

## VACINAS CONTRA RETROVÍRUS: MODELOS E DESAFIOS NO DESENVOLVIMENTO DE VACINA PARA HIV

*Vaccines Against Retrovirus: Models and Challenges in Development of a Vaccine Against HIV*

**Antônio Augusto Fonseca Júnior<sup>1</sup>; Jenner K. Pimenta dos Reis<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular, LANAGRO/MG - Av. Rômulo Joviano, s/n, Caixa Postal 50, Pedro Leopoldo, MG CEP 33600-000

<sup>2</sup>Laboratório de Retrovirose, Escola de Veterinária, UFMG - Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, CEP 31270-901

*Recebido em 02/06/2009 - Aceito em 28/10/2009*

**Resumo:** As pesquisas para se encontrar uma vacina contra o HIV já duram mais de vinte e cinco anos. Até o momento, nenhum resultado satisfatório foi encontrado. Vacinas promissoras falharam, causando consternação na comunidade científica. Talvez algumas respostas e modelos para essa vacina possam ser encontrados não apenas nos símios usualmente utilizados, mas na pesquisa veterinária. Essa revisão pretende abordar as falhas e sucessos conseguidos em outros mamíferos e relacionar os dados com as pesquisas recentes da vacina contra o HIV.

**Palavras-chave:** HIV, Virologia, Imunidade, Vacinas

**Abstract:** The researchs to find a vaccine against HIV began more than twenty-five years ago. To date, no satisfactory result was found. Promising vaccines failed, causing consternation in the scientific community. Maybe some answers and models for this vaccine can be found not only in simians usually used, but in veterinary research. This review aims to address the failures and successes achieved in other mammals and connect the data with recent research on the vaccine against HIV.

**Key-words:** HIV, Virology, Immunity, Vaccines

## Introdução

Os males advindos de microrganismos atingem qualquer espécie viva. Admite-se que existe pelo menos um vírus para cada espécie no planeta, podendo esse ser causador de alguma enfermidade ou simplesmente um agente replicante que faz uma passagem rápida e furtiva pelo organismo. Infelizmente, é natural que existam alguns hóspedes que causem incômodo e um grupo desses, os Retrovírus, são seres mais que inoportunos que perturbam a vida de diversas espécies a começar pelos humanos e seguindo pelos símios, felinos e eqüinos. A família *Retroviridae* segue como um mal que, com agentes que distribuídos entre várias espécies, dita um desafio para a sobrevivência e para a ciência.

Dentre as doenças retrovirais, a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) está entre os grandes desafios. Já se alcança a terceira década desde o início da epidemia em que 65 milhões de pessoas foram infectadas. Catorze mil novas infecções ocorrem diariamente em todo o mundo, 12 mil dessas em pessoas entre 15 e 49 anos (FAUCI, 2006).

O causador dessa terrível pandemia é o HIV (vírus da imunodeficiência humana). Diversos esforços já foram despendidos na tentativa de detê-lo, seja no estágio de infecção ou para diminuir os graves efeitos por ele causados. A tentativa de diminuir os danos gerados pelo HIV-1 (o principal agente entre os dois tipos de grupos de vírus causadores da AIDS) tem encontrado grande sucesso. Agentes antiretrovirais podem minimizar a replicação viral ao serem administrados em uma terapia antiretroviral altamente ativa (HAART; *highly active antiretroviral therapy*). Geralmente são administradas de três a quatro drogas de pelo

menos duas classes diferentes capazes de inibir várias etapas da replicação viral (ADAMSOM & FREED, 2008). Essas são boas novas que permitiram melhorar a qualidade de vida dos infectados, no entanto não atendem o principal anseio da humanidade, uma cura ou, se livrar desse mal ao impedir a infecção.

A melhor resposta para o vírus seria uma vacina. Trabalhar com a cura de um agente como esse, um retrovírus capaz de se integrar o genoma do hospedeiro, ainda não se encontra nos prospectos da ciência, mas a vacina é um sonho a ser alcançado e cujos esforços continuam em diversas pesquisas. Os resultados até o momento estão mais ligados a novas descobertas do que a sucessos. O recente fracasso da vacina da Merck gerou consternação no meio científico. A empresa foi obrigada a interromper testes clínicos de alta escala em humanos ao descobrir que os peptídeos gerados pelo adenovírus utilizado como vetor não só não protegiam contra a infecção, mas também aumentavam a suscetibilidade das células à entrada do HIV-1. O pessimismo gerado por esses resultados foi tamanho que no editorial da revista Nature a principal chamada foi *Don't Stop Me Now* (Não me Pare Agora) (NATURE, 2008).

As pesquisas realmente não podem parar. Daí a necessidade de se observar não apenas o HIV-1, mas procurar pelas respostas que a família *Retroviridae* pode conceder. A partir de trabalhos realizados com retrovírus de outras espécies, a replicação do vírus e os métodos de escape do sistema imune e incubação podem ser compreendidos. Novas vacinas podem ser testadas com maior liberdade e sem as pesadas restrições ao se trabalhar com humanos.

Essa revisão busca tratar justamente dos avanços conseguidos na área veterinária, a fonte de muitas respostas para o entendimento da virologia humana. Talvez as melhores respostas se encontrem em agente que debilitam espécies que estejam filogeneticamente próximas da humanidade (como os símios) ou que estejam tão próximos fisicamente (como eqüinos e felinos). Como metodologia, pretende-se uma breve explanação sobre os vírus sobre o vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da anemia infecciosa eqüina (EIAV) e dois vírus pertencentes ao grupo dos Lentivírus dos Pequenos Ruminantes (SRLV) conhecidos como vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) e vírus maedi-visna (MVV), seguidos por algumas das pesquisas mais recentes sobre o assunto.

O vírus da imunodeficiência símia (SIV) não será abordado, mas apenas citado. Apesar de ser inócuo para macacos africanos, quando aplicados em macacos rhesus geram uma infecção similar ao do HIV-1. Um vírus híbrido (SHIV) com o SIV completo expressando o envelope do vírus da AIDS, é utilizado em outros modelos animais. Para uma revisão detalhada desses, atentar para os trabalhos de Ambrose et al. (2007) e Hu (2005).

### Tipos de vacinas

As vacinas abordadas nesse trabalho serão divididas em quatro tipos. A primeira delas, **vacinas inativadas**, geralmente lida com o vírus completo inativado por formalina ou calor com resposta imune principalmente humoral. Geralmente não geram uma resposta potente por parte dos linfócitos T citotóxicos (CTL) do complexo maior de

histocompatibilidade de classe I (MHC-I). Essa seria necessária para a eliminação total das células infectadas pelos lentivírus. Existe ainda o fato de não serem efetivas contra variantes virais (ISSEL et al., 1992).

As **vacinas com subunidades** trabalham com partículas do vírus expressas por diversos mecanismos. Porções imunogênicas de *Env* ou *Gag* são as mais utilizadas. Vacinas contendo peptídeos sintéticos com epitopos múltiplos para linfócitos Th, células B e CTL podem gerar respostas protetoras contra microrganismos (ANN & WHITTON, 1997). A estratégia de ligar peptídeos em peptídeos é superior à de simplesmente se usar conjugados de proteínas portadoras devido ao fenômeno da supressão epitopo-específica. A mesma ocorre quando existe uma imunidade preexistente ou resposta imundominante à proteína portadora, o que previne a indução de anticorpos contra o peptídeo sintético conjugado (KYDD et al., 1994).

**Vacinas de DNA** oferecem muitos dos benefícios de vacinas vivas sem os riscos inerentes como reversão da virulência. Também podem ser utilizadas em neonatos por não sofrerem interferência dos anticorpos maternos (MEALEY et al., 2007). No tópico de vacinas de DNA serão abordados também as vacinas que utilizem vetores, outros vírus, geralmente inócuos, carreando proteínas heterólogas capazes de gerar a resposta imune.

As **vacinas vivas** lidam com o microorganismo ainda ativo, porém atenuado por mutações após adaptação à células de linhagem ou deleção de fatores de virulência ou mecanismos de regulação da replicação. São eficientes em estimular resposta imune celular,

mas têm a desvantagem de poderem resultar em reversão da virulência seja por mutações ou por recombinação com vírus infectante. Ainda podem gerar uma infecção persistente no organismo, que pode ser perigosa a longo prazo. Deve-se ainda lidar com cuidado com o nível da atenuação que pode acarretar em diminuição da eficácia da vacina (HOFMAN et al., 2003).

### **A Família *Retroviridae***

Os retrovírus são vírus RNA capazes de realizar a transcrição reversa desse ácido nucléico e integrar seu genoma ao do hospedeiro. Dentre as divisões da família *Retroviridae*, está o gênero Lentivírus que inclui o agente causador da AIDS, o HIV e outros como o vírus da imunodeficiência símia (SIV) o vírus da anemia infecciosa eqüina (EIAV) e o vírus da imunodeficiência felina. Como regra, todos são compostos de duas fitas únicas de RNA e enzimas não-estruturais como a transcriptase reversa e integrase dentro de um capsídeo protéico que, por sua vez, se encontra envolto em um envelope lipoprotéico.

O genoma dos retrovírus está organizado em três regiões principais. *Gag* (*group specific antigen*) codifica as proteínas estruturais internas. *Pol* (*polymerase*) contém as ORFs (*open reading frames* ou janelas abertas de leitura) das enzimas virais como transcriptase reversa, protease, integrase e RNase H. *Env* (*envelope*) constitui a região responsável pela codificação das glicoproteínas do envelope (CARTER & SAUNDER, 2007).

Um dos passos fundamentais da infecção pelos retrovírus é a integração do genoma ao DNA do hospedeiro. Após a adesão à membrana

celular e penetração, a transcriptase reversa encarrega-se de polimerizar uma molécula de DNA utilizando como molde o genoma RNA viral e como iniciadores um par de RNA transportadores presentes no capsídeo viral e derivados de uma infecção prévia. A partir daí, a replicação tem-se início utilizando-se o pró-vírus (DNA viral integrado) como molde para a codificação das proteínas.

### **Pesquisas Recentes em Modelos Animais**

#### **Anemia Infecciosa Eqüina (AIE)**

O vírus da anemia infecciosa eqüina é um lentivírus com tropismo por macrófagos. Causa uma infecção persistente em eqüinos e está distribuído mundialmente. Associa-se com sintomas como febre, anemia, trombocitopenia, edema (Sellin et al., 1994). Apesar das semelhanças genéticas com o HIV-1, tem um percurso único da enfermidade em na Ordem. Enquanto humanos e outros animais acometidos por lentivírus tendem a uma doença degenerativa e progressiva ou a imunossupressão, os eqüinos acometidos caracterizam-se por ciclos recorrentes e dinâmicos dos sintomas durante o primeiro ano da infecção. Cada um desses ciclos está associado a emergência de novas variantes virais com características diferentes da população anterior (HAMMOND et al., 2000).

Esse estado crônico dura entre seis e doze meses após a infecção, após o que o animal passa para um estado inaparente em que não se demonstra sinais clínicos (HAMMOND et al., 1997). É interessante notar que o animal não adquire esse estado por

eliminação total do vírus, mas sim pelo controle imunológico da replicação do mesmo. Os níveis de vírus infectantes no plasma diminuem somente devido à intervenção por uma resposta imune específica ao EIAV mediada tanto por fatores humorais quanto celulares do hospedeiro. Os portadores inaparentes são altamente resistentes à exposição adicional por cepas altamente virulentas, o que sugere que a resposta imune não apenas controla a infecção existente, mas garante um alto nível de imunidade profilática (TAGMYER et al., 2007). Somados esses fatores, o EIAV demonstra-se como um ótimo modelo para o estudo do HIV-1, sem contar o fato óbvio de que uma vacina para esse lentivírus auxiliaria muito nos programas de erradicação da anemia infecciosa equina que quase sempre necessitam do sacrifício dos animais infectados.

### **Vacina Inativada**

A eficácia de vacinas inativadas contendo o vírion completo do EIAV foi testada em alguns experimentos. Nenhum deles apresentou um resultado satisfatório. O primeiro foi realizado com a inativação do vírus por formalina e adição de subunidades de glicoproteínas do envelope. A vacinação não impediu a infecção por uma estirpe heteróloga do EIAV. Ao se inocular unicamente as subunidades, houve um aumento da virulência (ISSEL et al., 1992).

Uma outra tentativa com o vírus completo inativado foi elaborado posteriormente, agora com a intenção de se ligar os vírions a partículas de óxido de ferro. Pretendeu-se avaliar a capacidade de essa preparação antigênica com multicomponentes

particulados ser processada e apresentada pelas células fagocitárias para reconhecimento dos CTL. A vacinação não foi suficiente para gerar uma proteção eficiente ou imunidade estéril quando os animais foram expostos ao vírus, apesar de ter havido uma redução da carga viral no plasma e atraso no aparecimento dos sintomas clínicos. O estudo gerou resultados interessantes ao demonstrar que a produção efetiva de anticorpos contra glicoproteínas do envelope dos lentivírus depende dos meios qualitativos em que o antígeno é apresentando ao braço humoral do sistema imune (HAMMOND et al., 1999).

### **Vacina com Subunidades**

Pôneis foram imunizados com subunidades de gp90 expressadas em baculovírus e em seguida desafiados com uma estirpe virulenta do EIAV. Os resultados foram bastante peculiares. Houve tanto a inexistência de doença clínica quanto o severo aumento dos sintomas. O RNA viral foi encontrado no plasma de todos os animais testados (RAABE et al., 1998).

Lonning et al. (1999a) procuraram por epitopos nas proteínas p26 e p15 com a intenção de encontrar alvos que gerassem resposta celular e fossem suficientemente conservados para serem utilizados como vacinas. As mesmas possuíam regiões homólogas com as de outros lentivírus contra essas outras infecções, o que poderia ajudar a entender o processo de proteção. A maioria desses foi encontrada na p26, mas epitopos múltiplos para linfócitos Th foram encontrados em p15.

Um peptídeo sintético da proteína 26 também foi utilizado em conjunto com uma das glicoproteínas do envelope, gp45, para se verificar as respostas humoral e celular, tendo como base as regiões altamente conservadas (aminoácidos 523 a 547 em gp45 e 318 a 346 em p26). Foi feita a inoculação em animais portadores e todos geraram anticorpos. Houve proliferação de linfócitos em 80% dos animais em resposta a pelo menos um peptídeo (SOUTULLO et al., 2005). Experimento semelhante foi realizado pelo mesmo grupo, agora sintetizando peptídeos para gp90 e gp45, no entanto medindo aqui o perfil de citocinas através da quantificação do mRNA. Todos os animais responderam à seqüência de aminoácidos da primeira glicoproteína, mas apenas 60% apresentaram modificação no perfil em relação à segunda (BAILAT et al., 2008).

Epítopos para CTL são geralmente compostos de 8 a 12 aminoácidos gerado no interior do citoplasma após clivagem de seqüências maiores na via de processamento do MCH de classe I. Resíduos que flanqueiam essa área e modificações químicas como glicosilação e adição de lipídeos podem modificar a ação da protease que gerará essas seqüências curtas (MICHELETTI et al., 2000). Esse entendimento levou a um teste com uma lipoproteína ligada a um peptídeo sintético derivado de p26 ou de gp90 e ainda a um peptídeo antigênico múltiplo (MAP). Ao se comparar as respostas *in vitro* com os epítopos livres, partículas virais ou lipopetídeo sem MAP, percebeu-se que todos geravam estímulo de CTL igual ou inferior. Os resultados demonstraram também que as respostas dependiam do haplótipo de MCH I, o que indica

uma restrição da utilização dos mesmos em animais *outbred* (RIDGELY et al., 2002).

Esses mesmos lipopeptídeos foram usados para imunização de três cavalos com haplótipos de MHC I específicos. Os animais foram desafiados e todos apresentaram viremia, febre e trombocitopenia. Quando comparados com os alvos não imunizados, verificou-se que os sintomas eram estatisticamente inferiores. A explicação para o fato se deve à menor carga viral apresentada em dois dos animais inoculados com os lipopeptídeos (RIDGELY et al., 2003).

Testes com peptídeos realizados por Fraser et al. (2005) não foram nada animadores. Houve uma ampla reação linfocitária por parte dos animais inoculados, demonstrando que o MHC de classe II desses animais era capaz de apresentar as seqüências em teste. Os animais foram desafiados e descobriu-se que, apesar das respostas a peptídeos (nesse trabalho derivados dos genes Gag e Pol) e de resposta CTL duas semanas após a inoculação dos vírus, não houve proteção significativa. Os autores relatam a dificuldade de se induzir uma imunização consistente, mesmo quando se controla diversas variáveis como os peptídeos e os haplótipos do MHC classe I e classe II.

### **Vacinas com DNA Recombinante**

As tentativas de se desenvolver uma vacina de DNA para o EIAV primeiro usaram as glicoproteínas do envelope, devido a sua capacidade de gerar uma resposta imune maior. Um plasmídeo de baixo número de cópias contendo *Env*, um promotor de citomegalovírus e um sinal de poliadenilação do

hormônio de crescimento bovino. Uma baixa produção de gp90 foi detectada, mas também de dois polipeptídeos com 29 e 20 kDa, provavelmente Rev, responsável por se ligar ao mRNA viral não processado e exportá-lo para o citoplasma. Julgando que o processamento alternativo durante a expressão de *Env* fosse responsável essa produção indesejada e a mesma diminuísse a expressão de gp90, inseriu-se uma mutação para se evitar o problema. Ainda sim, não houve um aumento significativo da expressão. A imunogenicidade foi pobre com pouca resposta humoral em camundongos. O experimento permitiu entender que *Env* provavelmente não seria uma boa opção para uma vacina de DNA (ZHOU et al., 2002).

Outro trabalho lidou com genes diferentes. Um plasmídeo codificante para as proteínas Gag p15 e p26 foi sintetizado com códons otimizados para maior imunogenicidade em cavalos. A inoculação desse plasmídeo foi acompanhada de um outro codificante para interleucina 12 com a intenção de exacerbar a resposta imune. O teste *in vivo* foi realizado em potros neonatais (o experimento também avaliava uma vacina de DNA para *Rhodococcus equi*, importante causador de enfermidades em cavalos jovens) e em cavalos adultos. Nesses últimos, houve a indução de anticorpos específicos e proliferação de linfócitos, mas não de CTL sem que a presença da interleucina alterasse os resultados. Os filhotes tiveram uma resposta fraca. Percebeu-se também que a rota de administração e a dose eram variáveis importantes. A via intramuscular provou-se mais eficiente do que intradérmica, além de se notar, mais por teste científico do que por sugestão de rota de administração, a eficiência

da aplicação intratraqueal (MEALEY et al., 2007).

Ainda que não seja uma vacina de DNA e tenha obtido resposta tão pouco animadoras quanto os citados anteriormente, um outro experimento merece ser mencionado pela peculiaridade do vetor. Lonning et al. (1999b) utilizaram um vetor retroviral contendo promotores de citomegalovírus, vírus símio SV40 e vírus do sarcoma murino de Moloney (para expressão de Gag/Pr e gp90) e *Env* do vírus da leucemia do gibão para internalização. Apesar da resposta *in vitro*, somente um dos cinco animais inoculados via intramuscular geraram uma resposta com CTL específicos para EIAV.

### **Vacina Viva**

Vacinas vivas atenuadas são um campo de estudo contínuo para o combate à AIE. O primeiro relato de funcionamento de uma dessas é da China onde se utilizou um vírus vivo para o controle da enfermidade durante a década de 80 do século XX. O processo de atenuação foi realizado em três estágios. Primeiramente foram feitas dezesseis passagens em cavalos para se obter uma estirpe patogênica, após o que se inoculou sucessivamente 133 jumentos. O resultado desse segundo processo foi uma estirpe mais virulenta que foi logo submetida a sucessivas passagens em cultivo *in vitro* de macrófagos de asininos de onde surgiu o vírus atenuado que seria utilizado denominado DLV. Os testes clínicos em 500 cavalos e jumentos demonstraram a estabilidade da vacina visto não se percebeu a reversão da virulência. Como vantagens citadas, tem-se a inexistência de

reações adversas sistêmicas ou locais e ainda a resistência a desafios com EIAV homólogos e heterólogos (SHEN et al., 1979).

A vacinação de animais foi interrompida na China após ser declarado o controle da enfermidade. Após isso, poucos trabalhos foram realizados para se compreender o motivo da atenuação da estirpe. Publicações recentes começaram a elucidar as perguntas sobre o DLV. Percebeu-se que clones do vírus tornavam-se mais virulentos após algumas poucas mutações críticas em *gag* e em *env*. Três dessas levariam à substituição de aminoácidos em p15 e em p9, o que estaria associado a replicação viral. Outras quatro mutações não sinônimas em gp90 levariam à perda de sítios de glicosilação importantes para diminuir a disponibilidade de epítopos para o MHC (SHEN et al., 2006). Outro estudo relata o início do entendimento dos mecanismos de proteção imunológica. Cavalos vacinados com DLV foram desafiados com uma estirpe homóloga. Resultados indicaram o aumento da produção de citocinas, a diminuição dos níveis de interferon  $\delta$  e interleucina 12 e, três meses após o desafio, altos níveis de interleucina 2. Nos controles negativos, os níveis de citocinas não se sustentaram ou flutuaram (ZHANG et al., 2007).

A produção de uma vacina norte-americana é mais recente. O desenvolvimento de um pró-vírus atenuado denominado EIAV<sub>UK</sub> $\Delta$ S2 se deu a partir da inativação do gene acessório S2 o que gera regulação negativa da replicação *in vivo* sem alterar o crescimento *in vitro*. Imunização com essa estirpe permite a maturação do sistema imune em seis meses. O desafio com cepa padrão PV demonstrou a eficiência da resposta

imunológica visto que o vírus não foi detectado no plasma (LI et al., 2003). Publicações posteriores correlacionaram a importância da maturação do sistema imune com a eficiência da vacina. Uma proteção eficiente foi estabelecida somente seis meses após a inoculação. O nível de atenuação do vírus e sua replicação também estariam relacionados. Testes com estirpes mais atenuadas deram origem a respostas relativamente imaturas nesse mesmo período (CRAIGO et al., 2005).

Os estudos com a vacina norte-americana não pararam nesse ponto. Resultados posteriores demonstraram a importância de estudos aprofundados dos vírus atenuados e os reais efeitos de sua inoculação no sistema imune. Com o objetivo de determinar se a vacinação realmente prevenia a infecção persistente após o desafio, foi empregado um método de imunossupressão de doze animais com dexametasona por 14 dias. Resultados anteriores a esse experimento demonstraram que o vírus do desafio não era encontrado no plasma ao se verificar sua presença por RT-PCR em tempo real. No entanto, cinco dos cavalos imunossuprimidos apresentaram apenas esse último vírus no plasma e um sexto era portador também da estirpe vacinal. Encontrou-se somente o vírus derivado da vacinação dos últimos seis animais, sugerindo-se um total de proteção de 50%. Os autores consideraram, ainda sim, um sucesso relativo na imunização. Esse foi um dos poucos experimentos em que além de se evitar os sintomas clínicos, a vacinação impediu o estabelecimento da infecção persistente. Uma preocupação gerada foi a replicação do EIAV vacinal nos cavalos, o que sugere que o mesmo



poderia causar a enfermidade em animais imunossuprimidos (CRAIGO et al., 2007a).

A mesma vacina foi utilizada como base para um experimento fundamental para a associação das mutações do vírus e o escape do sistema imune. Animais vacinados foi desafiados com estirpes virais com variações progressivamente maiores. Percebeu-se que tão pouco quanto 6% de diversidade de aminoácidos reduz em 25% a proteção contra AIE. Se a divergência do *ENV* alcançar 13%, a proteção cai em 50%. Traçando-se um relação linear, os pesquisadores concluíram que se o vírus infectante divergisse em 23% da amostra vacinal, nenhum dos animais teria defesa contra a enfermidade (CRAIGO et al., 2007b)

### **Imunodeficiência Felina**

O FIV é o vírus causador da imunodeficiência felina (FI), uma enfermidade relacionada com sintomas como linfadenopatia, febre, leucopenia, gengivite, conjuntivite e diarreia em felinos. O vírus foi primeiramente isolado nos Estados Unidos em 1987 (PEDERSEN et al., 1987). Caracterizado como um lentivírus, tem um genoma similar ao do HIV-1, com apenas algumas diferenças. Uma delas é o fato de codificar a pirofosfatase deoxiuridina na região *Pol*, uma enzima responsável pela diminuição dos níveis celulares de dUTP, cuja presença pode provocar sua incorporação no cDNA viral. Essa atividade permite que o FIV infecte células que não estão em divisão como os macrófagos e é substituída no HIV-1 pela Vpr (LERNER et al., 1995). Os receptores utilizados pelo vírus felino também o diferenciam do lentivírus humano. O receptor primário do FIV é o CD134 e o co-receptor é o

CXCR4, responsável por se ligar a quimiocinas. O HIV-1 utiliza CD como receptor primário e CCR5 e CXCR4 como co-receptores (WILLET et al., 1997).

O vírus está dividido em cinco subtipos, denominados de A, B, C, D e E. O primeiro subtipo é encontrado nos Estados Unidos, Austrália e Europa. O subtipo B está presente no Japão, Brasil, Estados Unidos e Europa. O vírus do tipo C é encontrado no Canadá e na Europa. No Japão também foram detectados os subtipos D e E, sendo esse último também relatado na Argentina. As taxas de prevalência variam de 2,5% até 44% (LARA et al., 2007). A principal via de transmissão do FIV é a mordida, quando o vírus ou o vírus associado a células é inoculado pela saliva de um animal infectado. Tais características associam a doença a animais de vida livre que lutam por território (NATOLI et al., 2005). Um pico de viremia ocorre de oito a doze semanas após a infecção, período no qual o felino pode apresentar sintomas de moderados a leves como anorexia, pirexia, anorexia e linfadenopatia generalizada. A infecção se propaga por órgãos linfóides. A resposta imune demora semanas para ocorrer, quando então o aumento de linfócitos T CD8+ correlaciona-se com a diminuição da viremia. Os sintomas clínicos desaparecem por tempo indeterminado (algumas vezes por muitos anos). Nesse período ocorre um declínio progressivo da função imune em que chama a atenção a diminuição de linfócitos T CD4+ (BUKHARD & DEAN, 2003).

### **Vacina Inativada**

As vacinas inativadas foram aquelas que apresentaram os melhores resultados para proteção contra o FIV. Elas partem de dois princípios, a utilização do vírus inteiro inativado (VII) ou células infectadas com o vírus inteiro inativado (CIVII). Os primeiros testes indicaram que ambos os tipos elaboravam uma proteção substancial quando animais eram desafiados com estirpes homólogas do FIV. Foram realizados entre quatro e seis imunizações ao longo de cinco meses. A VII utilizada no experimento protegeu seis de nove animais, enquanto a CIVII conferiu imunidade a cinco em seis animais quando desafiados. O teste falhou, no entanto, quando a dosagem foi aumentada (YAMAMOTO et al., 1991). Experimento semelhante foi realizado posteriormente, agora também com um vírus heterólogo. Nesse, 90% dos animais foram considerados imunizados após o desafio (YAMAMOTO et al., 1993).

A tentativa de se melhorar a vacina contra FIV continuou com a idéia de se utilizar dois subtipos no processo de imunização. Foram escolhidos os clados A e D. A mistura desses dois subtipos foi comparada com uma vacina com apenas um subtipo. A primeira obteve um maior grau de imunização, principalmente quando comparada a proteção contra um vírus derivado de sistema *in vivo* (PU et al., 2001). Os testes seguintes foram feitos em um experimento que simularia as condições em campo. Gatos livres de patógenos específicos foram mantidos em uma sala. Divididos em grupos, haviam felinos desafiados com subtipo B, vacinados e não vacinados. Sendo monitorados por técnicas de ELISA e Nested PCR por um ano, percebeu-se que nenhum dos animais imunizados desenvolveu a

enfermidade, enquanto metade dos felinos não vacinados foram infectados. Essa vacina está disponível comercialmente nos EUA (KUSUHARA et al., 2005). Apesar desses resultados, a vacina ainda não induz uma proteção estéril (DUNHAM et al., 2004).

Os avanços em VII e CIVII não se deram somente no estudo da imunização, mas também na produção das mesmas, permitindo sua comercialização. A utilização de biorreatores e meios sintéticos facilitaram a transposição dos experimentos para serem produzidas em escala industrial e ainda com processos mínimos de purificação (KALLEL et al., 2003). Estudos com adjuvantes trabalham com citocinas de linfócitos T auxiliares e estimulantes de *toll-like receptor* (SEYA et al., 2006).

Uma alternativa interessante foi a de utilizar células dendríticas carregadas com um vírus inativado. Supunha-se que devido ao importante papel dessas na resposta imune, essas atuariam como adjuvantes vivos no processo de vacinação. Os animais vacinados exibiram proliferação das células mononucleares do sangue periférico e anticorpos, porém foram infectados da mesma maneira que os gatos não imunizados (FREER et al., 2008).

### **Vacinas com Subunidades**

Os estudos com peptídeos sintéticos não são promissores em FIV, mas como ocorreu em outras enfermidades, permitiram o entendimento sobre as dificuldades de se criar uma vacina contra lentivírus. Flynn et al. (1995) utilizaram MAPs contendo epítomos do terceiro domínio variável da glicoproteína do envelope viral. Houve resposta de CTL e

anticorpos contra os peptídeos, porém nenhum dos animais foi protegido ao serem desafiados.

Peptídeos expressados em vírus vaccinia foram inoculados três vezes em animais. As seqüências utilizadas pertenciam ao envelope viral, contendo ou não sítios de clivagem das glicoproteínas transmembrana e de superfície ou, ainda, uma proteína bacteriana (beta-galactosidase) ligada ao envelope viral. Após o desafio, notou-se que as duas primeiras seqüências geraram um aumento mais rápido da produção de anticorpos do que a proteína de fusão, sendo que essa última apresentou níveis similares aos controles. Entretanto, a vacinação gerou também o aumento da infectividade (SIENBELINK et al., 1995). Na tentativa de se determinar quais eram os fragmentos responsáveis por esse resultado, deletou-se as regiões hipervariáveis 3, 4 e 5 em uma nova vacinação. Obteve-se resultado semelhante ao do trabalho anterior, o que indica que essas não são as únicas responsáveis pelo realce da infectividade (HUISMAN et al., 2004)

Uma alternativa foi a imunização alvejando linfonodos ilíacos. Peptídeos foram inoculados nesses locais para posterior utilização em um desafio com vírus homólogo via retal. Houve resposta proliferativa e humoral que geraram algum grau de proteção contra ocom FIV (FINERTY et al., 2001).

Há um questionamento sobre a presença de Vif ou da Orf-A em vacinas. Ambas são essenciais para a replicação viral, portanto sua deleção permite desenvolver vacinas inativas ou atenuadas. Ainda que expressadas em baixos níveis, ambas são processadas e reconhecidas pelo sistema imune, gerando resposta celular nos gatos infectados por FIV. Para estudar o efeito dessas proteínas nas

vacinas, foram feitas três inoculações diferentes, com as proteínas da Orf-A e adjuvantes, DNA codificante das mesmas e inoculação inicial com DNA (*prime*) e reforço (*boost*) com proteínas. Os resultados indicaram resposta imune detectável, porém um visível aumento da infecção na fase aguda. Análises posteriores levaram a conclusão que o realce da virulência foi transiente, pois o declínio dos linfócitos CD4+ foi menor nos gatos imunizados do que nos controles. O estudo corroborou outros trabalhos que relatavam a necessidade de mais de uma proteína na vacinação, sendo importante a presença de proteínas acessórias e estruturais. É preciso salientar, entretanto, que mesmo que esses imunógenos auxiliem na atividade de proteção, podem causar um aumento transiente da infecção (PISTELLO et al., 2008).

### **Vacinas de DNA Recombinante**

Hosie et al. (1998) testaram uma vacina de DNA para FIV construindo um pró-vírus com uma deleção em *Pol*. Inocularam-na em dez animais via intramuscular juntamente com DNA de interferon gamma felino. As imunizações foram feitas em 0, 10 e 23 semanas gerando resposta de CTL contra *Gag* e *Env*, porém com ausência de anticorpos. Após o desafio (26 semanas pós-imunização), todos os animais controle se tornaram soropositivos. Quatro dos vacinados permaneceram soronegativos e livres da enfermidade. Mais testes demonstraram que a presença do DNA para interferon gerou a melhor imunização.

Outra vacina foi testada com DNA pró-viral atenuado com a deleção de Vif e ligado a um plasmídeo. Imunizou-se os animais via

intramuscular com boost após 43 semanas. Seis semanas depois de completada a vacinação, desafiou-se os animais via intraperitoneal. Ao contrário dos animais controle, em que o vírus foi detectado, nenhum dos vacinados teve detecção do vírus. As principais respostas geradas foram de CTL específicos para *Gag* e *Env*, além de anticorpos anti-*Env* (LOCKRIDGE et al., 2000).

Um pró-vírus com deleção em *Vif* é uma técnica que aparece também em um trabalho mais recente. Uma vacina de DNA foi elaborada com o vírus defectivo co-expressando interferon gama felino. Ela foi testada com frente a diferentes inoculações que incluíram um plasmídeo com apenas o pró-vírus com deleção de *Vif* ou esse último e ainda um outro plasmídeo para expressão separada do interferon. A proliferação de células T foi sempre maior na presença de interferon, mas em nenhum dos casos foi detectado o aparecimento de anticorpos antivirais. Ao se inocular de vírus ativo para se avaliar a imunização, encontrou-se como resultado a falha da vacina em proteger os animais ou sequer reduzir a carga viral (GUPTA et al., 2007).

Um clone de FIV teve sua replicação impedida com deleções na transcriptase reversa ou na integrase para desenvolvimento de uma vacina de DNA. Além de um desses vírus defectivos, gatos foram inoculados com DNA de interleucina 12 e/ou interleucina 18. O desafio dos animais foi feito com duas estirpes virais, uma de baixa virulência e outra de alta virulência. A combinação que obteve maior proteção foi com a deleção da integrase e interleucina 18 em resposta à cepa menos virulenta. No entanto, foi detectada viremia em

todos os animais quando o vírus mais infeccioso foi utilizado no desafio, apesar de os animais vacinados apresentarem menor carga viral e menor queda na contagem de linfócitos T CD4+ (DUNHAM et al., 2002).

Tentativas de se mesclar a vacina de DNA com VII foram infrutíferas. Dunham et al. (2006) separaram trinta gatos em quatro grupos, sendo um não vacinado e os outros três imunizados com DNA, com VII e com *prime-boost* DNA/VII. Todos os controles apresentaram viremia, porém um animal vacinado com o plasmídeo e um com o reforço misto permaneceram livres de FIV. Houve um aparente aumento da carga de RNA viral no plasma nos animais inoculados somente com VII. A utilização de cada elemento vacinal sozinho providenciou melhor efeito do que o *prime-boost*, apesar de não oferecerem uma proteção efetiva. Os resultados indicaram que a utilização do reforço misto não implica em nenhum efeito significativo.

A tecnologia do DNA recombinante permitiu utilizar vetores variados para a vacinação contra FIV. Tijhaar et al. (1997a) usaram a bactéria *Salmonella typhimurium* aroA expressando a proteína *Gag* do FIV em fusão com uma proteína ligante de maltose. Uma cepa codificando uma subunidade da toxina do cólera foi o controle do experimento em que gatos receberam as vacinas oralmente ou via intraperitoneal (com nova imunização nove semanas depois). Em ambos os casos, houve resposta de anticorpos contra *Gag*, porém os animais se tornaram infectados perante o desafio e a carga viral não foi reduzida. Essa mesma vacina (agora expressando também parte de *Env*) foi testada em comparação com complexos

imunostimulantes composto de proteínas de Gag e Env. Mesmo depois de quatro imunizações, a vacina com vetor bacteriano não induziu resposta imune eficiente. O complexo gerou melhores resultados com forte resposta imune e diminuição da carga viral após o desafio (TIJHAAR et al., 1997b). Um outro estudo com bactérias como vetores trabalhou com *Listeria monocytogenes* expressando Gag e liberando um plasmídeo contendo Env. A carga viral foi sensivelmente controlada, todavia não houve uma proteção estéril de nenhum dos animais. Mesmo não se obtendo os efeitos desejados é preciso notar que as bactérias podem ser um vetor importante para vacinação já que se replicam no citoplasma da célula do hospedeiro e podem transferir plasmídeos para células de mamíferos (STEVENS et al., 2004).

### **Vacinas Vivas**

O FIV está relacionado com outros lentivírus que infectam felinos selvagens, entre eles um vírus infectante de pumas e outro de leões. Ambos foram utilizados como vacinas vivas que geraram respostas humorais e medidas por células (VANDEWOUDE et al., 2003). Essa pode ser uma via interessante a ser utilizada para vacinação ao notar-se que quando o lentivírus do puma é exposto via mucosa tem sua infecção controlada não se percebe diferenças no perfil de citocinas e na proliferação de CTL durante a replicação do microrganismo. O mecanismo desse controle ainda não foi elucidado, estando possivelmente relacionado com a capacidade de o vírus cruzar a barreira das mucosas (TERWEE et al., 2005)..

Um dos métodos para se gerar uma vacina atenuada para FIV foi a deleção da Orf-A

que diminui drasticamente a capacidade de replicação do vírus em linfócitos, mas praticamente não a altera em outras células. Não se percebeu sinal de reversão da virulência após 22 meses de observação. Três de nove animais vacinados foram considerados protegidos sem apresentar sinais do vírus durante os quinze meses em que foram analisados. Esse trabalho apresenta testes iniciais, mas promissores de uma vacina atenuada com resultados que podem ser comparados a outros já citados (PISTELLO et al., 2005).

Outro estudo com vacinas vivas verificou também a replicação dos vírus atenuados. Os microrganismos desse trabalho continham mutações aleatórias em Env (região imunodominante de epitopos de células B) e foram atenuados ao serem adaptados à replicação em células de linhagem. Não foram encontradas diferenças na replicação entre os vírus atenuados com mutações e a estirpe parental. A proteção durante o desafio demonstrou que essas vacinas podem oferecer proteção e a inserção dessas variações aleatórias podem ser um método importante para melhorar a atenuação das vacinas. Um problema detectado foi a presença de certas reversões e a persistência por até um ano, o que aumenta o risco de retorno da virulência. Como pelo menos uma dos microrganismos utilizados no trabalho foi mais estável, talvez certas mutações possam controlar melhor essa característica (BROCHE-PIERRE et al., 2005).

### **Artrite-Encefalite Caprina**

O lentivírus causador da artrite-encefalite caprina possui um genoma

semelhante ao do HIV-1, contendo além de *Gag*, *Pol* e *Env*, genes reguladores *Vif* e *Rev* e uma proteína semelhante a *Vpr* (SALTARELLI et al., 1990). A infecção por CAEV está disseminada mundialmente com maior prevalência em países onde o rebanho caprino leiteiro está sob condições extensivas de produção. As estimativas variam de 30 a 80% de animais positivos nos EUA, Canadá e Europa, com taxas mais baixas, 0-10%, na África e América do Sul (ADAMS et al., 1984).

A infecção é geralmente persistente e assintomática, mas pode gerar diversos sintomas clínicos durante uma evolução crônica que leva a perda de peso, debilidade e até mesmo a morte do animal. Entre os principais sinais está a artrite em que se verifica lesões típicas de processos inflamatórios e degenerativos. Em uma forma pulmonar, tosse, dispnéia e taquipnéia são freqüentes. Além disso, pode ocorrer mamite e sintomas nervosos. A leucoencefalomielite é comum em cabritos, enquanto a artrite e a mastite ocorre em animais adultos (ZINK & JOHNSON, 1994).

Os animais infectados desenvolvem respostas celulares e humorais específicas para o CAEV. Nenhuma dessas previne a infecção persistente e muito menos a capacidade de o animal transmitir o vírus durante toda a vida do caprino (DAWNSON, 1989). O método de diagnóstico mais difundido para o CAEV é a imunodifusão em gel de ágar, considerado de boa sensibilidade e especificidade, além oferecer praticidade de execução e leitura (HARKISS & WATT, 1990).

### **Vacinas Inativadas**

Caprinos foram vacinados com VII em um estudo elaborado por McGuire et al. (1986). O desafio com estirpe virulenta do CAEV provocou o desenvolvimento de uma infecção mais grave nos animais imunizados. Todos apresentaram artrite severa e com evolução mais rápida. Posteriormente, o vírus foi inoculado duas vezes mensalmente em caprinos persistentemente infectados, o que desencadeou artrite aguda, algo que não ocorreu nos controles que receberam apenas meio de cultura. O experimento demonstrou que a reação do sistema imune frente ao CAEV é importante na sintomatologia da artrite-encefalite caprina. O fato foi confirmado mais tarde quando determinou-se que viés na reposta imunológica com a produção de IgG2 por células T auxiliares 2 está associada à ausência de inflamações nas juntas nos animais não-progressores, enquanto IgG1 está associada à presença desse sintoma nos indivíduos progressores (TRUJILLO et al., 2004a)

Resultado semelhante foi encontrado quando o VII foi inoculado juntamente com adjuvantes. A soma da vacinação e do desafio provocou o desenvolvimento de lesões mais graves sem induzir proteção (RUSSO et al., 1993). Apesar da forte resposta imune à vacinação (detectada por IDGA e ELISA), anticorpos neutralizantes não foram detectados (VITU et al., 1993).

### **Vacinas com Peptídeos**

A glicoproteína de superfície do CAEV, SU ou gp135, foi purificada e usada em conjunto com Quil A para imunizar quatro caprinos. O experimento não contou com

nenhum desafio, mas com avaliação de anticorpos contra estirpes homólogas e heterólogas do vírus. Anticorpos neutralizantes só foram detectados após sete imunizações. O soro de três animais neutralizou um vírus independente. O último caprino não desenvolveu anticorpos neutralizantes para o CAEV heterólogo e, quando seu soro foi misturado com o dos outros, inibiu a reação prévia (KEMP et al., 2000).

A glicoproteína 135 foi expressa em vaccinia vírus e purificada, só que com duas modificações. Os epítomos lineares imunodominantes foram mapeados com peptídeos de fusão com três domínios diferentes para então se produzir SU-M, com duas glicosilações em dois epítomos, e SU-T, proteína truncada no aminoácido 518. Seis caprinos foram imunizados com as duas proteínas mutadas e SU selvagem com Quil A como adjuvante. Reforços foram feitos em três, sete e 16 semanas. Detectou-se por ELISA anticorpos neutralizantes contra cepas homólogas e heteróloga nos três tipos de imunizados. SU-T diminuiu em até 4,6 vezes o título de anticorpos enquanto SU-M aumentou em até 2,7 vezes quando foram comparadas com SU selvagem. Os resultados indicaram que a glicosilação de epítomos lineares não neutralizantes, mas não a deleção desses, é uma estratégia eficaz para melhorar a resposta de anticorpos neutralizantes nas imunizações (TRUJILLO et al., 2004b).

A resposta de diferentes haplótipos do MHC pode ser frustrante durante o desenvolvimento de uma vacina. Fluri et al. (2006) imunizaram caprinos com diferentes antecedentes genéticos com um peptídeo contendo epítomos imunodominantes de *Gag*

reconhecidos por células T auxiliares e células B. A resposta primária à vacinação variou conforme o MHC podendo ser lenta e baixa ou rápida e alta. Os estudos com a memória imunológica demonstraram maior novidade, pois o peptídeo foi capaz de superar as diferenças genéticas e gerar uma forte resposta nesse sentido. O aumento da virulência, recorrente nesses casos, foi detectado e dado como ocorrido devido ao estímulo da produção do fator de crescimento de colônias macrófago-granulócito (NECI et al., 2007).

### **Vacinas com DNA Recombinante**

Um vírus vaccinia recombinante codificando as glicoproteínas de superfície e transmembrana do CAEV foi incapaz de estimular o sistema imune de caprinos para a produção de anticorpos neutralizantes ou proteção contra o desafio. Ao contrário do ocorrido em experimentos semelhantes somente com peptídeos, o aumento da severidade das inflamações nas juntas não foi detectado até 24 semanas depois (CHEEVERS et al, 1994). Quando esse vetor foi inoculado em conjunto com um vírus vaccinia expressando interleucina 12, percebeu-se o estímulo da produção de interferon gama e interleucina 4, mas não se alterou a resposta para SU (CHEEVERS et al, 2000).

Dois plasmídeos, um contendo *Rev* e *Env* e outro *Tat*, *Rev* e *Env*, foram injetados em caprinos para avaliação da resposta imune. Ambos geraram forte resposta imune com um viés para IgG2. A presença de um terceiro elemento no segundo plasmídeo não alterou a eficiência da resposta, a não ser quando foi feito o reforço com SU purificada e adjuvante

de Freund. Nesse caso, a presença de Tat diminuiu em até 20% a resposta, sugerindo que a expansão de células B de memória tenha sido reduzida (BEYER et al., 2001). Esses mesmos plasmídeos, se inoculados com um outro codificante para interferon gama, têm sua resposta imunológica suprimida (CHEEVERS et al., 2001). Essa vacina de DNA com reforço com SU e adjuvante incompleto de Freund protegeu os animais em um desafio posterior, suprimindo a artrite e a carga pró-viral nos linfonodos, apesar de não ter impedido a infecção de nenhum dos quatro caprinos vacinados (CHEEVERS et al., 2003).

### **Vacinas Vivas**

A inoculação do CAEV com deleção do gene regular *Tat* provoca infecção persistente em caprinos com resposta de anticorpos apresentando cinética de aparecimento e padrão de reatividade semelhante ao do vírus selvagem. Os índices de replicação foram os mesmos com a atividade de transcrição reversa, transcrição e produção viral medidas por PCR quantitativo (HARMACHE et al., 1995). A inoculação do vírus deletado foi feita em quatro animais para a comparação da patogênese e proteção frente a três animais. Os quatro indivíduos vacinados foram considerados protegidos, sendo que dois deles tiveram o vírus detectado por RT-PCR no sítio de inoculação. CAEV selvagem não foi detectado nos macrófagos do sangue de nenhum desses caprinos, a não ser nos controles negativos. Todos os animais foram acometidos por lesões inflamatórias nas juntas (HARMACHE et al., 1998).

### **Maedi-visna**

O vírus maedi-visna é um lentivírus de ovinos causador de uma pneumonia intersticial lentamente progressiva (maedi) e, menos frequentemente, meningoencefalite das ovelhas (visna) (TOMAR, 2005). Os principais alvos desse microrganismo são as linhagens de monócitos/macrófagos. Ao contrário dos lentivírus de primatas, o MVV não infecta linfócitos T ou causa imunodeficiência (GORREL et al., 1992). Assim como outros lentivírus, tem três ORFs principais (Gag, Pol e Env) e um pequeno número de ORFs que codificam proteínas regulatórias e acessórias Vif, Tat e Rev (KRISTBJÖRNSDÓTTIR et al., 2004).

A resposta imunológica contra o MVV não é suficiente para inibir a replicação viral. Os primeiros anticorpos a aparecerem após a infecção são contra a proteína do capsídeo viral. Já a resposta contra SU surge tardiamente com anticorpos de baixa afinidade e em quantidade insuficiente para impedir a replicação (BERTONI et al., 1994). Uma das características que distingue a infecção em relação ao CAEV são os anticorpos neutralizantes contra o MVV, ausentes na enfermidade anterior (NARAYAN et al., 1997).

É mais comum que a infecção ocorra nos primeiros meses de vida durante a amamentação com leite ou colostro de ovelhas infectadas. A separação dos animais positivos para MVV, especialmente as crias, é o principal meio de prevenção da enfermidade. Para isso, utiliza-se como principais métodos de diagnósticos são o IDGA e o ELISA (CALLADO et al., 2001).

### **Vacinas Inativadas**



Meio de cultura de células foi coletada e usada para preparar vacinas para o MVV. Os vírus foram inativados com calor, formalina ou etileneimina para serem posteriormente inoculados em ovelhas com ou sem adjuvantes (adjuvante incompleto de Freund ou hidróxido de alumínio). Apesar da produção de anticorpos, nenhum dos animais vacinados foi protegido frente ao desafio (CUTLIP et al., 1987). Um desafio diferente foi tentado com outra vacina semelhante. Injetou-se o VII com adjuvante alun em dezesseis animais. Esses desenvolveram altos níveis de anticorpos e foram deixados em conjunto com outros dezesseis animais não vacinados e ovelhas altamente infectadas. As ovelhas não vacinadas não soroconverteram após nove meses. O experimento não permitiu definir se a vacinação com VII permitiu proteção nesse caso (GUDNADÓTTIR, 1994).

### **Vacinas com Subunidades**

As vacinas para MVV com subunidades não são muito encontradas na literatura. Uma delas não foi testada em ovinos, mas apenas em porcos-da-Índia. Constituída de proteínas do envelope viral expressas pelo sistema baculovírus/células de inseto, induziu resposta imune ao gerar anticorpos capazes de neutralizar o vírus livre de células e ainda impedir a fusão de células mediada pelo MVV (HUSO, 1997).

### **Vacinas de DNA Recombinante**

González et al. (2005) seguiram o modelo de imunização e reforço (prime/boost) com vacinas de DNA já mencionado nos

estudos com outros lentivírus. Um plasmídeo expressando as glicoproteínas de *Env* foi inoculado na vulva de seis ovelhas de dois anos de idade naturalmente infectadas com um reforço posterior com esse mesmo vetor e ainda um plasmídeo expressando interferon gama. Após um mês, a carga viral dos animais vacinados foi considerada menor do que a dos não-vacinados. Dois meses depois, detectou-se anticorpos neutralizantes ausentes nos animais controle. A replicação viral foi transiente até dois anos após a vacinação, quando então a proteção vacinal desapareceu e o vírus voltou a se multiplicar como previamente. A resposta imune não pôde ser associada ao MHC, pois todas as ovelhas eram heterozigotas. Estudo semelhante, com imunização sistemática com plasmídeos codificando para *Gag* e/ou *Env*, demonstrou que a expressão apenas das glicoproteínas do envelope provocavam aumento das lesões. Plasmídeos com *Gag* e *Env* ou apenas *Gag* induziram diminuição da carga pró-viral no sangue e no tecido linfóide (NIESALLA et al., 2008).

Uma outra vacina de DNA, essa codificando *Gag*, não conferiu proteção aos animais imunizados. Mesmo que tenha ativado a proteção de anticorpos (em especial após reforço com *Gag* recombinante), não protegeu nenhum dos animais desafiados. Devido ao isolamento do vírus após o desafio ter ocorrido mais cedo nos animais vacinados, é possível que a inoculação dos plasmídeos tenha aumentado a infecção (TORSTEINSDÓTTIR et al., 2007). Fato semelhante ocorreu ao se comparar a imunização com *Gag* ou *Env* associada ao vírus vaccinia Ankara modificado. Animais vacinados com expressão das proteínas da ORF *Gag* tiveram aumento da carga viral

após desafio via pulmonar, apesar de apresentarem redução das lesões no órgão de inoculação (REINA et al., 2008).

Pelo menos outros dois plasmídeos são citados na literatura como candidatos a vacina de DNA com expressão bem sucedida *in vitro* mas ainda sem testes clínicos (HENRIQUES et al., 2007; FRASIER et al., 2007).

### **Vacina Viva**

Um clone atenuado do MVV com 1% de diferença de uma estirpe altamente patogênica foi testado como uma vacina. A inoculação foi feita em via intratraqueal em ovelhas de dez meses de idade com reforço após dezessete semanas. O desafio foi realizado 46 semanas depois. Todos os animais foram infectados, porém o vírus foi isolado menos frequentemente nas ovelhas imunizadas indicando uma proteção parcial (PÉTURSSON et al., 2005).

### **Obstáculos no Desenvolvimento da Vacina contra o HIV-1**

O princípio de vacinas virais clássicas como varíola, poliomielite e sarampo é evitar o desenvolvimento da doença clínica através da memória imunológica que garantirá a defesa do indivíduo vacinado. A partir desse ponto, o organismo poderia se livrar o agente infeccioso e ainda continuar protegido contra o vírus. A vacinação de uma grande proporção da população reduz o número de pessoas infectadas e a probabilidade de que um não-vacinado entre em contato com um indivíduo infectado. O "efeito rebanho" diminui a difusão

da enfermidade mesmo quando apenas parte da população suscetível está vacinada.

Tais ações ainda não foram possíveis com os retrovírus. Esses microrganismos possuem meios de escape ainda difíceis de se compreender. Relatos em diversos periódicos mostram meios que os vírus possuem de escapar do sistema imune ou até de se aproveitar das respostas de defesa.

### **Aumento da Infecção Viral**

A exacerbação da infecção pelos lentivírus após vacinação é recorrente nos quatro modelos descritos acima. Foi relatada também em estudos com HIV e SIV. Uma das explicações para esse efeito é a facilitação da entrada do vírus devido aos anticorpos neutralizantes. A ligação do anticorpo gera mudanças conformacionais no envelope viral, aproximando-o do co-receptor CCR-5 (TAKEDA et al., 1988). Entre os relatos, também é citado o fato de que plasma derivado de macacos infectados com SIV aumentava a infecção de uma linhagem celular humana de CD4+ na presença de complemento (MONTEFIORI et al., 1990).

O aumento da infecção viral é pouco relatado nos experimentos acima, pois poucos deles foram realizados em grandes grupos de animais. Um dos relatos citados acima menciona o aumento da infecção pelo FIV quando vacinas de subunidades foram utilizadas. Esse é um fenômeno preocupante que deve ser levado em consideração nas duas áreas, animal e humana, demonstrando a necessidade de se manter uma interação entre o conhecimento gerado nas duas áreas.

Um dado relacionado, no entanto, com a infecção e a proteção do hospedeiro é o aumento da produção de anticorpos não neutralizantes ou até mesmo neutralizantes e exacerbação dos sintomas. Trabalhos com o MVV e o CAEV demonstraram claramente o risco de se gerar anticorpos não neutralizantes. Essas imunoglobulinas estão relacionadas tanto com o aumento da infecção quanto com piora dos sintomas. Apesar da diferença na sintomatologia gerada por esses dois vírus animais e o HIV-1, é preciso atentar para o fato, visto algumas vacinas como a da Merck (descrita a seguir) não gerou anticorpos com proteção suficiente.

### **Aumento da Replicação**

O aumento da replicação viral depende da resposta imune mediada por células já que os lentivírus se multiplicam melhor em células ativadas do sistema de defesa. Esse fato já foi relatado, por exemplo, durante infecções oportunistas, quando a reação do organismo aumenta o número de alvos dos lentivírus (VAN DER ENDE et al., 1990). O aumento da replicação pode ocorrer até mesmo em indivíduos portadores do HIV-1 vacinados para diferentes patógenos como na imunização trivalente contra influenza (STRAPANS et al., 1995). Esse aumento da replicação em células ativadas não ocorre somente por causa da presença da expansão dos alvos, como os linfócitos CD4+ no caso do HIV-1. Esse vírus conta com outro processo para burlar o sistema imune. Células dendríticas ativadas capturam o vírion através de um receptor denominado DC-SIGN. A captura ocorre nos sítios de entrada seguida pelo transporte ativo dessas células

para os linfonodos onde ocorrerá a transmissão para as células T. A ligação do HIV-1 com DC-SIGN providencia escape do processamento e mantém o vírus infeccioso por vários dias (GEIJTENBEEK & VAN KOOYK, 2003).

Esse é um dos fenômenos mais descritos nos experimentos animais, apesar das peculiaridades de cada vírus, demonstrando uma característica bastante peculiar dos lentivírus. Vacinas de subunidades e inativadas para o EIAV obtiveram um resultado muito claro nesse aspecto. O aumento da virulência também coincidiu com sintomas visivelmente mais graves. O mesmo se repete com o FIV, CAEV e MVV. É interessante notar que isso se repete principalmente com as vacinas de subunidades. Essa parece ser, portanto, a estratégia mais viável, ao menos não com os peptídeos utilizados nos trabalhos descritos.

### **Escape**

Uma outra barreira a se mencionar é o curto espaço de tempo que o sistema imune tem para reagir ao lentivírus. Em dias ou semanas, um microrganismo se integra ao genoma e estabelece a infecção latente (CHUN et al., 1998). A transcriptase reversa não tem atividade de revisão de leitura, determinando uma série de erros durante a polimerização da fita de DNA que se refletirão no fenótipo viral, eludindo o sistema imune e permitindo infecções subseqüentes (COFFIN, 1995). Como se não bastasse esse fator, o vírus ainda se modifica com muita facilidade com os eventos de recombinação ao se integrar no genoma. Nessa mesma fase, continuará invisível às defesas do organismo até que suas proteínas sejam expressas (EMBRETSON et al., 1993).

Esse índice de mutações fica claro na variação das seqüências de aminoácidos do envelope dos subtipos ou clados do HIV-1. A divergência entre os sub-tipos varia de 25% a 35%. Dentro desses clados, pode ocorrer uma variação de até 20%. *Loops* hipervariáveis e a glicosilação presente nas moléculas do envelope ainda atuam ocultando os sítios conservados de ligação aos receptores e co-receptores (WEI et al., 2003).

Uma vacina contra retrovírus não pode se basear somente na resposta humoral, mas depende de ativação celular. Estudos comprovam que a imunidade celular é crítica no controle de infecções lentivirais. Células CD8+ são absolutamente necessárias para o controle da viremia aguda e crônica durante a infecção por SIV (SCHMITZ et al., 1999). A atividade de linfócitos T citotóxicos foi inversamente correlacionada com a carga de RNA viral do HIV-1 em alguns estudos (Edward et al., 2002). Os CTLs também aparecem ao mesmo tempo em que a viremia inicial do EIAV decai (MCGUIRE et al., 1994).

A maturação do sistema imune é fundamental para a proteção. Vacinas vivas atenuadas utilizadas em experimentos com o EIAV são um exemplo dessa necessidade. O problema, entretanto, é trabalhar com um vírus atenuado que não se reverta para virulência ou que possa ser suprimido pelo organismo e não seja transmissível.

### **A Falha da Merck**

A vacina desenvolvida pela Merck baseou-se na utilização de um adenovírus como vetor. Três desses vírus recombinantes foram utilizados expressando Gag, Pol e Nef. Os testes

chegaram a ser feito em humanos em duas fases, uma na América do Norte, América do Sul, Caribe e Austrália e o outro na África do Sul. Ambos foram interrompidos antes do término ao se perceber que a vacina não protegia os vacinados e também não diminuía a carga viral além de aumentar o número de infecções (JOHNSTON & FAUCI, 2008).

Associa-se essa falha à vários aspectos. O primeiro seria a expansão dos linfócitos T CD4+ devido à vacinação com o adenovírus (Ad5). O aumento do número de células alvo teria favorecido a infecção. O fato de diversas pessoas já terem entrado em contato recente com o adenovírus pode ter gerado células de memória ativadas que induziriam a suscetibilidade ao HIV-1. O problema não se mostra somente em indivíduos infectados previamente pelo vetor. Indivíduos sem imunidade prévia ao adenovírus já que a infecção com o vírus selvagem após a vacinação levaria à expansão das células CD4+ ativadas, um fator de risco em áreas endêmicas para HIV-1 e Ad5, onde a co-infecção teria alta probabilidade de existir (GRUTERS & OSTERHAUS, 2008). Mas esse não seria o único motivo da falha da vacina. Os vacinados com alto título de anticorpos para o vetor, um vírus circulante comum principalmente nos países em desenvolvimento, apresentaram uma tendência à exacerbação da infecção (COHEN, 2007).

### **Conclusão**

Os vinte e cinco anos de pesquisa sobre o HIV-1 tiveram um grande impacto na medicina ao colaborar para o entendimento de novas técnicas na procura incessante por uma

vacina ou cura para a enfermidade. Até o momento, apenas a HAART tem apresentado um sucesso elevado no tratamento da enfermidade, mas com o aumento de infecção ocorrendo em boa parte do mundo e o elevado custo da doença não só para os governos, mas para toda a humanidade, é preciso continuar o incentivo das pesquisas. As dificuldades são grandes e alguns problemas podem ser intrínsecos da diversidade do sistema imunológico humano, já que diferentes haplótipos do MHC controlam o vírus de variadas formas, desde aqueles controladores de elite, que suprimem a doença por longos prazos, a indivíduos mais suscetíveis. Pequenas mudanças nos alelos do MHC podem fazer uma grande diferença entre a suscetibilidade e a resistência. Esses fatores poderiam levar a diferentes respostas durante a vacinação (GOULDER & WATKINS, 2008).

Novas alternativas podem surgir de acordo com os avanços no estudo da virologia, vacinação e do próprio HIV. Não causa surpresa a hipótese de que o estímulo de uma defesa baseada em células *natural killer* seria importante na vacinação (LEVY et al., 2003). Estudo recente demonstrou que o HIV ativa a replicação e gera resposta imune contra um retrovírus humano endógeno (HERV). Essa

ativação depende da viremia do vírus da AIDS como foi detectado pela presença de cDNA desses dois retrovírus no plasma de humanos infectados. Seria possível associar uma vacinação contra o HERV, visando eliminar as células infectadas pelo HIV (CONTRERAS-GALINDO et al., 2006).

O uso de modelos animais é fundamental para a descobertas de novas vias de vacinação e ainda de se compreender o motivo de diversas das falhas. Ainda que não sejam perfeitos devido à variações nos patógenos e às óbvias diferenças dos hospedeiros, a relação estreita entre os resultados dos vírus humanos e animais está demonstrada nos diversos trabalhos citados. Os lentivírus animais usam mecanismos semelhantes para escapar do sistema imune e apresentam desafios tão grandes quanto o do HIV.

Os obstáculos são difíceis de ser superados, mas o desânimo não pode vencer a esperança de se desenvolver uma vacina para uma infecção tão grave. Ainda serão feitas novas tentativas, mas é importante que se aprenda com os fracassos em cada um desses passos, pois a partir dessas informações pode-se gerar novas expectativas e pesquisas relevantes.

## Referências

Adams, D. S. et al. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Veterinary Records*. v. 115, n.19, p. 493–495, 1984.

Adamson, C. S; Freed, E. O. Recent progress in antiretrovirals--lessons from resistance. *Drug Discovery Today*. v. 13, n. 9-10, p. 424-432, 2008.

Ambrose, Z et al. HIV/AIDS: in search of an animal model. *Trends in Biotechnology*. V. 25, n. 8, p. 333-337, 2007.

An, L. L., Whitton, J. L. A multivalent minigene vaccine, containing B-cell, cytotoxic T-lymphocyte, and Th epitopes from several microbes, induces appropriate responses in vivo and confers protection against more than one pathogen. *Journal of Virology*. v. 71, n. 3, p. 2292-302, 1997.

Bailat, A. S. et al.. Effect of two synthetic peptides mimicking conserved regions of equine infectious anemia virus proteins gp90 and gp45 upon cytokine mRNA expression. *Archives of Virology*. v. 153, n. 10, p. 1909-15, 2008

Bertoni, G. et al. Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. *Journal of Virology*. v. 68, n. 11, p. 7139-7147, 1994.

Beyer, J. C. et al. Immunization with plasmid DNA expressing the caprine arthritis-encephalitis virus envelope gene: quantitative and qualitative aspects of antibody response to viral surface glycoprotein. *Vaccine*. V. 19, n.13-14, p. 1643-51, 2001.

Broche-Pierre, S, et al. Evaluation of live feline immunodeficiency virus vaccines with modified antigenic properties. *Journal of General Virology*. v. 86, n. 9, p. 2495-506, 2005.

Burkhard, M. J., Dean, G. A. Transmission and immunopathogenesis of FIV in cats as a model for HIV. *Current HIV Research*. V. 1, n. 1, p. 15-29, 2003.

Callado, A. K. C. et al. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, 2001 .

Carter, J. B. & Saunders, V. A. Retroviruses. In: Carter, J. B. & Saunders, V. A. *Virology: principles and applications*. 1. ed. Wiley, 2007, p. 185-196.

Cheevers, W. P. et al. Caprine arthritis-encephalitis lentivirus (CAEV) challenge of goats immunized with recombinant vaccinia virus expressing CAEV surface and transmembrane envelope glycoproteins. *Veterinary Immunology Immunopathology*. v. 42, n. 3-4, p. 237-51, 1994.

Cheevers, W. P. et al. Prime-boost vaccination with plasmid DNA encoding caprine-arthritis-encephalitis lentivirus env and viral SU suppresses challenge virus and development of arthritis. *Virology*. v. 306, n. 1, p. 116-25, 2003.

Cheevers, W. P. et al. Immune response to caprine arthritis-encephalitis virus surface protein induced by coimmunization with recombinant vaccinia viruses expressing the caprine arthritis-encephalitis virus envelope gene and caprine interleukin-12. *Vaccine*. v. 18, n. 23, p. 2494-503, 2000.

Cheevers W. P, Beyer J. C, Hötzel I. Plasmid DNA encoding caprine interferon gamma inhibits antibody response to caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) surface protein encoded by a co-administered plasmid expressing CAEV env and tat genes. *Vaccine*. v. 19, n. 23-24, p. 3209-15, 2001.

Chun, T. W., et al. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 95. p. 8869-73, 1998.

Coffin, J.M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*. V. 27, n. 267, p. 483-9, 1995.

Cohen, J. AIDS research. Did Merck's failed HIV vaccine cause harm? *Science*. v. 318, p. 1048-9, 2007.

Contreras-Galindo, R. et al. Detection of HERV-K(HML-2) viral RNA in plasma of HIV type 1-infected individuals. *AIDS Research Human Retroviruses*. V. 22, n. 10, p. 979-84, 2006.

Craig, J. K. et al. Discerning an Effective Balance between Equine Infectious Anemia Virus Attenuation and Vaccine Efficacy. *Journal of Virology*, v. 79, n. 5, p. 2666-2677, 2005.

Craig, J. K. et al. Immune suppression of challenged vaccinates as a rigorous assessment of sterile protection by lentiviral vaccines. *Vaccine*, v. 25, p.834–845, 2007a.

Craig, J. K. et al. Envelope variation as a primary determinant of lentiviral vaccine efficacy. *Pnas*, V. 104, N. 38, p.15105-15110, 2007b.

Cutlip, R. C et al. Failure of experimental vaccines to protect against infection with ovine progressive pneumonia (maedi-visna) virus. *Veterinary Microbiology* v. 13, n. 3, p. 201-204, 1987.

Dawson, M. The caprine arthritis-encephalitis syndrome. *Veterinary Annual*. v. 29, p. 98–102, 1989.

Dunham, S. P. et al. Protection against feline immunodeficiency virus using replication defective proviral DNA vaccines with feline interleukin-12 and -18. *Vaccine*. v. 20, n. 11-12, p. 1483-96, 2002

Dunham, S. P. et al. IN DNA vaccine: effect of route of challenge on outcome. In: Proceedings of the Seventh International Feline Retrovirus Research Symposium, Pisa, Italy, p. 39, 2004.

Dunham, S. P. et al. Prime-boost vaccination using DNA and whole inactivated virus vaccines provides limited protection against virulent feline immunodeficiency virus. *Vaccine*. v. 24, n. 49-50, p. 7095-108, 2006.

Edwards, B.H. et al. Magnitude of functional CD8+ T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma. *Journal of Virology*. V. 76, n.5, p. 2298-305, 2002.

Embretson, J. et al. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature*. v.362, n. 6418, p. 359-62, 1993.

Fauci A.S. Twenty-five years of HIV/AIDS. *Science*. v. 313, n. 5786, p. 409, 2006.

Finerty, S. et al. Targeted lymph node immunization can protect cats from a mucosal challenge with feline immunodeficiency virus. *Vaccine*. v. 20, n. 1-2, p. 49-58, 2001.

Fluri, A. et al. The MHC-haplotype influences primary, but not memory, immune responses to an immunodominant peptide containing T- and B-cell epitopes of the caprine arthritis encephalitis virus Gag protein. *Vaccine*, v. 24, n. 5, p. 597-606, 2006.

Flynn, J.N. et al. Induction of feline immunodeficiency virus-specific cell-mediated and humoral immune responses following immunization with a multiple antigenic peptide from the envelope V3 domain. *Immunology*, v. 85, n. 2, p. 171-5, 1995.

Fraser, D.G. et al. Lymphocyte proliferation responses induced to broadly reactive Th peptides did not protect against equine infectious anemia virus challenge. *Clinical Diagnostic Lab Immunology*, v. 12, n. 8, p. 983-93, 2005.

Fraisier, C. et al. Expression of the gp150 maedi visna virus envelope precursor protein by mammalian expression vectors. *Journal of Virological Methods*, v. 146, n. 1-2, p. 363-7, 2007.

Freer, G. et al. Evaluation of feline monocyte-derived dendritic cells loaded with internally inactivated virus as a vaccine against feline immunodeficiency virus. *Clinical Vaccine Immunology*, v. 15, n. 3, p. 452-9, 2008.



González, B. et al. Mucosal immunization of sheep with a Maedi-Visna virus (MVV) env DNA vaccine protects against early MVV productive infection. *Vaccine*, v. 23, n. 34, p. 4342-52, 2005.

Geijtenbeek, T.B., van Kooyk, Y. DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 276, p. 31-54, 2003.

Gorrell, M.D. et al. Ovine lentivirus is macrophagetropic and does not replicate productively in T lymphocytes. *Journal of Virology*, v. 66, n. 5, p. 2679-88, 1992.

Gruters, R., Osterhaus, A. AIDS vaccine research: consider co-infections. *Science*, V. 319, n. 5868, p. 1337, 2008.

Gudnadóttir, M. Experiments with inactivated visna-maedi vaccine. *Annual Academic Science*, v. 724, p. 140-7. 1994.

Gupta, S. et al. Vaccination of cats with attenuated feline immunodeficiency virus proviral DNA vaccine expressing gamma interferon. *Journal of Virology*, v. 81, n. 2, p. 465-73, 2007.

Hammond, S.A. et al. Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process. *Journal of Virology*, v. 71, n. 5, p. 3840-52, 1997.

Hammond, S. A. et al. Immune responses and viral replication in long-term inapparent carrier ponies inoculated with equine infectious anemia virus. *Journal of Virology*, v. 74, n. 13, p. 5968–5981, 2000.

Harkiss G.D. & Watt N.J. Lentivirus infections and their detection. *Goat Veterinary Soc. Journal*, v. 1, n. 1, p. 19-25, 1990

Harmache, A. The caprine arthritis encephalitis virus *tat* gene is dispensable for efficient viral replication in vitro and in vivo. *Journal of Virology*, v. 69, n. 5445–5454, 1995

Harmache, A. et al. Priming with *tat*-deleted caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) proviral DNA or live virus protects goats from challenge with pathogenic CAEV. *Journal of Virology*, v. 72, n. 8, p. 6796-804, 1998

Henriques, A.M. et al. Development of a candidate DNA vaccine against Maedi-Visna virus. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v. 119, n. 3-4, p. 222-32, 2007.

Hofmann-Lehmann, R. et al. Live attenuated, nef-deleted SIV is pathogenic in most adult macaques after prolonged observation. *AIDS*. v. 17, n. 2, p. 157-66, 2003

Hosie, M.J. et al. DNA vaccination affords significant protection against feline immunodeficiency virus infection without inducing detectable antiviral antibodies. *Journal of Virology*, v. 72, n. 9, p. 7310-7319, 1998.

Hu, S.L. Non-human primate models for AIDS vaccine research. *Current Drug Targets Infectious Disorders*, v. 5, n. 2, p. 193-291, 2005.

Huisman, W. et al. Antibodies specific for hypervariable regions 3 to 5 of the feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein are not solely responsible for vaccine-induced acceleration of challenge infection in cats. *Journal of General Virology*, v. 85, p. 1833-1841, 2004;

Huso, D.L. Neutralizing and fusion-blocking antibodies induced by recombinant visna virus envelope glycoprotein. *Viral Immunology*, v. 10, n. 1, p. 15-20, 1997.

Issel, C.J. et al. Efficacy of inactivated whole-virus and subunit vaccines in preventing infection and disease caused by equine infectious anemia virus. *Journal Virology*, v. 66, n. 6, n. 3398-408, 1992

Johnston, M.I., Fauci, A.S. An HIV vaccine--challenges and prospects. *New England Journal of Medicine*, v. 359, n. 9, p. 888-90, 2008

Kallel, H. et al. A novel process for the production of a veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells grown on microcarriers in a 20-l bioreactor. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 61, n. 5-6, p. 441-6, 2003.

Kemp, R.K. et al. Crossreactive neutralizing antibodies induced by immunization with caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *Vaccine* v. 18, n. 13. p. 1282-7 2000

Kusuhara, H. et al.. Dual-subtype vaccine (Fel-O-Vax FIV) protects cats against contact challenge with heterologous subtype B FIV infected cats. *Veterinary Microbiology*, 108, n. 3-4, p. 155-65. 2005

LARA, V.M.; TANIWAKI, S.A.; ARAUJO JR, J.P. Caracterização filogenética de amostras do vírus da imunodeficiência felina (FIV) do Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, n. 11, 2007.

Lerner, D.L. et al.. Increased mutation frequency of feline immunodeficiency virus lacking functional deoxyuridine-triphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 92, n. 16, p. 7480-7484, 1995.

Levy, J.A., Scott, I., Mackewicz, C. Protection from HIV/AIDS: the importance of innate immunity. *Clinical Immunology* v. 108, n. 3, p. 167-174, 2003.

Li, F. et al. A live attenuated equine infectious anemia virus proviral vaccine with a modified S2 gene provides protection from detectable infection by intravenous virulent virus challenge of experimentally inoculated horses. *Journal of Virology*, v. 77, n. 13, p. 7244-53 2003

Lockridge, K.M., et al. Protective immunity against feline immunodeficiency virus induced by inoculation with vif-deleted proviral DNA. *Virology* v. 273, n. 1, p. 67-79, 2000.

Lonning, S. M. et al.. Gag protein epitopes recognized by CD4+ T-helper lymphocytes from equine infectious anemia virus-infected carrier horses. *Journal of Virology*, v. 73, n. 5, p.4257-4265, 1999.

Lonning, S. M. et al.. Detection and induction of equine infectious anemia virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by use of recombinant retroviral vectors. *Journal of Virology*, v. 73, n. 4, p.2762-2769, 1999b.

Kristbjörnsdóttir, H.B. et al. The vif gene of maedi-visna virus is essential for infectivity in vivo and in vitro. *Virology*. v. 318, n. 1, p. 350-359, 2004.

Kydd, J. et al. Report of the First International Workshop on Equine Leucocyte Antigens, Cambridge, UK, July 1991. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v. 42, n. 1, p. 3-60, 1994.

McGuire, T.C. et al. Adams DS, Johnson GC, Klevjer-Anderson P, Barbee DD, Gorham JR. Acute arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus challenge exposure of vaccinated or persistently infected goats. *American Journal Veterinary Research*, v. 47, n. 3, p. 537-40, 1986.

McGuire, T.C. et al. Major histocompatibility complex-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes from horses with equine infectious anemia virus recognize Env and Gag/PR proteins. *Journal of Virology*, v. 68, n. 3, p. 1459-1467, 1994.

Mealey, R.H., et al. Experimental *Rhodococcus equi* and equine infectious anemia virus DNA vaccination in adult and neonatal horses: effect of IL-12, dose, and route. *Vaccine*. V. 25, n. 43, p. 7582-7597, 2007.

Micheletti, F. et al. Supra-agonist peptides enhance the reactivation of memory CTL responses. *Journal of Immunology*, v. 165, n. 8, p. 4264-4271, 2000.

Montefiori, D.C. et al. Antibody-dependent enhancement of SIV infection: further characterization and cross reactivity between macaque and sooty mangabey isolates. *Journal of Medical Primatology*, v. 19, n. 3-4, p. 269-278, 1990.

Narayan, O. et al.. *Visna-maedi: the prototype lentiviral disease*. *Viral Pathogenesis*, p. 657-668. Edited by N. Nathanson. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1997

Natoli, E. et al. Bold attitude makes male urban feral domestic cats more vulnerable to Feline Immunodeficiency Virus. *Neuroscience Biobehaviour Rev*, v. 29, n. 1, p. 151-157, 2005.

Nature Editorial. Don't stop me now. *Nature*, v. 9, n 8, p. 821, 2008.

Nenci, C. et al. Vaccination with a T-cell-priming Gag peptide of caprine arthritis encephalitis virus enhances virus replication transiently in vivo. *Journal of General Virology*, v. 88, n. 5, p. 1589-1593, 2007.

Niesalla, H. et al. Systemic DNA immunization against ovine lentivirus using particle-mediated epidermal delivery and modified vaccinia Ankara encoding the gag and/or env genes. *Vaccine*. 2008.

Pedersen, N.C. et al.. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science*. v. 235, n. 4790, p. 790-793, 1987.

Pétursson, G. et al. Mucosal vaccination with an attenuated maedi-visna virus clone. *Vaccine*. v. 23, n. 24, p. 3223-3228, 2005.

Pistello, M. et al. Evaluation of feline immunodeficiency virus ORF-A mutants as candidate attenuated vaccine. *Virology*. v. 332, n. 2, p. 676-690, 2005.

Pistello, M. Should accessory proteins be structural components of lentiviral vaccines? Lessons learned from the accessory ORF-A protein of FIV. *Vet Immunol Immunopathol*. V. 123, n. 1-2, p. 144-149, 2008.

Pu, R. et al. Dual-subtype FIV vaccine protects cats against in vivo swarms of both homologous and heterologous subtype FIV isolates. *AIDS*. v. 15, n. 10, p. 1225, 2001.

Raabe, M.L. et al. Immunization with a recombinant envelope protein (rgp90) of EIAV produces a spectrum of vaccine efficacy ranging from lack of clinical disease to severe enhancement. *Virology*, v. 245, n. 1, p. 151-162, 1998.

Reina, R. et al. Mucosal immunization against ovine lentivirus using PEI-DNA complexes and modified vaccinia Ankara encoding the gag and/or env genes. *Vaccine*. V. 26, n. 35, p. 4484-4505, 2008.

Ridgely, S.L., McGuire, T.C. Lipopeptide stimulation of MHC class I-restricted memory cytotoxic T lymphocytes from equine infectious anemia virus-infected horses. *Vaccine*, v. 20, n. 13-14, p. 1809-1819, 2002.

Ridgely, S.L., Zhang, B., McGuire, T.C. Response of ELA-A1 horses immunized with lipopeptide containing an equine infectious anemia virus ELA-A1-restricted CTL epitope to virus challenge. *Vaccine*, v. 21, n. 5-6, p. 491-506, 2003.

Russo, P. et al. Caprine arthritis-encephalitis: trial of an adjuvant vaccine preparation. I. Clinical and virological study. *Comp Immunology Microbiology Infectious Diseases*. V. 16, n. 2, p. 131-136, 1993.

Savarino, A. et al. Human immunodeficiency virus integrase inhibitors efficiently suppress feline immunodeficiency virus replication in vitro and provide a rationale to redesign antiretroviral treatment for feline AIDS. *Retrovirology*. V. 4, p. 79, 2007.

Saltarelli, M. et al. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*. V. 179, n. 1, p. 347-364, 1990.

Schmitz, J.E. et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science*. v. 282, n. 5403, p. 857-860, 1999.

Selin, L.K., Nahill, S.R., Welsh, R.M. Cross-reactivities in memory cytotoxic T lymphocyte recognition of heterologous viruses. *Journal of Experimental Medicine*, v. 179, n. 6, p. 1933-1943, 1994.

Seya, T. et al. Role of Toll-like receptors in adjuvant-augmented immune therapies. *Evid Based Complement Alternative Medicine*, v. 3, n. 1, p. 31-38, 2006.

Shen, R. X. et al. Study on immunological methods of equine infectious anemia. *China Agricultural Science*, p. 41-115, 1979.

Siebelink, K.H. et al. Enhancement of feline immunodeficiency virus infection after immunization with envelope glycoprotein subunit vaccines. *Journal of Virology*, v. 69, n. 6, p. 3704-3711, 1995.

Soutullo, A. et al. Antibodies and PMBC from EIAV infected carrier horses recognize gp45 and p26 synthetic peptides. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v. 198, n. 3-4, p. 335-343, 2005.

Stevens, R. et al. Oral immunization with recombinant *listeria monocytogenes* controls virus load after vaginal challenge with feline immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, v. 78, n. 15, p. 8210-8218, 2004.

Staprans, S.I. et al. Activation of virus replication after vaccination of HIV-1-infected individuals. *Journal of Exp Medicine*, v. 182, n. 6, p. 1727-1737, 1995.

Shen, T. et al. Amino acid mutations of the infectious clone from Chinese EIAV attenuated vaccine resulted in reversion of virulence. *Vaccine*, v. 24, n. 6, p. 738-749, 2006.

Tagmyer, T.L. et al. Envelope-specific T-helper and cytotoxic T-lymphocyte responses associated with protective immunity to equine infectious anemia virus. *Journal of General Virology*, v. 88, p. 1324-1336, 2007.

Takeda, A., Tuazon, C.U., Ennis, F.A. Antibody-enhanced infection by HIV-1 via Fc receptor-mediated entry. *Science*, v. 242, n. 4878, p. 580-583, 1988.

Terwee, J.A. et al.. Puma lentivirus is controlled in domestic cats after mucosal exposure in the absence of conventional indicators of immunity. *Journal of Virology*, v. 79, n. 5, p. 2797-2806, 2005.

Tijhaar, E.J. et al. Induction of feline immunodeficiency virus specific antibodies in cats with an attenuated *Salmonella* strain expressing the Gag protein. *Vaccine*, v. 15, n. 6-7, p. 587-596, 1997a.

Tijhaar, E. J. et al. *Salmonella typhimurium aroA* recombinants and immune-stimulating complexes as vaccine candidates for feline immunodeficiency virus. *Journal of General Virology*, v. 78, p. 3265-3275, 1997b.

Thormar, H. Maedi-visna virus and its relationship to human immunodeficiency virus. *AIDS Review*, v. 7, n. 4, p. 233-245, 2005.

Torsteinsdóttir, S. et al. Vaccination of sheep with Maedi-visna virus gag gene and protein, beneficial or harmful? *Vaccine*, v. 25, n. 37-38, p. 6713-6720, 2007.

Trujillo, J.D. et al.. Antibody response to the surface envelope of caprine arthritis-encephalitis lentivirus: disease status is predicted by SU antibody isotype. *Virology*, v. 325, v. 1, p. 129-136, 2004a.

Trujillo, J.D. et al. Glycosylation of immunodominant linear epitopes in the carboxy-terminal region of the caprine arthritis-encephalitis virus surface envelope enhances vaccine-induced type-specific and cross-reactive neutralizing antibody responses. *Journal of Virology*, v. 78, n. 17, p. 9190-9202, 2004b.

van der Ende, M.E. et al. CD4 T cells remain the major source of HIV-1 during end stage disease. *AIDS*. V. 13, n. 9, p. 1015-1019, 1999.

VandeWoude, S., Hageman, C.L., Hoover, E.A. Domestic cats infected with lion or puma lentivirus develop anti-feline immunodeficiency virus immune responses. *J Acquired Immune Deficiency Syndrome*, v. 34, n. 1, p. 20-31, 2003.

Vitu, C., Russo, P., Vignoni, M. Caprine arthritis-encephalitis: trial of an adjuvant vaccine preparation. II. Study of the antibody response. *Comp Immunology Microbiology Infectious Diseases*, v. 16, n. 2, p. 137-144, 1993.

Wei, X. et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*, v. 422, n. 6929, p. 307-312, 2003.

Willett, B.J., Flynn. J.N., Hosie. M.J. FIV infection of the domestic cat: an animal model for AIDS. *Immunology Today*. v. 18, n. 4, p. 182-189, 1997.

Yamamoto, J.K. et al. Experimental vaccine protection against feline immunodeficiency virus. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1991 Nov; 7(11):911-22.

Yamamoto, J.K. et al. Experimental vaccine protection against homologous and heterologous strains of feline immunodeficiency virus. *J Virol*. 1993 Jan; 67(1):601-5.

Zhang, X. et al. Correlation between the induction of Th1 cytokines by an attenuated equine infectious anemia virus vaccine and protection against disease progression. *J Gen Virol*. 2007 Mar; 88(Pt 3):998-1004.

Zhou, W. et al. Multiple RNA splicing and the presence of cryptic splice donor and acceptor sites may contribute to low expression levels and poor immunogenicity of potential DNA vaccines containing the *env* gene of equine infectious anemia virus (EIAV). *Veterinary Microbiology*, v. 88, p. 127-151, 2002.

Zink, M.C., Johnson, L.K. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Research*, v. 32, n. 2, p. 139-154, 1994.