vif 1-110 variante se destacou, apresentando valores significativamente maiores que os grupos naïve, mock e FA 17DD. Os grupos de vírus FA/Vif apresentaram valores maiores que o FA 17DD. O grupo FA/Vif 42-110 com o naïve não estimulado e com FA 17DD, apresentou um *p*-valor limítrofe de 0,0571. Assim como o grupo FA/Vif 1-110 original com FA/Vif 1-110 variante (Figura 4.9 C).

Também avaliamos as células T CD4⁺ e T CD8⁺ que proliferaram após a incubação com o estímulo do vírus de FA 17D (populações T CD4⁺ CFSE^{low} e T CD8⁺CFSE^{low}). A frequência de células T CD4⁺CFSE^{low} foi maior no grupo do FA 17DD e FA/Vif 1-110 variante, e essa resposta se encontra acima da resposta dos controles negativos, apesar de não haver diferença significativa

entre os todos os grupos experimentais. O *p*-valor da diferença entre o grupo FA 17DD e o FA/Vif 42-110 é limítrofe, de 0,0571 (Figura 4.9 D). O grupo do FA 17DD e o FA/Vif 1-110 variante, também apresentaram maior frequência de células T CD8⁺CFSE^{low}, com diferença significativa desses dois grupos com o naïve não estimulado, naïve e mock, e o grupo do FA 17DD apresentou valores significativamente maiores que o FA/Vif 1-110 original. Os grupos FA/Vif 1-110 original e FA/Vif 42-110, apresentaram *p*-valor limítrofe de 0,0571 com o grupo naïve não estimulado (Figura 4.9 E).

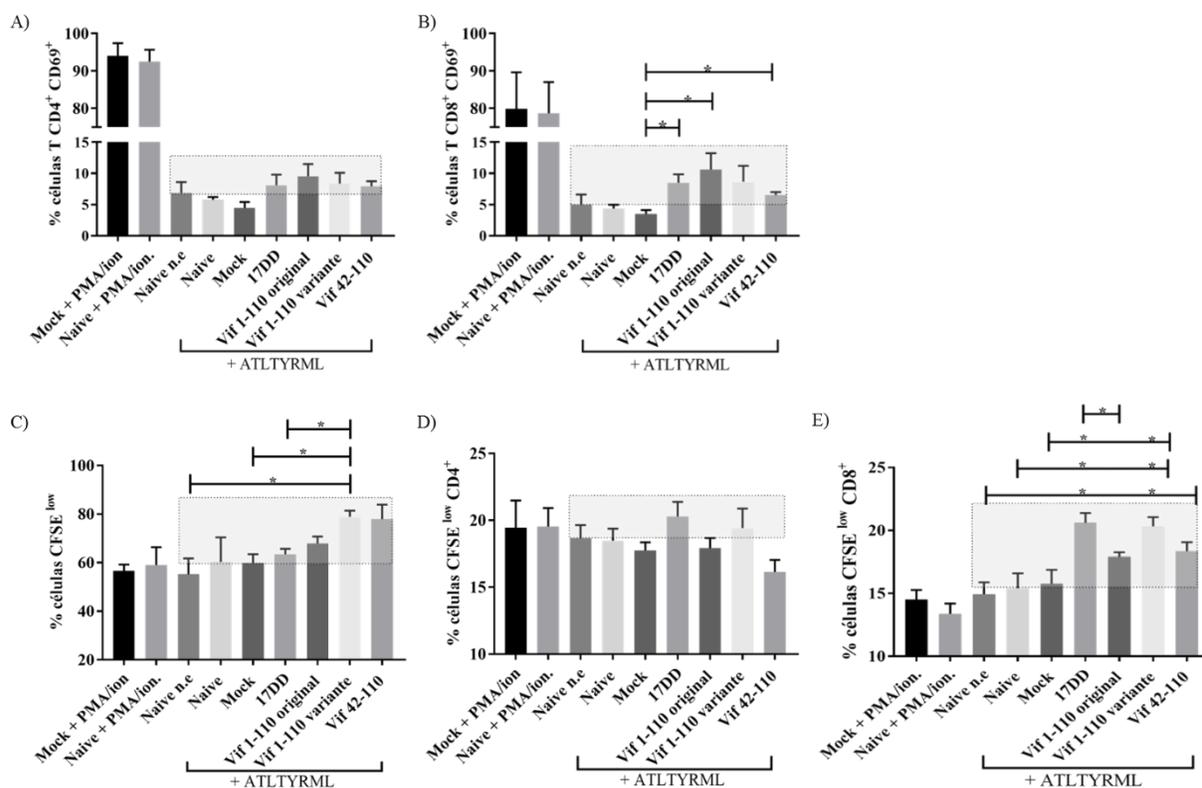


Figura 4.9 - Detecção de células T ativadas e que proliferaram após estímulo *in vitro* com peptídeo ATLTYRML do vírus da FA 17D.

Os gráficos representam: (A) e (B) Frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas (CD69⁺), respectivamente; (C) Células CD3⁺ que proliferaram (CFSE^{low}); (D) Frequência de células T CD4⁺ que proliferaram (CFSE^{low} T CD4⁺) e (E) Frequência de células T CD8⁺ que proliferaram (CFSE^{low} T CD8⁺). As abreviações PMA/ion. correspondem a forbol-12-miristato-13-acetato e ionomicina, respectivamente, e naïve n.e a naïve não estimulado. Os asteriscos nos gráficos indicam a diferença significativa encontrada entre os grupos, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, as colunas; as médias dos grupos, e as barras nas colunas correspondem ao erro médio. O retângulo em cinza claro nos gráficos evidencia onde está a diferença ou tendência encontrada acima dos controles negativos. As chaves presentes no eixo x do gráfico, embaixo da identificação dos grupos, mostra quem recebeu o estímulo, e qual foi ele.

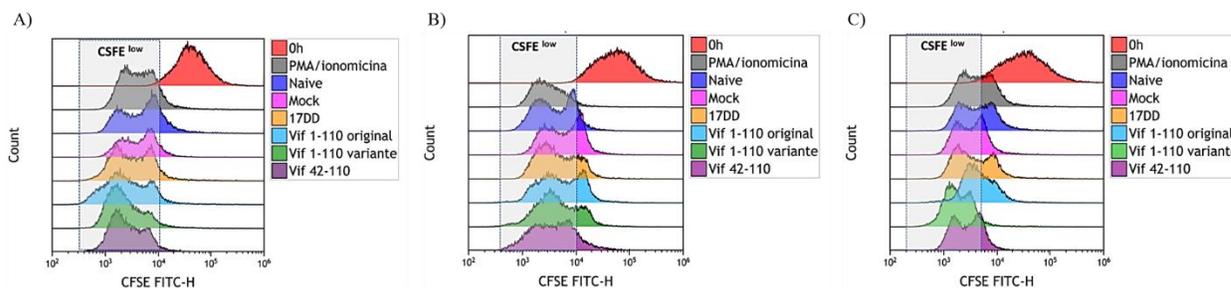


Figura 4.10 - Overlays representativos para a identificação da região de proliferação celular (CFSE^{low}).

Sobreposição da amostra 0 hora com as amostras incubadas por 18-19 horas. *Overlays* representativos de (A) amostras estimuladas com peptídeo de FA 17D e controles negativos; (B) amostras estimuladas com *pool* de peptídeos de Vif 41-107 e controles negativos e (C) amostras estimuladas com *pool* de peptídeos de Vif 1-51 e controles.

Quando estimulamos as células com o *pool* de peptídeos de Vif 41-107, não houve diferença significativa na frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas entre os grupos experimentais, inclusive controles negativos e vírus. Mas observa-se que o FA/Vif 1-110 variante se destaca, com maior frequência nessas duas populações (Figura 4.11 A e B).

Não houve clara distinção entre os grupos experimentais, quando analisamos as células CD3⁺ que proliferaram com o estímulo do *pool* de peptídeos de Vif 41-107. Não encontramos diferença significativa entre os grupos. Apesar de observamos um discreto aumento na frequência dessa população nos grupos FA 17DD e FA/Vif 1-110 variante, a média desses dois grupos se encontra próxima a do naíve não estimulado (Figura 4.11 C).

Na análise das células T CFSE^{low} com o estímulo com o *pool* de peptídeos de Vif 41-107, constatou-se que em T CD4⁺CFSE^{low}, todos os grupos experimentais, inclusive os de controle negativo, se apresentaram de forma semelhantes, não havendo diferença significativa entre eles (Figura 4.11 D). A diferença notada na frequência das células das T CD8⁺CFSE^{low}, é que o grupo FA/Vif 1-110 original, tem valores menores em relação a todos os outros grupos, sendo significativamente menor que o grupo FA 17DD (Figura 4.11 E). A diferença do grupo FA 17DD com o naíve é limítrofe (*p*-valor da 0,0571).

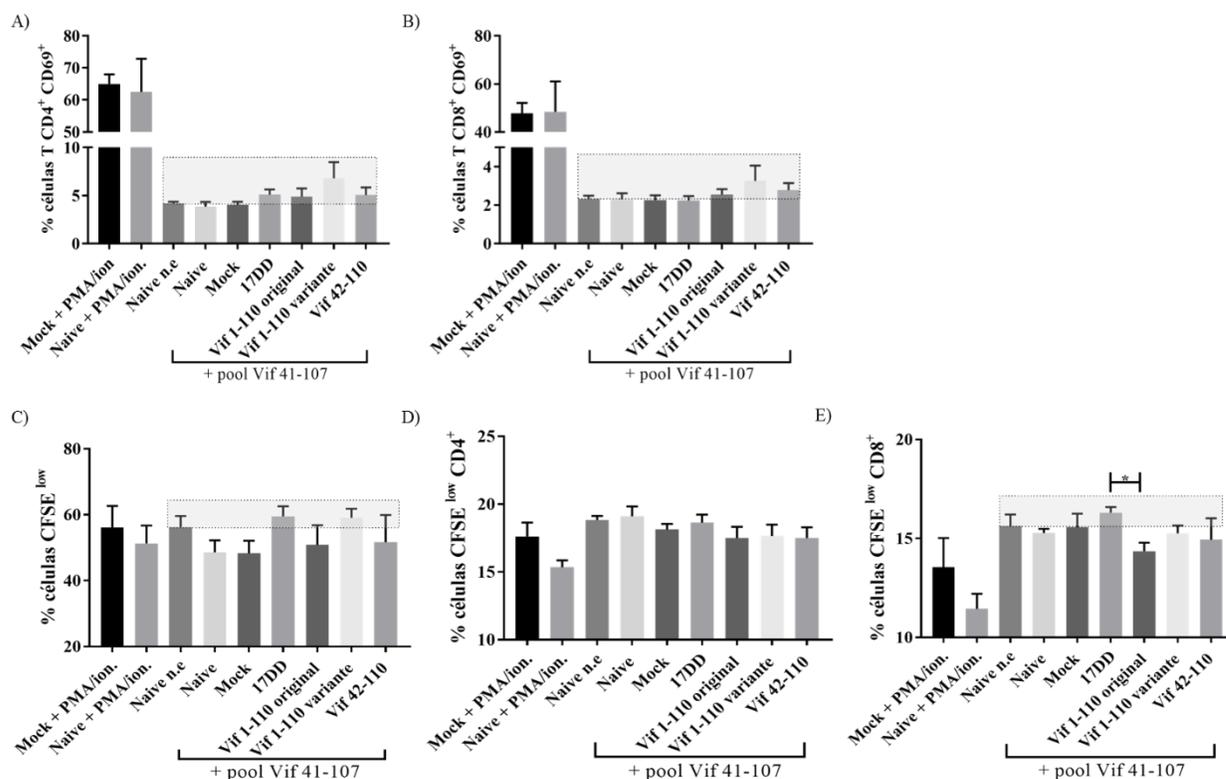


Figura 4.11 - Detecção de células T ativadas e que proliferaram após estímulo *in vitro* com *pool* de peptídeos de Vif 41-107.

Os gráficos representam: (A) e (B) Frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas (CD69⁺), respectivamente; (C) Células CD3⁺ que proliferaram (CFSE^{low}); (D) Frequência de células T CD4⁺ que proliferaram (CFSE^{low} T CD4⁺) e (E) Frequência de células T CD8⁺ que proliferaram (CFSE^{low} T CD8⁺). As abreviações PMA/ion. correspondem a forbol-12-miristato-13-acetato e ionomicina, respectivamente, e naïve n.e. a naïve não estimulado. Os asteriscos nos gráficos indicam a diferença significativa encontrada entre os grupos, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, as colunas; as médias dos grupos, e as barras nas colunas correspondem ao erro médio. O retângulo em cinza claro nos gráficos evidencia onde está a diferença ou tendência encontrada acima dos controles negativos. As chaves presentes no eixo x do gráfico, embaixo da identificação dos grupos, mostra quem recebeu o estímulo, e qual foi ele.

Na investigação das células T ativadas com o *pool* de peptídeos de Vif 1-51, os FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110 apresentaram um aumento muito discreto nessas populações, mas menor do que o observado com o *pool* de peptídeos de Vif 41-107. Também não encontramos diferença significativa entre os grupos com o estímulo do *pool* de peptídeos de Vif 1-51 (Figura 4.12 A e B).

Em relação a células CD3⁺ que proliferaram com o estímulo do *pool* de peptídeos de Vif 1-51, também não houve distinção entre os grupos, porém o grupo do vírus FA/Vif 1-110 variante,

apresentou um discreto aumento na frequência de células em proliferação com esse estímulo, em relação aos grupos de controle negativo (Figura 4.12 C).

Resultado semelhante na frequência das células das T CD4⁺CFSE^{low} foi observado. Todos os grupos responderam de forma equivalente (Figura 4.12 D). Enquanto em T CD8⁺CFSE^{low}, notamos um pequeno aumento nessa população, no grupo FA/Vif 1-110 variante, porém não encontramos diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 4.12 E). O estímulo com os *pools* de peptídeos de Vif não discriminou as diferenças entre os grupos experimentais, quando analisamos as populações CFSE^{low} e T CD4⁺CFSE^{low} e T CD8⁺CFSE^{low}. Porém observamos a indução de resposta específica e diferença entre os grupos virais e controles negativos, quando estimulamos com o peptídeo de FA 17D.

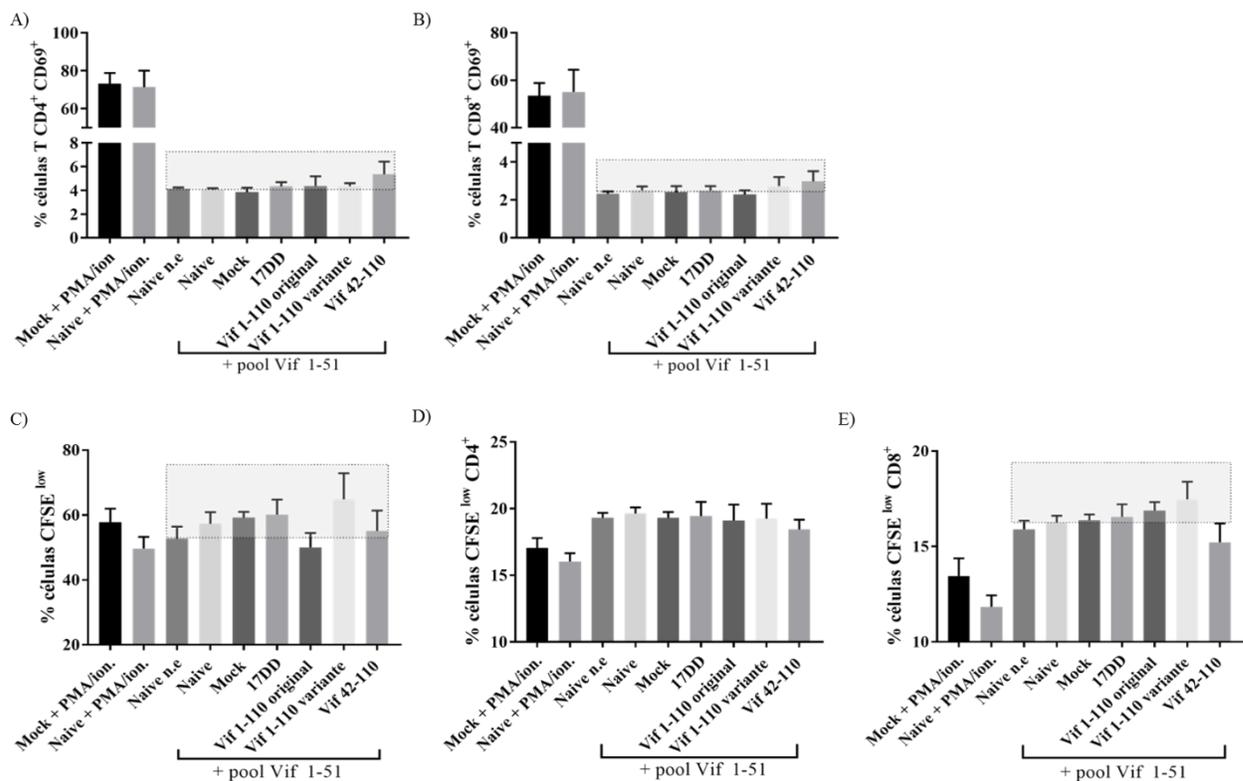


Figura 4.12 - Detecção de células T ativadas e que proliferaram após estímulo *in vitro* com *pool* de peptídeos de Vif 1-51.

Os gráficos representam: (A) e (B) Frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas (CD69⁺), respectivamente; (C) Células CD3⁺ que proliferaram (CFSE^{low}); (D) Frequência de células T CD4⁺ que proliferaram (CFSE^{low} T CD4⁺) e (E) Frequência de células T CD8⁺ que proliferaram (CFSE^{low} T CD8⁺). As abreviações PMA/ion. correspondem a forbol-12-miristato-13-acetato e ionomicina, respectivamente, e naïve n.e. a naïve não estimulado. Os asteriscos nos gráficos indicam a diferença significativa encontrada entre os grupos, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, as colunas; as médias dos grupos, e as barras nas colunas correspondem ao erro médio. O retângulo em cinza

claro nos gráficos evidencia onde está a diferença ou tendência encontrada acima dos controles negativos. As chaves presentes no eixo x do gráfico, embaixo da identificação dos grupos, mostra quem recebeu o estímulo, e qual foi ele.

4.3.3.2 Determinação de células T de memória de camundongos imunizados com os vírus FA/Vif após estímulo *in vitro*

A ativação de células T aumenta a expressão de CD44, que é um receptor do ácido hialurônico da matriz extracelular, que quando ligado as suas moléculas ligantes, auxilia a retenção de células T efectoras e T de memória, nos sítios teciduais de infecção ou de danos, onde o antígeno está presente (153). Devido a sua importância, avaliamos as populações que são T CD44^{high} (T efectoras e T de memória), dentro das células que proliferaram após os estímulos *in vitro* (CFSE^{low}).

Na frequência de células T CD4⁺CFSE^{low}CD44^{high} encontrada após incubação com o peptídeo ATLYRML do vírus da FA 17D, os grupos imunizados com vírus são semelhantes ao controle negativo naïve não estimulado, onde esse grupo possui valores significativamente maiores que os grupos FA 17DD e naïve (Figura 4.13 A). Na frequência das células T CD8⁺CFSE^{low}CD44^{high}, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais, porém, notamos que o grupo FA/Vif 1-110 original, apresentou um aumento dessa população em relação aos outros vírus. Observamos também que a frequência de células T CD8⁺CFSE^{low}CD44^{high} nos grupos de vírus é maior que a frequência de células T CD4⁺CFSE^{low}CD44^{high}. O *p*-valor da diferença do grupo naïve e mock é limítrofe de 0,0571 (Figura 4.13 D).

As células T de memória são CD44^{high}, porém, somente com esse marcador, não é possível definirmos as subpopulações de memória central e efetora, e diferenciá-las das células efectoras. Na nossa próxima análise, utilizamos os marcadores CCR7 e CD62L, para detectar as populações de memória central e efetora que proliferaram (CFSE^{low}). As células T de memória central, possuem o fenótipo de CD44^{high}CCR7^{high}CD62L^{high}, enquanto as de memória efetora de CD44^{high}CCR7^{low}CD62L^{low}.

Na análise da frequência das células T CD4⁺CFSE^{low} de memória central, após estímulo com peptídeo ATLYRML do vírus da FA 17D, observamos que o grupo mock apresentou-se com média mais alta que os outros grupos, resultado que também foi observado nos ensaios de detecção *in vivo* de células T de memória, nesse mesmo parâmetro analisado (Figura 4.13 B). Ele aparece mais acentuado nas células T CD8⁺CFSE^{low} de memória central, com valor maior

significativamente com o grupo do FA 17DD (Figura 4.13 E), e com p -valor limítrofe de 0,0571 com FA/Vif 1-110 original, e em T CD4⁺ de memória central, com FA/Vif 1-110 variante.

Analisamos a frequência de células T CFSE^{low}CD44^{high}CCR7^{low}CD62L^{low} (memória efetora), com o mesmo estímulo, e observamos que os grupos FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110 possuem a maior frequência dessa população, entre os grupos de vírus, e apresentam média acima dos controles negativos. FA/Vif 42-110 apresentou valores mais altos significativamente que o grupo naíve não estimulado, e o p -valor limítrofe de 0,0571 foi encontrado entre o naíve não estimulado e o FA/Vif 1-110 original (Figura 4.13 C). Em T CD8⁺CFSE^{low} de memória efetora, todos os grupos de vírus apresentaram diferença significativa, com valores mais altos, com todos os grupos de controle negativo (naíve não estimulado, naíve e mock). O grupo FA 17DD apresentou valores mais altos dessa população entre os grupos de vírus (Figura 4.13 F).

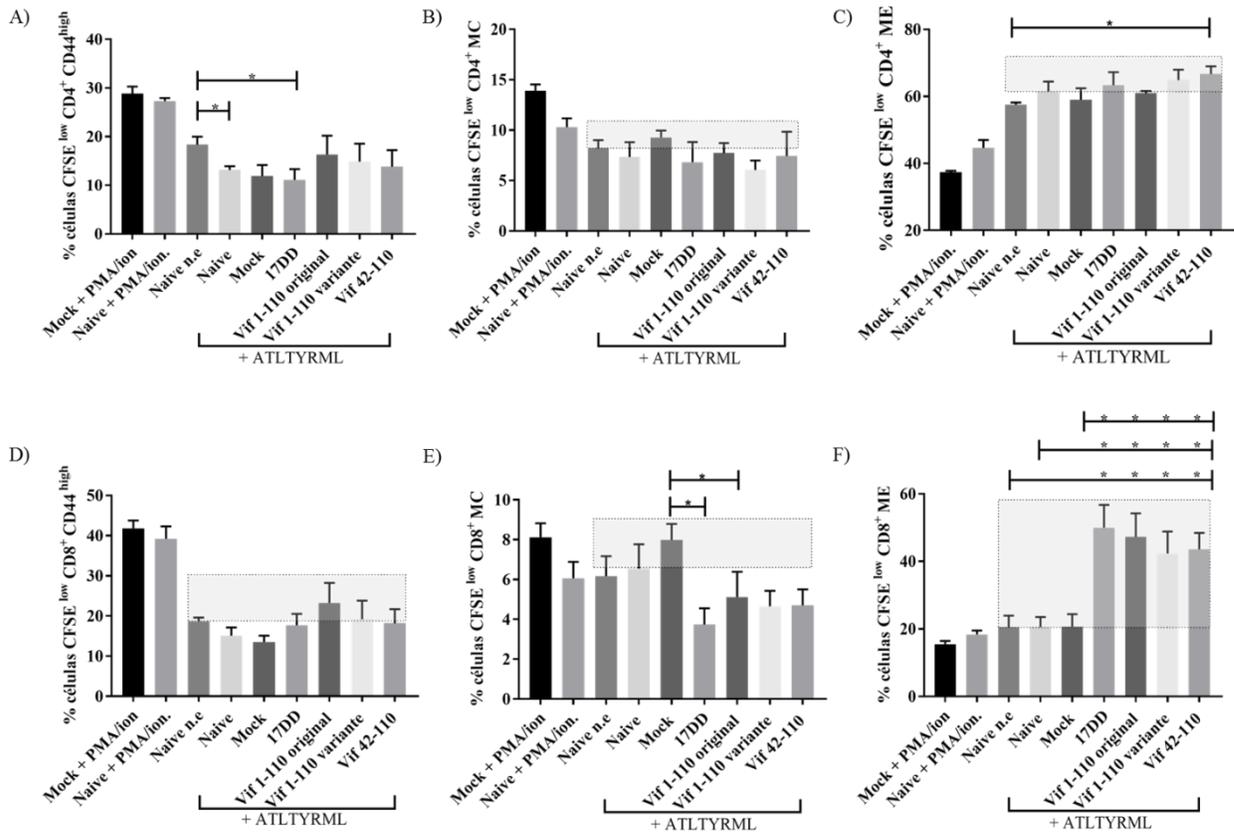


Figura 4.13 - Determinação de células T de memória de camundongos imunizados com os vírus FA/Vif após estímulo *in vitro* com o peptídeo ATLTYRML do vírus de FA 17D.

Os gráficos representam: (A) Frequência de células T CD4⁺CFSE^{low}CD44^{high}; (B) Frequência de células T CD4⁺CFSE^{low} de memória central; (C) Frequência de T CD4⁺CFSE^{low} de memória efetora; (D) Frequência de células T CD8⁺CFSE^{low}CD44^{high}; (E) Frequência de células T CD8⁺CFSE^{low} de memória central; (F) Frequência de T CD8⁺CFSE^{low} de memória efetora. As

abreviações PMA/ion. correspondem a forbol-12-miristato-13-acetato e ionomicina, respectivamente, e naïve n.e. a naïve não estimulado. Os asteriscos nos gráficos indicam a diferença significativa encontrada entre os grupos, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney e as barras nas colunas correspondem ao erro médio. O retângulo em cinza claro nos gráficos evidencia onde está a diferença ou tendência encontrada acima dos controles negativos. As chaves presentes no eixo x do gráfico, embaixo da identificação dos grupos, mostra quem recebeu o estímulo, e qual foi ele.

Com o estímulo do *pool* de Vif de 41-107, o resultado da frequência das populações T CD4⁺ e T CD8⁺CFSE^{low}CD44^{high} foi muito semelhante. Todos os grupos de vírus apresentaram valores maiores que os controles negativos, porém sem diferença significativa entre eles. E com esse estímulo, assim como o do vírus de FA, observamos que a frequência de células T CD8⁺CFSE^{low}CD44^{high} é maior que a de T CD4⁺ CFSE^{low}CD44^{high}, nos grupos imunizados com vírus. O grupo FA/Vif 1-110 variante se destacou com maiores valores entre os grupos imunizados com vírus, tanto em T CD4⁺CFSE^{low}CD44^{high} e T CD8⁺CFSE^{low}CD44^{high}, e apresentou limítrofe com o grupo naïve não estimulado e mock, respectivamente (*p*-valor 0,0571) (Figura 4.14 A e D).

Na frequência das células T CD4⁺CFSE^{low} de memória central, com o estímulo do *pool* de peptídeos de Vif 41-107, todos os grupos se mostraram muito semelhantes (Figura 4.14 B). O grupo mock se apresentou com a média mais alta na frequência de células T CD8⁺CFSE^{low} de memória central, em relação a todos os outros grupos, como também foi observado com o estímulo do vírus de FA (Figura 4.14 E).

Na análise das células T CD4⁺CFSE^{low} de memória efetora, notamos que os grupos FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110 apresentaram diferença significativa com valores mais altos com os grupos naïve não estimulado e naïve (Figura 4.14 C). Na frequência de células T CD8⁺CFSE^{low} de memória efetora, todos os grupos de vírus apresentaram diferença significativa com valores mais altos que o naïve. O grupo FA 17DD e FA/Vif 1-110 original apresentaram valores maiores significativamente que o naïve não estimulado, e o FA/Vif 1-110 original valores significativamente maiores que o mock. O grupo FA/Vif 1-110 original se destacou com maior frequência de células T de memória efetora (T CD4⁺CFSE^{low} e T CD8⁺CFSE^{low}) entre os grupos de vírus. Os grupos FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110, apresentaram *p*-valor limítrofe com naïve não estimulado (0,0571), assim como o grupo mock com naïve, FA 17DD com mock, e FA/Vif 42-110 com mock (Figura 4.14 F).

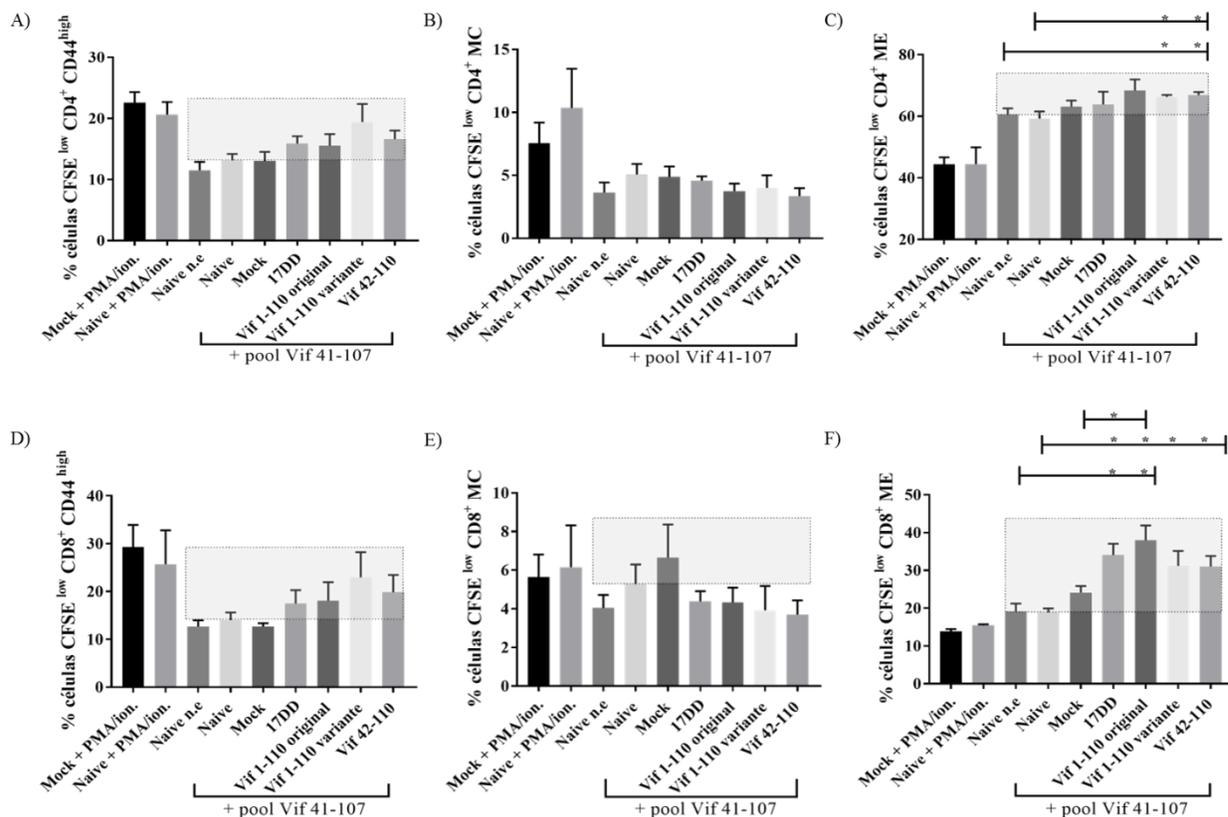


Figura 4.14 - Determinação de células T de memória de camundongos imunizados com os vírus FA/Vif após estímulo *in vitro* com o pool de peptídeos de Vif 41-107.

Os gráficos representam: (A) Frequência de células T CD4⁺CFSE^{low}CD44^{high}; (B) Frequência de células T CD4⁺CFSE^{low} de memória central; (C) Frequência de T CD4⁺CFSE^{low} de memória efetora; (D) Frequência de células T CD8⁺CFSE^{low}CD44^{high}; (E) Frequência de células T CD8⁺CFSE^{low} de memória central; (F) Frequência de T CD8⁺CFSE^{low} de memória efetora. As abreviações PMA/ion. correspondem a forbol-12-miristato-13-acetato e ionomicina, respectivamente, e naïve n.e. a naïve não estimulado. Os asteriscos nos gráficos indicam a diferença significativa encontrada entre os grupos, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney e as barras nas colunas correspondem ao erro médio.

Quando estimulamos as células com o *pool* de peptídeos de Vif 1-51, observamos que o grupo FA/Vif 1-110 variante apresentou maior frequência de células T CD4⁺CFSE^{low}CD44^{high} que o grupo mock, com diferença significativa, mas os outros grupos de vírus, se apresentaram semelhantes aos controles negativos (Figura 4.15 A). Todos os grupos responderam de forma semelhante, sem diferença significativa, na frequência de células T CD8⁺CFSE^{low}CD44^{high}, apesar do discreto aumento dessa população, nos grupos de vírus em relação aos controles negativos (Figura 4.15 D).

A tendência do grupo mock com valores mais altos que os grupos de vírus, se repete nas células T de memória central com o estímulo do *pool* de Vif 1-51, principalmente em T CD8⁺CFSE^{low} de memória central (Figura 4.15 E). Em T CD4⁺CFSE^{low} de memória central, os grupos naïve não estimulado e o naïve apresentaram valores significativamente maiores que o FA/Vif 1-110 original, e esses grupos também possuem valores mais altos que os grupos de vírus (Figura 4.15 B).

Nas populações de células T de memória efetora, mais uma vez conseguimos discriminar as diferenças entre os grupos de controles negativos e grupos de vírus. Todos os grupos de vírus apresentaram maior frequência de células T CD4⁺CFSE^{low} de memória efetora, que o grupo naïve não estimulado. Os maiores valores estão nos grupos FA/Vif 1-110 original e FA/Vif 42-110 (*p*-valor de 0,02), com diferença significativa com o grupo naïve não estimulado. Todos os grupos de vírus apresentaram aumento na frequência de T CD4⁺CFSE^{low} de memória efetora, em relação aos controles negativos (Figura 4.15 C).

A diferença entre os grupos de controles negativos e vírus, é ainda maior quando analisamos as células T CD8⁺CFSE^{low} de memória efetora. Nessa população, todos os grupos de vírus apresentaram valores significativamente mais altos que o naïve não estimulado, naïve e mock (*p*-valores de 0,002, 0,004 e 0,008). E ainda nessa população, também encontramos diferenças entre grupos de vírus, onde o grupo FA/Vif 1-110 original apresentou valores significativamente maiores que o FA/Vif 1-110 variante e o FA/Vif 42-110 (Figura 4.15 F). A frequência das células T de memória efetora, assim como nos ensaios de detecção *in vivo* células T de memória, se revelou a população que mais discriminou a diferença entre os grupos experimentais, especialmente as células T CD8⁺ de memória efetora.

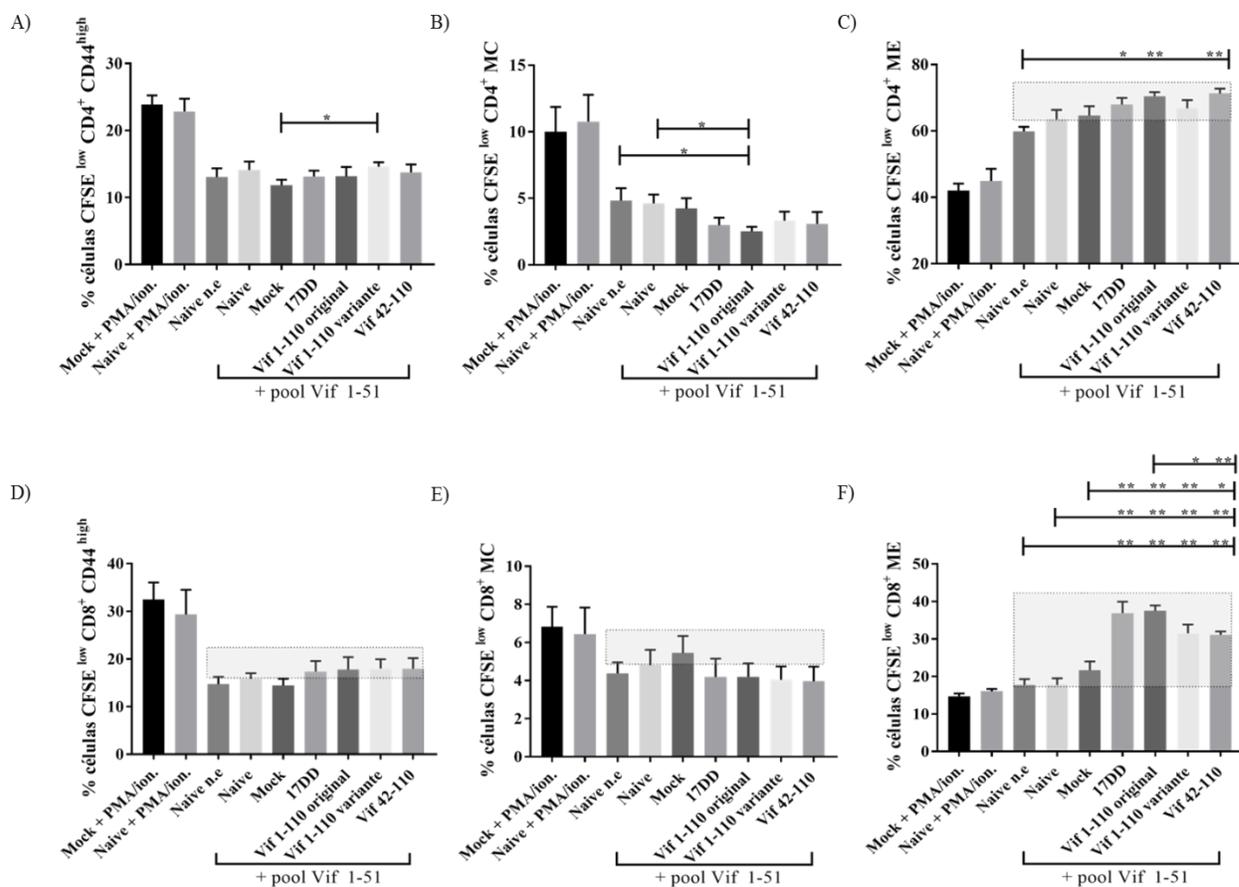


Figura 4.15 - Determinação de células T de memória de camundongos imunizados com os vírus FA/Vif após estímulo *in vitro* com o pool de peptídeos de Vif 1-51.

Os gráficos representam: (A) Frequência de células T CD4⁺CFSE^{low}CD44^{high}; (B) Frequência de células T CD4⁺CFSE^{low} de memória central; (C) Frequência de T CD4⁺CFSE^{low} de memória efetora; (D) Frequência de células T CD8⁺CFSE^{low}CD44^{high}; (E) Frequência de células T CD8⁺CFSE^{low} de memória central; (F) Frequência de T CD8⁺CFSE^{low} de memória efetora. As abreviações PMA/ion. correspondem a forbol-12-miristato-13-acetato e ionomicina, respectivamente, e naïve n.e. a naïve não estimulado. Os asteriscos nos gráficos indicam a diferença significativa encontrada entre os grupos, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney e as barras nas colunas correspondem ao erro médio. O retângulo em cinza claro nos gráficos evidencia onde está a diferença ou tendência encontrada acima dos controles negativos. As chaves presentes no eixo x do gráfico, embaixo da identificação dos grupos, mostra quem recebeu o estímulo, e qual foi ele.

4.3.3.3 Detecção das citocinas secretadas pelos esplenócitos dos camundongos imunizados com os vírus FA/Vif após estímulo *in vitro*

Nessa segunda etapa da investigação da resposta celular específica, nós avaliamos a secreção de citocinas no sobrenadante da cultura de esplenócitos dos camundongos imunizados

com os vírus FA/Vif, comparando com os controles naïve, mock e FA 17DD, após estímulo *in vitro* com o peptídeo de FA 17D e *pools* de peptídeos de Vif. Sabemos que o vírus da FA 17D, vetor utilizado na construção dos vírus recombinantes FA/Vif, induz um perfil balanceado de resposta T_H1 e T_H2 , devido à ampla estimulação da resposta imune inata. O nosso objetivo nessa etapa foi avaliar as citocinas T_H1 e T_H2 secretadas pelas células ativadas na cultura. As células dos controles estimulados com PMA e ionomicina, responderam inespecificamente, como esperado, em todas as citocinas detectadas.

Com o estímulo do peptídeo ATLYRML do vírus da FA 17D, detectamos no sobrenadante as citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-2. Sendo que não observamos secreção de citocinas TNF- α e IL-2 nos controles negativos naïve não estimulado, naïve e mock (ficaram abaixo do limite de detecção do citômetro de fluxo). Somente observamos secreção de TNF- α pelo grupo do FA/Vif 42-110 e FA 17DD, onde a concentração no FA/Vif 42-110 foi três vezes maior que a do grupo FA 17DD (Figura 4.16 A).

A maior concentração de citocina detectada com esse estímulo, foi a de IFN- γ , onde os esplenócitos do grupo do FA 17DD secretaram aproximadamente duas vezes mais que o grupo FA/Vif 1-110 original, três vezes mais que o FA/Vif 42-110 e quatro que o FA/Vif 1-110 variante. As concentrações de IFN- γ encontradas nos grupos de vírus, são significativamente maiores que nos controles negativos. Os valores de concentração de IFN- γ foram significativamente maiores nos grupos FA 17DD e FA/Vif 42-110, em relação ao grupo naïve e ao mock. O grupo FA 17DD apresentou valores significativamente maiores que os grupos FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110, e o FA/Vif 1-110 original valores maiores que o FA/Vif 1-110 variante. A diferença entre o grupo FA/Vif 1-110 original e os grupos naïve e mock foi limítrofe (*p*-valor 0,0571) (Figura 4.16 B).

A concentração de IL-2 detectada nos grupos virais foi semelhante, com exceção do grupo FA/Vif 1-110 original que foi mais baixa. O FA/Vif 1-110 variante produziu aproximadamente duas vezes mais que FA/Vif 1-110 original (Figura 4.16 C). Não observamos diferença significativa entre os grupos experimentais em TNF- α e IL-2.

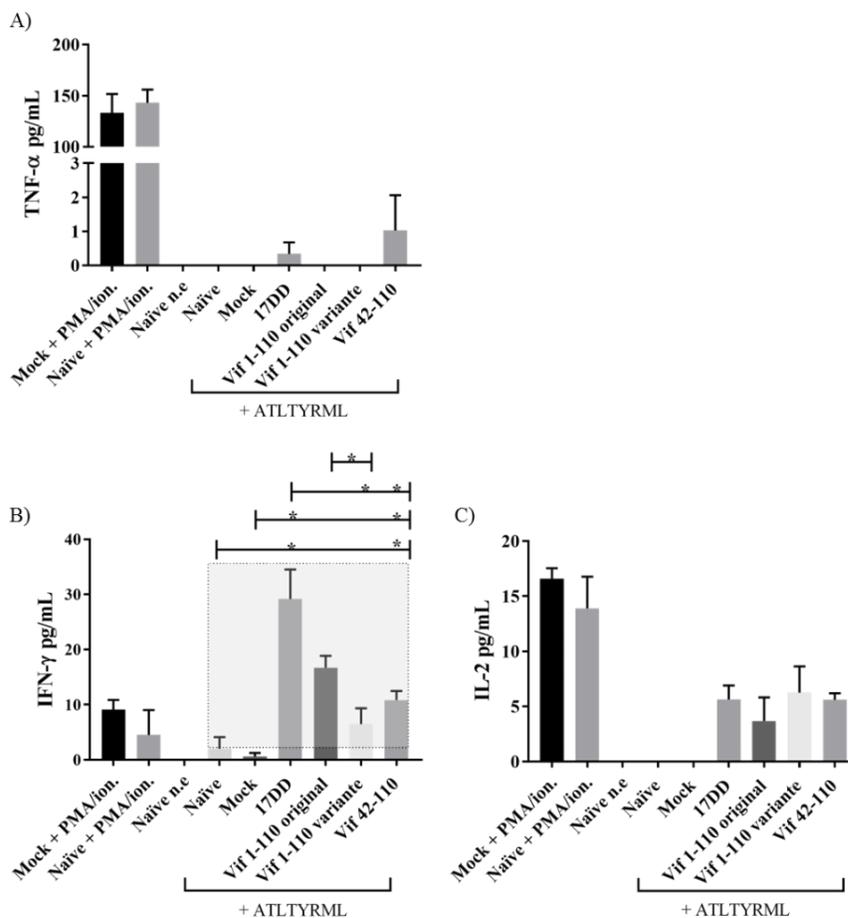


Figura 4.16 - Detecção de citocinas secretadas pelos esplenócitos no sobrenadante da cultura celular, após estímulo *in vitro* com peptídeo ATLYRML do vírus da FA 17D.

Os gráficos representam: (A) Concentração detectada de TNF- α em pg/mL; (B) Concentração detectada de IFN- γ em pg/mL e (C) Concentração detectada de IL-2 em pg/mL. As abreviações PMA/ion. correspondem a forbol-12-miristato-13-acetato e ionomicina, respectivamente, e naïve n.e. a naïve não estimulado. Os asteriscos nos gráficos indicam a diferença significativa encontrada entre os grupos, pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney e as barras nas colunas correspondem ao erro médio. O retângulo em cinza claro nos gráficos evidencia onde está a diferença ou tendência encontrada acima dos controles negativos. As chaves presentes no eixo x do gráfico, embaixo da identificação dos grupos, mostra quem recebeu o estímulo, e qual foi ele.

Com o estímulo dos *pools* dos peptídeos de Vif, detectamos também a citocina IL-5. Não detectamos secreção das citocinas IL-2 e IFN- γ nos controles negativos com esses estímulos (ficaram abaixo do limite de detecção do citômetro de fluxo). Com o *pool* de Vif 41-107, a citocina secretada em maior concentração foi a IL-2. Não encontramos diferença significativa entre os grupos experimentais, porém, quando analisamos as médias dos grupos em TNF- α , notamos que o

grupo do FA/Vif 1-110 original apresentou concentração duas vezes maior que o FA 17DD. A diferença das médias foi de quatro vezes do FA/Vif 1-110 original com o FA/Vif 1-110 variante, porém, esse último grupo tem a mesma média que o naíve não estimulado (Figura 4.17 A). Na concentração de IFN- γ detectada, o grupo do FA/Vif 1-110 variante se destacou com a concentração duas vezes maior que em FA 17DD, sete vezes que em FA/Vif 1-110 original e quatro que em FA/Vif 42-110 (Figura 4.17 B).

Na análise de secreção da citocina IL-2, o grupo do vírus FA/Vif 1-110 original e do FA 17DD foram semelhantes, e a concentração dessa citocina foi aproximadamente duas vezes maior nesses grupos que em FA/Vif 42-110 (Figura 4.17 C). Os grupos de controles negativos e virais apresentaram concentração similar de IL-5, especialmente o grupo mock com os grupos de vírus (Figura 4.17 D).

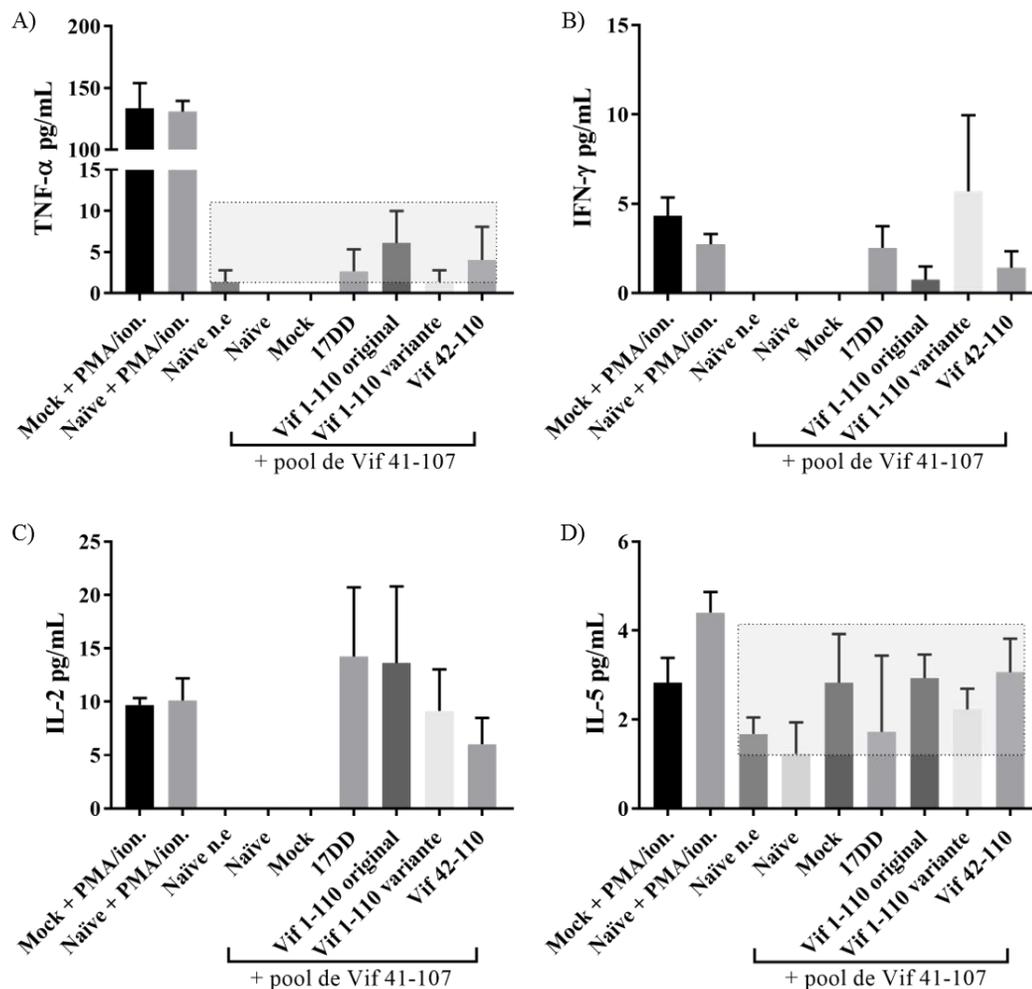


Figura 4.17 - Detecção de citocinas secretadas pelos esplenócitos no sobrenadante da cultura celular, após estímulo *in vitro* com o *pool* de peptídeos de Vif 41-107.

Os gráficos representam: (A) Concentração detectada de TNF- α em pg/mL; (B) Concentração detectada de IFN- γ em pg/mL; (C) Concentração detectada de IL-2 em pg/mL e (D) Concentração detectada de IL-5 em pg/mL. As abreviações PMA/ion. correspondem a forbol-12-miristato-13-acetato e ionomicina, respectivamente, e naïve n.e. a naïve não estimulado. As colunas correspondem a média do grupo e as barras ao erro médio. O retângulo em cinza claro nos gráficos evidencia onde está a diferença ou tendência encontrada acima dos controles negativos. As chaves presentes no eixo x do gráfico, embaixo da identificação dos grupos, mostra quem recebeu o estímulo, e qual foi ele.

Quando estimulamos os esplenócitos com o *pool* de peptídeos de Vif de 1-51, o perfil das citocinas detectadas foi muito semelhante ao do *pool* Vif 41-107. Detectamos TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-5, onde detectamos secreção de citocinas nos controles negativos em TNF- α e IL-5. Na análise da detecção de TNF- α , observamos que a concentração detectada nos grupos FA/Vif 1-110 variante, FA/Vif 42-110 e FA 17DD, foi semelhante ao grupo naïve. Não detectamos essa citocina no grupo FA/Vif 1-110 original. (Figura 4.18 A). Não encontramos diferença significativa entre os grupos experimentais, em todas as citocinas detectadas utilizando esse estímulo, assim como com o *pool* de Vif 41-107.

Na detecção de IFN- γ , o grupo FA 17DD apresentou concentração similar ao FA/Vif 42-110 (média dos grupos), enquanto os grupos do FA/Vif 1-110 original e FA/Vif 1-110 variante, responderam menos (Figura 4.18 B). A citocina IL-2 também foi detectada em maior concentração nos grupos com o estímulo do *pool* Vif 1-51. O grupo do FA 17DD se destacou, apresentando maior concentração de IL-2, resultado semelhante ao observado com o *pool* de Vif 41-107, mas aqui com a média próxima ao do grupo FA/Vif 1-110 variante (Figura 4.18 C). Em IL-5, o grupo naïve e os virais apresentaram concentração similar de IL-5, enquanto o naïve não estimulado e o mock responderam um pouco menos que esses grupos (Figura 4.18 D).

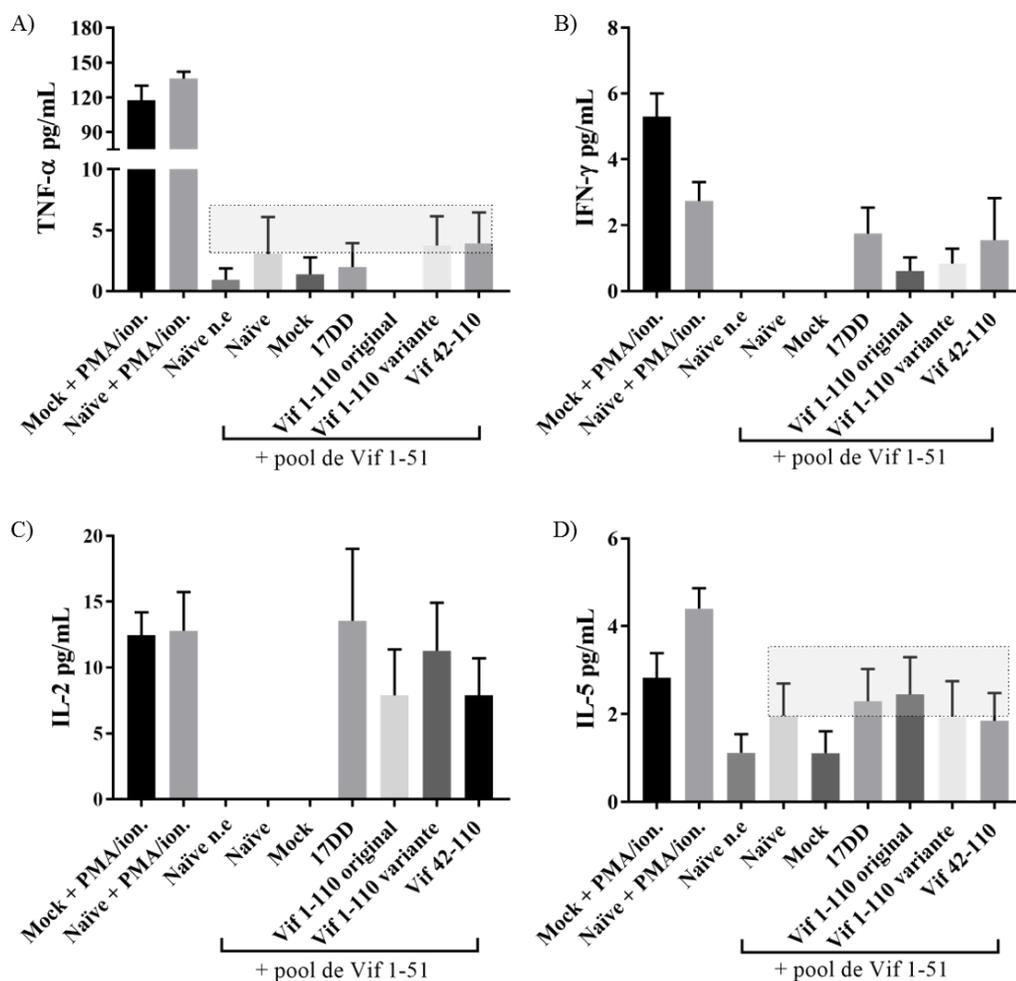


Figura 4.18 - Detecção de citocinas secretadas pelos esplenócitos no sobrenadante da cultura celular, após estímulo *in vitro* com *pool* de peptídeos de Vif 1-51.

Os gráficos representam: (A) Concentração detectada de TNF- α em pg/mL. (B) Concentração detectada de IFN- γ em pg/mL. (C) Concentração detectada de IL-2 em pg/mL e (D) Concentração detectada de IL-5 em pg/mL. As abreviações PMA/ion. correspondem a forbol-12-miristato-13-acetato e ionomicina, respectivamente, e naïve n.e. a naïve não estimulado. As barras nas colunas correspondem ao erro médio. O retângulo em cinza claro nos gráficos evidencia onde está a diferença ou tendência encontrada acima dos controles negativos. As chaves presentes no eixo x do gráfico, embaixo da identificação dos grupos, mostra quem recebeu o estímulo, e qual foi ele.

4.3.4 Indução de anticorpos neutralizantes para o vírus da febre amarela em camundongos imunizados com os vírus recombinantes de FA/Vif

Nesta etapa do trabalho, pretendia-se saber se a imunização com os diferentes vírus FA recombinantes com fragmentos de Vif seriam capazes de induzir anticorpos neutralizantes contra

o vírus de FA, tanto quanto o vírus vacinal FA 17DD é capaz. O soro obtido dos animais imunizados no último dia experimental, que corresponde a 15 dias após segunda imunização viral, foi utilizado para titulação de anticorpos neutralizantes teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT). Dois camundongos de diferentes ensaios, do grupo do FA 17DD ficaram de fora da análise, porque não tivemos soro suficiente para definirmos os seus títulos. Um camundongo apresentou neutralização até a diluição 1:5120, quando o soro esgotou, e o outro em 1:1280. Por isso, considerou-se que os títulos seriam encontrados acima dessas diluições, isto é, $> 1:5120$ e $> 1:1280$.

Anticorpos neutralizantes contra o vírus vacinal FA 17DD foram detectados em todos os grupos de animais imunizados com o vírus vacinal FA 17DD ou com os vírus recombinantes FA/Vif, com 100% de soroconversão em todos os grupos de vírus FA (controle vacinal 17DD e recombinantes FA/Vif). Em contraposição, os títulos de anticorpos neutralizantes aferidos nos soros de camundongos imunizados com os vírus FA/Vif, foram menores que em soros de animais imunizados com o vírus FA 17DD. Encontramos diferença significativa entre o grupo FA 17DD e todos os grupos FA/Vif, com *p*-valor menor que 0,0001, mas não houve diferença entre grupos de vírus recombinantes (Figura 4.19). Os soros dos camundongos do grupo naíve e mock foram negativos, não apresentando reatividade inespecífica.

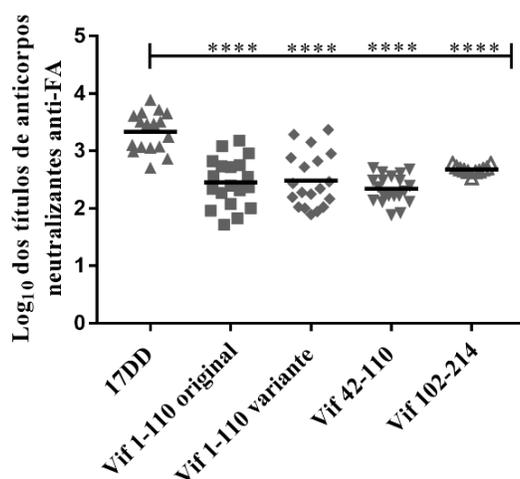


Figura 4.19 - Indução de anticorpos neutralizantes para o vírus FA nos grupos de animais imunizados.

O título de anticorpos neutralizantes é expresso pelo log 10 do inverso da diluição que neutralizou 50 % das placas de lise virais no teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT). Gráficos de dispersão montados com os valores de log₁₀ dos títulos de anticorpos contra febre amarela de cada camundongo. A análise comparativa entre os soros do grupo FA 17DD e os soros dos animais imunizados com FA/Vif foi realizada pelo pós-teste de Dunnett, e a significância das diferenças está representada pelos asteriscos.

O vírus vacinal FA 17DD apresentou a maior média e a maior faixa de título de anticorpos neutralizantes (de 2141 e 1661 - 2621, respectivamente). Entre os vírus recombinantes de FA/Vif, o grupo de FA/Vif 102-214 apresentou a maior média de título neutralizante contra febre amarela (476), e a menor faixa de título (452 - 500), sendo o grupo mais homogêneo em relação aos títulos obtidos. Enquanto o FA/Vif 42-110 apresentou a menor média dentre os recombinantes (218). As médias dos grupos FA/Vif 1-110 original e FA/Vif variante foram muito semelhantes (284 e 304, respectivamente) (Tabela 4.3).

Por fim, todos os resultados encontrados estão na Tabela 4.4, onde apresentamos o resumo dos resultados de resposta imune celular e humoral, nos grupos FA/Vif e em relação aos controles naïve não estimulado, naïve, mock e FA 17DD, nessa ordem. Os experimentos de detecção *in vivo* de memória não possuem o controle naïve não estimulado, e, portanto, os resultados apresentados serão em relação ao naïve, mock e FA 17DD, nessa ordem. A tabela foi dividida em 5 partes: (A) caracterização biológica e genética, e detecção *in vivo* de células de memória; (B) indução de células T ativadas e de memória após estímulo com peptídeo do vírus 17D, e indução de anticorpos neutralizantes contra FA; (C) indução de células T ativadas e de memória após estímulo com o *pool* de Vif 41-107; (D) indução de células T ativadas e de memória após estímulo com o *pool* de Vif 1-51; (E) secreção de citocinas nos grupos FA/Vif.

Tabela 4.3 - Títulos de anticorpos neutralizantes contra o vírus FA 17DD induzidos pela imunização de camundongos com os vírus recombinantes FA/Vif.

Grupos	Animais (n)	Soroconversão (%)	Média do título	S.E.M.	Faixa do título
FA 17DD	17	100	2141	480	1661 - 2621
FA/Vif 1-110 original	19	100	284	93	191 - 377
FA/Vif 1-110 variante	19	100	304	152	152 - 456
FA/Vif 42-110	20	100	218	29	189 - 247
FA/Vif 102-214	11	100	476	24	452 - 500

Tabela 4.4 – Resumo dos resultados encontrados na caracterização biológica e genética dos vírus FA/Vif, e detecção *in vivo* de células T de memória nos grupos em relação aos controles naïve, mock e FA 17DD.

	Plataforma de expressão	Estabilidade genética	Proliferação em Vero	Detecção <i>in vivo</i> T CD4 ⁺ MC	Detecção <i>in vivo</i> T CD8 ⁺ MC	Detecção <i>in vivo</i> T CD4 ⁺ ME	Detecção <i>in vivo</i> T CD8 ⁺ ME
17DD		-	7,27 ± 0,16	(+) SD	(+) -	(+) +	(+) +
Vif 1-110 original	I	* 5P	6,41 ± 0,04	(+) SD SD	+ SD +	(+) SD -	(+) + SD
Vif 1-110 variante	II	* 10P	6,54 ± 0,55	(+) SD SD	(+) - SD	(+) + +	(+) (+) +
Vif 42-110	II	-	6,29 ± 0,73	(+) SD SD	+ - -	(+) + SD	(+) (+) +
Vif 102-214	I	-	6,97 ± 0,28	(+) SD SD	+ - -	(+) SD -	(+) (+) +

Plataforma de expressão da proteína heteróloga. Vírus recombinantes: Original - FA/Vif 1-110 original, variante - FA/Vif 1-110 variante, FA/Vif 42-110 e FA/Vif 102-214.

Estabilidade genética:

(*) perda do inserto, (-) estável, (P) passagem seriada.

Proliferação em células Vero: média e desvio padrão do título viral em log₁₀ PFU/mL em 72 horas de infecção (pico da proliferação viral).

Detecção *in vivo* de células T de memória central e efetora: mediana do número absoluto de células T de memória efetora.

Símbolos da detecção *in vivo* de células T de memória; os símbolos + e - são referentes aos controles nessa ordem: naïve, mock e FA 17DD.

+ aumento da população, (+) aumento da população com diferença significativa;

- diminuição da população, (-) diminuição da população com diferença significativa;

SD (sem diferença) – os grupos foram semelhantes.

Tabela 4.5 – Resumo dos resultados encontrados nos grupos na indução de células T ativadas e de memória, após estímulo com peptídeo do vírus de FA 17D em relação aos controles naïve não estimulado, naïve e mock e FA 17DD, e anticorpos neutralizantes contra o vírus de FA.

	Ativação T CD4 ⁺	Ativação T CD8 ⁺	Proliferação T CD4 ⁺ MC	Proliferação T CD8 ⁺ MC	Proliferação T CD4 ⁺ ME	Proliferação T CD8 ⁺ ME	Anticorpos neutralizantes anti-FA
17DD	+++	++ (+)	---	-- (-)	+++	(+) (+) (+)	-
Vif 1-110 original	++++	++ (+) +	- + - +	-- (-) +	+ SD + -	(+) (+) (+) -	7,5 < 17DD
Vif 1-110 variante	++++	+++ SD	----	--- +	++++	(+) (+) (+) -	7,0 < 17DD
Vif 42-110	+++ -	++ (+) -	- SD - +	--- +	(+) +++	(+) (+) (+) -	9,5 < 17DD
Vif 102-214	-	-	-	-	-	-	4,5 < 17DD

Vírus recombinantes: Original - FA/Vif 1-110 original, variante - FA/Vif 1-110 variante, FA/Vif 42-110 e FA/Vif 102-214.

Ativação de células T (marcador CD69): média da frequência de células T ativadas. O grupo FA/Vif 102-214 não foi avaliado.

Proliferação de células T de memória: média da frequência de células T de memória. O grupo FA/Vif 102-214 não foi avaliado.

Marcadores de células T que proliferaram: CFSE, CD3, CD4, CD8, CD44, CCR7 e CD62L.

Símbolos dos grupos em relação aos controles nessa ordem; naïve não estimulado, naïve, mock e FA 17DD:

+ aumento da população, (+) aumento da população com diferença significativa;

- diminuição da população, (-) diminuição da população com diferença significativa;

SD (sem diferença) – os grupos foram semelhantes.

Anticorpos neutralizantes anti-FA: número de vezes que a média do título dos FA/Vif é menor que a do vírus FA 17DD.

Tabela 4.6 - Resumo dos resultados encontrados nos grupos na indução de células T ativadas e de memória, após estímulo com o *pool* de peptídeos de Vif 41-107 em relação aos controles naïve não estimulado, naïve e mock e FA 17DD.

	Ativação T CD4 ⁺	Ativação T CD8 ⁺	Proliferação T CD4 ⁺ MC	Proliferação T CD8 ⁺ MC	Proliferação T CD4 ⁺ ME	Proliferação T CD8 ⁺ ME
17DD	+++	SD SD SD	+ - SD	+ - -	+ + SD	(+) (+) +
Vif 1-110 original	+++ -	++++	SD - - -	+ - - SD	++++	(+) (+) (+) +
Vif 1-110 variante	++++	++++	SD - - -	SD - - -	(+) (+) + +	+ (+) + -
Vif 42-110	+++ SD	++++	SD - - -	- - - -	(+) (+) + +	+ (+) + -

Vírus recombinantes: Original - FA/Vif 1-110 original, variante - FA/Vif 1-110 variante, FA/Vif 42-110 e FA/Vif 102-214.

Ativação de células T (marcador CD69): média da frequência de células T ativadas. O grupo FA/Vif 102-214 não foi avaliado.

Proliferação de células T de memória: média da frequência de células T de memória. O grupo FA/Vif 102-214 não foi avaliado.

Marcadores de células T que proliferaram: CFSE, CD3, CD4, CD8, CD44, CCR7 e CD62L.

Símbolos dos grupos em relação aos controles nessa ordem; naïve não estimulado, naïve, mock e FA 17DD:

+ aumento da população, (+) aumento da população com diferença significativa;

- diminuição da população, (-) diminuição da população com diferença significativa;

SD (sem diferença) – os grupos foram semelhantes.

Tabela 4.7 - Resumo dos resultados encontrados nos grupos a indução de células T ativadas e de memória, após estímulo com o *pool* de peptídeos de Vif 1-51 em relação aos controles naïve não estimulado, naïve e mock e FA 17DD.

	Ativação T CD4 ⁺	Ativação T CD8 ⁺	Proliferação T CD4 ⁺ MC	Proliferação T CD8 ⁺ MC	Proliferação T CD4 ⁺ ME	Proliferação T CD8 ⁺ ME
17DD	SD SD SD	SD SD SD	---	---	+++	(+) (+) +
Vif 1-110 original	SD SD SD SD	SD SD SD SD	(-) (-) --	--- SD	++++	(+) (+) (+) +
Vif 1-110 variante	SD SD SD SD	++++	--- +	--- SD	(+) (+) ++	+ (+) + -
Vif 42-110	++++	++++	--- SD	--- SD	(+) (+) ++	+ (+) + -

Vírus recombinantes: Original - FA/Vif 1-110 original, variante - FA/Vif 1-110 variante, FA/Vif 42-110 e FA/Vif 102-214.

Ativação de células T (marcador CD69): média da frequência de células T ativadas. O grupo FA/Vif 102-214 não foi avaliado.

Proliferação de células T de memória: média da frequência de células T de memória. O grupo FA/Vif 102-214 não foi avaliado.

Marcadores de células T que proliferaram: CFSE, CD3, CD4, CD8, CD44, CCR7 e CD62L.

Símbolos dos grupos em relação aos controles nessa ordem; naïve não estimulado, naïve, mock e FA 17DD:

+ aumento da população, (+) aumento da população com diferença significativa;

- diminuição da população, (-) diminuição da população com diferença significativa;

SD (sem diferença) – os grupos foram semelhantes.

Tabela 4.8 - Resumo dos resultados encontrados nos grupos na secreção de citocinas após estímulos com peptídeo do vírus de FA 17D e pools de Vif em relação aos controles naïve não estimulado, naïve e mock e FA 17DD.

	TNF- α VFA	IFN- γ VFA	IL-2 VFA	TNF- α Vif 41-107	IFN- γ Vif 41-107	IL-2 Vif 41-107	TNF- α Vif 1-51	IFN- γ Vif 1-51	IL-2 Vif 1-51
17DD	+++	+ (+) (+)	+++	+++	+++	+++	+-+	+++	+++
Vif 1-110 original	ND	+++ -	+++ -	++++	+++ -	+++ SD	ND	+++ -	+++ -
Vif 1-110 variante	ND	+++ (-)	++++	-+++ -	++++	+++ -	++++	+++ -	+++ -
Vif 42-110	++++	+ (+) (+) (-)	+++ -	++++	+++ -	+++ -	++++	+++ -	+++ -

Vírus recombinantes: Original - FA/Vif 1-110 original, variante - FA/Vif 1-110 variante, FA/Vif 42-110.

Resultado em relação as médias dos grupos.

Citocina não detectada no grupo (ND).

VFA: estímulo com peptídeo do vírus da FA 17D.

Vif 41-107: *pool* com peptídeos de Vif do fragmento 41-107 da proteína.

Vif 1-51: *pool* com peptídeos de Vif do fragmento 1-51 da proteína.

Símbolos dos grupos em relação aos controles nessa ordem; naïve não estimulado, naïve, mock e FA 17DD:

+ aumento da população, (+) aumento da população com diferença significativa;

- diminuição da população, (-) diminuição da população com diferença significativa;

SD (sem diferença) – os grupos foram semelhantes.

Na citocina IL-5 detectada com os *pools* de Vif; os grupos virais e controles negativos foram semelhantes, e por isso não colocamos na tabela.

5. Discussão

A pandemia de HIV ainda é um grande problema de saúde pública, com 36,9 milhões de pessoas vivendo com HIV em todo mundo, em 2017. Apesar da expansão dos tratamentos antirretrovirais, 940.000 pessoas morreram de doenças relacionadas a AIDS, e 1,8 milhões de pessoas se tornaram infectadas em 2017. Uma vacina contra o HIV é necessária para acabar com a pandemia, mas a diversidade genética global do HIV-1 é o maior obstáculo para o desenvolvimento de uma vacina, porque uma vacina efetiva globalmente deverá proteger contra os divergentes subtipos de HIV e seus recombinantes. Desta forma, o desenho, o teste e a implementação de vacinas contra o HIV requer conhecimento atualizado da distribuição dos subtipos e recombinantes, em diversas partes do mundo, porque a sequência do imunógeno da vacina precisa ser correspondente às sequências virais circulantes na população alvo (154).

A escolha do imunógeno para vacinas contra o HIV permanece uma questão em aberto, já que o controle da replicação viral pode ser afetado de acordo com a proteína que seria alvo da resposta imune (155). Apesar da proteína Gag ser citada como antígeno preferencial para a indução de imunidade celular, muitas evidências vem surgindo de que Vif e Nef também podem ser alvos úteis (1, 156-158).

Vacinas constituídas por vírus replicativos atenuados são mais eficazes em induzir respostas protetoras contra infecções. Pela sua capacidade de realizar ciclos de replicação em humanos, o vírus da FA 17D aparece como um dos possíveis vetores mais imunogênicos atualmente disponíveis e surge como uma opção interessante a ser testada como vetor de epítopos de HIV/SIV (159). Neste sentido, nosso grupo foi pioneiro em construir vírus FA 17D carreando epítopos de SIV para serem testados em 98 primatas não-humanos em uma colaboração com Dr. David Watkins (58). O vírus da FA 17D apresenta uma série de vantagens quanto a indução de imunidade de longa duração. No entanto, por possuir um genoma compacto, algumas das principais preocupações que surgem em relação ao seu uso como vetor são sua restrição quanto ao tamanho do inserto heterólogo e sua estabilidade genética (159).

Em 2013, o nosso grupo em colaboração com Dr. David Watkins, publicou um estudo sobre a construção e a avaliação da imunogenicidade de sete vírus recombinantes de FA 17D/SIV, expressando fragmentos das proteínas de Gag, Nef e Vif, em macacos rhesus (59). Nesse estudo, foram construídos os vírus recombinantes FA/Vif 1-110 original e FA/Vif 102-214 utilizados nessa tese. Os resultados foram promissores em relação ao vírus de FA/Vif, onde foi observado uma rápida expansão de células T CD8⁺ alvejando Vif, e em níveis mais baixos Nef, depois de um *boost* com vírus recombinantes de Ad5 expressando essas proteínas.

Entretanto, estudos realizados em nosso laboratório, indicaram que o vírus FA/Vif 1-110 original demonstrou ser um vírus instável geneticamente, rapidamente perdendo o inserto de Vif na quinta passagem seriada em células Vero, enquanto o vírus FA/Vif 102-214 era estável até a décima quinta passagem em células Vero.

O que ocorreu com o vírus FA/Vif 1-110 original é um dos grandes problemas enfrentados para fabricação de vacinas constituídas por vírus recombinantes, que consiste na deleção do inserto heterólogo durante a replicação viral (160). As subpopulações virais em que o inserto foi deletado apresentam vantagem replicativa sobre os vírus contendo o inserto e acabam predominando na cultura ou no indivíduo vacinado. Portanto, a estabilidade genética do inserto heterólogo no genoma viral é um fator importante a ser avaliado durante o desenvolvimento de vacinas constituídas de vírus recombinantes.

Utilizando a estratégia de inserção do gene heterólogo na região intergênica E/NS1 do genoma do vírus da FA 17D, nosso grupo construiu um vírus recombinante com esse vetor expressando o fragmento da proteína de Gag 45-269 do vírus SIVmac239, em que o vírus era instável com perda do inserto na quinta passagem em células Vero. Outros grupos também já publicaram a obtenção de vírus recombinantes com a mesma estratégia de inserção E/NS1, e demonstraram que essa abordagem era a que gerava maior estabilidade genética ao vírus (136). Após um estudo do fragmento de Gag 45-269, constatou-se que havia um elemento IRES (*internal ribosome entry site*) que poderia estar influenciando a estabilidade genética do vírus. Sendo assim, nosso grupo desenvolveu um segundo vírus, FA 17D/Gag 45-269, no qual o elemento IRES presente na construção inicial foi nocauteado, sendo este chamado de FA 17D/Gag Δ IRES. Esse segundo vírus foi mais estável que o primeiro, mantendo o inserto por pelo menos 20 passagens seriadas em células Vero (161).

Assim como o vírus recombinante FA/Gag 45-269 citado acima, o vírus construído anteriormente ao projeto, FA/Vif 1-110 original, era instável geneticamente. Buscando informações sobre a proteína de Vif na literatura, com o objetivo de entender o que poderia estar induzindo a perda do inserto, observamos que no N-terminal de Vif existem motivos de ligação a RNA de lentivírus (152). Postulamos que a instabilidade genética do vírus FA/Vif 1-110 original poderia então estar relacionada com a ligação da proteína recombinante Vif com o RNA genômico do vírus FA 17D, levando a distúrbios nos processos em que o RNA genômico está envolvido durante o ciclo de replicação viral. Com a deleção do N-terminal de Vif, obtivemos o vírus FA/Vif 42-110, que é estável geneticamente até a vigésima passagem seriada em células Vero, e que foi avaliado nessa tese, quanto a sua imunogenicidade. O nosso objetivo foi investigar se o aumento da estabilidade genética, está relacionado a maior indução de resposta imune celular e humoral, comparando os resultados principalmente com o vírus FA/Vif

1-110 original (instável, perda do inserto na quinta passagem em Vero) e FA/Vif 1-110 variante (instável, perda do inserto na décima passagem em Vero).

O vírus FA/Vif 42-110 e o FA/Vif 1-110 variante, foram construídos nessa tese, na plataforma II de expressão da proteína heteróloga. Enquanto os anteriores, FA/Vif 1-110 original e FA/Vif 102-214, na plataforma I. A construção dos novos vírus na plataforma II, que é um aprimoramento da plataforma I, foi direcionada pelos resultados observados em um projeto de doutorado desenvolvido em nosso laboratório, onde comparou-se diferentes construções da plataforma II, utilizando a proteína EGFP, como inserto heterólogo na região intergênica E/NS1 do genoma do vírus da FA 17D, e posteriormente, com fragmentos da proteína gp120 e gp41 de HIV/SIV (162). As diferentes estratégias de construção da plataforma II utilizadas nesse projeto de doutorado citado acima, objetivavam o aumento da estabilidade genética dos vírus recombinantes de FA 17D, assim como uma melhor expressão da proteína heteróloga, em termos de adquirir um enovelamento ao ser translocada para o retículo endoplasmático, durante o processo de síntese de poliproteína viral (162).

Os resultados da referida tese com os vírus recombinantes de FA/EGFP, mostraram que os motivos de N-glicosilação e clivagem por furina introduzidos nos vírus da plataforma II se mostraram funcionais e causaram impacto sobre a expressão da GFP recombinante, principalmente na qualidade do seu enovelamento e no seu tráfego para a via secretora. Constatou-se que as modificações introduzidas no N-terminal da proteína recombinante na plataforma II causaram pouco impacto sobre a expressão da GFP e sua localização intracelular, porém apresentaram alterações na estabilidade genética do inserto. O aumento do domínio HA para conter todos os segmentos derivados da HA da proteína E de DENV-4 foi favorável para a replicação viral, apresentando consequências positivas sobre a estabilidade do inserto e cinética de crescimento viral (162).

Além da estabilidade genética, a caracterização biológica *in vitro* dos vírus recombinantes é uma etapa importante de avaliação de protótipos vacinais. Os dados das curvas de crescimento dos vírus FA/Vif em cultura de células Vero, mostram uma ligeira redução no *fitness* viral desses vírus em relação ao FA 17DD. A relativa redução da capacidade proliferativa dos vírus recombinantes também já havia sido observada para vírus da FA recombinantes carregando proteínas do vírus Lassa, que apresentavam tamanhos de placas de lise em células Vero, reduzidos em relação ao vírus FA 17DD (136), assim como os vírus FA/Gag 45-269 e FA/Gag Δ IRES, citados anteriormente (163), e recombinantes de FA 17D/*T. cruzi*, que também apresentaram perfil menos proliferativo nas curvas de crescimento em células Vero (129).

Apesar dos recombinantes apresentarem menor taxa de proliferação em relação ao FA 17DD, os vírus construídos nessa tese, FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110, apresentaram um incremento na taxa de proliferação quando comparados com o FA/Vif 1-110 original, que apresentou a menor taxa de crescimento entre os vírus recombinantes FA/Vif. O perfil proliferativo dos vírus FA/Vif foi compatível com os observados em outros estudos do nosso grupo, com insertos de EGFP e *Trypanosoma cruzi* (130, 134).

Após a caracterização biológica e genética dos vírus FA/Vif, investigamos a imunogenicidade desses vírus em modelo murino, utilizando a linhagem C57BL/6. Optamos por essa linhagem porque havia sido observado em um projeto de doutorado do nosso laboratório, que a magnitude da resposta imune celular e humoral é maior em relação a linhagem BALB/c, quando utilizamos vírus recombinantes de FA 17D/SIV (163, 164).

Uma imunização efetiva induz resposta imune inata e adaptiva, e necessariamente deve induzir resposta imune celular e humoral de longo prazo, com a produção de anticorpos neutralizantes e células T de memória (165). Na avaliação da imunogenicidade dos vírus FA/Vif, o primeiro passo foi investigar *in vivo*, a indução de células T de memória pelas imunizações com os vírus recombinantes no baço dos camundongos, realizando uma varredura na resposta total de células T de memória dentro dos grupos FA/Vif, comparando com os controles naïve, mock e FA 17DD.

Nesta análise, observou-se maiores valores e dispersão na contagem de esplenócitos e no número de células T CD4⁺ nos grupos FA/Vif, principalmente no FA/Vif 1-110 variante, FA/Vif 42-110 e FA/Vif 102-214. Este efeito estaria associado à imunização com os vírus FA/Vif, e foi mais acentuado no grupo FA/Vif 1-110 variante, que apresentou maiores valores que o controle FA 17DD. Uma vez que o grupo do vírus FA/Vif 1-110 variante apresentou maiores valores e dispersão, poderia ser uma indicação de maior potencial imunogênico desse vírus recombinante. Entretanto, os resultados da contagem de esplenócitos, número de células T CD4⁺ e T CD8⁺, mostraram que as imunizações com os FA/Vif não induziram realmente grandes alterações nessas populações celulares. Esse resultado seria o esperado como resposta imune mediada por vírus recombinantes de FA 17D atenuados em camundongos de linhagens selvagens imunocompetentes, já que esses apresentam a resposta antiviral mediada por interferon, controlando assim a replicação viral. Não foi também observada qualquer alteração clínica nos baços desses camundongos, no momento da coleta. De forma geral, o modelo murino produz uma resposta celular modesta, em relação a resposta em humanos (166). Entretanto, em linhagens deficientes em receptores de interferon, como A129 (deficiente em receptores de IFN- α e β), G129 (deficiente em receptor de IFN- γ), AG129 (deficiente em receptores de IFN- α , β e γ) e IFNAR^{-/-} (deficiente em receptores de IFN- α e β), observa-se

maior proliferação do vírus FA 17D nos órgãos linfoides, e o vírus da FA selvagem induz doença viscerotrópica, muito semelhante à observada em humanos (166, 167). Essa resposta do vírus da FA selvagem se dá pela sua capacidade de ultrapassar ou evadir a imunidade inata, incluindo as respostas de interferon tipo I (IFN- α e β) e/ou tipo II (IFN- γ) em humanos e primatas não humanos, muito similar a outros flavivírus (168, 169).

Alguns estudos descrevem o vírus da FA 17D em camundongos de linhagens selvagens, como o C57BL/6, como severamente atenuado. Contudo, a rota da administração da imunização também é extremamente importante, mesmo nos camundongos deficientes de interferon, na indução da resposta imune. Em um estudo com camundongos imunocompetentes C57BL/6 PVR-Tg21 (IFNAR^{+/+}) e imunodeficientes C57BL/6 PVRTg21 (IFNAR^{-/-}), observou-se que quando o inóculo de FA 17D foi administrado pela via subcutânea nos camundongos imunodeficientes, não induziu doença, enquanto pelas vias intraperitoneal e intramuscular, houve indução de doença (167, 170).

Quando analisamos a razão de células T CD4⁺ e T CD8⁺ nos grupos FA/Vif, não notamos uma grande diferença quando comparados aos controles naïve, mock e FA 17DD. Porém, apesar das limitações do modelo animal, o vírus FA/Vif 1-110 variante, apresentou um ligeiro aumento nas células T CD4⁺, o que também foi observado no número de células T CD4⁺, conforme discutido anteriormente.

Diferentes estratégias em relação à escolha dos marcadores de moléculas de superfície, para se investigar células T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória por citometria de fluxo, podem ser adotadas. Optamos para os experimentos *in vivo*, utilizar o marcador CD44 que desempenha a função de migração celular, adesão a matriz celular e sinalização; o marcador CD127 é o receptor de IL-7, uma das citocinas responsáveis pela sobrevivência das células T de memória; CCR7 ou CD197, receptor das quimiocinas CCL19 e CCL21, relacionadas a migração e adesão celular, e o marcador CD62L, uma selectina em que o seu ligante são as sialomucinas das vênulas endoteliais altas, sendo responsável então, pelo *homing* celular em órgãos linfoides secundários (18, 148).

Muitos estudos que investigaram a resposta de célula T de memória induzida pelo vírus FA 17D ou subcepas, utilizaram os marcadores citados acima, para detectar essa população. Akondy e cols. (108) demonstraram a ampla e polifuncional resposta de células T CD8⁺ induzida pela vacina de FA 17D utilizando os mesmos marcadores, assim como Miller e cols. (103); que desenvolveram uma análise longitudinal da resposta T CD8⁺ induzida pela vacina em humanos. Todryk em uma revisão de literatura sobre a formação de memória após vacinação, onde ele cita os marcadores de memória que utilizamos nessa tese, diz que a melhor

e crescente compreensão da geração, manutenção, atividade das células T, está levando a estratégias de vacinação com melhor eficácia e cobertura (149).

Na análise da população de células T de memória ($CD44^{\text{high}}CD127^{\text{high}}$) induzida pelas imunizações com os vírus recombinantes FA/Vif, porém ainda sem discriminar as subpopulações de memória central e efetora, dentro dos experimentos *in vivo*, observamos somente a diferença significativa entre o grupo naíve e os grupos de vírus. O grupo mock se mostrou muito semelhante aos grupos virais no número dessas células e também porcentagem. Contudo, o grupo FA/Vif 1-110 variante mais uma vez apresentou valores mais altos no número de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ de memória. Esse resultado sugere que dentro da população total de memória de células T, nas nossas condições experimentais, a resposta observada provavelmente foi gerada pela imunização em si, e não pelo inóculo da imunização, já que a resposta encontrada no grupo mock foi semelhante aos grupos de vírus.

Adicionando os marcadores CCR7 e CD62L, discriminamos as populações de T de memória central e efetora. O número de células T de memória central ($CD44^{\text{high}}CD127^{\text{high}}CCR7^{\text{high}}CD62L^{\text{high}}$) foi semelhante nos grupos virais e mock, sendo esses diferentes significativamente somente do grupo naíve. No número de células T $CD4^+$ de memória central, notamos maior dispersão e maiores valores nos grupos FA/Vif. Quando analisamos a porcentagem de células T $CD8^+$ de memória central, observamos que o grupo mock apresentou valores significativamente maiores que os grupos FA/Vif.

O órgão estudado pode estar relacionado ao fato de não termos conseguido discriminar as diferenças entre os grupos FA/Vif e os controles no parâmetro de células T de memória central. As células T de memória central são encontradas principalmente nos linfonodos (171, 172). Porém, o baço apresenta algumas vantagens em relação aos linfonodos, como o maior número de células para as análises, e a facilidade na coleta. Além disso, a realização de um desafio intracerebral após as imunizações, com um vírus selvagem da FA, talvez aumentasse a magnitude da resposta imune celular, já que o vírus da febre amarela apresenta neurotropismo, o que auxiliaria no aumento do *pool* das células de memória geradas após as imunizações, devido ao terceiro encontro com o vírus, porém, nessa ocasião, com maior número de partículas virais que infectariam o parênquima cerebral, e desencadeariam maior resposta imune. Assim como a combinação de diferentes formulações virais de FA/Vif e/ou *boost* com vírus recombinantes de Vif com outros vetores, como adenovírus, estratégias que foram adotadas em estudos com vírus recombinantes de FA 17D/T. *cruzi* em camundongos; e FA 17D/SIV em macacos rhesus, respectivamente (59, 130).

Ao contrário da resposta de células T de memória central, a resposta de células T de memória efetora encontrada nos grupos FA/Vif foi muito mais promissora e interessante.

Conseguimos observar a diferença significativa entre os grupos virais e grupos de controles negativos, e em geral, os vírus FA/Vif 1-110 variante, FA/Vif 42-110 e FA/Vif 102-214 se destacaram entre os grupos virais. O grupo FA/Vif 1-110 variante apresentou maiores valores e dispersão no número de células T CD8⁺ de memória efetora. Essa discriminação entre os grupos experimentais foi maior nas células T CD8⁺ de memória efetora, principalmente na porcentagem dessa população. O *background* genético da linhagem dos camundongos utilizada nessa tese, pode ter influenciado nesse resultado, já que os camundongos C57BL/6 apresentam resposta celular predominantemente T_H1 (173, 174).

A investigação da resposta específica de células T de memória frente a estímulos específicos do vírus da FA 17D e de Vif, foi primeiramente estudada pela expressão do CD69, que é um marcador de ativação recente, para imunofenotipar as células T ativadas. A expressão do CD69 é rapidamente induzida na superfície dos linfócitos T, depois da interação TCR/CD3 (175). Com o estímulo do peptídeo do vírus de FA 17D, observamos maior porcentagem de células ativadas nos grupos de vírus, especialmente nas células T CD8⁺ ativadas, onde o grupo FA/Vif 1-110 original apresentou maior porcentagem dessas células que o FA 17DD. Todos os grupos de vírus apresentaram maior porcentagem de células T ativadas que os controles negativos naïve não estimulado, naïve e mock, indicando que haviam células específicas contra o vírus FA 17D e Vif, induzidas pelas imunizações com os FA/Vif, que responderam mais rapidamente.

Neves e cols. avaliaram a ativação precoce de células T polifuncionais, produtoras de INF- γ e TNF- α , utilizando o marcador CD69, nas células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de macacos rhesus coletado nos dias 5 e 7 após imunização com o vírus vacinal FA 17D (176). Esse marcador de ativação precoce é muito utilizado em ensaios *in vitro* com estímulo de antígenos, como foi realizado por Krowka e cols., que demonstraram o uso do CD69 em ensaios para a investigação rápida de deficiência de subpopulações de linfócitos em pacientes HIV⁺, e também para testar os efeitos de agentes que modulam a ativação da resposta imune (177).

A ativação de células T inicia uma cascata de sinalização intracelular que resulta na proliferação, função efetora ou morte, dependendo da intensidade do sinal no TCR (178). A ativação de células T induz proliferação com o objetivo de clonalmente selecionar e expandir células T antígeno específicas. Células T CD8⁺ expandem com um fator de 50.000, enquanto T CD4⁺ um pouco menos (179). Utilizamos o marcador CFSE para avaliar diferentes populações celulares que proliferaram após os estímulos *in vitro*, mas principalmente as células T de memória, já que nessa etapa da tese, o nosso objetivo era investigar a resposta específica ao vírus FA 17D e Vif.

Com o estímulo do peptídeo do vírus FA 17D, observamos maior proliferação de células CD3⁺ nos grupos de vírus, especialmente nos grupos FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110. Não houve grande discriminação entre os grupos experimentais (controles e FA/Vif) na porcentagem de células T CD4⁺ que proliferaram com o estímulo citado, porém, notou-se um incremento nos grupos FA 17DD e FA/Vif 1-110 variante. A porcentagem de células T CD8⁺ que proliferaram com este estímulo se mostrou um parâmetro mais interessante, pois encontramos diferença significativa entre os grupos de vírus e controle negativo, onde os vírus FA 17DD e FA/Vif 1-110 variante apresentaram os maiores valores. Podemos esperar maior discriminação na resposta de células T CD8⁺ com o peptídeo ATLYRML da proteína NS3 do vírus da FA 17D, já que é um epítipo imonodominante para essas células, na linhagem C57BL/6 (151).

A mesma análise de ativação e proliferação foi realizada com os *pools* de peptídeos de Vif. Quando estimulamos as células com o *pool* de Vif 41-107, não observamos diferença entre os grupos FA/Vif e os controles, nas células T ativadas, entretanto, existe uma tendência de maiores valores nos grupos de vírus, especialmente no FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110 o que indicaria que esses vírus possuem maior potencial de imunogenicidade frente aos epítomos desse *pool* de Vif. Em relação a proliferação de células T com esse estímulo, todos os grupos FA/Vif e os controles apresentaram porcentagens semelhantes dessas populações. Resultados muito similares foram observados com o estímulo do *pool* de Vif 1-51, mas com o FA/Vif 42-110 mostrando um aumento muito discreto na porcentagem de células T ativadas, também sem diferença significativa com os controles. E assim como o *pool* Vif 41-107, os grupos FA/Vif e os controles apresentaram porcentagens semelhantes de células T que proliferaram após esse estímulo. Este conjunto de dados indica que não ocorreu indução significativa de resposta imune dirigida a Vif neste modelo animal.

Os peptídeos de Vif utilizados nos estudos aqui apresentados, induziram boa resposta imune celular em estudos em macacos rhesus quando foram utilizados em ELISpot e marcação de moléculas intracelulares (ICS), porém, em um desenho experimental muito mais complexo (1, 59, 157, 158). Foi realizada a genotipagem das moléculas de MHC de classe I desses animais, para descartar ou usar como controle, os macacos que apresentavam os tipos que controlam a replicação viral ou são controladores de elite (Mamu-A*01, Mamu-B*08 or Mamu-B*17). Além de vírus recombinantes de FA 17D/Vif, eles também utilizaram Ad5/Vif e DNA/Vif (vacina de DNA), resultando em diferentes estratégias vacinais de *prime* e *boost*. Os animais foram imunizados com os vírus recombinantes por diferentes vias de inoculação (intramuscular coxa e braço, ombros, panturrilha e abdômen), alternando lado direito e esquerdo. Após as imunizações, alguns estudos ainda realizaram desafio intra-retal. Como eles

construíram vírus recombinantes expressando fragmentos de toda a proteína de Vif, o número de pools testados também foi maior (geralmente 4 *pools* com 10 peptídeos).

Em um estudo com vacina de DNA com o gene completo de NS1 do vírus DENV2, um outro flavivírus, onde camundongos BALB/c foram imunizados e desafiados intracerebralmente, observou-se que células T específicas induzidas pela imunização, proliferaram e migraram para órgãos como o fígado. A proliferação de células T foi investigada com o uso do marcador CFSE, assim como no nosso trabalho (180). Contudo, a inserção do desafio no desenho experimental desses estudos citados, pode ter influenciado na magnitude da resposta celular observada.

A fim de se detectar resposta imune induzida pela imunização com os vírus recombinantes, investigamos as populações de células T que proliferaram após a incubação com os estímulos do vírus da FA 17D e Vif, com o auxílio dos marcadores CFSE, CD44, CCR7 e CD62L. Definimos primeiro a população de células T CD44^{high}, que são células efetoras e de memória efetora. Com o peptídeo do vírus de FA 17D, não observamos diferença entre os FA/Vif e controles na porcentagem de células T CD4⁺ CD44^{high}, mas nas células T CD8⁺CD44^{high}, o grupo FA/Vif 1-110 original, apresentou um aumento na porcentagem dessa população em relação aos outros vírus. Nas populações de células T de memória central que proliferaram, assim como nos resultados dos ensaios *in vivo*, não conseguimos discriminar a resposta entre os grupos de vírus e controles negativos, independente do estímulo utilizado; peptídeo do vírus de FA 17D ou os *pools* de Vif. Como mencionamos anteriormente, esse resultado pode ser reflexo do órgão estudado, já que predominantemente as células T de memória central são encontradas nos linfonodos (171, 172).

De maneira semelhante ao que foi observado nos ensaios *in vivo*, os resultados das células T de memória efetora foram mais interessantes e promissores na investigação da resposta imune específica. Observamos também que no parâmetro de células T de memória central que proliferaram, os controles negativos apresentaram maior porcentagem dessa população celular, enquanto no de células T de memória efetora, o contrário ocorreu, com os grupos de vírus apresentando maior porcentagem dessa população que os controles negativos. Essa relação invertida poderia estar relacionada a função das populações dentro dos grupos estudados. Existe uma porcentagem maior de células T de memória efetora dentro dos grupos de vírus, possivelmente porque após o estímulo *in vitro* específico, elas proliferaram rapidamente, já que reconheceram o antígeno da exposição prévia das imunizações, e desempenharam sua função efetora para o *clearance* do antígeno. A população de células T de memória central é menor nos grupos de vírus, porque provavelmente essas células foram

ativadas *in vitro*, e se diferenciaram em efetoras, e por isso observamos a maior porcentagem dessa população celular. Contudo, essa seria somente uma hipótese, que teria que ser avaliada.

O peptídeo do vírus de FA 17D foi capaz de induzir a proliferação de células T de memória efetora *in vitro*, principalmente T CD8⁺, onde a diferença entre os grupos de vírus e controles negativos foi clara e significativa, sendo o FA 17DD com valores mais altos entre os grupos de vírus, mas sem diferença significativa entre esse grupo e os FA/Vif. Um incremento no grupo FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110 em relação ao FA 17DD foi observado nas células T CD4⁺ de memória efetora. Esse resultado demonstra que os vírus recombinantes de FA/Vif são capazes de responder a um estímulo do vírus de FA 17D tão bem quanto o controle FA 17DD, apesar de serem mais atenuados que esse controle, como visto nos resultados de caracterização biológica, principalmente os vírus FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110, que nos parâmetros analisados até o momento, apresentaram maior potencial.

Com o estímulo dos *pools* de Vif, observamos um perfil similar, porém a magnitude da resposta celular foi menor, e o grupo FA 17DD também respondeu aos peptídeos de Vif. A maior porcentagem da população T CD44^{high} que proliferou após o estímulo com o *pool* de Vif 41-107, foi observada no grupo FA/Vif 1-110 variante, especialmente nas células T CD8⁺CD44^{high}. Nas células T de memória efetora, o FA/Vif 1-110 original apresentou um incremento em relação aos outros vírus, e essa diferença foi maior nas células T CD8⁺ de memória efetora. O *pool* de Vif 1-51 parece induzir menos resposta celular específica que o Vif 41-107, já que não notamos nenhuma diferença ou tendência na população de células T CD44^{high}, e nas células T CD8⁺ de memória efetora, o FA 17DD se mostrou muito semelhante ao FA/Vif 1-110, apesar dos grupos de vírus apresentarem valores significativamente maiores que os controles negativos.

O fato de termos observado maior resposta T CD8⁺ de memória efetora quando utilizamos os peptídeos de Vif como estímulo, é condizente com a análise de predição de imunogenicidade de MHC de classe I, que utilizamos para selecionar os peptídeos para o *pool* de Vif 41-107, e até mesmo com a análise de predição de ligação desses peptídeos a células T CD8⁺. Como são análises independentes, optamos pela de imunogenicidade de MHC de classe I para selecionar os peptídeos, já que todos os peptídeos que são imunogênicos, são necessariamente bons ligadores a células T CD8⁺, mas o inverso não é verdadeiro. Uma pontuação alta na análise de imunogenicidade, indica maior probabilidade de elicitar resposta imune. Essa análise prediz reconhecimento de epítomos e propensão de fatores para processamento/clivagem. Enquanto epítomos devem se ligar biologicamente com afinidade relevante, nem todos os peptídeos que se ligam dessa maneira, são epítomos (não são processados, ou não existe repertório de células T etc.). Selecionamos para o *pool* de Vif 41-

107, os peptídeos com a pontuação mais alta, mas também é possível observar que esses peptídeos possuem bons *percentile rank* (valores mais baixos), em relação a ligação a células T CD8⁺

Selecionamos os melhores peptídeos no fragmento 41-111 de Vif, porque é o fragmento comum aos vírus FA/Vif 1-110 original, FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110. Porém, após os primeiros experimentos com o *pool* de Vif 41-107, observamos que ele não induzia resposta celular com a magnitude que esperávamos. Devido a isso, decidimos testar um *pool* de Vif com o fragmento 1-51, porque achamos que talvez estivéssemos perdendo a resposta celular de algum epítipo desse fragmento. Na análise de predição de imunogenicidade de MHC de classe I dos peptídeos do fragmento 1-51 notamos que, a metade dos peptídeos não obtiveram uma boa pontuação (negativa). Contudo, mais da metade deles obtiveram um bom *percentile rank* na análise de ligação a células T CD8⁺ (valores baixos). Interessante que quando estimulamos as células do grupo FA/Vif 42-110 com o *pool* de Vif 1-51, observamos resposta, apesar de somente dois peptídeos desse *pool*, com o *overlap* de 11 aminoácidos, se encontrarem no fragmento de Vif 42-110 (peptídeos das posições 37-51 e 41-55).

As células T de memória efetora do grupo FA 17DD, principalmente as células T CD8⁺ de memória, responderam quando estimuladas com os *pools* de peptídeos de Vif. Apesar de estudos citarem o antígeno cognato como essencialmente a única maneira de reativar células T de memória, muitas evidências apontam para o importante papel das citocinas e quimiocinas nesse processo. Dados iniciais apontavam que células T CD8⁺ exibindo aspectos de memória (CD44^{high}) proliferavam em resposta a IL-15 *in vitro* e *in vivo*, e independente da ativação via TCR (181). Soudja e cols. observaram que células T CD8⁺ de memória foram ativadas (confirmada pela expressão de INF- γ , granzima B, CD25, NKG2D, e outros) quando o antígeno cognato estava presente ou não (182). Investigando os mecanismos, eles mostraram que as citocinas IL-18 e IL-15 foram as maiores indutoras da diferenciação precoce de células T de memória efetora em células secretoras de INF- γ e granzima B (183). A cultura de esplenócitos que foi estimulada com os peptídeos de Vif, pode, portanto, ter criado um ambiente de citocinas propício para a proliferação de células T de memória, não dependente de antígeno cognato. Importante lembrar que nessa cultura de esplenócitos estavam presentes diferentes tipos celulares como monócitos, produtores de IL-15, células dendríticas e macrófagos; produtoras de IL-18 (182, 184).

O uso de ferramentas para a investigação de resposta específica, como tetrâmeros, poderia ter nos ajudado no refinamento da resposta celular contra Vif, assim como foi utilizado no estudo de com macacos rhesus, que foram imunizados com vírus recombinantes de diferentes vetores expressando Env, Vif e Nef de SIVmac239. Com o auxílio dos tetrâmeros,

eles investigaram a resposta de células T CD8⁺ SIV específicas, e observaram o controle da replicação viral após desafio (185). Contudo, pelo seu alto custo, a aplicação dessa ferramenta seria interessante em uma segunda etapa, onde utilizaríamos os vírus FA/Vif mais promissores selecionados na tese, em um modelo animal mais permissivo, e com a inserção de um desafio, para aumentar a magnitude da resposta.

Estudos em macacos rhesus investigando a resposta específica contra Vif, sempre se mostraram mais ricos em resposta imune celular e humoral. Epítomos imunodominantes de Vif de SIVmac239 já foram descritos na literatura, em um estudo onde se investigou os mecanismos dos controladores de elite em um modelo animal de MHC de classe I, associado com o controle da replicação do vírus da imunodeficiência símia. O mapeamento dos alelos de MHC de classe I e os epítomos em que eles se ligam, no contexto dos macacos rhesus controladores de elite, tem mostrado que as células T CD8⁺ nesses animais, parecem focar na proteína Vif de SIV. Epítomos de Vif são apresentados por inúmeros alelos de MHC de classe I, incluindo aqueles que são associados com o controle de elite, Mamu-B*17 e Mamu-B*08 (4). Metade dos macacos rhesus expressando Mamu-B*08 espontaneamente se tornarão controladores de elite após a infecção com SIVmac239 (186).

Loffredo e cols. mapearam a resposta restrita Mamu-B*08 T CD8⁺ para 13 epítomos de Gag, Vpr, Env, Vif, Nef, e Rev. A resposta imune mais forte e mais frequente foi a contra epítomos de Vif, Nef e Rev, e análise da sequência das quasispecies de SIV desses animais, demonstraram predominantemente mutações em epítomos de Vif e Nef. A importância de células T Vif específicas ficou clara, quando em outro estudo foi demonstrado que mutações de escape no epítomo de Vif RL8 (172-179) diferenciam progressores Mamu-B*08+ de controladores de elite (5). Nesse estudo, eles encontraram muitas mutações não sinônimas nos cinco epítomos mais imunodominantes: Vif RL8 (172-179), Vif RL9 (123-131), Nef RL10, Nef RL9b, e Nef RL9c. A resposta de células T CD8⁺ contra esses epítomos tem sido associada com produção de IFN- γ , controle da replicação viral, e/ou seleção dos mutantes de escape.

A imunofenotipagem das células T de memória que proliferaram, foi parte da investigação da resposta celular específica contra o vírus FA 17D e Vif. Essa análise foi realizada logo após o procedimento de ativação com peptídeos com esplenócitos frescos obtidos dos camundongos imunizados com os vírus FA/Vif e FA 17DD. O sobrenadante da cultura estimulada de esplenócitos foi congelado para a análise posterior das citocinas secretadas. Optamos pelo CBA (Cytometric Bead Array) para investigar as citocinas secretadas porque é uma análise multiparamétrica, onde conseguimos dentro de um único ensaio, detectar 5 citocinas diferentes (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-5), utilizando um volume pequeno de

amostra. O vírus da FA 17D, nosso vetor nos vírus recombinantes FA/Vif, induz uma resposta celular balanceada T_{H1} e T_{H2} , e por isso utilizamos um kit de CBA para essa resposta.

Idealmente, uma vacina induz células T de memória de vida longa, caracterizadas como T de memória central e de memória efetora. Essas células T de memória quando encontram o antígeno que tiveram contato previamente, via imunização, expandem clonalmente para se diferenciar em efetoras. O mecanismo chave em que as células T_{H1} medeiam a sua função efetora, é através da produção simultânea de IFN- γ , TNF- α e IL-2 (187). O IFN- γ atua em sinergia com TNF- α para promover a morte do patógeno através da ativação de macrófagos, enquanto IL-2 aumenta a expansão de células T, levando a respostas efetoras mais eficientes. Portanto, entre as formas mais comuns de se avaliar a existência de células efetoras induzidas pela vacina é medir a proliferação de esplenócitos e a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 após estimulação *in vitro* com antígenos que foram utilizados na vacina (188).

Células T $CD4^+$ de memória central são capazes de produzir IL-2, e as T $CD4^+$ de memória efetora predominantemente produzem IFN- γ , IL-4 e TNF- α , mas uma população pequena dessas células produz IL-2. Esses achados são consistentes com as subpopulações de células T $CD8^+$. De acordo com Okada e cols., a subpopulação $CCR7^- CD45RA^+ CD27^+ CD28^+$ predominantemente incluem células IFN- $\gamma^- IL-4^- IL-2^+$ e IFN- $\gamma^+ IL-4^- IL-2^+$ sugerindo ser uma população de células T de memória efetora (189). Além de células T, na cultura de esplenócitos que foram estimulados para os ensaios de CBA, estão presentes diferentes tipos celulares como células B, monócitos, granulócitos, células NK e NKT, que também contribuíram na secreção de citocinas encontradas no sobrenadante analisado.

O peptídeo do vírus da FA 17D, como também observado nos resultados da imunofenotipagem das diferentes populações celulares que proliferaram, foi capaz de induzir maior secreção de citocinas pelos esplenócitos nos grupos de vírus, que as concentrações detectadas com o estímulo dos *pools* de peptídeos de Vif. As citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-2 foram detectadas com esse estímulo, sendo que a maior concentração observada foi a de IFN- γ . Podemos dizer que observamos uma resposta específica ao peptídeo do vírus da FA 17D, já que detectamos IFN- γ em uma concentração maior, com valores significativamente maiores nos grupos de vírus, especialmente no FA 17DD, que nos controles negativos. De maneira geral, avaliando todas as citocinas detectadas, os grupos FA/Vif parecem responder de forma semelhante frente a esse estímulo.

Com o estímulo dos *pools* de peptídeos de Vif, detectamos as mesmas citocinas e detectamos também a IL-5, porém, não conseguimos discriminar a resposta entre os grupos FA/Vif e controles nessa citocina. Observamos secreção de citocinas com os estímulos de Vif, no grupo FA 17DD, em todas as citocinas detectadas, sendo esse grupo semelhante ao FA/Vif

1-110 original na IL-2; citocina com a maior concentração detectada. De maneira geral, com o estímulo dos peptídeos de Vif, fica difícil dizer que grupo de FA/Vif apresentou melhor resposta, já que notamos a presença do FA 17DD em todas elas. Com o *pool* de Vif 41-107, somente um FA/Vif apresentou a resposta maior que o FA 17DD, observada na detecção de IFN- γ , que foi o FA/Vif 1-110 variante, enquanto com o *pool* de Vif 1-51, observamos no TNF- α , o FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110. Porém, as concentrações encontradas dessa citocina nos controles negativos foi alta, principalmente no grupo naïve, que apresentou valores semelhantes a esses dois vírus recombinantes.

Existe uma resposta celular frente aos estímulos de Vif, detectada pelas concentrações da citocinas observadas, que predominantemente foi detectada nos grupos de vírus e não nos controles negativos, especialmente com o *pool* de Vif 41-107. As concentrações das citocinas observadas com o *pool* Vif 41-107 foram maiores quando comparadas as obtidas com o *pool* Vif 1-51, porém não foi possível afirmar que essa resposta é específica visto que também foi observada uma resposta no grupo FA 17DD. Apesar de termos detectado a IL-5, as concentrações observadas nos controles negativos e grupos virais, são muito semelhantes. É possível que isso tenha ocorrido porque a secreção da IL-5 é mais tardia em relação as outras citocinas detectadas. A opção pelo tempo de incubação de 18-19 horas nos ensaios foi determinada principalmente pelo pico de secreção das citocinas T_H1, como a IL-2, em que o pico é em 12 horas, e o IFN- γ , em 24 horas após o estímulo *in vitro*. O objetivo foi determinar um tempo de incubação, onde não perdêssemos a secreção de nenhuma citocina que poderia ser detectada com o kit do CBA que utilizamos. Mas também pensando, na viabilidade das células que ficariam incubadas com os diferentes estímulos. Para tanto, realizamos pilotos para testar diferentes condições experimentais.

A resposta não cognata na secreção de citocinas, no FA 17DD frente ao estímulo com os *pools* peptídeos de Vif, também foi observada quando imunofenotipamos as células T de memória que proliferaram com esses estímulos *in vitro*. Kupz e cols. observaram no baço e pulmão de camundongos, que a produção não cognata de IFN- γ pelas células T CD8⁺ de memória antígeno *Mycobacterium tuberculosis* independente e células NK, foi protetora durante infecção com *Mtb*, e que a secreção de IFN- γ por essas células, requer IL-18 (190). Em projeto de tese de uma aluna do nosso laboratório, onde foi avaliada a resposta celular específica de vírus recombinantes de FA/Gag de SIV, através de estímulo com *pools* de peptídeos Gag, também foi observada uma resposta inespecífica no grupo de camundongos que haviam sido imunizados com o vírus FA 17DD, porém, essa resposta foi maior nos grupos FA/Gag (163).

Nesse mesmo projeto foi possível demonstrar que a imunização de camundongos com os vírus recombinantes de FA/Gag foi capaz de induzir a formação de células T produtoras de

IL-2 e IFN- γ concomitantemente, citocinas que também detectamos no nosso projeto, indicando a formação de uma população de memória que exibia mais de uma função celular (191), tanto para células T CD8⁺ quanto para células T CD4⁺ (163). No entanto, as técnicas utilizadas nesse estudo, foram ELISpot e marcação intracelular. A ativação e produção de citocinas como a IL-2 por células T CD8⁺ e, principalmente, por células T CD4⁺, são características importantes da resposta imunológica induzida pelo vírus vacinal da FA 17D e de seus derivados recombinantes, diferenciando-o de outros vírus que vêm sendo utilizados como possíveis vetores vacinais, como o Adenovírus tipo 5 (Ad5) e o vírus vaccínia Ankara (MVA), cujas respostas são geralmente confinadas à produção de IFN- γ por células T CD8⁺ (103, 176, 192).

Apesar de não termos utilizado as mesmas técnicas que a tese citada acima, onde avaliou-se a funcionalidade das células T frente aos estímulos específicos de FA 17DD e Gag, nossos resultados em relação as citocinas detectadas, sugerem que podemos estar avaliando também a secreção de citocinas pelas células T de memória. Principalmente porque sabe-se que essas células de memória responderiam mais rapidamente a antígenos que já tiveram contato (193). Importante lembrar que também estavam presentes na cultura de esplenócitos que foi estimulada, outros tipos celulares que secretam as citocinas avaliadas, como NK, NKT, monócitos e células B (18, 194). Além disso, os nossos resultados em relação as citocinas detectadas, são condizentes com as citocinas encontradas na referida tese, após estímulos específicos de Gag, apesar dos peptídeos de Vif não demonstrarem grande potencial imunogênico nas nossas condições experimentais. Importante mencionar que os dados existentes na literatura com peptídeos de Vif e a resposta T CD8⁺ Vif específica, relacionada ao controle da infecção após desafio com SIVmac239, foram realizados em macacos rhesus e não em modelo murino.

O TNF- α que foi detectado nos nossos ensaios, mas não foi investigado nos estudos com vírus recombinantes FA/Gag, é uma citocina pró-inflamatória muito importante da resposta imune inata. Macrófagos e mastócitos são as células que a produzem, em sua maioria, mas esta citocina também é produzida pelas células dendríticas. Juntamente com a IL-1, IL-6 e quimiocinas, TNF- α é secretado nos locais de infecção, desempenhando múltiplos efeitos nas células endoteliais vasculares, leucócitos, medula, que juntos aumentam a entrega local de células para reparar os tecidos (18).

As células dendríticas são alvo para a replicação do vírus da dengue e FA, e são as primeiras populações celulares a interagirem com esses vírus durante a infecção natural, que leva à indução da proteção em humanos. Gandini e cols. estudaram *in vitro* a infectividade dos vírus DENV2, FA 17DD e um quimérico de FA 17D/DENV2, em células dendríticas derivadas de monócitos, avaliando maturação celular, ativação e produção de citocinas. A maior diferença

encontrada entre os vírus DENV2 e FA 17DD, foi na produção de TNF- α e IFN- α pelas células dendríticas. Os níveis de TNF- α foram significativamente maiores com a infecção de DENV2 na cultura, e discretamente alterado na presença de FA 17DD e FA 17D/DENV2. Porém, esses dois últimos vírus foram capazes de elicitar níveis de IFN- α que não foram atingidos durante a infecção com DENV2 (195).

Investigando a resposta específica de vírus recombinantes de FA/Gag, Neves e cols. observaram que houve formação de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória que exibem mais de uma função (células IFN- γ ⁺IL-2⁺) quando estimuladas com o vírus 17DD inativado, comparável entre os três vírus; FA 17DD, e os recombinantes FA/Gag 45-269 e FA/Gag Δ IRES, principalmente no compartimento de células T CD4⁺, o que é uma característica importante do vetor da FA 17D (176, 192). O mesmo perfil foi visto para as células T CD4⁺ e T CD8⁺ estimuladas com os *pools* de peptídeos de Gag provenientes dos grupos de camundongos imunizados com os três vírus citados. Além destas células T IL-2⁺IFN- γ ⁺ de memória, a presença de células IL-2⁺ demonstra que os vírus recombinantes foram capazes de estimular também células T antígeno-específicas que estão em um estágio superior de diferenciação funcional, já que a secreção desta citocina indica maior duração da memória e está mais correlacionada à proteção contra diversas infecções do que a secreção de IFN- γ somente, incluindo a infecção pelo HIV (191).

No projeto de tese do nosso laboratório citado anteriormente, foi observado que havia produção de IFN- γ e IL-2, após o estímulo específico dos esplenócitos de camundongos imunizados com o antígeno FA 17DD inativado, com magnitude maior para a linhagem C57BL/6, cuja resposta precoce de IFN- γ é mais alta, quando comparado a BALB/c. Da mesma forma, com relação à resposta obtida para os antígenos de Gag carregados pelos vírus recombinantes, a resposta de células T CD4⁺ foi melhor nos camundongos C57BL/6. As mesmas diferenças de qualidade e magnitude das respostas de células T CD8⁺ entre os modelos C57BL/6 e BALB/c já haviam sido descritas para a infecção pelo vírus da Dengue em camundongos (196). Essas são algumas das razões por que optamos por trabalhar com a linhagem C57BL/6 no nosso projeto.

Com o intuito de aprimorarmos a detecção da resposta celular específica a Vif, entendemos que em uma segunda etapa de investigação da imunogenicidade dos vírus FA/Vif mais promissores, seria necessário adotar novas ferramentas, técnicas e desenho experimental, como um outro modelo animal mais permissivo, uso de tetrâmeros para investigar a resposta Vif específica, inserção de *boost* com outros vetores expressando Vif e/ou vacina de DNA/Vif, inserção de desafio, e também um número maior de ensaios para diminuir a variação que

obtivemos com somente dois ensaios com o estímulo do vírus FA 17D e o com o *pool* de Vif 41-107, e três com o *pool* de Vif 1-51.

Além do tempo de incubação e a linhagem de camundongos utilizada, que podem ter influenciado na maior detecção de citocinas T_H1 que T_H2 , as plataformas de expressão da proteína heteróloga, também podem ter contribuído para essa resposta. O fator de infectividade viral (Vif) no contexto do genoma do HIV, e da formação do vírion, é uma proteína citoplasmática, que se localiza com p55 Gag (precursor de proteínas estruturais), e está ligada não-covalentemente à complexos celulares. Pela sua função de imobilizar a proteína AG3, marcando a mesma para degradação via proteossoma, Vif também é degradada, e seus peptídeos apresentados por moléculas MHC I na superfície da célula, e que serão reconhecidos por células T $CD8^+$ citotóxicas. Devido a sua função, a expressão de Vif é moderada ou alta nas células do hospedeiro (197).

Avaliando os vírus FA/Vif nas plataformas de expressão em que foram construídos, na plataforma I (vírus FA/Vif 1-110 original e FA/Vif 102-214), as proteínas ficam retidas no retículo (RE). Segundo a literatura, tal fato poderia levar a uma sobrecarga do RE das células infectadas com proteínas mal enoveladas, o que causaria estresse de retículo, ativando respostas ao mau enovelamento proteico, chamadas UPR (*unfolded protein response*), que culminariam com apoptose, potencializando o efeito apoptótico dos vírus recombinantes (198). A proteína recombinante que apresenta mau enovelamento, tende a induzir maiores níveis de morte celular, provavelmente devido ao estresse de RE causado pelo acúmulo de proteínas mal-formadas, que estariam em contínuo processo de correção pelo sistema de controle de qualidade ERQC (*endoplasmic reticulum quality control*). Os peptídeos de Vif nessas condições, seriam apresentados por MHC I, e reconhecidos por células T $CD8^+$ citotóxicas.

Os vírus FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110 foram construídos na plataforma II de expressão, onde a proteína heteróloga é secretada, endocitada por APCs, e os peptídeos apresentados para células T $CD4^+$, sendo uma resposta de MHC de classe II. O motivo de *N*-glicosilação e o sítio de clivagem proteolítica por furina, flanqueando a sequência de aminoácidos da proteína heteróloga nessa plataforma, fazem com que a retenção da forma glicosilada da proteína recombinante no RE induza menor taxa de degradação desta quando comparamos com à proteína expressa pela plataforma I. Como no nosso sistema a proteína heteróloga é precedida de um fragmento N-terminal da NS1, postulamos que ao introduzir o domínio de endereçamento da proteína NS1 nesta região, a nossa proteína recombinante poderia ser retirada do RE e endereçada para a membrana plasmática ou para secreção. Para isto, utilizamos a sequência do N-terminal da NS1 do próprio vírus FA 17D, apenas estendendo este fragmento de 9 para 18 aminoácidos, a fim de incluir o domínio de endereçamento. Essas

observações referentes a plataforma I e II de expressão, foram testadas com a proteína EGFP em um projeto de tese do nosso laboratório (162), e aplicamos esses conceitos e resultados no presente projeto. Precisaríamos ainda verificar a expressão das proteínas de Vif nas duas plataformas, para verificarmos o tipo de resposta celular (MHC de classe I e II).

Os vírus recombinantes FA/Vif, em diferentes condições experimentais, poderiam induzir dois tipos de resposta imune celular; a contra o vírus da FA e contra a proteína de Vif, e, portanto, uma única vacina geraria proteção contra esses dois antígenos, e poderia ser indicada para indivíduos saudáveis. Conseguimos demonstrar a eficácia em relação a resposta celular específica ao vírus da FA, desses recombinantes, mas também avaliamos o outro braço imunológico, a resposta humoral. Realizamos PRNT contra o vírus da FA 17DD, com os soros dos camundongos imunizados com os vírus FA/Vif, e comparamos com o controle FA 17DD.

Estudos recentes, incluindo a estratégia de biologia de sistemas (110), que analisaram as respostas inata, celular e humoral depois da vacinação com FA 17D, indicam que todos os braços de resposta imune são ativados, levando a uma resposta polifuncional, que é essencial para a imunidade duradoura induzida pela vacina (93, 94, 110). Apesar da ampla estimulação imunológica, existem fortes evidências de que a imunidade humoral mediada pelos anticorpos neutralizantes contra o vírus da FA, principalmente contra a proteína E, é o principal mecanismo efetivo de proteção (92).

Neste trabalho, nós demonstramos que os vírus recombinantes FA/Vif foram capazes de estimular a produção de anticorpos neutralizantes em níveis semelhantes entre si, porém sempre mais baixos do que os níveis encontrados nos animais vacinados com o vírus vacinal FA 17DD. Entre os vírus FA/Vif, o FA/Vif 102-214 apresentou a maior média de título, seguido do FA/Vif 1-110 variante. Sabe-se que a produção de anticorpos é dependente da ligação direta do antígeno às células B que irão se diferenciar em plasmócitos com auxílio das células T CD4⁺, e, portanto é também dependente do quanto o antígeno é capaz de dissipar dentro dos centros germinativos do órgão linfóide secundário para onde migrou (199).

Nossos resultados de resposta imune humoral indicam que os vírus FA/Vif, bem como outros já obtidos em nosso laboratório (129, 134), são mais atenuados que o vírus FA 17DD, tendo uma menor capacidade de indução de anticorpos neutralizantes em camundongo C57BL/6, provavelmente em função da inserção heteróloga no genoma viral, que poderia provocar um atraso no processo replicativo dentro de um hospedeiro vivo.

Em um dos estudos do nosso laboratório citados acima, foi observado que os vírus recombinantes de FA/*T. cruzi* induziram títulos menores de anticorpos neutralizantes do que a imunização com o vacinal FA 17DD em camundongos A/J. Com o intuito de aumentar a imunogenicidade viral, decidiu-se testar novas formulações virais, nas quais seriam

administrados dois vírus recombinantes simultaneamente. As formulações foram compostas de uma mistura dos vírus FA 17D/NS2B3/*T. cruzi* e FA 17D/ENS1/ *T. cruzi*, sendo que duas concentrações virais distintas foram testadas, compondo as formulações 1 e 2. A formulação 1 (combinação de vírus FA 17D/ENS1/ *T. cruzi* e FA 17D/NS2B3/ *T. cruzi*) mostrou-se promissora quanto aos resultados de proteção, parasitemia, indução de IFN- γ e linfoproliferação específica para o vetor vacinal FA 17D e para antígeno específico de *T. cruzi* (130). Os vírus recombinantes de FA/Gag construídos no nosso laboratório, também apresentaram títulos menores de anticorpos em relação ao FA 17DD, nas duas linhagens de camundongos avaliadas; C57BL/6 e BALB/c (163).

A resposta humoral contra Vif poderá ser avaliada na segunda etapa de investigação da imunogenicidade dos vírus FA/Vif, através de ELISA ou outra técnica ainda a ser definida. Porém, como previamente mencionamos, precisamos avaliar a expressão dessa proteína no contexto dos vírus recombinantes FA/Vif, já que no contexto de HIV/SIV, é uma proteína citoplasmática, e por isso, não seria esperada a formação de uma resposta humoral contra ela.

6. Conclusões

- Os vírus FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110 construídos nesse projeto de tese, foram viáveis e apresentaram taxas de proliferação viral em células Vero semelhantes entre si.
- Os vírus FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110 mostraram-se mais estáveis geneticamente que o FA/Vif 1-110 original. Apesar de não possuir um fragmento de Vif relacionado aos vírus citados acima, o FA/Vif 102-214, estável geneticamente, apresentou o melhor perfil de proliferação viral entre os FA/Vif.
- Os vírus FA/Vif são bons indutores de resposta celular contra o vírus da FA, apesar de possuírem o perfil mais atenuado que o FA 17DD. A resposta celular específica para o vírus da FA, foi observada principalmente na secreção de IFN- γ , após o estímulo com o peptídeo do vírus de FA, que foi significativamente maior no FA 17DD.
- Não ocorreu resposta imune celular específica e discriminação clara entre os vírus FA/Vif e FA 17DD com os peptídeos de Vif, visto que observamos resposta celular não cognata no FA 17DD quando estimulado com os *pools* de Vif. No entanto, o *pool* de Vif 41-107 se mostrou discretamente melhor indutor de resposta celular que o Vif 1-51, principalmente na detecção de citocinas, o que condiz com os resultados das análises de predição de imunogenicidade de MHC de classe I e ligação a T CD8⁺, que mostraram que os peptídeos do *pool* de Vif 41-107, são imunogênicos e também bons ligantes as células T CD8⁺.
- Na detecção das citocinas com os *pools* de peptídeos de Vif, observamos que houve resposta celular, principalmente com estímulo do *pool* de Vif 41-107, onde detectamos maiores concentrações de IFN- γ e IL-2, porém também encontramos resposta não cognata no FA 17DD.
- O FA/Vif 1-110 variante e FA/Vif 42-110 se apresentaram como bons indutores de resposta celular, porém o FA/Vif 42-110 apresentou a menor média de título de anticorpos neutralizantes. O FA/Vif 102-214 apresentou bons resultados de resposta imune celular e humoral, apesar de não ter sido avaliado dentro da resposta específica. O FA/Vif 1-110 variante conseguiu uma boa indução da resposta celular e humoral. O vírus FA/Vif 1-110 original parece promissor segundo os nossos dados de resposta celular de memória efetora, apesar de ter apresentado uma média baixa de títulos de anticorpos neutralizantes.
- De maneira geral, os vírus FA/Vif induzem diferentes braços de resposta imune, sendo uns mais indutores de resposta celular que humoral e vice-versa. Com os vírus FA/Vif apresentando essas particularidades em relação a resposta imune, não conseguimos relacionar a estabilidade genética com imunogenicidade, mas com essas características, uma

estratégia promissora para abranger os dois tipos de resposta, seria o uso de formulações virais, utilizando dois ou mais vírus FA/Vif no mesmo regime vacinal.

7. Perspectivas

O potencial dos vírus FA/Vif avaliados nessa tese, é promissor. Com um novo desenho experimental, onde teríamos um outro modelo animal e/ou inserção de desafio, diferentes técnicas e ferramentas de avaliação da resposta celular específica contra o vírus da FA e Vif, acreditamos que observaríamos maior magnitude e discriminação de resposta entre eles, e com o controle FA 17DD. Como citado anteriormente, a estratégia de formulações virais, seria utilizada com o objetivo de aumentarmos a indução dos dois braços da resposta imune. Além disso, um *boost* com vírus recombinantes de diferentes vetores expressando Vif, e/ou vacina de DNA/Vif, poderia auxiliar no incremento dessa resposta, como já foi demonstrado em estudos em macacos rhesus.

Referências

1. Mudd PA, Martins MA, Ericson AJ, Tully DC, Power KA, Bean AT, et al. Vaccine-induced CD8+ T cells control AIDS virus replication. *Nature*. 2012;491(7422):129-33.
2. Goncalves J, Jallepalli P, Gabuzda DH. Subcellular localization of the Vif protein of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology*. 1994;68(2):704-12.
3. Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nature medicine*. 2003;9(11):1398-403.
4. Silver ZA, Watkins DI. The role of MHC class I gene products in SIV infection of macaques. *Immunogenetics*. 2017;69(8-9):511-9.
5. Mudd PA, Ericson AJ, Burwitz BJ, Wilson NA, O'Connor DH, Hughes AL, et al. Escape from CD8(+) T cell responses in Mamu-B*00801(+) macaques differentiates progressors from elite controllers. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;188(7):3364-70.
6. Brasil U. Estatísticas globais sobre HIV 2019 2019 [Available from: <https://unaid.org.br/estatisticas/>].
7. (OPAS) OP-AB. Folha informativa - HIV/aids 2017 [Available from: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5666:folha-informativa-hiv-aids&Itemid=812].
8. Saúde Md. Boletim epidemiológico HIV/Aids 2018 2018 [Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-hiv-aids-2018>].
9. The current state of an HIV cure: innovative approaches and limitations. *EBioMedicine*. 2019;42:1-2.
10. Brasil U. Mensagem do Secretário-Geral da ONU para o Dia Mundial contra a AIDS 2018 2018 [Available from: <https://unaid.org.br/2018/12/mensagem-do-secretario-geral-da-onu-para-o-dia-mundial-contra-a-aids-2018/>].
11. Fields BN. *Fields virology*. 3rd ed ed: Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers; 1996.
12. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 1999;397(6718):436-41.
13. Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Bedford T, Ward MJ, et al. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science (New York, NY)*. 2014;346(6205):56-61.
14. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science (New York, NY)*. 2000;288(5463):55-6.
15. Louwagie J, McCutchan FE, Peeters M, Brennan TP, Sanders-Buell E, Eddy GA, et al. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS (London, England)*. 1993;7(6):769-80.
16. Tanuri A, Swanson P, Devare S, Berro OJ, Savedra A, Costa LJ, et al. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association*. 1999;20(1):60-6.
17. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, NY)*. 1983;220(4599):868-71.
18. Abbas AKL, A. H.; Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology* Seventh edition ed: Elsevier Saunders; 2012.
19. Doolittle RF, Feng DF, McClure MA, Johnson MS. Retrovirus phylogeny and evolution. *Current topics in microbiology and immunology*. 1990;157:1-18.
20. Kuiken CL FB, Hahn B, Korber B, Marx PA, Mccutchan F, Mellors JW, Mullins, JI SJ, Wolinsky S 2000 - Los Alamos, Laboratory N. HIV Sequence Compendium 2000 2000 [Available from: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/Compendium/2000compendium.html>].

21. Human Immunodeficiency Virus (HIV). Transfusion medicine and hemotherapy : offzielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie. 2016;43(3):203-22.
22. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. Annual review of immunology. 1999;17:657-700.
23. Telesnitsky A GS. Retroviruses: Cold Spring Harbor; 1997.
24. Hottiger M, Hubscher U. Human Immunodeficiency Virus type 1 reverse transcriptase. Biological chemistry Hoppe-Seyler. 1996;377(2):97-120.
25. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. Annual review of biochemistry. 1998;67:1-25.
26. Rodrigues NF. Imunomodulação da replicação do HIV-1 pela hemaglutinina do vírus Influenza. Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz2017.
27. Andrieu JM, Lu W. A 30-year journey of trial and error towards a tolerogenic AIDS vaccine. Archives of virology. 2018;163(8):2025-31.
28. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. Journal of virology. 2003;77(8):4911-27.
29. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. The Journal of experimental medicine. 1998;188(12):2205-13.
30. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. Blood. 2006;107(12):4781-9.
31. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. Nature medicine. 2002;8(4):379-85.
32. Doering TA, Crawford A, Angelosanto JM, Paley MA, Ziegler CG, Wherry EJ. Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory. Immunity. 2012;37(6):1130-44.
33. Quigley M, Pereyra F, Nilsson B, Porichis F, Fonseca C, Eichbaum Q, et al. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. Nature medicine. 2010;16(10):1147-51.
34. Paley MA, Kroy DC, Odorizzi PM, Johnnidis JB, Dolfi DV, Barnett BE, et al. Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection. Science (New York, NY). 2012;338(6111):1220-5.
35. Kao C, Oestreich KJ, Paley MA, Crawford A, Angelosanto JM, Ali MA, et al. Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8+ T cell responses during chronic infection. Nature immunology. 2011;12(7):663-71.
36. Hersperger AR, Martin JN, Shin LY, Sheth PM, Kovacs CM, Cosma GL, et al. Increased HIV-specific CD8+ T-cell cytotoxic potential in HIV elite controllers is associated with T-bet expression. Blood. 2011;117(14):3799-808.
37. Goila-Gaur R, Strebel K. HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. Retrovirology. 2008;5:51.
38. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. Nature. 2002;418(6898):646-50.
39. Henriët S, Mercenne G, Bernacchi S, Paillart JC, Marquet R. Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. 2009;73(2):211-32.

40. Chiu YL, Greene WC. The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annual review of immunology*. 2008;26:317-53.
41. Rose KM, Marin M, Kozak SL, Kabat D. The viral infectivity factor (Vif) of HIV-1 unveiled. *Trends in molecular medicine*. 2004;10(6):291-7.
42. Harris RS, Liddament MT. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(11):868-77.
43. Casartelli N, Guivel-Benhassine F, Bouziat R, Brandler S, Schwartz O, Moris A. The antiviral factor APOBEC3G improves CTL recognition of cultured HIV-infected T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(1):39-49.
44. Thomsen D, Erikstrup C, Jespersen S, Medina C, Te DDS, Correia FG, et al. The influence of human leukocyte antigen-types on disease progression among HIV-2 infected patients in Guinea-Bissau. *AIDS (London, England)*. 2018;32(6):721-8.
45. Goulder PJ, Watkins DI. Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(8):619-30.
46. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet (London, England)*. 2014;384(9939):258-71.
47. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(6):749-59.
48. Lackner AA, Lederman MM, Rodriguez B. HIV pathogenesis: the host. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(9):a007005.
49. Rodriguez B, Sethi AK, Cheruvu VK, Mackay W, Bosch RJ, Kitahata M, et al. Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. *Jama*. 2006;296(12):1498-506.
50. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet (London, England)*. 2008;372(9635):293-9.
51. Barouch DH, Alter G, Broge T, Linde C, Ackerman ME, Brown EP, et al. Protective efficacy of adenovirus/protein vaccines against SIV challenges in rhesus monkeys. *Science (New York, NY)*. 2015;349(6245):320-4.
52. Esparza J. A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine. *Vaccine*. 2013;31(35):3502-18.
53. Reks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *The New England journal of medicine*. 2009;361(23):2209-20.
54. Koup RA, Roederer M, Lamoreaux L, Fischer J, Novik L, Nason MC, et al. Priming immunization with DNA augments immunogenicity of recombinant adenoviral vectors for both HIV-1 specific antibody and T-cell responses. *PLoS One*. 2010;5(2):e9015.
55. Hammer SM, Sobieszczyk ME, Janes H, Karuna ST, Mulligan MJ, Grove D, et al. Efficacy trial of a DNA/rAd5 HIV-1 preventive vaccine. *The New England journal of medicine*. 2013;369(22):2083-92.
56. Robinson HL. HIV/AIDS Vaccines: 2018. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2018;104(6):1062-73.
57. HIV vaccines go to trial. *Nature medicine*. 2019;25(5):703.
58. Bonaldo MC, Martins MA, Rudersdorf R, Mudd PA, Sacha JB, Piaskowski SM, et al. Recombinant yellow fever vaccine virus 17D expressing simian immunodeficiency virus SIVmac239 gag induces SIV-specific CD8+ T-cell responses in rhesus macaques. *Journal of virology*. 2010;84(7):3699-706.
59. Martins MA, Bonaldo MC, Rudersdorf RA, Piaskowski SM, Rakasz EG, Weisgrau KL, et al. Immunogenicity of seven new recombinant yellow fever viruses 17D expressing

- fragments of SIVmac239 Gag, Nef, and Vif in Indian rhesus macaques. *PLoS One*. 2013;8(1):e54434.
60. Reed W. Recent Researches concerning the Etiology, Propagation, and Prevention of Yellow Fever, by the United States Army Commission. *The Journal of hygiene*. 1902;2(2):101-19.
 61. Tan SY, Sung H. Carlos Juan Finlay (1833-1915): of mosquitoes and yellow fever. *Singapore Med J*. 2008;49(5):370-1.
 62. Staples JE, Monath TP. Yellow fever: 100 years of discovery. *Jama*. 2008;300(8):960-2.
 63. Stokes A, Bauer JH, Hudson NP. The transmission of yellow fever to *Macacus rhesus*. 1928. *Reviews in medical virology*. 2001;11(3):141-8.
 64. Theiler M, Smith HH. The Use of Yellow Fever Virus Modified by in Vitro Cultivation for Human Immunization. *J Exp Med*. 1937;65(6):787-800.
 65. Theiler M, Smith HH. The Effect of Prolonged Cultivation in Vitro Upon the Pathogenicity of Yellow Fever Virus. *J Exp Med*. 1937;65(6):767-86.
 66. Stokes A, Bauer J, Hudson P. Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals. *Am J Trop Med Hyg* 1928;8:103-64.
 67. Lloyd W, Theiler M, Ricci N. Modification of the virulence of yellow fever virus by cultivation in tissues in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1936;29:481-529.
 68. Marchevsky RS, da Luz Leal M, Homma A, Coutinho ES, Camacho LA, Jabor AV, et al. Molecular and phenotypic analysis of a working seed lot of yellow fever virus 17DD vaccine strain produced from the secondary seed lot 102/84 with an additional passage in chicken embryos. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*. 2006;34(3):191-7.
 69. Galler R, Post PR, Santos CN, Ferreira, II. Genetic variability among yellow fever virus 17D substrains. *Vaccine*. 1998;16(9-10):1024-8.
 70. Stock NK, Boschetti N, Herzog C, Appelhans MS, Niedrig M. The phylogeny of yellow fever virus 17D vaccines. *Vaccine*. 2012;30(6):989-94.
 71. Beck AS, Barrett AD. Current status and future prospects of yellow fever vaccines. *Expert review of vaccines*. 2015;14(11):1479-92.
 72. Monath TP. 17D Yellow Fever Virus Vaccine. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2013;89(6):1225.
 73. (OMS) OMdS. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of 7 live attenuated yellow fever vaccines 2010 [Available from: https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/yellow_fever/YF_Recommendations_Draft5_final_for_web_post_11June2010_2.pdf].
 74. Vasconcelos PF. [Yellow Fever]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003;36(2):275-93.
 75. Benchimol JL. *Dos micróbios aos mosquitos : febre amarela e a revolução pasteuriana no Brasil*. Rio de Janeiro, Brasil: Editora Fiocruz : Editora UFRJ; 1999. 498 p. p.
 76. Benchimol JL, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. *Febre amarela : a doença e a vacina, uma história inacabada*. Rio de Janeiro, RJ: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos : Editora Fiocruz; 2001. 469 p. p.
 77. Costa ZGA, Romano APM, Elkhoury ANM, Flannery B. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2011;2:11-26.
 78. WHO. Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations to ensure the quality, safety and efficacy of live attenuated yellow fever vaccines. WHO technical report series. Geneva: World Health Organization; 2010.
 79. Monath T, Gershman M, Staples E, Barrett A. Yellow fever vaccine. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P, editors. *Vaccines*. 6^a ed 2012. p. 870-96.

80. dos Santos CN, Post PR, Carvalho R, Ferreira, II, Rice CM, Galler R. Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus research*. 1995;35(1):35-41.
81. WHO. Yellow Fever Genebra: WHO; 1998 [Available from: www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF/www9842.pdf].
82. WHO. Vaccines and vaccination against yellow fever: WHO Position Paper, June 2013-Recommendations. *Vaccine*. 2015;33(1):76-7.
83. Gotuzzo E, Yactayo S, Cordova E. Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: systematic review on the need for a booster every 10 years. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89(3):434-44.
84. Collaborative group for studies on yellow fever v. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. *Vaccine*. 2014;32(39):4977-84.
85. Vasconcelos PF. Single shot of 17D vaccine may not confer life-long protection against yellow fever. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2018;113(2):135-7.
86. Bio-Manguinhos/Fiocruz. Perguntas e respostas sobre fracionamento da dose da vacina de febre amarela 2018 [Available from: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/noticias/1618-perguntas-e-respostas-sobre-fracionamento-da-dose-da-vacina-de-febre-amarela>].
87. World Health O. WHO position on the use of fractional doses - June 2017, addendum to vaccines and vaccination against yellow fever WHO: Position paper - June 2013. *Vaccine*. 2017;35(43):5751-2.
88. De Menezes Martins R, Maia MLS, de Lima SMB, de Noronha TG, Xavier JR, Camacho LAB, et al. Duration of post-vaccination immunity to yellow fever in volunteers eight years after a dose-response study. *Vaccine*. 2018;36(28):4112-7.
89. Brasil O. Perguntas e respostas: febre amarela 2018 [Available from: https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5601:perguntas-e-respostas-febre-amarela&Itemid=875].
90. Monath TP, Vasconcelos PF. Yellow fever. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2015;64:160-73.
91. Jonker EF, Visser LG, Roukens AH. Advances and controversies in yellow fever vaccination. *Ther Adv Vaccines*. 2013;1(4):144-52.
92. Barrett AD, Teuwen DE. Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Current opinion in immunology*. 2009;21(3):308-13.
93. Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(10):741-7.
94. Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(2):413-24.
95. Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(13):3119-31.
96. Santos AP, Matos DCS, Bertho AL, Mendonca SCF, Marcovitz R. Detection of Th1/Th2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccinees through ELISpot assay. *Cytokine*. 2008;42(2):152-5.
97. Pulendran B, Oh JZ, Nakaya HI, Ravindran R, Kazmin DA. Immunity to viruses: learning from successful human vaccines. *Immunological reviews*. 2013;255(1):243-55.
98. Cao W, Manicassamy S, Tang H, Kasturi SP, Pirani A, Murthy N, et al. Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nature immunology*. 2008;9(10):1157-64.
99. Martins MA, Silva ML, Eloi-Santos SM, Ribeiro JG, Peruhype-Magalhaes V, Marciano AP, et al. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation

- and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine*. 2008;26(9):1173-84.
100. Neves PC, Matos DC, Marcovistz R, Galler R. TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination. *Vaccine*. 2009;27(41):5543-9.
 101. Campi-Azevedo AC, de Araujo-Porto LP, Luiza-Silva M, Batista MA, Martins MA, Sathler-Avelar R, et al. 17DD and 17D-213/77 yellow fever substrains trigger a balanced cytokine profile in primary vaccinated children. *PLoS One*. 2012;7(12):e49828.
 102. Martins MA, Silva ML, Marciano AP, Peruhype-Magalhaes V, Eloi-Santos SM, Ribeiro J G, et al. Activation/modulation of adaptive immunity emerges simultaneously after 17DD yellow fever first-time vaccination: is this the key to prevent severe adverse reactions following immunization? *Clinical and experimental immunology*. 2007;148(1):90-100.
 103. Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, Glidewell JT, Albott S, Masopust D, et al. Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity*. 2008;28(5):710-22.
 104. Kohler S, Bethke N, Bothe M, Sommerick S, Frensch M, Romagnani C, et al. The early cellular signatures of protective immunity induced by live viral vaccination. *European journal of immunology*. 2012;42(9):2363-73.
 105. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Cropp CB, Monath TP. Protection against yellow fever in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1. *Journal of virology*. 1986;60(3):1153-5.
 106. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. Protection against 17D yellow fever encephalitis in mice by passive transfer of monoclonal antibodies to the nonstructural glycoprotein gp48 and by active immunization with gp48. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1985;135(4):2805-9.
 107. Ahmed R, Akondy RS. Insights into human CD8(+) T-cell memory using the yellow fever and smallpox vaccines. *Immunology and cell biology*. 2011;89(3):340-5.
 108. Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H, et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;183(12):7919-30.
 109. Ferreira CC, Campi-Azevedo AC, Peruhype-Magalhaes V, Costa-Pereira C, Albuquerque CP, Muniz LF, et al. The 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines: an overview of major similarities and subtle differences. *Expert review of vaccines*. 2018;17(1):79-90.
 110. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nature immunology*. 2008;10:116.
 111. Bonaldo MC, Caufour PS, Freire MS, Galler R. The yellow fever 17D vaccine virus as a vector for the expression of foreign proteins: development of new live flavivirus vaccines. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000;95 Suppl 1:215-23.
 112. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Review of Microbiology*. 1990;44(1):649-88.
 113. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*. 2012;30(29):4301-6.
 114. Bonaldo MC, Sequeira PC, Galler R. The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2014;10(5):1256-65.
 115. Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *The New biologist*. 1989;1(3):285-96.
 116. Chambers TJ, Nestorowicz A, Mason PW, Rice CM. Yellow fever/Japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties. *J Virol*. 1999;73(4):3095-101.
 117. Guirakhoo F, Zhang ZX, Chambers TJ, Delagrave S, Arroyo J, Barrett AD, et al. Immunogenicity, genetic stability, and protective efficacy of a recombinant, chimeric yellow

- fever-Japanese encephalitis virus (ChimeriVax-JE) as a live, attenuated vaccine candidate against Japanese encephalitis. *Virology*. 1999;257(2):363-72.
118. Caufour PS, Motta MC, Yamamura AM, Vazquez S, Ferreira, II, Jabor AV, et al. Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. *Virus Res*. 2001;79(1-2):1-14.
119. Galler R, Marchevsky RS, Caride E, Almeida LF, Yamamura AM, Jabor AV, et al. Attenuation and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 virus for rhesus monkeys. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2005;38(12):1835-46.
120. Mateu GP, Marchevsky RS, Liprandi F, Bonaldo MC, Coutinho ES, Dieudonne M, et al. Construction and biological properties of yellow fever 17D/dengue type 1 recombinant virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007;101(3):289-98.
121. Appaiahgari MB, Vрати S. IMOJEV((R)): a Yellow fever virus-based novel Japanese encephalitis vaccine. *Expert review of vaccines*. 2010;9(12):1371-84.
122. Pugachev KV, Guirakhoo F, Monath TP. New developments in flavivirus vaccines with special attention to yellow fever. *Current opinion in infectious diseases*. 2005;18(5):387-94.
123. Monath TP, Seligman SJ, Robertson JS, Guy B, Hayes EB, Condit RC, et al. Live virus vaccines based on a yellow fever vaccine backbone: standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine*. 2015;33(1):62-72.
124. Sinha G. Sanofi's dengue vaccine first to complete phase 3. *Nat Biotechnol*. 2014;32(7):605-6.
125. The Lancet Infectious D. The dengue vaccine dilemma. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018;18(2):123.
126. Giel-Moloney M, Goncalvez AP, Catalan J, Lecouturier V, Girerd-Chambaz Y, Diaz F, et al. Chimeric yellow fever 17D-Zika virus (ChimeriVax-Zika) as a live-attenuated Zika virus vaccine. *Scientific reports*. 2018;8(1):13206.
127. McAllister A, Arbetman AE, Mandl S, Pena-Rossi C, Andino R. Recombinant yellow fever viruses are effective therapeutic vaccines for treatment of murine experimental solid tumors and pulmonary metastases. *Journal of virology*. 2000;74(19):9197-205.
128. Tao D, Barba-Spaeth G, Rai U, Nussenzweig V, Rice CM, Nussenzweig RS. Yellow fever 17D as a vaccine vector for microbial CTL epitopes: protection in a rodent malaria model. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(2):201-9.
129. Nogueira RT, Nogueira AR, Pereira MC, Rodrigues MM, Galler R, Bonaldo MC. Biological and immunological characterization of recombinant Yellow Fever 17D viruses expressing a Trypanosoma cruzi Amastigote Surface Protein-2 CD8+ T cell epitope at two distinct regions of the genome. *Virology journal*. 2011;8:127.
130. Nogueira RT, Nogueira AR, Pereira MC, Rodrigues MM, Neves PC, Galler R, et al. Recombinant yellow fever viruses elicit CD8+ T cell responses and protective immunity against Trypanosoma cruzi. *PLoS One*. 2013;8(3):e59347.
131. Bonaldo MC, Garratt RC, Caufour PS, Freire MS, Rodrigues MM, Nussenzweig RS, et al. Surface expression of an immunodominant malaria protein B cell epitope by yellow fever virus. *Journal of molecular biology*. 2002;315(4):873-85.
132. Mudd PA, Piaskowski SM, Neves PC, Rudersdorf R, Kolar HL, Eernisse CM, et al. The live-attenuated yellow fever vaccine 17D induces broad and potent T cell responses against several viral proteins in Indian rhesus macaques--implications for recombinant vaccine design. *Immunogenetics*. 2010;62(9):593-600.
133. De Melo AB, Nascimento EJ, Braga-Neto U, Dhalaria R, Silva AM, Oelke M, et al. T-cell memory responses elicited by yellow fever vaccine are targeted to overlapping epitopes containing multiple HLA-I and -II binding motifs. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(1):e1938.

134. Bonaldo MC, Mello SM, Trindade GF, Rangel AA, Duarte AS, Oliveira PJ, et al. Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. *Virology journal*. 2007;4:115.
135. Jabor AV. Manipulação genética do vírus amarelo vacinal 17D. Dissertação de mestrado em Virologia e Biologia Celular e Molecular: IOC; 2001.
136. Jiang X, Dalebout TJ, Bredenbeek PJ, Carrion R, Jr., Brasky K, Patterson J, et al. Yellow fever 17D-vectored vaccines expressing Lassa virus GP1 and GP2 glycoproteins provide protection against fatal disease in guinea pigs. *Vaccine*. 2011;29(6):1248-57.
137. Mello SM. Clonagem e expressão da proteína EGFP na região intergênica E/NS1 da cepa vacinal 17D do vírus Febre Amarela. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular: IOC; 2007.
138. Trindade GF. Estudo sobre os elementos funcionais da região haste-âncora de flavivírus envolvidos na retenção da proteína E ao retículo endoplasmático da célula infectada e implicações para o uso do vírus da FA 17D como vetor de expressão usando o sítio E/NS1. Tese de doutorado em Biologia Parasitária: IOC; 2011.
139. Trindade GF, Santana MG, Santos JR, Galler R, Bonaldo MC. Retention of a recombinant GFP protein expressed by the yellow fever 17D virus in the E/NS1 intergenic region in the endoplasmic reticulum. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107(2):262-72.
140. McCarthy MK, Weinberg JB. The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. *Front Microbiol*. 2015;6:21.
141. Freeze HH, Esko JD, Parodi AJ. Glycans in Glycoprotein Quality Control. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY)2009.
142. Remacle AG, Shiryaev SA, Oh ES, Cieplak P, Srinivasan A, Wei G, et al. Substrate cleavage analysis of furin and related proprotein convertases. A comparative study. *J Biol Chem*. 2008;283(30):20897-906.
143. Castilho BGeE. Pontuações sobre vacinas contra HIV/AIDS 1992 [Available from:http://www.giv.org.br/Projetos/Vacinas-Anti-HIV-AIDS/CDRom-BoletimVacinas/boletins/dossie01/pont_sobre_vac.htm].
144. Im EJ, Hong JP, Roshorn Y, Bridgeman A, Letourneau S, Liljestrom P, et al. Protective efficacy of serially up-ranked subdominant CD8+ T cell epitopes against virus challenges. *PLoS pathogens*. 2011;7(5):e1002041.
145. Rodriguez F, Harkins S, Slifka MK, Whitton JL. Immunodominance in virus-induced CD8(+) T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon. *Journal of virology*. 2002;76(9):4251-9.
146. Guy B, Nougarede N, Begue S, Sanchez V, Souag N, Carre M, et al. Cell-mediated immunity induced by chimeric tetravalent dengue vaccine in naive or flavivirus-primed subjects. *Vaccine*. 2008;26(45):5712-21.
147. De Madrid AT, Porterfield JS. A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bull World Health Organ*. 1969;40(1):113-21.
148. Rosenblum MD, Way SS, Abbas AK. Regulatory T cell memory. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(2):90-101.
149. Todryk SM. T Cell Memory to Vaccination. *Vaccines*. 2018;6(4).
150. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM. T cell responses: naive to memory and everything in between. *Advances in physiology education*. 2013;37(4):273-83.
151. Singh R, Rothman AL, Potts J, Guirakhoo F, Ennis FA, Green S. Sequential immunization with heterologous chimeric flaviviruses induces broad-spectrum cross-reactive CD8+ T cell responses. *The Journal of infectious diseases*. 2010;202(2):223-33.
152. Barraud P, Paillart JC, Marquet R, Tisne C. Advances in the structural understanding of Vif proteins. *Current HIV research*. 2008;6(2):91-9.

153. Baaten BJ, Li CR, Bradley LM. Multifaceted regulation of T cells by CD44. *Communicative & integrative biology*. 2010;3(6):508-12.
154. Hemelaar J, Elangovan R, Yun J, Dickson-Tetteh L, Fleminger I, Kirtley S, et al. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *The Lancet Infectious diseases*. 2019;19(2):143-55.
155. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E, et al. CD8⁺ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nature medicine*. 2007;13(1):46-53.
156. Adland E, Carlson JM, Paioni P, Klooverpris H, Shapiro R, Ogwu A, et al. Nef-specific CD8⁺ T cell responses contribute to HIV-1 immune control. *PLoS One*. 2013;8(9):e73117.
157. Martins MA, Wilson NA, Reed JS, Ahn CD, Klimentidis YC, Allison DB, et al. T-cell correlates of vaccine efficacy after a heterologous simian immunodeficiency virus challenge. *Journal of virology*. 2010;84(9):4352-65.
158. Martins MA, Wilson NA, Piaskowski SM, Weisgrau KL, Furlott JR, Bonaldo MC, et al. Vaccination with Gag, Vif, and Nef gene fragments affords partial control of viral replication after mucosal challenge with SIVmac239. *Journal of virology*. 2014;88(13):7493-516.
159. Robert-Guroff M. Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development. *Current opinion in biotechnology*. 2007;18(6):546-56.
160. Naim HY. Applications and challenges of multivalent recombinant vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2013;9(3):457-61.
161. de Santana MG, Neves PC, dos Santos JR, Lima NS, dos Santos AA, Watkins DI, et al. Improved genetic stability of recombinant yellow fever 17D virus expressing a lentiviral Gag gene fragment. *Virology*. 2014;452-453:202-11.
162. Lima NS. Estudos biológicos e imunológicos de novas plataformas de expressão de proteínas pelo vírus da febre amarela vacinal 17D 2015.
163. Neves P. Estudo da resposta imunológica contra o vírus vacinal YF 17DD e seus derivados recombinantes YF 17D/ SIV após a imunização de modelos experimentais. 2013.
164. Neves PC, Santos JR, Tubarao LN, Bonaldo MC, Galler R. Early IFN-gamma production after YF 17D vaccine virus immunization in mice and its association with adaptive immune responses. *PLoS One*. 2013;8(12):e81953.
165. Clem AS. Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of global infectious diseases*. 2011;3(1):73-8.
166. Watson AM, Klimstra WB. T Cell-Mediated Immunity towards Yellow Fever Virus and Useful Animal Models. *Viruses*. 2017;9(4).
167. Meier KC, Gardner CL, Khoretonenko MV, Klimstra WB, Ryman KD. A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. *PLoS pathogens*. 2009;5(10):e1000614.
168. Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(24):14333-8.
169. Cumberworth SL, Clark JJ, Kohl A, Donald CL. Inhibition of type I interferon induction and signalling by mosquito-borne flaviviruses. *Cellular microbiology*. 2017;19(5).
170. Erickson AK, Pfeiffer JK. Spectrum of disease outcomes in mice infected with YFV-17D. *The Journal of general virology*. 2015;96(Pt 6):1328-39.
171. Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Current opinion in immunology*. 2005;17(3):326-32.
172. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology*. 2004;22:745-63.
173. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock (Augusta, Ga)*. 2004;22(5):460-6.

174. Busch RA, Jonker MA, Pierre JF, Heneghan AF, Kudsk KA. Innate Mucosal Immune System Response of BALB/c vs C57BL/6 Mice to Injury in the Setting of Enteral and Parenteral Feeding. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition*. 2016;40(2):256-63.
175. Cibrian D, Sanchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *European journal of immunology*. 2017;47(6):946-53.
176. Neves PC, Rudersdorf RA, Galler R, Bonaldo MC, de Santana MG, Mudd PA, et al. CD8+ gamma-delta TCR+ and CD4+ T cells produce IFN-gamma at 5-7 days after yellow fever vaccination in Indian rhesus macaques, before the induction of classical antigen-specific T cell responses. *Vaccine*. 2010;28(51):8183-8.
177. Krowka JF, Cuevas B, Maron DC, Steimer KS, Ascher MS, Sheppard HW. Expression of CD69 after in vitro stimulation: a rapid method for quantitating impaired lymphocyte responses in HIV-infected individuals. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association*. 1996;11(1):95-104.
178. Ralph C. Budd KAF. Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology. 10th Edition ed2017.
179. J. örg Goronzy CMW. Goldman's Cecil Medicine. 24th Edition ed2012.
180. Oliveira ER, Amorim JF, Paes MV, Azevedo AS, Goncalves AJ, Costa SM, et al. Peripheral effects induced in BALB/c mice infected with DENV by the intracerebral route. *Virology*. 2016;489:95-107.
181. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity*. 1998;8(5):591-9.
182. Soudja SM, Ruiz AL, Marie JC, Lauvau G. Inflammatory monocytes activate memory CD8(+) T and innate NK lymphocytes independent of cognate antigen during microbial pathogen invasion. *Immunity*. 2012;37(3):549-62.
183. Lauvau G, Soudja SM. Mechanisms of Memory T Cell Activation and Effective Immunity. *Advances in experimental medicine and biology*. 2015;850:73-80.
184. Robertson SE, Young JD, Kitson S, Pitt A, Evans J, Roes J, et al. Expression and alternative processing of IL-18 in human neutrophils. *European journal of immunology*. 2006;36(3):722-31.
185. Martins MA, Tully DC, Pedreno-Lopez N, von Bredow B, Pauthner MG, Shin YC, et al. Mamu-B*17(+) Rhesus Macaques Vaccinated with env, vif, and nef Manifest Early Control of SIVmac239 Replication. *Journal of virology*. 2018;92(16).
186. Loffredo JT, Maxwell J, Qi Y, Glidden CE, Borchardt GJ, Soma T, et al. Mamu-B*08-positive macaques control simian immunodeficiency virus replication. *Journal of virology*. 2007;81(16):8827-32.
187. Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nature medicine*. 2007;13(7):843-50.
188. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(4):247-58.
189. Okada R, Kondo T, Matsuki F, Takata H, Takiguchi M. Phenotypic classification of human CD4+ T cell subsets and their differentiation. *International immunology*. 2008;20(9):1189-99.
190. Kupz A, Zedler U, Staber M, Perdomo C, Dorhoi A, Brosch R, et al. ESAT-6-dependent cytosolic pattern recognition drives noncognate tuberculosis control in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(6):2109-22.
191. Makedonas G, Betts MR. Polyfunctional analysis of human t cell responses: importance in vaccine immunogenicity and natural infection. *Springer seminars in immunopathology*. 2006;28(3):209-19.

192. Franco D, Li W, Qing F, Stoyanov CT, Moran T, Rice CM, et al. Evaluation of yellow fever virus 17D strain as a new vector for HIV-1 vaccine development. *Vaccine*. 2010;28(35):5676-85.
193. Cho BK, Wang C, Sugawa S, Eisen HN, Chen J. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(6):2976-81.
194. Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Current opinion in immunology*. 2008;20(3):332-8.
195. Gandini M, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Freire Mda S, Galler R, et al. Dengue-2 and yellow fever 17DD viruses infect human dendritic cells, resulting in an induction of activation markers, cytokines and chemokines and secretion of different TNF-alpha and IFN-alpha profiles. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011;106(5):594-605.
196. Beaumier CM, Jaiswal S, West KY, Friberg H, Mathew A, Rothman AL. Differential in vivo clearance and response to secondary heterologous infections by H2(b)-restricted dengue virus-specific CD8+ T cells. *Viral immunology*. 2010;23(5):477-85.
197. Simon JH, Carpenter EA, Fouchier RA, Malim MH. Vif and the p55(Gag) polyprotein of human immunodeficiency virus type 1 are present in colocalizing membrane-free cytoplasmic complexes. *Journal of virology*. 1999;73(4):2667-74.
198. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011;334(6059):1081-6.
199. Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(11):787-96.

ANEXO I – Lista de meios e soluções

Meio Earle's 199 completo

10 mL	Meio 199 10X (Gibco)
5 mL	Bicarbonato de sódio - NaHCO ₃ (Sigma)
5 mL	Soro fetal bovino (Gibco)
80 µL	Gentamicina 50 mg/mL (Gibco)
q.s.p. 100 mL	Água tipo I estéril

Meio diluente

10 mL	Meio 199 10X (Gibco)
0,5 mL	Bicarbonato de sódio - NaHCO ₃ (Sigma)
2,5 mL	HEPES 1M (Gibco)
5 mL	Soro fetal bovino (Gibco)
80 µL	Gentamicina 50 mg/mL (Gibco)
q.s.p. 100 mL	Água tipo I estéril

Meio CMC completo

10 mL	Meio 199 10X (Gibco)
5 mL	Bicarbonato de sódio - NaHCO ₃ (Sigma)
5 mL	Soro fetal bovino (Gibco)
80 µL	Gentamicina 50 mg/mL (Gibco)
q.s.p. 100 mL	Carboximetilcelulose 3,0 % (m/v) (Sigma)

Meio RPMI 10% soro fetal bovino

2,5 mL	Piruvato
2,5 mL	NEAS
2,5 mL	Vitamina
2,5 mL	L-glutamina
1,25 mL	B-mercaptaetanol
0,312 mL	Gentamicina
2,5 mL	HEPES
25 mL	Soro fetal bovino
q.s.p 250 mL	RPMI

Solução de lise 1X

70 mL	Água Milli-Q autoclavada
7 mL	BD Pharm Lyse 10X

Solução de bloqueio PBS 1 X/1% BSA

100 mL	PBS 1 X
1 g	BSA

Paraformaldeído 1%

100 mL Água Milli-Q
100 mL Tampão fosfato dibásico
2 g Paraformaldeído Sigma P6148

Caldo triptose 2,6 % (10 X)

5,20 g Caldo triptose (Tryptose Phosphate Broth; Sigma)
200 mL Água do tipo I
Esterilização por autoclavação

Formaldeído 10,0 % (v/v)

270 mL Formaldeído 37 % (Merck)
q.s.p. 1 L Água tipo I

Cristal violeta 2,0 % (m/v)

4,0 g Cristal violeta (Merck)
10,0 mL Metanol (Merck)
q.s.p. 200 mL Água tipo I

Cristal violeta 0,04 % (v/v)

20 mL Cristal violeta 2,0 %
q.s.p. 1 L Água tipo I

Meio LB líquido

10 g Tryptona (Bacto Tryptona – BD)
5 g Extrato de levedura (Bacto Yeast Extract – BD)
10 g Cloreto de sódio - NaCl (Sigma)
q.s.p. 1 L Água tipo I
Esterilização por autoclavação

Meio LB sólido

3,75 g Bacto agar (BD)
250 mL Meio LB líquido
Esterilização por autoclavação

Meio SOC (Invitrogen)

2 %	Triptona
0,5 %	Extrato de levedura
10 nM	NaCl
2,5 nM	KCl
10 nM	MgCl ₂
10 nM	MgSO ₄
20 nM	Glicose

Tampão tris-acetato-EDTA (TAE) 50 X

242 g	Tris-base (Sigma)
57,1 mL	Ácido acético (Merck)
100 mL	Solução de 0,5 M EDTA dissódico (Sigma) em água tipo 2 pH 8,0
q.s.p. 1 L	Água tipo I

Tampão tris-acetato-EDTA (TAE) 1 X

20 mL	Tampão tris-acetato-EDTA (TAE) 50 X
q.s.p. 1 L	Água tipo I

Agarose 0,8 % (m/v)

1,6 g	Agarose (Promega)
200 mL	TAE 1 X

Aquecer gradativamente no micro-ondas até total dissolução da agarose no TAE.

Tampão de amostra 6X

0,25%	Azul de bromofenol (Sigma)
0,25%	Xileno cianol (Sigma)
30%	Glicerol (Sigma)
10 mL	Tampão tris-EDTA (TE – Qiagen)

Solução de brometo de etídio

0,01 mL	Brometo de etídio (Bio-Rad)
200 mL	Água tipo I

Glicerol 50,0 % (v/v)

50 mL	Glicerol 99+ % (Sigma)
50 mL	Água tipo I

Tampão AVE (Qiagen)

0,04 %	NaN ₃ (azida sódica)
	Água livre de RNAses

Tampão salina fosfato (PBS) 10 X

87 g Cloreto de sódio - NaCl (Sigma)
13,6 g Fosfato de sódio monobásico - NaH₂PO₄ (Sigma)
12,78 g Fosfato de sódio dibásico - Na₂HPO₄ (Sigma)
q.s.p. 1 L Água tipo I
Ajustar pH para 7,0

PBS-DEPC

87 g Cloreto de sódio - NaCl (Sigma)
13,6 g Fosfato de sódio monobásico - NaH₂PO₄ (Sigma)
12,78 g Fosfato de sódio dibásico - Na₂HPO₄ (Sigma)
q.s.p. 1 L Água tratada com DEPC (0,01 %)
Ajustar pH para 7,0

PBS-T

1L PBS
0,5 mL Tween 20 (Sigma)

Tampão carbonato/bicarbonato 0,1M

0,1 M Tampão carbonato - Na₂CO₃ (Sigma) em água tipo 2 pH 8,3
0,1 M Tampão bicarbonato - NaHCO₃ (Sigma) em água tipo 2 pH 11,2
Ajustar pH para 8,6

Tampão fosfato/citrato 0,2M

0,2 M Tampão fosfato - Na₂HPO₄ (Sigma) em água tipo I pH 9,0
0,2 M Tampão citrato – Ácido cítrico (Sigma) em água tipo I pH 2,0
Ajustar pH para 5,0

ANEXO II – Figuras e tabelas suplementares

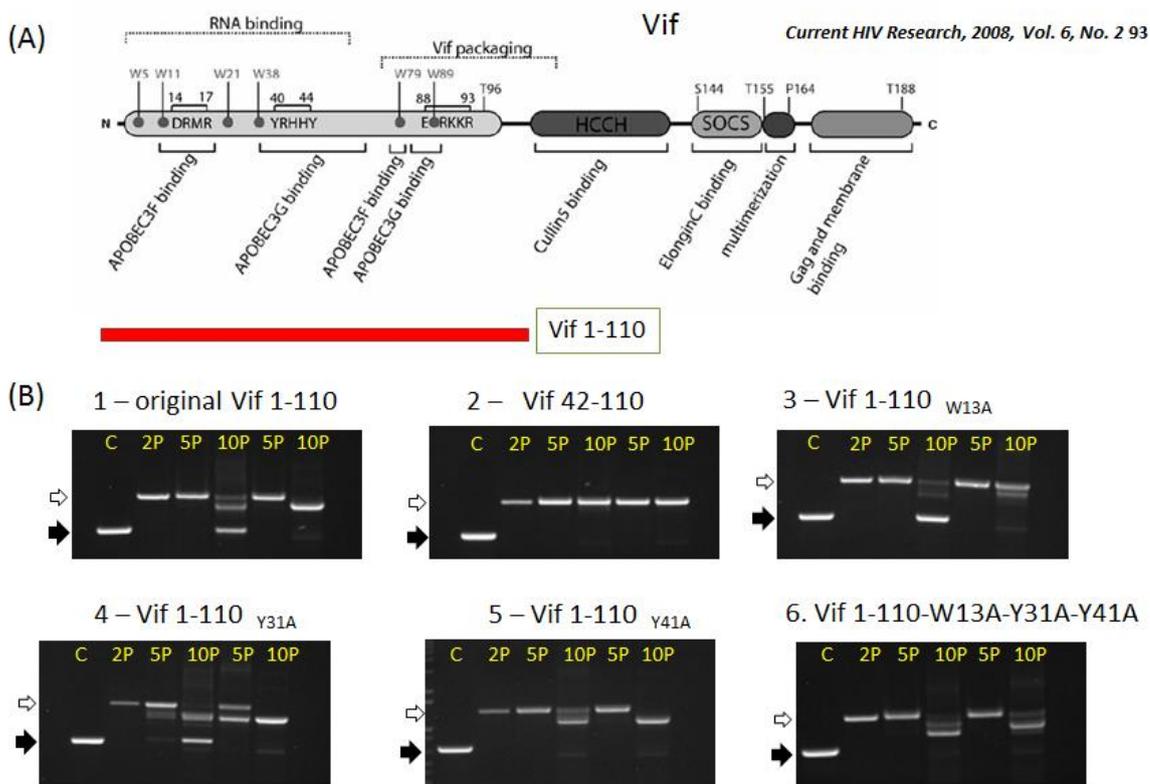


Figura A1 - Estabilidade genética dos vírus recombinantes FA/Vif construídos na plataforma II de expressão da proteína heteróloga.

(A) - Figura do artigo de Barraud P *et al.*, 2008, mostrando a região de ligação a RNA em Vif, no seu N-terminal, onde as mutações nos resíduos foram realizadas, para a obtenção de um vírus estável geneticamente. (B) Resultado de estabilidade genética dos vírus FA/Vif. C – vírus controle G1/2T3, (2P) - estoque viral da segunda passagem; (5P) - quinta passagem seriada em célula Vero; (10P) – décima passagem seriada em célula Vero; (15P) - décima quinta passagem seriada em célula Vero. A 5P, 10P, 15P e 20P logo após o primeiro controle, são referentes à passagem PA, e os seguintes à PB. (B) 1 – original Vif 1-110, mesmo fragmento do vírus original FA/Vif 1-110, porém construído na plataforma II de expressão da proteína heteróloga; (B) 2 – Vif 42-110, vírus que sofreu a deleção do N-terminal de Vif; (B) 3 – mutação no resíduo 13 de triptofano para alanina, do N-terminal; (B) 4 – mutação no resíduo 31 tirosina para alanina; (B) 5 – mutação no resíduo 41 tirosina para alanina; (B) 6 – triplo mutante; resíduo 13 de triptofano para alanina, resíduo 31 tirosina para alanina e resíduo 41 tirosina para alanina.

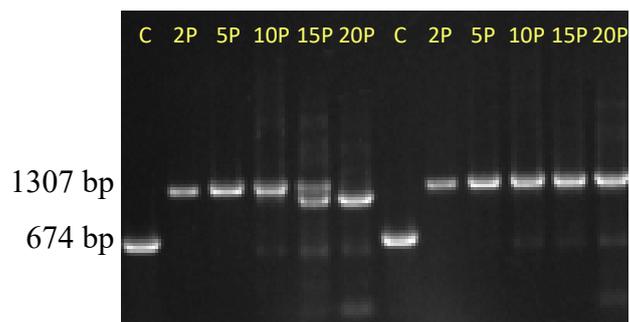


Figura A2 - Estabilidade genética do vírus recombinante FA/Vif 42-110.

(C) - controle vírus G1/2T3, 2P - estoque viral da segunda passagem; (5P) - quinta passagem seriada em célula Vero; (10P) – décima passagem seriada em célula Vero; (15P) - décima quinta passagem seriada em célula Vero. A 5P, 10P, 15P e 20P logo após o primeiro controle, são referentes à passagem PA, e os seguintes à PB. O vírus perde o inserto de Vif na passagem 15PA, mas mantém até a 20PB.

Tabela A1 – Exemplo de desenho experimental dos ensaios detecção de resposta específica ao vírus da FA 17D e Vif.

Número	Amostra	Estímulo
1	Controle de morte com 17DD	Nenhum
2	Controle de morte com 17DD	Nenhum
3	Controle só célula com 17DD	Nenhum
4	Controle só célula com 17DD	Nenhum
5	Controle do CCR7 PE Dazzle 594 com 17DD	Nenhum
6	Controle do CD44 BV 605 com 17DD	Nenhum
7	Controle do CD62L PerCP/Cy5.5 com 17DD	Nenhum
8	Controle do CD4 APC/Cy7 com 17DD	Nenhum
9	Controle do CD8 PE/Cy7 com 17DD	Nenhum
10	Controle do CD69 PE	5ng/mL PMA + 100ng/mL ionomicina
11	Controle do CD3 Alexa Fluóor 700 com 17DD	Nenhum
12	Controle do CFSE com 17DD	Nenhum
13	Controle do Zombie com 17DD	Nenhum
14	Isotipo controle PE	Nenhum
15	Controle de acetonitrila 1% Naive	Nenhum
16	Controle positivo com pool do Mock	5ng/mL PMA + 100ng/mL ionomicina
17	Controle positivo com pool do Mock	5ng/mL PMA + 100ng/mL ionomicina
18	Controle positivo com pool do Naive	5ng/mL PMA + 100ng/mL ionomicina
19	Controle positivo com pool do Naive	5ng/mL PMA + 100ng/mL ionomicina
20	Controle negativo com pool do Naive	Nenhum
21	Controle negativo com pool do Naive	Nenhum
22	Pool do grupo Naive	Peptídeo de FA
23	Pool do grupo Naive	Peptídeo de FA
24	Pool do grupo Naive	Pool de peptídeos de Vif 41-107
25	Pool do grupo Naive	Pool de peptídeos de Vif 41-107
26	Pool do grupo Mock	Peptídeo de FA
27	Pool do grupo Mock	Peptídeo de FA
28	Pool do grupo Mock	Pool de peptídeos de Vif 41-107
29	Pool do grupo Mock	Pool de peptídeos de Vif 41-107
30	Pool do grupo FA 17DD	Peptídeo de FA
31	Pool do grupo FA 17DD	Peptídeo de FA
32	Pool do grupo FA 17DD	Pool de peptídeos de Vif 41-107
33	Pool do grupo FA 17DD	Pool de peptídeos de Vif 41-107
34	Pool do grupo FA/Vif 1-110 original	Peptídeo de FA
35	Pool do grupo FA/Vif 1-110 original	Peptídeo de FA
36	Pool do grupo FA/Vif 1-110 original	Pool de peptídeos de Vif 41-107
37	Pool do grupo FA/Vif 1-110 original	Pool de peptídeos de Vif 41-107
38	Pool do grupo FA/Vif 1-110 variante	Peptídeo de FA
39	Pool do grupo FA/Vif 1-110 variante	Peptídeo de FA
40	Pool do grupo FA/Vif 1-110 variante	Pool de peptídeos de Vif 41-107
41	Pool do grupo FA/Vif 1-110 variante	Pool de peptídeos de Vif 41-107
42	Pool do grupo FA/Vif 42-110	Peptídeo de FA
43	Pool do grupo FA/Vif 42-110	Peptídeo de FA
44	Pool do grupo FA/Vif 42-110	Pool de peptídeos de Vif 41-107
45	Pool do grupo FA/Vif 42-110	Pool de peptídeos de Vif 41-107

Coleta
de
sobrena-
dante

Exemplo do desenho experimental de um ensaio onde utilizamos o peptídeo do vírus de FA 17D e o *pool* de peptídeos de Vif 41-107 para estimular *in vitro*, as células dos camundongos imunizados. Realizamos duplicatas dentro dos grupos experimentais com os estímulos. Amostras de 1 a 15 – controles de citometria de fluxo. Essas amostras não foram estimuladas com peptídeos. São células que foram incubadas para a marcação com os anticorpos do painel para a avaliação de resposta celular específica. Amostras 16 a 45 – amostras estimuladas para a imunofenotipagem de células T ativadas e que proliferaram, com o *pool* de anticorpos do painel, e o sobrenadante desses poços foi coletado para a detecção de citocinas.