

FRANCIANE MOURADIAN EMIDIO TEIXEIRA

Avaliação da resposta à vacina de DNA *LAMP-1/p55Gag* do HIV-1 e da geração de células T foliculares na imunização de camundongos neonatos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências

São Paulo
2018

FRANCIANE MOURADIAN EMIDIO TEIXEIRA

Avaliação da resposta à vacina de DNA *LAMP-1/p55Gag* do HIV-1 e da geração de células T foliculares na imunização de camundongos neonatos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências

Área de concentração: Imunologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Notomi Sato

Versão original.

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Teixeira, Franciane Mouradian Emidio
Avaliação da resposta à vacina de DNA LAMP-
1/p55Gag do HIV-1 e da geração de células T
foliculares na imunização de camundongos neonatos /
Franciane Mouradian Emidio Teixeira; orientador
Maria Notomi Sato. -- São Paulo, 2018.
131 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. HIV. 2. Vacina de DNA. 3. Neonatos. 4.
Imunogenicidade. 5. Células T foliculares. I. Sato,
Maria Notomi, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDIAS

Candidato (a): Franciane Mouradian Emidio Teixeira

Título da Dissertação: **Avaliação da resposta à vacina de DNA *LAMP-1/p55Gag* do HIV-1 e da geração de células T foliculares na imunização de camundongos neonatos**

Orientador (a): Profª Dra. Maria Notomi Sato

A Comissão Julgadora do trabalho de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a...../...../....., considerou

Aprovado **Reprovado**

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Avaliação da resposta efetora e reguladora de células T CD4+ foliculares na imunização de camundongos neonatos com a vacina de DNA quimérica LAMP-1/p55gag do HIV-1*", registrado sob o protocolo nº **9/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **19/04/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Maria Notomi Sato**

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Luana de Mendonça Oliveira (Pós-graduando), Franciane Mouradian Emidio Teixeira (Investigador principal)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico http://www3.icb.usp.br/corpoeditorial/index.php?option=com_content&view=article&id=702. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Evaluation of effector and regulatory response by T follicular helper cells in the immunization of neonates mice with the chimeric DNA LAMP-1/p55gag of HIV-1 vaccine*", protocol nº **9/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **4/19/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Maria Notomi Sato**

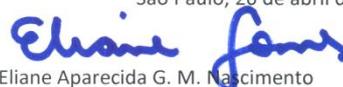
- Team members: *Luana de Mendonça Oliveira (Graduate Student), Franciane Mouradian Emidio Teixeira ((Principal Investigator)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57bl/6	Fêmea/female	20-25 g	78
	C57bl/6	Macho/Male	20-25 g	20
	C57bl/6		Neonatos	143

São Paulo, 26 de abril de 2016.


Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP


Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132



São Paulo, 06 de Maio de 2016

Ilmo(a)

Dr(a). Maria Notomi Sato

(aos cuidados de Franciane Mouradian Emidio Teixeira)

Certificamos que o projeto intitulado "**Avaliação da resposta efetora e reguladora de células T CD4+ foliculares na imunização de camundongos neonatos com a vacina de DNA quimérica LAMP-1/p55gag do HIV-1**", protocolo nº **000333A**, sob a responsabilidade de **Maria Notomi Sato** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IMT) do Instituto de Medicina Triopical de São Paulo, em reunião na presente data.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa.

Vigência da Autorização: 04/02/2016 a 06/08/2018							
Finalidade	Pesquisa						
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Material	Quantidade		
					M	F	M+F
Camundongo isogênico	C57BL/6	8-10 semanas	15-20g	a ser Coletado	20	78	98
Origem: Biotério - Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP					TOTAL		98

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

Trabalho realizado no Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - USP, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À minha mãe Maria Luiza, à minha avó Inocência, às minhas irmãs Franciellen e Ariane e o meu namorado Fernando, por todo apoio e amor ao longo do período de elaboração deste trabalho. Amo vocês!

E às crianças que convivem com HIV/Aids em todo o mundo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dra. Maria Notomi Sato primeiramente pela oportunidade concedida em fazer parte de seu grupo. Pela amizade, carinho, dedicação, orientação e paciência ao longo destes anos e por ter acreditado e confiado em mim para a realização deste trabalho. Pelos conselhos e ensinamentos que certamente foram de grande valia. Um pessoa admirável e uma profissional exímia, um exemplo de orientador que está sempre a disposição para nós como alunos e como pessoas. Obrigada por tudo e por me inspirar a ser pesquisadora.

Ao Prof^o Dr. Alberto José da Silva Duarte pela infraestrutura e qualidade do laboratório.

À Anna Cláudia (Anninha) e ao Cesar Cervantes pela amizade, por terem me selecionado para iniciação científica e acreditado em mim, e por me ensinarem com qualidade a base para o que sei hoje. Vocês foram fundamentais para realização desse projeto e deixo minha gratidão por essa oportunidade.

À Luana Oliveira (Lu) pela amizade e por toda ajuda na realização dos experimentos, pela paciência em me ensinar manipular os animais (mesmo nos momentos de medo), por me ensinar as análises de citometria, pela discussão constante dos resultados (mesmo quando estive nos Estados Unidos), pelas noites e finais de semana no laboratório. Por me permitir colaborar em seu trabalho e ampliar meus conhecimentos.

À Anna Julia (Rúlia) pela amizade e parceria em todos os momentos do Mestrado. Desde a prova, matrícula, disciplinas, PAE, qualificação...seleção do doutorado. Por compartilhar todos os momentos de angústia, pelos risos e pelos choros, pelas noites no laboratório e almoços no bandeirão. E por toda ajuda técnica com os ensaios de PCR.

À Luana Oliveira (Lu) por todo conhecimento compartilhado, e ajuda com citometria. Também pela amizade e por me permitir morar em São Paulo com ela durante um dos momentos mais difíceis do meu Mestrado.

Ao Fábio Seiti (Fabinho) pela amizade, paciência (muita paciência) em esclarecer minhas dúvidas e discutir os resultados. Também por toda ajuda na padronização e ensaio de western blot.

Aos amigos do grupo Experimental e laboratório que fazem meu dia a dia mais gratificante: Nátalli (Nate), Nilson, Marina, Kelly, Yasmim, Elaine (Re), Cyro, Alexia, Gabriel, Augusto, Iara, Danielle e Amanda. Sem o apoio e companheirismo de vocês tudo seria muito mais difícil. Obrigada pelo carinho, amizade e pelos momentos compartilhados dentro e fora do laboratório, na alegria e na tristeza. Obrigada por todas as vezes que me ajudaram e por contribuírem para a realização deste trabalho.

À Marília e Aline pela amizade e ajuda no biotério com as imunizações e manipulação dos C57BL/6.

À Mariane e a Edite pelo auxílio na transformação dos plasmídeos e por cederem o espaço de seu laboratório para as expansões das bactérias.

Ao Dr. Gil Bernard, Dra Gilda e seus alunos por cederem o espaço da micoteca.

À toda equipe dos setores técnicos do LIM-56: Noêmia, pela atenção e auxílio durante aquisição das amostras; Eduardo (carga viral), pela inúmeras vezes que cedeu sua sala para extração da vacina e Tatiana (cultura celular).

Aos funcionários do LIM-56 que nos oferecem suporte, auxílio e apoio em diversos momentos: Edna, Lúcio, Luiz, Evelyn, Cristina e Celeste (secretaria); Anderson e Marcelo (informática); Adriana (lavagens dos materiais de laboratório); Sílvia (limpeza e lavagem de materiais).

Aos funcionários do biotério pelo cuidado com nossos animais: Andréia, Edilma e Luiz.

Aos amigos e professores do Departamento de Imunologia, pelo apoio e amizade. Especialmente à todos companheiros de organização do Curso de Férias. Aprendi muito com todos vocês.

À secretária Eni pelo apoio, carinho, paciência e ajuda com as constantes dúvidas.

Aos professores da banca de qualificação pelas sugestões e questionamentos que enriqueceram este trabalho: Prof^a Dra. Daniela Santoro Rosa, Prof^a Dra. Maria Regida D'Império Lima e Dr. Rafael Ribeiro Almeida.

Ao Prof^o José Maria Alvarez Mozig (Pepe) pelo estágio PAE e oportunidade de aprendizado em docência.

À CAPES pela concessão de bolsa e FAPESP pelo suporte financeiro.

Em especial, agradeço a minha mãe Maria Luiza (Malu) e minha avó Inocência (Dna. Nena) por toda a base e educação ao longo desses anos. Por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a ir em busca dos meus sonhos. Por não me deixar desanimar diante dos obstáculos e por me inspirarem a ser uma pessoa melhor. Por terem sido pai e mãe e por me mostrarem o quanto o amor da família é fundamental. Vocês são meus exemplos de vida.

Às minhas irmãs pelo amor incondicional, apoio, pelos momentos de descontração e desabafo e por participarem comigo desta jornada.. À minha Irmã Franciellen (Ellen) principalmente por assistir a todas as minhas apresentações, seja de congresso, aula, qualificação ou defesa. À minha irmã Ariana (Ane), que mesmo distante se faz presente em minha vida, transmitindo seu carinho diariamente e me dando força em cada etapa.

Ao meu namorado Fernando pelo imenso amor, dedicação e carinho. Por acreditar em mim, me apoiar em minhas escolhas e me incentivar diariamente. E principalmente pela paciência e momentos juntos.

Aos meus familiares e amigos pelo carinho e apoio. Especialmente ao meu afilhado Luigi e minha sobrinha de coração Mariana por renovarem minhas energias e trazerem alegria aos meus dias. Vocês são meu refúgio.

À tia Marlene, que teve um papel fundamental para minha formação e por sempre acreditar em mim e me incentivar nos estudos.

As minhas amigas da faculdade pelo apoio e amizade: Flavia, Karina, Yasmim e Jaqueline. E a minha amiga de longa data Mayara que está sempre presente.

À Deus, meu alicerce, por me permitir viver esse momento e chegar até aqui. Por ter colocado pessoas maravilhosas em meu caminho, me dar saúde, paz de espírito e pela renovação diária de fé.

E à todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste sonho.

"Lembre-se de olhar para as estrelas e não para seus pés.

Tente achar um sentido para o que vê, e pergunte-se o porquê do Universo.

Seja curioso.

*E não importa o quão difícil a vida seja, há sempre algo que você pode fazer e ter
sucesso.*

É importante não desistir."

(Stephen Hawking)

RESUMO

TEIXEIRA, F.M.E. **Avaliação da resposta à vacina de DNA *LAMP-1/p55Gag* do HIV-1 e da geração de células T foliculares na imunização de camundongos neonatos.** 2018.131p Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018

O número de jovens infectados por HIV vem aumentando nas últimas décadas, o que salienta a necessidade de estratégias vacinais que sejam imunogênicas em fase precoce de vida capazes de induzir resposta de longa duração. A vacina quimérica *LAMP-1/p55Gag*, associa o gene que codifica a LAMP-1 (proteína de associação da membrana lisossomal) e o gene da *gag* do HIV-1, direciona o tráfego da proteína viral para os compartimentos MIIC, possibilitando a apresentação dos peptídeos virais pela classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC II). Esta vacina quimérica é imunogênica em camundongos BALB/c adultos e neonatos e crucial para induzir resposta T e B de longa duração, com produção de elevados níveis de anticorpos. Contudo, os mecanismos imunológicos envolvidos na indução da resposta humoral da vacina *LAMP/Gag*, como a geração de células T auxiliares foliculares (T_{FH}), ainda não são conhecidos no período neonatal. O objetivo do estudo foi avaliar a geração de células T_{FH} , T citotóxicos e B foliculares em camundongos neonatos submetidos à imunização com as vacinas *LAMP/Gag* (LG) e *Gag* (G). Inicialmente, avaliamos a imunogenicidade das vacinas gênicas na imunização neonatal aos sete dias de idade em camundongos de linhagem C57BL/6. Os resultados mostram que a imunização neonatal com a vacina LG é capaz de aumentar a frequência de células secretoras de IFN- γ aos peptídeos imunodominantes da região *gag* do HIV-1 e de células T CD8+IFN- γ + comparadas a vacina *Gag*. A imunização neonatal com a vacina LG também levou a produção de títulos elevados de anticorpos IgG1 anti-p24 e aumento da porcentagem de células secretoras de IgG1 *Gag*-específicas. O *priming* neonatal com LG é capaz de promover resposta celular e humoral anti-*Gag* de longa duração. Além disto, a imunização neonatal (ip) com LG foi capaz de induzir células T_{FH} (CD4+CXCR5+PD-1+Bcl-6+), linfócitos T CD8+ foliculares (T_{FC}) (CD8+CXCR5+) e formação de centro germinativo (CG) nos linfonodos mesentéricos, contudo, ambas as vacinas induziram células B foliculares (CD19+CXCR5+). Apesar da menor frequência de T_{FH} dos neonatos em relação

a adultos na imunização com LG, houve frequência similar de células T_{FC} . A imunização intradérmica convencional induziu aumento do número de células T_{FH} nos linfonodos inguinais já ao terceiro dia após o reforço vacinal, embora frequência similar de células T_{FH} , T_{FC} e B foliculares. Neste período foi possível observar que a vacina LG também induziu a geração de células B de CG. Outra peculiaridade da vacina LG neonatal foi o aumento da expressão gênica da enzima citidina deaminase (AID). Os resultados mostram que a vacina *LAMP/Gag* é imunogênica na fase neonatal de camundongos C57BL/6 quanto à geração de resposta celular e humoral antígeno-específica e resposta de longa duração, similarmente aos camundongos BALB/c. Os dados mostraram que a vacina LG é eficaz na indução de células T foliculares, na maturação de tecidos linfoides com formação de CGs e na indução de de transcritos para AID. No conjunto, os achados evidenciam que a estratégia da vacina quimérica *LAMP/Gag* é eficaz neste período da vida, e possui importante papel adjuvante na maturação da resposta humoral.

Palavras-chaves: HIV. Vacina de DNA. Neonatos. Imunogenicidade. Células T foliculares.

ABSTRACT

TEIXEIRA, F. M. E. **Evaluation of response to the DNA vaccine LAMP-1/p55Gag of HIV-1 and generation of follicular T cells in the neonatal mice immunization** 2018. 131p. Master Thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018

The number of young people infected with HIV has been increasing in recent decades, which highlights the need for vaccine strategies that are immunogenic at early phase of life able of inducing long-term response. The chimeric *LAMP-1/p55Gag* vaccine, associates the gene encoding LAMP-1 (lysosomal associated membrane protein) and the HIV-1 gag gene, directs the traffic of viral protein to MHC compartments, leading to presentation of the viral peptides through class II of the Major Histocompatibility Complex (MHC II). This chimeric vaccine is immunogenic in adult and neonatal BALB/c mice and crucial to induce long-term T and B responses, producing high levels of antibodies. However, the immunological mechanisms involved in the induction of the humoral response of the *LAMP/Gag* vaccine, such as the generation of T follicular helper cells (T_{FH}), are unknown in the neonatal period. The objective of this study was to evaluate the generation of T_{FH} , and follicular cytotoxic T cells and B cells in neonates submitted to immunization with the *LAMP/Gag* (LG) and *Gag* (G) vaccines. The results show that neonatal immunization at seven days-old in C57BL/6 mice strain with the LG vaccine is able to increasing the frequency of IFN- γ -secreting cells to the immunodominant peptides of the HIV-1 gag region and of CD8+IFN- γ + T cells compared to the *Gag* vaccine. Neonatal immunization with the LG vaccine led to the production of high titers of anti-p24 IgG1 antibodies and the increased percentage of Gag-specific IgG1 secreting cells. Neonatal priming with LG is able to promote long-lasting anti-Gag humoral and cellular response. Moreover, neonatal (ip) immunization with LG was able to induce T_{FH} cells (CD4+CXCR5+PD-1+Bcl-6 +), follicular CD8 + T cells (T_{FC}) (CD8+CXCR5+) and germinal center (GC) formation in the mesenteric lymph nodes, whereas both vaccines induced follicular B cells (CD19+CXCR5+). Despite the lower frequency of T_{FH} in neonates in relation to adult counterpart the immunization with LG, a similar percentage of T_{FC} cells was observed. Conventional immunization by intradermal immunization induced an increased number of T_{FH} cells in inguinal lymph nodes on the third day after booster

vaccination, despite the similar frequency of follicular T_{FH}, T_{FC} and B cells. In this period the LG vaccine also induced generation of CG B cells. Another peculiarity of the LG neonatal vaccine was the increase in the gene expression of the enzyme activation-induced cytidine deaminase (AID). The results show that the *LAMP/Gag* vaccine is immunogenic in the neonatal phase of C57BL/6 mice for the generation of antigen-specific humoral and cellular response and long-term response, similar to BALB/c mice. The findings showed effective induction of follicular T cells, maturation of lymphoid tissues with formation of GCs and up-regulation of transcripts for AID. Taken together, our findings demonstrate that the *LAMP/Gag* chimeric vaccine strategy is effective at this time in life, and has an important adjuvant role in the maturation of the humoral response.

Keywords: HIV. DNA vaccine. Neonates. Immunogenicity. Follicular T cells.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Epidemiologia, características biológicas e moleculares do HIV	18
1.2 Vacinas contra o HIV-1.....	20
1.3 Vacinas gênicas	22
1.4 Vacina de DNA quimérica <i>LAMP-1/p55Gag</i>	24
1.5 Imunidade no período neonatal	29
1.6 Células T CD4+ e TCD8+ foliculares	33
2. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	40

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) foi reconhecida pela primeira vez como uma nova doença em 1981, quando um número crescente de homens jovens homossexuais passou a apresentar infecções oportunistas incomuns e malignidades raras ((Cdc), 1981; Greene, 2007).

Um retrovírus foi identificado como agente causador da doença, posteriormente denominado como vírus da imunodeficiência humana (HIV - *human immunodeficiency virus*) (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984).

A infecção pelo HIV se caracteriza principalmente por uma depleção progressiva de linfócitos T CD4+, levando ao quadro de imunodeficiência característico da Aids (Cohen *et al.*, 2011). Embora o tratamento antiretroviral tenha reduzido o número de mortes relacionadas à Aids, o acesso à terapia não é universal, e as perspectivas de tratamentos que promovam a cura e uma vacina eficaz ainda são incertos (Richman *et al.*, 2009).

1.1 Epidemiologia, características biológicas e moleculares do HIV

A epidemia promovida pela infecção do HIV é um problema de saúde pública mundial, representando altas taxas de morbidade, com perda da qualidade de vida, e mortalidade. Atualmente, 36,7 milhões de pessoas vivem com HIV/Aids em todo o mundo e cerca de 5000 novas infecções ocorrem a cada dia (Unaid, 2017).

No Brasil, foram notificados 882.810 casos de infecção pelo HIV e 123 mil óbitos decorrente de Aids até junho de 2017, com uma média estimada de 40 mil casos de Aids nos últimos cinco anos (Ministério Da Saúde, 2017). No período de 2007 a 2016, em relação às faixas etárias, observou-se que a maioria dos casos de infecção pelo HIV encontra-se nas faixas de 20 a 34 anos, com percentual de 52,5% dos casos (Ministério Da Saúde, 2017).

A Aids ainda é um grande desafio à saúde pública, e está associada a 1 milhão de mortes em todo o mundo, sendo que 120.000 correspondem à crianças menores de 15 anos, cuja infecção ocorre quase que exclusivamente por transmissão vertical (Unaid, 2017).

Com o advento da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART -*highly active antiretroviral therapy*), mesmo em países em desenvolvimento, observou-se uma diminuição na taxa de transmissão vertical e redução no número de crianças infectadas por HIV na última década. No entanto, aumentou o número de crianças expostas ao HIV-1 e não infectadas na África Subsaariana, que é considerada uma população mais vulnerável, com maior mortalidade já nos primeiros anos de vida (Afran *et al.*, 2014).

O HIV é um retrovírus pertencente à família *Retroviridae*, composto por duas fitas simples de ácido ribonucleico (RNA), o qual é transcrito em ácido desoxirribonucleico (DNA) e integrado no genoma celular do hospedeiro (Turner e Summers, 1999). O HIV pode ser dividido em HIV-1 e HIV-2, que diferem quanto à estrutura genômica e distribuição geográfica. Filogeneticamente o HIV-1 é subdividido em três grupos: M (*major*), O (*outlier*) e N (não M/ não O) (Korber *et al.*, 2000; Keele *et al.*, 2006). O grupo M é a forma predominante circulante, responsável pela epidemia mundial e está dividido nos subtipos A, B, C, D, F, G, H, J e K (Robertson *et al.*, 2000; Hemelaar *et al.*, 2006).

O genoma do HIV é constituído por três genes estruturais (*env*, *gag*, *pol*) e seis genes acessórios/reguladores (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev*, *nef*). Dentre os genes estruturais, o gene *env* codifica a estrutura do envelope viral, composta pelas glicoproteínas gp120 e gp41, que permitem a entrada do vírus na célula hospedeira; o gene *gag* codifica as proteínas do *core*, constituída pela poliproteína p55 precursora das proteínas da matriz (p17), capsídeo (p24) e nucleocapsídeo (p7), responsáveis pela estrutura do virion; e o gene *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease, responsáveis pela transcrição do RNA em DNA, integração do DNA pró-viral ao genoma da célula hospedeira e clivagem das sequências peptídicas virais, respectivamente (figura 1) (Turner e Summers, 1999; HIV Sequence Compendium, 2014).

O HIV infecta as células que expressam concomitantemente a moléculas CD4+ e os receptores de quimiocinas CCR5 ou CXCR4 (Fanales-Belasio *et al.*, 2010). O vírus tem a característica de replicar-se melhor em células ativadas e, assim os ciclos repetitivos da infecção e ativação celular levam à destruição das células, principalmente os linfócitos T CD4+ (Rowland-Jones, 2003).

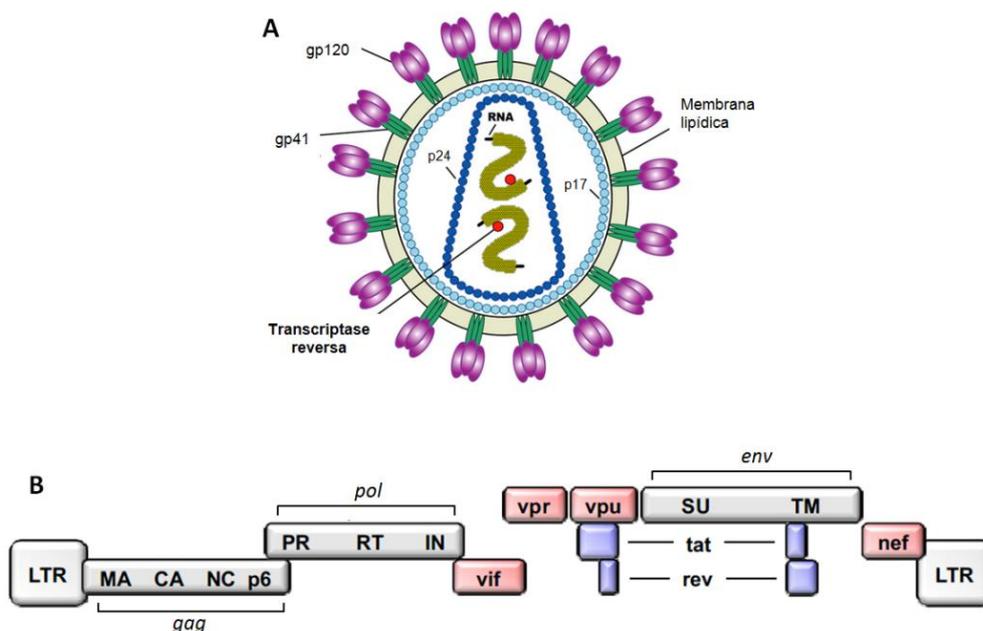


Figura 1. Organização estrutural e genômica do HIV. (A) Esquema representativo do HIV-1, representados pelas proteínas de envelope (gp120 / gp41), capsídeo (p24) e matriz (p17), RNA de fita dupla e a enzima transcriptase reversa. (B). Representação do genoma do HIV, composto pelos genes estruturais (caixa cinza), reguladores (caixas azuis) e acessórios caixas vermelhas. (Adaptado,(Ayinde *et al.*, 2010).

A infecção pelo HIV em adultos pode reduzir a viremia plasmática durante a infecção aguda, em paralelo ao aparecimento de uma vigorosa resposta citotóxica específica. Entretanto, na infecção pediátrica derivada da transmissão vertical, há evidências de rápida progressão da doença em consequência da imaturidade imunológica dos neonatos (Goulder *et al.*, 2001).

1.2 Vacinas contra o HIV-1

Ao longo de três décadas após a descoberta do HIV, uma vacina ainda permanece ilusiva. Em países onde há adesão variável à ART, disponibilidade limitada de medicamentos e infra-estrutura deficiente, o desenvolvimento de uma vacina contra HIV-1 ainda é necessária (Stephenson *et al.*, 2016). Considerando ainda o aumento na incidência de jovens, como também de indivíduos acima de 60 anos infectados por HIV-1 no país.

Há dois enfoques principais na questão de delineamento de vacinas: i) vacinas profiláticas, capazes de prevenir a infecção (induzir imunidade esterilizante) pela geração de anticorpos altamente neutralizantes e ii) vacinas

terapêuticas capazes de reduzir a viremia e progressão da doença pela indução de imunidade celular (Estcourt *et al.*, 2004; Barouch e Korber, 2010). Apesar da necessidade emergente no desenvolvimento de uma vacina contra o HIV, até o momento existem apenas seis candidatos vacinais que completaram os testes clínicos de eficácia (Stephenson *et al.*, 2016).

As vacinas candidatas AIDSVAX B/B e AIDSVAX B/E, desenhadas para a indução de anticorpos à gp120 do envelope do HIV-1, foram usadas nos primeiros ensaios clínicos de fase III, conduzidos nos Estados Unidos (VAX004 *trial*) e Tailândia (VAX003 *trial*), ambas as vacinas falharam em gerar proteção contra a infecção (Flynn *et al.*, 2005; Pitisuttithum *et al.*, 2006).

Outras estratégias vacinais foram delineadas para induzir respostas celulares, considerando o papel dos linfócitos T CD8+ (Allen *et al.*, 2000; Buchbinder *et al.*, 2008; Emu *et al.*, 2008). O protocolo clínico STEP (HVTN 502) de fase IIb foi o primeiro teste de eficácia pela indução de imunidade celular de uma vacina trivalente composta por um adenovírus sorotipo 5 (Ad5) codificando para Gag, Pol e Nef do HIV-1. Este ensaio foi encerrado em 2007, por ausência de eficácia (Buchbinder *et al.*, 2008; Duerr *et al.*, 2012). Um braço deste estudo foi conduzido na África, (Teste de Phambili - HVTN 503) e também apresentou ausência de eficácia (Gray *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2011).

Outro ensaio clínico, HVTN 505, testou a combinação de duas vacinas candidatas em regime de imunização inicial (“*prime*”) com uma vacina de DNA codificando para diferentes proteínas do HIV-1 dos subtipos A, B e C e reforço (“*boost*”) com Ad5 recombinante (DNA/rAd5), projetadas para gerar resposta humoral e celular, porém não mostrou eficácia (Hammer *et al.*, 2013).

O estudo clínico RV144, conduzido na Tailândia, utilizou esquema de *prime* com o vetor recombinante *Canarypox* codificando a gp120, Gag e protease do HIV-1 (ALVAC) e *boost* com a vacina AIDSVAX/BE, o qual demonstrou eficácia de 31% na aquisição da infecção (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009). Os participantes vacinados apresentaram proliferação de linfócitos T CD4+ e anticorpos anti-gp120, além de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC -*antibody-dependent cellular cytotoxicity*) (Mcelrath e Haynes, 2010). Estudos subsequentes mostraram que os anticorpos não neutralizantes das regiões variáveis 1 e 2 (V1/V2) do envelope do HIV-1 foram associados a um risco reduzido de aquisição da infecção (Rolland *et al.*, 2012).

No que se refere à vacinação pediátrica, o primeiro teste clínico (HPTN 027) foi conduzido na Uganda em crianças nascidas de mãe soropositivas que receberam a vacina ALVAC. Entretanto, os bebês expostos ao HIV-1 geraram baixa resposta celular à vacina ALVAC, semelhante ao observado em adultos (Kaleebu *et al.*, 2014).

Em primatas-não humanos, algumas vacinas foram eficazes na proteção ou controle da infecção pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV - *simian immunodeficiency virus*) (Hansen *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2009; Barouch *et al.*, 2015).

Apesar do amplo conhecimento do HIV e da resposta imune na infecção, até o momento nenhuma vacina foi capaz de gerar cobertura populacional adequada, o que salienta a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias que ampliem as oportunidades para uma vacina candidata eficaz.

1.3 Vacinas gênicas

A tecnologia de vacina de DNA geralmente é baseada em plasmídeos bacterianos que codificam sequências polipeptídicas de antígenos candidatos (Rajcáni *et al.*, 2005). Esses plasmídeos são geralmente produzidos em cultura bacteriana, purificados e depois utilizados para inoculação no hospedeiro (Suschak *et al.*, 2017). A clonagem ou síntese de ácidos nucleicos evita a necessidade de purificar proteínas de agentes patogênicos e seu uso na fabricação de vacinas (Li e Petrovsky, 2016). Além disso, não há risco de patogenicidade, devido ao vírus incompletamente inativado ou por um vírus atenuado parcialmente revertido (Rajcáni *et al.*, 2005). Evitando, assim, o risco das vacinas com organismos vivos ou atenuados, especialmente quando utilizados em fase precoce de vida.

A vacinação com DNA provou ser bem sucedida em modelos animais para prevenir ou tratar algumas doenças infecciosas, alergias, câncer ou auto-imunidade (Abdulhaqq e Weiner, 2008). Adicionalmente, a tecnologia de DNA recombinante permite quase qualquer tipo de manipulação molecular no DNA do plasmídeo, que garante o redesenho rápido de antígenos para agentes patogênicos, como por exemplo, ao vírus da influenza que exibe uma deriva antigênica constante (Li e Petrovsky, 2016).

As vacinas de DNA podem ser administradas por rotas intramuscular, subcutânea, mucosa ou intradérmica. De modo que é necessário ganhar entrada no citoplasma das células no local da injeção, de modo a induzir a expressão do antígeno *in vivo*, permitindo a apresentação antigênica via as moléculas de classe I ou II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *major hystocompatibility complex*) (Li e Petrovsky, 2016).

Na imunização com as vacinas gênicas ocorre a transfecção nas células e tradução proteica, seguida da sua secreção ou processamento celular antigênico. Assim, os antígenos podem ser gerados endogenamente, processados no citoplasma e apresentados via classe I do MHC ou podem ser secretados, endocitados e posteriormente degradados no endossomo, sendo apresentado pelo MHC de classe II, também conhecido como apresentação cruzada (figura 2) (Howarth e Elliott, 2004; Stevenson, 2004).

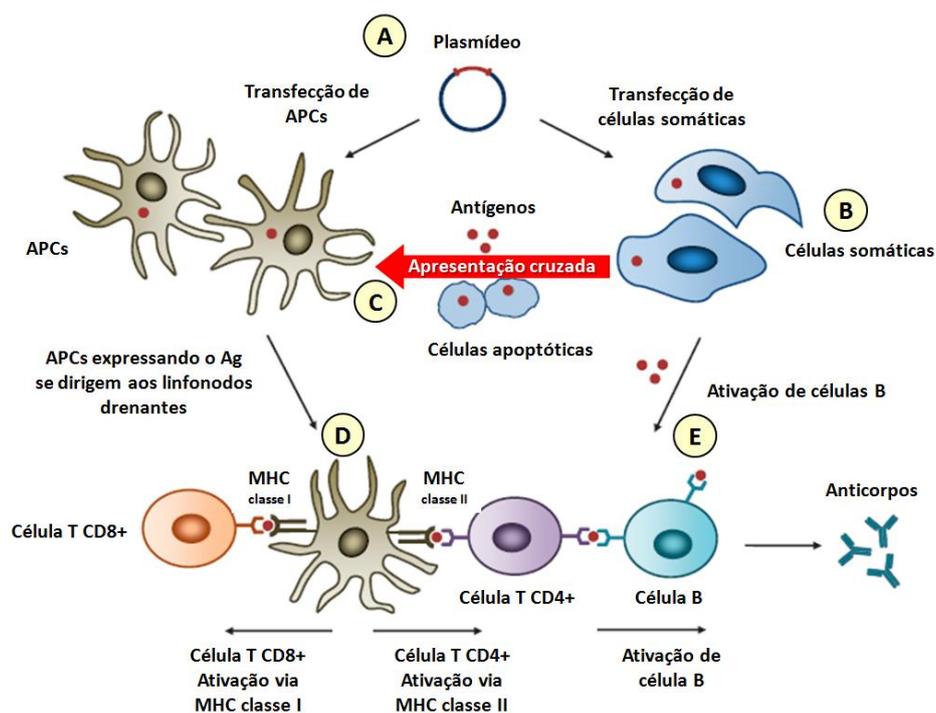


Figura 2. Mecanismos de ação das vacinas de DNA. (A) As sequências gênicas são inseridas em um plasmídeo e depois são entregues ao hospedeiro (Ex: injeção intramuscular ou intradérmica). O plasmídeo entra no núcleo das células somáticas (Ex: miócitos ou queratinócitos) e células apresentadoras de antígeno (APCs). Utilizando a maquinaria da célula hospedeira, o antígeno (Ag) é produzido. (B) Os Ag endógenos derivados da vacina são apresentados em moléculas de MHC I. (C) Ag secretado ou liberado de células apoptóticas é capturado e processado pelas APCs e apresentado via MHC II. (D) APC migra para o linfonodo drenante e estimula as populações de linfócitos T CD4 + CD8 +. (E) O Ag secretado também pode ser reconhecido pelo receptor de célula B e apresentado ao T CD4+, conduzindo as respostas de anticorpos (Adaptado, (Xu *et al.*, 2014).

As vacinas de DNA utilizam os sinais de transcrição e as organelas das células eucarióticas transfectadas para expressão do antígeno *in situ* (Estcourt *et al.*, 2004). Estas vacinas codificam os genes de uma porção antigênica de um microrganismo, conduzidos por promotores eficientes, normalmente um promotor viral (Hobson *et al.*, 2003; Estcourt *et al.*, 2004).

Apesar das inúmeras vantagens das vacinas gênicas, estas são pouco imunogênicas, comparando com as demais vacinas, necessitando de estratégias, ou de adjuvantes moleculares. A imunização com plasmídeos que codificam epítomos de classe I do MHC geralmente induz baixa resposta de linfócitos T CD8+ citotóxicos (CTL - *cytotoxic T lymphocytes*) e, somente as construções com epítomos de classe II do MHC podem melhorar a amplitude da resposta CTL (Vatakis *et al.*, 2005). Camundongos adultos imunizados com vacinas de DNA que expressam epítomos de classe I da gp120 do HIV e epítomos de classe II da ovalbumina mostraram que o não direcionamento às moléculas de MHC II ou baixa afinidade dos epítomos de classe II resulta em uma deficiente resposta CTL à gp120 (Vatakis *et al.*, 2005).

As vacinas gênicas que possibilitam o direcionamento de antígenos às moléculas de MHC II são vitais para a ativação de linfócitos T auxiliares (Th - *T helper*). Como consequência da ativação das células Th, há expansão clonal de células B antígeno-específicas secretoras de anticorpos, geração de células T de memória, aumento da expressão de sinais coestimuladores e produção de citocinas, bem como contribui para a geração de respostas CTL, algo que permanece evasivo na maioria das vacinas não vivas.

As vacinas de DNA também demonstraram a capacidade de gerar populações de células T auxiliares foliculares (T_{FH} - *T follicular helper cells*), que são essenciais para a indução de respostas eficazes de células B antígeno-específicas (Hollister *et al.*, 2014). Assim, novas abordagens, como a inclusão de adjuvantes moleculares capazes de ativar resposta Th, parecem ser promissoras no desenvolvimento de uma vacina de DNA eficiente.

1.4 Vacina de DNA química LAMP-1/p55Gag

Construções vacinais de DNA com o intuito de potencializar a imunogenicidade vacinal, favorecendo a apresentação do antígeno endógeno

pelas moléculas de MHC II, são capazes de potencializar a resposta CTL, produção de anticorpos, geração de resposta efetora e de memória.

Neste sentido, o Dr. Thomas August, do Departamento de Farmacologia e Ciências Moleculares, da Escola de Medicina da Universidade John Hopkins, realizou estudos com vacinas quiméricas de DNA, constituídas pela proteína de associação à membrana lisossomal 1 (LAMP-1 – *lysosomal associated membrane protein 1*), que direcionam o tráfego do antígeno para os compartimentos de classe II do MHC conjugada à genes virais, como da dengue (Lu *et al.*, 2003), do vírus do papiloma humano (Wu *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000), do HIV-1 (Rowell *et al.*, 1995; Ruff *et al.*, 1997; Marques *et al.*, 2003) e do vírus da febre amarela (Maciel *et al.*, 2015). Outros estudos independentes também utilizaram vacinas quiméricas de DNA com a proteína LAMP-1 conjugada à genes de microrganismos como do *Plasmodium sp* (Dobaño *et al.*, 2007) e do *Hantavirus Gn* (Jiang *et al.*, 2017).

As moléculas LAMP (LAMP-1 e LAMP-2) são proteínas transmembrânicas do tipo I e os principais componentes proteicos da membrana lisossomal. A estrutura da LAMP-1 consiste em um domínio luminal fortemente glicosilado, um domínio transmembranar e uma cauda citoplasmática de 11 resíduos, cuja sequências carboxiterminais YQTI são necessárias e suficientes para levar algumas proteínas recombinantes através do compartimento vesicular aos lisossomos (Chen *et al.*, 1988; Fukuda *et al.*, 1988; Guarnieri *et al.*, 1993).

A proteína LAMP atinge compartimentos endossômicos especializados, denominados MIIC (*endosomal MHC class II compartment*), os quais correspondem a sítios relacionados com a formação do complexo peptídeo:MHC II e estão envolvidos com o transporte desse complexo até a superfície celular das células apresentadoras de antígenos (APCs - *antigen-presenting cells*) (Kleijmeer *et al.*, 1995; Ruff *et al.*, 1997).

Com relação ao HIV, a vacina de DNA quimérica que codifica a gp160 do HIV e a proteína LAMP-1 promoveu uma maior amplitude da resposta humoral e celular em camundongos imunizados, decorrente do direcionamento do antígeno sintetizado endogenamente pelo tráfego via LAMP (Ruff *et al.*, 1997). Contudo, o uso de glicoproteínas do envelope consiste em um obstáculo na construção de vacinas eficazes que impeçam a infecção pelo HIV-1 uma

vez que precisam ser constituídas por diversos genes do envelope capazes de cobrir toda heterogeneidade desta região viral.

A construção de uma vacina de HIV-1 com o gene *gag* é um atrativo, pois é uma das proteínas virais mais conservadas entre os diversos grupos e subtipos de HIV, capaz de promover resposta cruzada anti-Gag em pacientes infectados por diferentes subclasses do vírus (Norris *et al.*, 2004). Diversos estudos mostram que a resposta de linfócitos T CD4+ e CD8+ aos peptídeos da Gag do HIV, está associada à proteção e controle da viremia. Os linfócitos T citotóxicos Gag-específicos em indivíduos infectados pelo HIV-1 também são importantes no controle da replicação viral tardia, promovendo uma progressão lenta da doença (Zhang *et al.*, 2004).

A Gag é o primeiro antígeno a ser exposto na membrana de células infectadas e linfócitos T CD8+ Gag-específicos reconhecem células T CD4+ infectadas logo na segunda hora após a infecção, antes mesmo da integração do DNA pró viral, síntese de proteínas virais e regulação negativa do MHC I mediada pelo Nef (Sacha *et al.*, 2007). Propõe-se que estratégias vacinais direcionadas a antígenos conservados como a Gag, a qual é expressa precocemente antes do ciclo viral replicativo terminar, sejam ideais, pois os linfócitos T CD8+ reconheceriam as células infectadas antes da liberação de novos vírus (Sacha *et al.*, 2007), uma vez que o ciclo replicativo do HIV é concluído em aproximadamente 24 horas (Kim *et al.*, 1989).

Em contrapartida, o uso da Gag como antígeno vacinal não permite a geração de anticorpos neutralizantes, os quais são desenvolvidos em resposta aos antígenos de superfícies. Os anticorpos específicos direcionados as proteínas de superfícies são capazes de neutralizar o vírus, impedindo assim sua entrada na célula hospedeira, promovendo uma imunidade esterilizante.

Marques e colaboradores desenvolveram a vacina quimérica constituída pela LAMP-1 e os nucleotídeos 1-1503 do gene *p55gag* do HIV-1 da cepa selvagem HXB2 (*GenBank*KO3455) inseridos no plasmídeo pITR, denominada *LAMP-1/p55Gag* (Marques *et al.*, 2003). Proteínas estruturais do HIV são pobremente translocadas ao citoplasma e a expressão da *gag* requer a atividade da proteína viral Rev (Pollard e Malim, 1998). A sequência *p55gag* está inserida estrategicamente entre os domínios luminal e transmembrana da LAMP-1, a qual promove o direcionamento adequado da Gag aos

compartimentos MIIC, levando a uma resposta imune Gag-específica mais potente e prolongada (Marques *et al.*, 2003). A associação ao domínio luminal é essencial para mediar a expressão gênica da Gag e seu direcionamento aos compartimentos lisossomais, além de culminar na secreção da quimera *LAMP/Gag* parcialmente em associação à vesículas semelhantes a exossomas (Godinho *et al.*, 2014).

A imunização de camundongos BALB/c adultos com a quimera *LAMP/gag* demonstrou ser mais eficiente na indução da resposta humoral e celular específica quando comparado à vacina de DNA que codifica a proteína p55 do *gag* nativo, sendo capaz de aumentar 10 vezes a resposta das células T CD4+, 4 a 5 vezes a resposta das células T CD8+ e de elevar 50 a 100 vezes os títulos de anticorpos (Marques *et al.*, 2003). Além disto, é capaz de gerar resposta de memória de linfócitos T e B de longa duração (De Arruda *et al.*, 2004). A estratégia vacinal *LAMP/Gag* (contendo o gene LAMP humano) também foi imunogênica em primatas não-humanos, capaz de induzir aumento na resposta de células T e B aos epítomos da Gag (Chikhlikar *et al.*, 2006).

Outra estratégia do grupo é a vacina *DC-LAMP/Gag*, que faz um direcionamento da Gag para as células dendríticas (DCs - *dendritic cells*) (Arruda *et al.*, 2006). O DC-LAMP (*Dendritic cell – lysosomal associated membrane protein*), conhecido também como LAMP-3, é uma molécula da família LAMP evidenciada no compartimento lisossomal/endossomal de DCs humanas e em pneumócitos tipo II (De Saint-Vis *et al.*, 1998; Akasaki *et al.*, 2004). O DC-LAMP no compartimento MIIC em DC deve exercer função no processamento de antígenos exógenos, em especial aos antígenos crípticos, aumentando a magnitude da resposta vacinal. A imunização de camundongos adultos com as vacinas *DC-LAMP/Gag* e *LAMP/Gag* promove aumento na diversidade de epítomos reconhecidos por células T e B (Arruda *et al.*, 2006).

Nosso grupo de pesquisa, em colaboração com os Professores Ernesto Marques e Thomas August, avaliou a imunogenicidade da vacina quimérica *LAMP/Gag* no período neonatal. A imunização de camundongos BALB/c neonatos (7 dias de idade) com *LAMP/Gag* em duas doses, ou uma dose seguido de *Gag*, foi capaz de gerar intensa resposta celular e humoral anti-Gag e de induzir resposta de memória de células T CD4+ e CD8+ de longa duração comparado com a vacina nativa *Gag* (Rigato *et al.*, 2010). Houve

indução de resposta de células T citotóxicas *in vivo*, CTL Gag-específica, bem como níveis de anticorpos anti-Gag que permaneceram elevados até nove meses após imunização neonatal com *LAMP/Gag* (Rigato *et al.*, 2010).

A imunização materna pré-concepção com *LAMP/Gag* também foi capaz de transferir elevados níveis de anticorpos, principalmente IgG1, por via placentária e pela amamentação à prole, os quais inibiram a geração de células efetoras na prole ao desafio com *LAMP/Gag* comparado aos neonatos de mães não vacinadas. Apesar desta inibição transitória da resposta vacinal, a vacina foi capaz de sensibilizar a prole, vista pela geração de resposta de memória de longa duração das células B e T na prole (Rigato *et al.*, 2012). Alternativamente, mães imunizadas com *LAMP/Gag* nos últimos dias da gestação com uma única dose por via intravenosa, foi capaz de sensibilizar a mãe e a prole simultaneamente (Rigato *et al.*, 2012) (figura 3). Assim, a vacinação com *LAMP/Gag* é capaz de primar os neonatos *in utero* como também no período pós-natal gerando resposta de memória de longa duração (Rigato *et al.*, 2010; Rigato *et al.*, 2012).

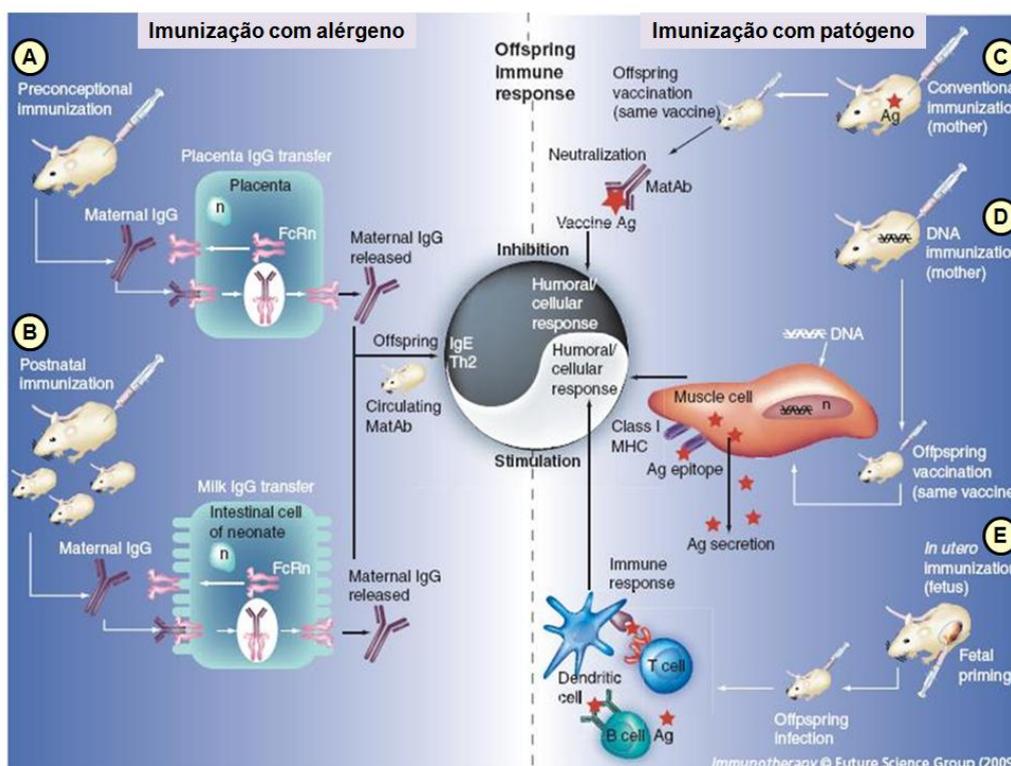


Figura 3. Efeitos da imunização materna na resposta imunológica da prole. (A) Imunização pré-concepção com alérgenos permite a transferência placentária de anticorpos maternos (MatAb - *maternal antibody*) ao feto. (B) Imunização pós-natal com alérgenos e MatAb transferidos à prole via amamentação. Ambos evitam a

sensibilização neonatal com alérgeno. (C) Vacinação materna convencional contra patógenos permite a transferência (pré ou pós-natal) de MatAb aos neonatos, capaz de inibir a resposta vacinal na prole. (D) Vacinação gênica materna promove a transferência de MatAb sem interferir na resposta celular da prole. (E). Estratégia de vacinação com DNA *in utero*, por via intravenosa, pode primar o feto e permitir o desenvolvimento de resposta imunológica antígeno-específica na prole contra o desafio com o respectivo patógeno. (Adaptado, (Rigato *et al.*, 2009).

Além disto, a vacina quimérica *LAMP/Gag* foi imunogênica nas mucosas no período neonatal. A imunização por via intranasal com três doses da vacina induziu resposta efetora celular e humoral, de IgA e IgG nas mucosas dos camundongos BALB/c (Goldoni *et al.*, 2011). O efeito sistêmico foi observado quando associado ao reforço por via intradérmica, com aumento nos níveis séricos de anticorpos anti-Gag e resposta de linfócitos T CD4+ e CD8+ (Goldoni *et al.*, 2011).

Em conjunto, os dados enfatizam que é necessária a formulação quimérica com LAMP-1 para a vacina ser imunogênica no período neonatal, seja por induzir imunidade em mucosas ou sistêmicas, ou *in utero*. Contudo, ainda não se conhece os mecanismos envolvidos na indução de uma resposta humoral robusta no contexto de imunização em fase neonatal, considerando as peculiaridades do sistema imunológico adaptativo neste período. Uma hipótese seria o desenvolvimento adequado de células T auxiliares foliculares mediado pelo direcionamento antigênico via LAMP e ativação eficiente de células T CD4+.

Além disso, atualmente há um aumento do número de novas infecções por HIV na população de faixa etária de jovens. Assim, o estudo de estratégias vacinais capazes de serem imunogênicas para neonatos/crianças e de induzir resposta de longa duração, seria essencial, considerando não só a iniciação precoce do sexo, como também a gravidez na adolescência. A questão de formulações vacinais que sejam imunogênicas em fase precoce de vida, há uma aplicação importante no contexto de vacinas pediátricas e infecções emergentes, não somente para a infecção por HIV-1.

1.5 Imunidade no período neonatal

Neonatos possuem um sistema imunológico em desenvolvimento, relativamente imaturo com diferenças qualitativas e quantitativas em relação à adultos, além de pouca memória imunológica, o que aumenta sua

vulnerabilidade a agentes infecciosos (De Brito *et al.*, 2009). A imunidade mediada por linfócitos T e B em neonatos requer experiência antigênica prévia e leva tempo para se desenvolver. Nesta fase, neonatos dependem principalmente da imunidade passiva via transferência materna de anticorpos.

Em determinadas situações *in vitro*, as células dos neonatos são capazes de responder a adjuvantes de resposta inata semelhante às células de adultos, evidenciando a plasticidade do sistema imunológico neonatal. Este fato ressalta a importância do desenvolvimento de estratégias vacinais à patógenos a fim de potencializar a magnitude da resposta neonatal e promover resposta de memória imunológica de longa duração (De Brito *et al.*, 2009; Rigato *et al.*, 2009; Futata *et al.*, 2012).

Após a estimulação via receptores de reconhecimento de padrão (PRR - *pattern recognition receptor*), os monócitos / macrófagos e DCs de recém-nascidos humanos produzem um perfil de citocinas que difere de adultos (Kollmann *et al.*, 2017), com menor quantidade de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e citocinas promotora de Th1 (IFN- γ e IL-12p70) (Kollmann *et al.*, 2009). Os monócitos de recém-nascidos e as DCs convencionais (cDC) também produzem mais IL-10 em comparação aos adultos (Kollmann *et al.*, 2017). Um dos mecanismos envolvidos inclui altos níveis monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) nas células mononucleares, que atua como um mensageiro intracelular secundário que suprime Th1, mas aumenta a produção de citocinas Th2 e anti-inflamatórias (Levy *et al.*, 2006; Kollmann *et al.*, 2017).

As APCs em neonatos são imaturas quanto à função e possuem menor expressão de MHC II e moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, após ativação, o que leva a uma capacidade limitada de promover a proliferação de linfócitos T antígeno-específicos (Muthukkumar *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2006). Muitos desses fatores, característicos da imunidade inata neonatal, exercem papel importante no desenvolvimento de respostas adaptativas.

Quanto aos linfócitos T, em humanos são mais abundantes ao nascimento e diminuem a níveis adultos na primeira infância (Walker *et al.*, 2011). Os linfócitos T neonatais são em grande parte de fenótipo *naive* com presença marcante de células T reguladoras (T_{reg}) supressoras funcionalmente ativas (Goenka e Kollmann, 2015). Em modelos experimentais, há uma menor

quantidade em relação a camundongos adultos, além de desenvolverem preferencialmente uma resposta de memória Th2 (Adkins *et al.*, 2001).

A resposta Th1 diminuída nos neonatos se dá por uma ineficiente resposta de APCs no eixo IL-12/IFN γ , deficiência na fosforilação de STAT1, desvio para a resposta Th2, alteração da regulação epigenética do promotor de IFN- γ e o estado hipometilado da região promotora de citocinas Th2 que facilitam a expressão rápida e robusta dos genes *IL4* e *IL13* em camundongos (Adkins *et al.*, 2001; Rose *et al.*, 2007). A IL-4 reforça uma propensão do neonato a resposta Th2 por também inibir o desenvolvimento de células Th17 (Debock *et al.*, 2012). Outro mecanismo, é a sinalização para apoptose mediada pela IL-4 através do receptor alternativo IL-13R α 1, o qual é expresso em maior quantidade nas células Th1 dos neonatos, mas que são indetectáveis nas células de camundongos adultos (Li *et al.*, 2004).

Os recém-nascidos frequentemente apresentam respostas do tipo Th1 limitadas a algumas vacinas e patógenos, correlacionando-se com uma menor capacidade de células T CD4+ em produzir IFN- γ e de APCs em produzir citocinas que polarizam para Th1 (Debock e Flamand, 2014). Além disso, a indução de resposta CTL por vacinas é reduzida em recém-nascidos em comparação com adultos (Siegrist, 2001). É descrito que DCs neonatais murinas são deficientes em promover a apresentação cruzada de antígenos solúveis via MHC de classe I (Kollmann *et al.*, 2004).

Além da diminuição funcional das APCs e células T nos neonatos, a falta de um microambiente anatômico apropriado para a interação entre as DCs e as células T e B, pode gerar diferenças fenotípicas e funcionais das células B, que refletem na baixa produção de anticorpos.

Os linfócitos B neonatais expressam níveis mais baixos de CD40, uma das principais moléculas co-estimuladora que facilitam a interação entre as APCs, células T e B (Goenka e Kollmann, 2015). Além de possuir baixa capacidade proliferativa comparados a adultos com menor produção de IgG e IgA em resposta ao CD40L (Kaur *et al.*, 2007). As células B neonatais também apresentam baixa expressão de receptores TACI (ativador transmembrânico, modulador de cálcio, ligante de ciclofilina), BAFF-R (receptor do fator de ativação de célula B) e BCMA (antígeno de maturação de célula B), envolvidos na sobrevivência das células B, produção de anticorpos, mudança de isótipo e

interação com células T (Kaur *et al.*, 2007). Reduzidos níveis de TACI, podem justificar a suscetibilidade dos neonatos a infecções por bactérias encapsuladas (Katsenelson *et al.*, 2007). E influenciar na regulação das respostas à antígenos T-independentes (Castigli *et al.*, 2005), a qual está diminuída no período neonatal (Klein Klouwenberg e Bont, 2008).

A hipermutação somática das células B periféricas e da zona marginal começa *in utero* e levando à diversificação fetal do repertório de receptores de células B (Rechavi *et al.*, 2015). A capacidade do recém-nascido em desenvolver respostas de anticorpos depende da natureza do antígeno, como refletido na imunogenicidade das vacinas infantis padrão (Kollmann *et al.*, 2017). Por exemplo, a vacina contra o vírus da hepatite B induz respostas de anticorpos equivalentes em neonatos e adultos, a medida que a resposta de anticorpos pelas vacinas orais contra poliomielite, sarampo e rubéola aumenta com a idade da imunização (Ota *et al.*, 2004; Siegrist e Aspinall, 2009).

Há uma falha nas células estromais da medula óssea, vitais para a diferenciação e sobrevivência de plasmablastos de longa duração, o que confere com o rápido declínio dos níveis de anticorpos após a imunização, em contraste com crianças mais velhas e adultos (Pihlgren *et al.*, 2006). O sistema imunológico neonatal é caracterizado por uma limitada resposta de plasmócitos e células B de centro germinativo (CG) (Siegrist e Aspinall, 2009), e ocasionalmente pela presença de anticorpos maternos com propriedades imunomoduladoras (Niewiesk, 2014).

A resposta de células B de maneira T dependente é essencial no desenvolvimento da imunidade. Para isso, a microarquitetura dos tecidos linfoides secundários é de suma importância e requer folículos linfoides, rede de células dendríticas foliculares (FCDs - *follicular DCs*) e CGs (Goodnow *et al.*, 2010). Essas estruturas estão ausentes ao nascer em camundongos e se desenvolvem nos primeiros dias ou semanas de vida (Fu e Chaplin, 1999). A falta de resposta dos precursores de FDCs aos sinais linfoides em neonatos, retarda a maturação de FDC e a indução de CG, limitando assim as respostas primárias das células secretoras de anticorpos aos antígenos dependentes de T em fase precoce da vida (Pihlgren *et al.*, 2003).

Nesse contexto, as células T_{FH} promovem uma resposta completa de células B, incluindo as reações de CG que permitem uma resposta humoral

eficaz e duradoura (Breitfeld *et al.*, 2000; Schaerli *et al.*, 2000). Portanto, o desenvolvimento de formulações de vacinas capazes de melhorar as respostas neonatais mediadas por T_{FH} é uma estratégia promissora para o estabelecimento de resposta de anticorpos efetores de alta afinidade e longa duração.

1.6 Células T CD4+ e TCD8+ foliculares

As células T_{FH} são essenciais para a formação do CG nos folículos de células B de órgãos linfoides secundários, onde ocorre a mudança de isótipo de imunoglobulina, hipermutação somática e seleção de células B de alta afinidade. Além disto, é o local de intensa capacidade de proliferação e diferenciação de células plasmáticas de longa duração e células B de memória (Goodnow *et al.*, 2010). Em resposta a um antígeno, as células T_{FH} interagem especificamente com as células B cognatas, células T CD4+ convencionais e DCs promovendo as reações de CG e eficiente resposta de células B (Tangye e Tarlinton, 2009; Goodnow *et al.*, 2010).

As células T_{FH} expressam moléculas co-estimuladoras ICOS (*Inducible coestimulator protein*), moléculas inibidoras PD-1 (*programmed death-1 protein*), ligante de CD40 (CD40L), a proteína adaptadora citoplasmática SAP (*SLAM-associated protein*), o fator de transcrição Bcl-6 (*B cell lymphoma 6*), capaz de inibir a expressão de fatores T-bet, GATA3 e ROR γ t, além de secretarem a IL-21 (Nurieva *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2012).

A IL-21 é a principal citocina produzida pelas células T_{FH} , com efeito autócrino e parácrino sobre os linfócitos B foliculares (Bryant *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2012), além de contribuir para indução de isótipos de IgG (Avery *et al.*, 2008). O fator de transcrição Bcl-6 é necessário para a geração, manutenção e função de células T_{FH} (Nurieva *et al.*, 2009). Em contraste, o fator de transcrição Blimp-1, um antagonista de Bcl6, inibe a diferenciação de células T_{FH} , limitando assim as respostas de CG e de anticorpos pelas células B (Johnston *et al.*, 2009). Adicionalmente, a expressão de Blimp-1 também está associada ao desenvolvimento de plasmócitos (Shapiro-Shelef e Calame, 2005).

Diversos mecanismos são necessários para ativação da célula T CD4+ naíve e polarização para T_{FH}. As DCs interagem com células T CD4+ naíve via ICOS/ICOS-L que induz a expressão de Bcl-6 e CXCR5, e as citocinas derivadas de DCs, IL-6 e IL-27, promovem a expressão de Bcl-6 e c-Maf (figura 4). Por sua vez, c-Maf é capaz de induzir a produção de IL-21 *in vivo* e *in vitro* (Hiramatsu et al., 2010).

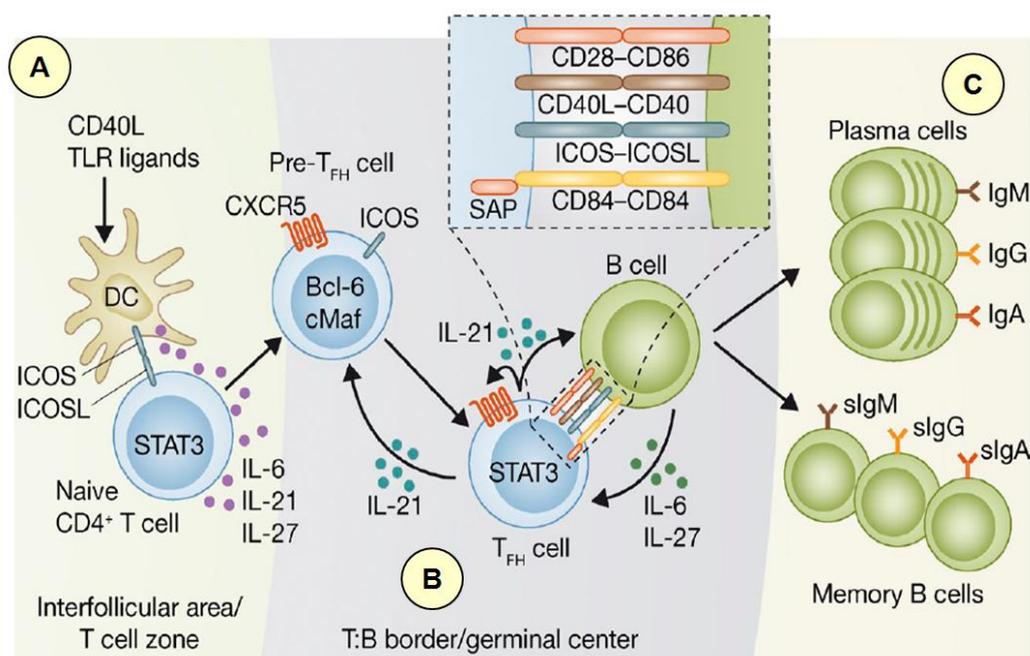


Figura 4. Diferenciação das células T_{FH}. (A) Células T CD4+ naíve são ativadas pela DCs na zona de células T via interações MHC-II/ receptor de célula T (TCR) e ICOS / ICOS-L (ligante de ICOS). DCs produzem IL-6 e IL-27 que promovem a expressão de Bcl-6 e cMaf, e produção de IL-21 de uma maneira dependente de STAT3. A expressão do CXCR5 permite o direcionamento para os folículos de célula B. (B) Linfócitos B antígeno-específicos interagem com células T_{FH} e fornecem sinais coestimuladores para manutenção do fenótipo T_{FH}. Em paralelo, as T_{FH} promovem ativação das células B e formação dos CGs. (C) Reações de CG levam a mudança de isótipo de imunoglobulina e hipermutação somática, com diferenciação em plasmócitos de vida longa e células B de memória. (Adaptado, (Ma et al., 2012).

Camundongos neonatos submetidos à imunização com ovalbumina são capazes de induzir células T_{FH} CD4+CXCR5+PD-1+, porém de lento desenvolvimento (Debock et al., 2013). As células T_{FH} neonatais expressam menores níveis de Bcl-6 e IL-21 e mostram localização inadequada no CG, com predominância nas regiões interfoliculares (Mastelic et al., 2012). Entretanto, a vacinação contendo adjuvante CpG em camundongos neonatos é capaz de reverter a expansão e o desenvolvimento limitado das células T_{FH} e CG (Mastelic et al., 2012).

A função das células T_{FH} no período neonatal depende de citocinas Th2, uma vez que a IL-4 é essencial para induzir seu desenvolvimento e localização nos CGs. A proporção de células T_{FH} em neonatos deficientes de IL-4 imunizados é significativamente reduzida. Além disso, a ausência de IL-4 afeta o perfil genético e a especificidade da célula B, uma vez que as células T_{FH} expressaram ROR γ t, IL-17 e aumento de IgG2a (Debock *et al.*, 2013).

As células T_{FH} são consideradas críticas para o desenvolvimento de imunidade protetora induzida por infecção ou vacina (Crotty, 2014). Neste contexto, uma gama de estudos concentram-se na promoção das T_{FH} para aumentar a eficácia vacinal. Já foi demonstrado que a imunização de camundongos com uma vacina de DNA que codifica gp120 do HIV-1, leva aumento da frequência de células T_{FH} , células B do CG e dos títulos de anticorpos antígeno-específicos (Hollister *et al.*, 2014).

Em resposta a infecções virais, células T CD8+ naive antígeno-específicas são primadas nas zonas de células T dos tecidos linfoides secundários e se diferenciam em CTLs que atuam na eliminação de células infectadas (Mueller *et al.*, 2013). No entanto, alguns mecanismos envolvidos na reação do CG e a função das células T CD8+ neste local não estão totalmente elucidados. Um subtipo de células T CD8+ que expressam marcadores de migração para região folicular com capacidade de entrar nessas áreas foram descritas em modelo de infecção viral, especialmente pelo HIV, e tem sido denominadas como células T CD8+ foliculares (T_{FC} - *T follicular cytotoxic cells*) (Leong *et al.*, 2016; Perdomo-Celis *et al.*, 2017).

Células T CD8+CXCR5+CCR7- foram descritas em tonsilas humanas, a expressão do receptor de quimiocina CXCR5 propicia a sua localização na região de folículos das células B e a ausência de CCR7, é uma característica do fenótipo de células de memória central (Quigley *et al.*, 2007).

A diferenciação das células T_{FC} é dependente dos fatores de transcrição Bcl6, E2A e TCF-1 e inibida pelos reguladores transcricionais Blimp1, Id2 e Id3. Blimp1 e E2A regularam diretamente a expressão de CXCR5 e, em conjunto com Bcl6 e TCF-1, formam um circuito transcricional que direciona o desenvolvimento de células T_{FC} (Leong *et al.*, 2016).

As células T_{FC} diferem das CTLs convencionais quanto ao fenótipo, perfil transcricional e funcional, com menor expressão dos transcritos relacionados à

citotoxicidade (granzima A e B, perforina e IFN- γ), e maior expressão de genes envolvidos no desenvolvimento de células T de memória, como receptor de IL-7 (IL-7R) e CD62L (Quigley *et al.*, 2007; Leong *et al.*, 2016).

É reconhecido que as células T_{FH} representam um importante reservatório da infecção pelo HIV, e que os CGs são sítios primários de replicação do vírus, inclusive responsáveis por manter uma replicação viral em indivíduos não virêmicos infectados pelo HIV sob terapia antiretroviral (ART - *antiretroviral therapy*) (Banga *et al.*, 2016). As células T_{FH} são altamente permissíveis ao HIV-1 e podem mudar o fenótipo, diminuindo a expressão de PD-1 e, em menor grau de CXCR5, caracterizando as T_{FH} como principais produtoras de HIV-1 na infecção crônica assintomática (Kohler *et al.*, 2016).

Na infecção independente por HIV ou vírus Epstein-Barr, os quais que causam latência em células T_{FH} e B respectivamente, a avaliação de tecido linfóide dos pacientes mostrou que as células T_{FC} foram responsáveis por controlar a infecção de células T_{FH} e linfócitos B nos folículos de células B (Leong *et al.*, 2016). Outro estudo mostrou que a modificação genética de células TCD8+ para expressar CXCR5, em macacos Rhesus foi capaz de direcionar estas aos folículos de células B, sugerindo ser uma interessante estratégia para eliminar os santuários virais, por auxiliar na eliminação dessa fonte persistente de vírus (Ayala *et al.*, 2017).

As células T_{FC} possuem eficiente capacidade citotóxica *in vitro* em células T_{FH} infectadas, através da utilização de anticorpo biespecífico, que combina a especificidade de um anticorpo altamente neutralizante ao HIV e um anticorpo anti-CD3 (anti-HIV/anti-CD3), capazes de redirecionar as T CD8+ foliculares para eliminar a células alvo (Petrovas *et al.*, 2017; Ferrando-Martinez *et al.*, 2018).

Contudo, ainda não se conhece se há geração de células T_{FH} e T_{FC} induzida por vacinas gênicas no período neonatal, o que pode fornecer informações na elaboração de estratégias vacinais futuras em crianças.

A hipótese do trabalho é que, considerando que a estratégia vacinal LG é capaz de promover elevados títulos de anticorpos e resposta de longa duração, na imunização neonatal a vacina seja capaz de promover a maturação do tecido linfóide, a geração de células T_{FH} e a permutação para IgG.

Conclusão

2. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho nos permite concluir que:

- A imunização neonatal com a vacina quimérica *LAMP/Gag* é potencialmente imunogênica em relação a vacina nativa *Gag*, promovendo resposta celular e humoral de longa duração, com geração de plasmócitos de vida longa, evidenciando adequada ativação de células T CD4+ no *priming* neonatal;
- A eficaz produção de anticorpos utilizando a estratégia *LAMP/Gag* foi decorrente da geração precoce de células T_{FH} efetoras, e conseqüentemente de células B de CG;
- A vacina *LAMP/Gag* contribui para maturação dos tecidos linfoides no período neonatal e induz expressão da enzima AID, que pode ser um dos mecanismos responsáveis pela resposta eficiente de anticorpos anti-Gag.

Referências

REFERÊNCIAS*

(CDC), C. F. D. C. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men-- New York City and California. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 30, n. 25, p. 305-8, Jul 1981. ISSN 0149-2195. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6789108> >.

ABDULHAQQ, S. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. **Immunol Res**, v. 42, n. 1-3, p. 219-32, 2008. ISSN 0257-277X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066740> >.

ADKINS, B.; BU, Y.; GUEVARA, P. The generation of Th memory in neonates versus adults: prolonged primary Th2 effector function and impaired development of Th1 memory effector function in murine neonates. **J Immunol**, v. 166, n. 2, p. 918-25, Jan 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11145668> >.

AFRAN, L. et al. HIV-exposed uninfected children: a growing population with a vulnerable immune system? **Clin Exp Immunol**, v. 176, n. 1, p. 11-22, Apr 2014. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24325737> >.

AKASAKI, K. et al. Human dendritic cell lysosome-associated membrane protein expressed in lung type II pneumocytes. **Arch Biochem Biophys**, v. 425, n. 2, p. 147-57, May 2004. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111122> >.

ALLEN, T. M. et al. Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 386-90, Sep 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11014195> >.

ARRUDA, L. B. et al. Dendritic cell-lysosomal-associated membrane protein (LAMP) and LAMP-1-HIV-1 gag chimeras have distinct cellular trafficking pathways and prime T and B cell responses to a diverse repertoire of epitopes. **J Immunol**, v. 177, n. 4, p. 2265-75, Aug 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16887987> >.

AVERY, D. T. et al. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. **J Immunol**, v. 181, n. 3, p. 1767-79, Aug 2008. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641314> >.

AYALA, V. I. et al. CXCR5-Dependent Entry of CD8 T Cells into Rhesus Macaque B-Cell Follides Achieved through T-Cell Engineering. **J Virol**, v. 91, n. 11, Jun 2017. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28298605> >.

AYINDE, D. et al. Limelight on two HIV/SIV accessory proteins in macrophage infection: is Vpx overshadowing Vpr? **Retrovirology**, v. 7, p. 35, Apr 2010. ISSN 1742-4690. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20380700> >.

BANGA, R. et al. PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. **Nat Med**, v. 22, n. 7, p. 754-61, Jul 2016. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27239760> >.

BAROUCH, D. H. et al. Protective efficacy of adenovirus/protein vaccines against SIV challenges in rhesus monkeys. **Science**, v. 349, n. 6245, p. 320-4, Jul 2015. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26138104> >.

BAROUCH, D. H.; KORBER, B. HIV-1 vaccine development after STEP. **Annu Rev Med**, v. 61, p. 153-67, 2010. ISSN 1545-326X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20059334> >.

BARRÉ-SINOUSI, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868-71, May 1983. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6189183> >.

BREITFELD, D. et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. **J Exp Med**, v. 192, n. 11, p. 1545-52, Dec 2000. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104797> >.

BRYANT, V. L. et al. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. **J Immunol**, v. 179, n. 12, p. 8180-90, Dec 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18056361> >.

BUCHBINDER, S. P. et al. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. **Lancet**, v. 372, n. 9653, p. 1881-1893, Nov 2008. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19012954> >.

CASTIGLI, E. et al. TAC1 is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. **Nat Genet**, v. 37, n. 8, p. 829-34, Aug 2005. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007086> >.

CHEN, C. H. et al. Boosting with recombinant vaccinia increases HPV-16 E7-specific T cell precursor frequencies of HPV-16 E7-expressing DNA vaccines. **Vaccine**, v. 18, n. 19, p. 2015-22, Apr 2000. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706963> >.

CHEN, J. W. et al. Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding lysosomal membrane glycoprotein mouse LAMP-1. Sequence similarity to proteins bearing onco-differentiation antigens. **J Biol Chem**, v. 263, n. 18, p. 8754-8, Jun 1988. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3379044> >.

CHIKHLIKAR, P. et al. DNA encoding an HIV-1 Gag/human lysosome-associated membrane protein-1 chimera elicits a broad cellular and humoral immune response in Rhesus macaques. **PLoS One**, v. 1, p. e135, Dec 2006. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17205139> >.

COHEN, M. S. et al. Acute HIV-1 Infection. **N Engl J Med**, v. 364, n. 20, p. 1943-54, May 2011. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21591946> >.

CROTTY, S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. **Immunity**, v. 41, n. 4, p. 529-42, Oct 2014. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25367570> >.

DE ARRUDA, L. B. et al. DNA vaccine encoding human immunodeficiency virus-1 Gag, targeted to the major histocompatibility complex II compartment by lysosomal-associated membrane protein, elicits enhanced long-term memory response. **Immunology**, v. 112, n. 1, p. 126-33, May 2004. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15129672> >.

DE BRITO, C. A.; GOLDONI, A. L.; SATO, M. N. Immune adjuvants in early life: targeting the innate immune system to overcome impaired adaptive response. **Immunotherapy**, v. 1, n. 5, p. 883-95, Sep 2009. ISSN 1750-7448. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20636030> >.

DE SAINT-VIS, B. et al. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. **Immunity**, v. 9, n. 3, p. 325-36, Sep 1998. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9768752> >.

DEBOCK, I. et al. Th17 alloimmunity prevents neonatal establishment of lymphoid chimerism in IL-4-deprived mice. **Am J Transplant**, v. 12, n. 1, p. 81-9, Jan 2012. ISSN 1600-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21992234> >.

DEBOCK, I.; FLAMAND, V. Unbalanced Neonatal CD4(+) T-Cell Immunity. **Front Immunol**, v. 5, p. 393, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25221551> >.

DEBOCK, I. et al. Neonatal follicular Th cell responses are impaired and modulated by IL-4. **J Immunol**, v. 191, n. 3, p. 1231-9, Aug 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23804713> >.

DOBAÑO, C. et al. Targeting antigen to MHC Class I and Class II antigen presentation pathways for malaria DNA vaccines. **Immunol Lett**, v. 111, n. 2, p. 92-102, Aug 2007. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17604849> >.

DUERR, A. et al. Extended follow-up confirms early vaccine-enhanced risk of HIV acquisition and demonstrates waning effect over time among participants in a randomized trial of recombinant adenovirus HIV vaccine (Step Study). **J Infect Dis**, v. 206, n. 2, p. 258-66, Jul 2012. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561365> >.

EMU, B. et al. HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. **J Virol**, v. 82, n. 11, p. 5398-407, Jun 2008. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18353945> >.

ESTCOURT, M. J.; MCMICHAEL, A. J.; HANKE, T. DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1. **Immunol Rev**, v. 199, p. 144-55, Jun 2004. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15233732> >.

FANALES-BELASIO, E. et al. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. **Ann Ist Super Sanita**, v. 46, n. 1, p. 5-14, 2010. ISSN 0021-2571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20348614> >.

FERRANDO-MARTINEZ, S. et al. Accumulation of follicular CD8+ T cells in pathogenic SIV infection. **J Clin Invest**, v. 128, n. 5, p. 2089-2103, May 2018. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29664020> >.

FLYNN, N. M. et al. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. **J Infect Dis**, v. 191, n. 5, p. 654-65, Mar 2005. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15688278> >.

FU, Y. X.; CHAPLIN, D. D. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 399-433, 1999. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10358764> >.

FUKUDA, M. et al. Cloning of cDNAs encoding human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Comparison of their deduced amino acid sequences. **J Biol Chem**, v. 263, n. 35, p. 18920-8, Dec 1988. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3198605> >.

FUTATA, E. A. et al. The neonatal immune system: immunomodulation of infections in early life. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 10, n. 3, p. 289-98, Mar 2012. ISSN 1744-8336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22397563> >.

GALLO, R. C. et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 500-3, May 1984. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6200936> >.

GODINHO, R. M. et al. Regulation of HIV-Gag expression and targeting to the endolysosomal/secretory pathway by the luminal domain of lysosomal-associated membrane protein (LAMP-1) enhance Gag-specific immune response. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99887, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24932692> >.

GOENKA, A.; KOLLMANN, T. R. Development of immunity in early life. **J Infect**, v. 71 Suppl 1, p. S112-20, Jun 2015. ISSN 1532-2742. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25934325> >.

GOLDONI, A. L. et al. Mucosal and systemic anti-GAG immunity induced by neonatal immunization with HIV LAMP/gag DNA vaccine in mice. **Immunobiology**, v. 216, n. 4, p. 505-12, Apr 2011. ISSN 1878-3279. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870310> >.

GOODNOW, C. C. et al. Control systems and decision making for antibody production. **Nat Immunol**, v. 11, n. 8, p. 681-8, Aug 2010. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644574> >.

GOULDER, P. J. et al. Mother-to-child transmission of HIV infection and CTL escape through HLA-A2-SLYNTVATL epitope sequence variation. **Immunol Lett**, v. 79, n. 1-2, p. 109-16, Nov 2001. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595297> >.

GRAY, G.; BUCHBINDER, S.; DUERR, A. Overview of STEP and Phambili trial results: two phase IIb test-of-concept studies investigating the efficacy of MRK adenovirus type 5 gag/pol/nef subtype B HIV vaccine. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 5, n. 5, p. 357-61, Sep 2010. ISSN 1746-6318. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20978374> >.

GRAY, G. E. et al. Safety and efficacy of the HVTN 503/Phambili study of a clade-B-based HIV-1 vaccine in South Africa: a double-blind, randomised, placebo-controlled test-of-concept phase 2b study. **Lancet Infect Dis**, v. 11, n. 7, p. 507-15, Jul 2011. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570355> >.

GREENE, W. C. A history of AIDS: looking back to see ahead. **Eur J Immunol**, v. 37 Suppl 1, p. S94-102, Nov 2007. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17972351> >.

GUARNIERI, F. G. et al. The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. **J Biol Chem**, v. 268, n. 3, p. 1941-6, Jan 1993. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8420968> >.

HAMMER, S. M. et al. Efficacy trial of a DNA/rAd5 HIV-1 preventive vaccine. **N Engl J Med**, v. 369, n. 22, p. 2083-92, Nov 2013. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24099601> >.

HANSEN, S. G. et al. Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. **Nat Med**, v. 15, n. 3, p. 293-9, Mar 2009. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19219024> >.

HEMELAAR, J. et al. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. **AIDS**, v. 20, n. 16, p. W13-23, Oct 2006. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053344> >.

HIRAMATSU, Y. et al. c-Maf activates the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and TGF-beta inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4+ T cells. **J Leukoc Biol**, v. 87, n. 4, p. 703-12, Apr 2010. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042469> >.

HIV Sequence Compendium. 2014.

HOBSON, P. et al. Mucosal immunization with DNA vaccines. **Methods**, v. 31, n. 3, p. 217-24, Nov 2003. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14511954> >.

HOLLISTER, K. et al. The role of follicular helper T cells and the germinal center in HIV-1 gp120 DNA prime and gp120 protein boost vaccination. **Hum Vaccin Immunother**, v. 10, n. 7, p. 1985-92, 2014. ISSN 2164-554X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25424808> >.

HOWARTH, M.; ELLIOTT, T. The processing of antigens delivered as DNA vaccines. **Immunol Rev**, v. 199, p. 27-39, Jun 2004. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15233724> >.

JIANG, D. B. et al. Recombinant DNA vaccine of Hantavirus Gn and LAMP1 induced long-term immune protection in mice. **Antiviral Res**, v. 138, p. 32-39, 02 2017. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27923570> >.

JOHNSTON, R. J. et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. **Science**, v. 325, n. 5943, p. 1006-10, Aug 2009. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19608860> >.

KALEEBU, P. et al. Immunogenicity of ALVAC-HIV vCP1521 in infants of HIV-1-infected women in Uganda (HPTN 027): the first pediatric HIV vaccine trial in Africa. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 65, n. 3, p. 268-77, Mar 2014. ISSN 1944-7884. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24091694> >.

KATSENELSON, N. et al. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 7, p. 1785-95, Jul 2007. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17557373> >.

KAUR, K. et al. Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. **Blood**, v. 110, n. 8, p. 2948-54, Oct 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17634409> >.

KEELE, B. F. et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. **Science**, v. 313, n. 5786, p. 523-6, Jul 2006. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16728595> >.

KIM, S. Y. et al. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. **J Virol**, v. 63, n. 9, p. 3708-13, Sep 1989. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2760980> >.

KLEIJMEER, M. J. et al. MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. **J Immunol**, v. 154, n. 11, p. 5715-24, Jun 1995. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7751623> >.

KLEIN KLOUWENBERG, P.; BONT, L. Neonatal and infantile immune responses to encapsulated bacteria and conjugate vaccines. **Clin Dev Immunol**, v. 2008, p. 628963, 2008. ISSN 1740-2530. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18825269> >.

KOHLER, S. L. et al. Germinal Center T Follicular Helper Cells Are Highly Permissive to HIV-1 and Alter Their Phenotype during Virus Replication. **J Immunol**, v. 196, n. 6, p. 2711-22, Mar 2016. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26873986> >.

KOLLMANN, T. R. et al. Neonatal innate TLR-mediated responses are distinct from those of adults. **J Immunol**, v. 183, n. 11, p. 7150-60, Dec 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917677> >.

_____. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. **Immunity**, v. 46, n. 3, p. 350-363, 03 2017. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28329702> >.

_____. Deficient MHC class I cross-presentation of soluble antigen by murine neonatal dendritic cells. **Blood**, v. 103, n. 11, p. 4240-2, Jun 2004. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14982880> >.

KORBER, B. et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1789-96, Jun 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10846155> >.

LEONG, Y. A. et al. CXCR5(+) follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles. **Nat Immunol**, v. 17, n. 10, p. 1187-96, Oct 2016. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27487330> >.

LEVY, O. et al. The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-alpha production in the human newborn. **J Immunol**, v. 177, n. 3, p. 1956-66, Aug 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849509> >.

LEWIS, D. B. et al. Newborn immunology: relevance to the clinician. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care**, v. 36, n. 5, p. 189-204, 2006 May-Jun 2006. ISSN 1538-5442. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16631097> >.

LI, L. et al. IL-4 utilizes an alternative receptor to drive apoptosis of Th1 cells and skews neonatal immunity toward Th2. **Immunity**, v. 20, n. 4, p. 429-40, Apr 2004. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084272> >.

LI, L.; PETROVSKY, N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. **Expert Rev Vaccines**, v. 15, n. 3, p. 313-29, 2016. ISSN 1744-8395. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26707950> >.

LU, Y. et al. Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. **Vaccine**, v. 21, n. 17-18, p. 2178-89, May 2003. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706709> >.

MA, C. S. et al. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. **J Exp Med**, v. 209, n. 7, p. 1241-53, Jul 2012. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753927> >.

MACIEL, M. et al. A DNA vaccine against yellow fever virus: development and evaluation. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 4, p. e0003693, Apr 2015. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25875109> >.

MARQUES, E. T. et al. HIV-1 p55Gag encoded in the lysosome-associated membrane protein-1 as a DNA plasmid vaccine chimera is highly expressed, traffics to the major histocompatibility class II compartment, and elicits enhanced immune responses. **J Biol Chem**, v. 278, n. 39, p. 37926-36, Sep 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824194> >.

MASTELIC, B. et al. Environmental and T cell-intrinsic factors limit the expansion of neonatal follicular T helper cells but may be circumvented by specific adjuvants. **J Immunol**, v. 189, n. 12, p. 5764-72, Dec 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23162125> >.

MCELRATH, M. J.; HAYNES, B. F. Induction of immunity to human immunodeficiency virus type-1 by vaccination. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 542-54, Oct 2010. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21029964> >.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico HIV/Aids 2016 2017.**

MUELLER, S. N. et al. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 137-61, 2013. ISSN 1545-3278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23215646> >.

MUTHUKKUMAR, S.; GOLDSTEIN, J.; STEIN, K. E. The ability of B cells and dendritic cells to present antigen increases during ontogeny. **J Immunol**, v. 165, n. 9, p. 4803-13, Nov 2000. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11046003> >.

NIEWIESK, S. Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. **Front Immunol**, v. 5, p. 446, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278941> >.

NORRIS, P. J. et al. Fine specificity and cross-clade reactivity of HIV type 1 Gag-specific CD4+ T cells. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 20, n. 3, p. 315-25, Mar 2004. ISSN 0889-2229. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15117455> >.

NURIEVA, R. I. et al. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. **Science**, v. 325, n. 5943, p. 1001-5, Aug 2009. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19628815> >.

OTA, M. O. et al. Hepatitis B immunisation induces higher antibody and memory Th2 responses in new-borns than in adults. **Vaccine**, v. 22, n. 3-4, p. 511-9, Jan 2004. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670334> >.

PERDOMO-CELIS, F.; TABORDA, N. A.; RUGELES, M. T. Follicular CD8. **Front Immunol**, v. 8, p. 1241, 2017. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29085360> >.

PETROVAS, C. et al. Follicular CD8 T cells accumulate in HIV infection and can kill infected cells in vitro via bispecific antibodies. **Sci Transl Med**, v. 9, n. 373, Jan 2017. ISSN 1946-6242. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28100833> >.

PIHLGREN, M. et al. Reduced ability of neonatal and early-life bone marrow stromal cells to support plasmablast survival. **J Immunol**, v. 176, n. 1, p. 165-72, Jan 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365407> >.

_____. Unresponsiveness to lymphoid-mediated signals at the neonatal follicular dendritic cell precursor level contributes to delayed germinal center induction and limitations of neonatal antibody responses to T-dependent antigens. **J Immunol**, v. 170, n. 6, p. 2824-32, Mar 2003. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626532> >.

PITISUTTITHUM, P. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. **J Infect Dis**, v. 194, n. 12, p. 1661-71, Dec 2006. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109337> >.

POLLARD, V. W.; MALIM, M. H. The HIV-1 Rev protein. **Annu Rev Microbiol**, v. 52, p. 491-532, 1998. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9891806> >.

QUIGLEY, M. F. et al. CXCR5+ CCR7- CD8 T cells are early effector memory cells that infiltrate tonsil B cell follicles. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 12, p. 3352-62, Dec 2007. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000950> >.

RAJCÁNI, J.; MOSKO, T.; REZUCHOVÁ, I. Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved? **Rev Med Virol**, v. 15, n. 5, p. 303-25, 2005 Sep-Oct 2005. ISSN 1052-9276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15906276> >.

RECHAVI, E. et al. Timely and spatially regulated maturation of B and T cell repertoire during human fetal development. **Sci Transl Med**, v. 7, n. 276, p. 276ra25, Feb 2015. ISSN 1946-6242. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25717098> >.

RERKS-NGARM, S. et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. **N Engl J Med**, v. 361, n. 23, p. 2209-20, Dec 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843557> >.

RICHMAN, D. D. et al. The challenge of finding a cure for HIV infection. **Science**, v. 323, n. 5919, p. 1304-7, Mar 2009. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19265012> >.

RIGATO, P. O. et al. Maternal immunization to modulate the development of allergic response and pathogen infections. **Immunotherapy**, v. 1, n. 1, p. 141-56, Jan 2009. ISSN 1750-7448. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20635979> >.

_____. Immunization of neonatal mice with LAMP/p55 HIV gag DNA elicits robust immune responses that last to adulthood. **Virology**, v. 406, n. 1, p. 37-47, Oct 2010. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20667577> >.

_____. Maternal LAMP/p55gagHIV-1 DNA immunization induces in utero priming and a long-lasting immune response in vaccinated neonates. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31608, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22355381> >.

ROBERTSON, D. L. et al. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**, v. 288, n. 5463, p. 55-6, Apr 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766634> >.

ROLLAND, M. et al. Increased HIV-1 vaccine efficacy against viruses with genetic signatures in Env V2. **Nature**, v. 490, n. 7420, p. 417-20, Oct 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22960785> >.

ROSE, S. et al. Murine neonatal CD4+ cells are poised for rapid Th2 effector-like function. **J Immunol**, v. 178, n. 5, p. 2667-78, Mar 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17312108> >.

ROWELL, J. F. et al. Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. **J Immunol**, v. 155, n. 4, p. 1818-28, Aug 1995. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636236> >.

ROWLAND-JONES, S. L. Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 4, p. 343-8, 04 2003. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12669024> >.

RUFF, A. L. et al. The enhanced immune response to the HIV gp160/LAMP chimeric gene product targeted to the lysosome membrane protein trafficking pathway. **J Biol Chem**, v. 272, n. 13, p. 8671-8, Mar 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9079699> >.

SACHA, J. B. et al. Gag-specific CD8+ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. **J Immunol**, v. 178, n. 5, p. 2746-54, Mar 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17312117> >.

SCHAERLI, P. et al. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. **J Exp Med**, v. 192, n. 11, p. 1553-62, Dec 2000. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104798> >.

SHAPIRO-SHELEF, M.; CALAME, K. Regulation of plasma-cell development. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 3, p. 230-42, Mar 2005. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738953> >.

SIEGRIST, C. A. Neonatal and early life vaccinology. **Vaccine**, v. 19, n. 25-26, p. 3331-46, May 2001. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348697> >.

SIEGRIST, C. A.; ASPINALL, R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 3, p. 185-94, Mar 2009. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19240757> >.

STEPHENSON, K. E.; D'OUTO, H. T.; BAROUCH, D. H. New concepts in HIV-1 vaccine development. **Curr Opin Immunol**, v. 41, p. 39-46, Aug 2016. ISSN 1879-0372. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27268856> >.

STEVENSON, F. K. DNA vaccines and adjuvants. **Immunol Rev**, v. 199, p. 5-8, Jun 2004. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15233722> >.

SUSCHAK, J. J.; WILLIAMS, J. A.; SCHMALJOHN, C. S. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. **Hum Vaccin Immunother**, v. 13, n. 12, p. 2837-2848, Dec 2017. ISSN 2164-554X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28604157> >.

TANGYE, S. G.; TARLINTON, D. M. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 8, p. 2065-75, Aug 2009. ISSN 1521-4141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19637202> >.

TURNER, B. G.; SUMMERS, M. F. Structural biology of HIV. **J Mol Biol**, v. 285, n. 1, p. 1-32, Jan 1999. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9878383> >.

UNAIDS. **UNAIDS DATA 2017** 2017.

VATAKIS, D. N.; KOH, Y. T.; MCMILLAN, M. CD4+ T cell epitope affinity to MHC II influences the magnitude of CTL responses elicited by DNA epitope vaccines. **Vaccine**, v. 23, n. 20, p. 2639-46, Apr 2005. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15780447> >.

WALKER, J. C. et al. Development of lymphocyte subpopulations in preterm infants. **Scand J Immunol**, v. 73, n. 1, p. 53-8, Jan 2011. ISSN 1365-3083. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21129003> >.

WILSON, N. A. et al. Vaccine-induced cellular responses control simian immunodeficiency virus replication after heterologous challenge. **J Virol**, v. 83, n. 13, p. 6508-21, Jul 2009. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19403685> >.

WU, T. C. et al. Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 25, p. 11671-5, Dec 1995. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524826> >.

XU, Y.; YUEN, P. W.; LAM, J. K. Intranasal DNA Vaccine for Protection against Respiratory Infectious Diseases: The Delivery Perspectives. **Pharmaceutics**, v. 6, n. 3, p. 378-415, Jul 2014. ISSN 1999-4923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25014738> >.

ZHANG, H. et al. Human immunodeficiency virus type 1 gag-specific mucosal immunity after oral immunization with papillomavirus pseudoviruses encoding gag. **J Virol**, v. 78, n. 19, p. 10249-57, Oct 2004. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15367590> >.