Mariana Ribeiro Dominguez

**Importância da resposta aos epítomos
subdominantes, da proliferação e da
recirculação de linfócitos T CD8⁺ durante a
vacinação experimental contra a infecção
pelo *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

Mariana Ribeiro Dominguez

**Importância da resposta aos epítomos
subdominantes, da proliferação e da recirculação de
linfócitos T CD8⁺ durante a vacinação experimental
contra a infecção pelo *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Martins Rodrigues

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Dominguez, Mariana Ribeiro.

Importância da resposta aos epítomos subdominantes, da proliferação e da recirculação de linfócitos T CD8⁺ na vacinação experimental contra a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* / Mariana Ribeiro Dominguez. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Martins Rodrigues.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Vacinação genética experimental contra a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Versão do título para o inglês: Importance of the response to subdominant epitope, proliferation and recirculation of CD8⁺ T lymphocytes during experimental vaccination against *Trypanosoma cruzi* infection.

1. Adenovirus recombinante 2. Vacinação genética 3. Linfócitos CD8
4. Proliferação 5. Recirculação 6. Memória efetora I. Rodrigues,
Prof. Dr. Mauricio Martins II. Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia
III. Título.

ICB/SBIB0159/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mariana Ribeiro Dominguez.

Título da Tese: Importância da resposta aos epítomos subdominantes, da proliferação e da recirculação de linfócitos T CD8⁺ na vacinação experimental contra a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Orientador(a): Prof. Dr. Mauricio Martins Rodrigues.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.051.12

WTL/mcgn

São Paulo, 13 de junho de 2012.

REF.: Protocolo nº 55.08.

"Resposta imune a antígenos de protozoários patogênicos com ênfase no desenvolvimento de vacinas recombinantes".

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 22.06.2014**.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilmo.Sr.

Prof. Dr. MAURICIO MARTINS RODRIGUES
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **055** nas fls. **57** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Mauricio Martins Rodrigues, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Resposta imune a antígenos de protozoários patogênicos com ênfase no desenvolvimento de vacinas recombinantes**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Daniel B. Youssef, Bruna Cunha Gondim de Alencar, Samanta de Mello, Mariana Dominguez**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **25.11.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 26 de novembro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

A todos que compreendem que estar junto não significa estar perto e que permitiram a minha ausência física, mas que nunca deixaram que eu saísse de seus pensamentos e de seus corações. A todos aqueles a quem eu dedico o meu amor: a minha família (pai, mãe e irmã), aos meus amigos (em especial ao meu melhor amigo Raphael Kudaka). E a todos aqueles que assim como a ciência me fazem sorrir, sonhar, pensar e acreditar que a vida vale a pena.

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que aqui manifesto o meu mais profundo agradecimento aos mencionados abaixo.

Aquele cuja participação nesta tese e na minha formação foi quase tão determinante de sua qualidade e dos méritos alcançados quanto a minha própria participação, ao meu orientador: professor Dr. Mauricio Martins Rodrigues.

Aquele que também participou de modo direto e decisivo na minha formação e na elaboração dos dados desta tese, que se tornou muito mais que um colaborador, mas um grande amigo: Dr. José Ronnie de Vasconcelos.

Aos meus colaboradores e colegas que também trabalharam diretamente no desenvolvimento dos dados obtidos durante o meu doutoramento: Jonatan Ersching, Fernando Virgilio, Dr. Ricardo T. Gazzinelli, Dr. Oscar Bruna-Romero, Dr. Alexandre V. Machado, Luara I. Santos, Dr. Ramon Lemos, Dr.^a Paula Rigato, Dr. Adriano Araujo, Dr.^a Bruna de Alencar, Dr. Eduardo L. Silveira, Dr.^a Carla Claser, Dr. João Gustavo P. A. Mendes, Tiago Clemente Machado e Narciso Junior Vieira.

Aos demais colegas de laboratório que participaram de modo direto ou indireto no meu desenvolvimento profissional: Msc. Filipe A Haolla, Dr.^a Samanta Mattei de Mello, Msc. Ariane Camacho, Msc. Lais Teixeira, Dr.^a Fanny Tzelepis, Dr. Daniel Bargieri, Msc. Monica Teixeira, Dra. Cibele A. Tararam, Msc. Vander O. Jampaulo, Msc. Silvia Lage, Msc. Carina Lima, Msc. Thais Boccia, Msc. Virginia Gonçalves, Kelly, Laura, Keyna, Carla, Bruna, Camila e Danny.

Aos professores da Universidade de São Paulo e da Universidade Federal de São Paulo que contribuíram de algum modo para o meu crescimento profissional: Prof.^a Dr.^a Karina R. Bortoluci, Prof. Dr. Esper Kallas, Prof.^a Dr.^a Regina do Império Lima, Prof.^a Dr.^a Elaine Rodrigues, Prof.^a Dr.^a Daniela Santoro Rosa, Prof.^a Dr.^a Silvia Boscardin, Prof.^a Dr.^a Karina Carvalho.

Aos amigos que me ajudaram a manter a calma e a sanidade mental durante este período: Gabrielly Maria Denadai, Larissa Bim, Maria Pratis Riva, Natalia Valdrighi, Tatiana Clemente, Gabriel Capela Machado, Henrique Aldar, Ivelise Mariana Pinheiro e Natalia Prearo Moço.

A minha família, meus amores e queridos, que apesar de por vezes duvidarem das minhas faculdades mentais formam o alicerce que me permitiu

chegar até aqui: Alvaro Dominguez Veiga, Maria do Carmo Ribeiro Dominguez, Isabela Ribeiro Dominguez, Camila dos Santos Ribeiro, Raphael Kudaka, Julia e Nelson Kudaka, Juliana e Rodrigo Antônio.

Aos técnicos de laboratório, técnicos administrativos, secretários, bioteristas, auxiliares de limpeza, porteiros, seguranças e demais responsáveis pela organização, manutenção e ordem das estruturas dos Biotérios, dos laboratórios, dos departamentos de Imunologia da USP e da UNIFESP e em especial do CTCMol. Em particular a Ivanete dos Santos, a Maria Eni do Sacramento, ao João Pinheiro, a Dr.^a Heloisa Allegro Baptista, ao Paulo César Simões, a Sandra Fabbriotti, ao Osvaldo Gomes da Silva, a Magali Theodoro, a Ivone de Paulo, ao Danilo Duarte Camara, ao Sergio, ao Miguel, ao Jerônimo, ao Eliezer e muitos outros funcionários competentes.

E por fim, as instituições de financiamento e amparo à pesquisa que financiaram o presente trabalho: FAPESP, CAPES, CNPq e INCTV.

Deixando claro que muitos outros funcionários e professores da USP e da UNIFESP que não foram mencionados passaram pela minha vida enquanto pós-graduanda e provocaram em mim o sentimento de gratidão pelos sorrisos, pelo respeito, pelas conversas, mas sobre tudo pela eficiência de seus trabalhos.

“Perspectives

Understanding the role of different host defense pathways in protection from infections is often complicated and there is debate on some fundamental issues, such as the role of different innate sensing pathways in host defense and control of adaptive immunity. The underlying problem is that immunity and infectious diseases are studied in three fields that use different language and mind-sets: basic immunology, human immunology and ecological immunology. Most of the available fundamental knowledge is generated by experiments on model organisms (such as inbred mice and fruit flies), where carefully controlled mechanistic studies are possible. Studies of human infectious diseases, including studies of human immunodeficiencies, provide valuable information that is relevant to human health. Finally, studies in ecological immunology examine biology of infections in the natural context and reveal evolutionary processes that account for disease resistance and susceptibility. Each of these approaches has important limitations: Studies in model animals, while well controlled, generally rely on a limited set of read-outs (e.g., survival and/or pathogen burden) and are performed in the unnatural environment of animal facilities. Furthermore, unique aspects of biology of model animals may preclude generalizations to other species. Analysis of human infectious diseases and immunodeficiencies is necessarily descriptive and cannot be controlled in the same way as studies in model organisms. Human studies may also have sample biases: First, the human subjects available for clinical studies may not be representative of the entire human population because of unequal access to medical care, sanitation and hygiene; and second, even patients accessible for analyses may not be homogenous in terms of their genetics, nutrition, microbiota, etc. For example, if a given immunodeficiency results in 50 percent mortality from infections, it is generally not known whether the survivors (or non-survivors) share another mutation or polymorphism (or a symbiont) that may account for their survival or mortality in the presence of the immunodeficiency in question. The modern human environment is also unnatural from the evolutionary standpoint: abnormally high population density on the one hand, and access to antibiotics, vaccination, sanitation, and hygiene products on the other hand, are not exactly natural for human species in a sense that much of human biology was shaped by an entirely different environment. Finally, ecological immunology has many logistic limitations of the field studies and is usually performed on species that can be easily observed in their natural environment. Ecological immunology provides a unique perspective on evolutionary processes that shape the immune system, but unfortunately most ‘mainstream’ immunologists are not familiar with this field.

Thus all three subfields of study of infectious diseases have their strengths and natural limitations. The future challenge is to incorporate the knowledge from all three areas into a more complete understanding of immunity and infectious diseases.”

Simone Nishi e Ruslan Medzhitov (1)

RESUMO

Dominguez MR. Importância da resposta aos epítomos subdominantes, da proliferação e da recirculação de linfócitos T CD8⁺ durante a vacinação experimental contra a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Linfócitos T CD8⁺ específicos para antígenos do protozoário patogênico *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, são importantes na resistência do hospedeiro induzida pela vacinação genética. Neste trabalho nós estudamos qual seria o impacto da indução de resposta imune à epítomos CD8 subdominantes na imunidade gerada pela vacinação genética, pois esta pode ser uma estratégia importante para o desenvolvimento de vacinas genéticas. Inicialmente, demonstramos que durante a infecção experimental em camundongos do haplótipo A apenas um epítomo imunodominante é reconhecido no antígeno denominado proteína 2 da superfície de amastigotas (ASP-2). Em contraste, os linfócitos T CD8⁺ induzidos nos animais geneticamente vacinados com DNA e/ou vetor adenoviral recombinante expressando a ASP-2 são capazes de reconhecer, além do epítomo imunodominante, dois outros epítomos (subdominantes). A identificação desses epítomos permitiu que estudássemos o papel da resposta imune a epítomos subdominantes na imunidade protetora durante a vacinação experimental. Observamos que os animais vacinados com genes mutados que somente induziam resposta imune contra os epítomos subdominantes, apresentavam imunidade protetora mediada por linfócitos T CD8⁺ contra a infecção experimental. Assim, confirmamos que a resposta imune contra os epítomos subdominantes pode ser importante na indução de imunidade às infecções experimentais induzidas por vacinações genéticas. Apesar do papel crítico dos linfócitos T CD8⁺ na resposta imune protetora induzida pela vacinação genética do tipo imunização e reforço heterólogo, não se sabe ao certo se após o desafio experimental estes linfócitos T CD8⁺ necessitam proliferar ou recircular para mediar a imunidade protetora. Nós investigamos a primeira hipótese pelo tratamento de animais geneticamente vacinados com a droga hidróxiuréia que inibe a proliferação celular. Observamos que o tratamento com esta droga não alterou drasticamente a suscetibilidade dos animais após a infecção experimental. Por outro lado, o tratamento dos animais vacinados com a droga FTY720 que inibe a saída de linfócitos dos órgãos linfóides secundários pelo bloqueio da sinalização via receptor de esfingosina 1 fosfato levou a um aumento significativo na suscetibilidade à infecção experimental. Nossos resultados desafiam o paradigma de ação das vacinas tradicionais de que a imunidade é dependente da proliferação dos linfócitos T de memória e que estes não necessitam recircular pelos órgãos linfóides secundários para mediar a imunidade protetora.

Palavras-chave: Adenovírus recombinante. Vacinação genética. Linfócitos CD8. Proliferação. Recirculação. Memória efetora.

ABSTRACT

Dominguez MR. Importance of the response to subdominant epitopes, proliferation and recirculation of CD8⁺ T lymphocytes during experimental vaccination against *Trypanosoma cruzi* infection. [Ph. D thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

CD8⁺ T lymphocytes specific for antigens from the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, are important in host resistance induced by genetic vaccination. In the present study, we evaluated the impact of induction of immune response to sub-dominant CD8 epitopes on immunity generated by genetic vaccination, as this can be an important strategy for the development of effective genetic vaccines. Initially, we demonstrated that during experimental infection in mice of A haplotype only a single immunodominant epitope is recognized on the Antigen amastigote surface protein 2 (ASP-2). In contrast, the CD8⁺ T lymphocytes induced in animals genetically vaccinated with DNA and/or recombinant adenoviral vector expressing the ASP-2 recognized, in addition to the immunodominant epitope, two other epitopes (sub-dominants). The identification of these epitopes allowed us to test the role of immune response to sub-dominant epitopes in protective immunity during experimental vaccination. We found that animals vaccinated with mutated genes that only induced immune responses against the sub-dominant epitopes, developed protective immunity mediated by CD8⁺ T lymphocytes against experimental infection. Thus, we concluded that the immune response against the sub-dominant epitopes can be important during immunity induced by genetic vaccination to experimental infections. In spite of the critical role of CD8⁺ T lymphocytes in protective immune response induced by genetic vaccination using the heterologous prime-boost regimen, it is unclear whether after the experimental challenge these CD8⁺ T lymphocytes need to proliferate or recirculate to mediate protective immunity. We investigated the first by treating genetically vaccinated animals with Hydroxyurea, a drug that inhibits cellular proliferation. We observe that the treatment with this drug did not change drastically the susceptibility of animals after experimental infection. On the other hand, the treatment of animals vaccinated with FTY720, a drug that inhibits the exit of lymphocytes from secondary lymphoid organs by blocking the signaling via sphingosine 1 phosphate receptor led to a significant increase in susceptibility to experimental infection. Our results challenge the paradigm of action of traditional vaccines that immunity is dependent on the proliferation of memory T lymphocytes and that these cells do not need to recirculate.

Keywords: Recombinant adenovirus. Genetic vaccination. CD8 T lymphocytes. Proliferation. Recirculation. Effector memory.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 O ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
1.2 Relevância da doença de Chagas	15
1.3 Relevância do desenvolvimento de uma vacina para a doença de Chagas	16
1.4 Dados clínicos da doença de Chagas	17
1.5 Resposta Imune na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	18
1.6 Relevância dos linfócitos T CD8 ⁺ na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	20
1.7 Imunização genética contra a infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i> com gene da proteína 2 da superfície de amastigotas (ASP-2)	35
2 OBJETIVOS	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Infecção experimental pela cepa Y de <i>T. cruzi</i> e parasitemia	40
3.2 Camundongos	40
3.3 Plasmídios recombinantes	41
3.4 Mutagênese sítio dirigida	42
3.5 Composição das soluções e tampões utilizados	43
3.6 Meios de cultura para bactérias	43
3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	43
3.8 Clonagem da <i>asp-2</i> mutada no plasmídio pMOS e transformação de bactérias competentes pMOS	44
3.9 Extração de DNA plasmidial por lise alcalina (miniprep)	44
3.10 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição para verificação da presença do inserto e sua orientação (<i>screening</i> para colônias positivas)	45
3.11 Sequenciamento	46
3.12 Análise computacional das sequências obtidas	46
3.13 Sub-clonagem	46
3.14 Crescimento em larga escala e método da lise alcalina em larga escala (maxiprep)	47
3.15 Purificação de plasmídio crescido em larga escala por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl)	48
3.16 Geração do vetor adenoviral AdTAWETGQA	49
3.17 Produção e purificação dos vetores adenovirais recombinantes	49
3.18 Purificação dos vetores adenovirais recombinantes em gradiente de cloreto de cério	50
3.19 Titulação de estoques de adenovírus recombinantes	50

3.20	Protocolo de Imunização	51
3.21	Medição da resposta imune mediada por linfócitos T CD8	51
3.21.1	Peptídeos sintéticos	51
3.21.2	ELISPOT	52
3.21.3	Ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i>	53
3.21.4	Determinação do numero de células CD8+ esplênicas específicas pela coloração com o pentâmero H-2Kb-VNHRFTLV	54
3.21.5	Isolamento de linfócitos, coloração na superfície celular e coloração intracelular (ICS)	54
3.22	Tratamento com FTY720.....	55
3.23	Tratamento com Hidroxiuréia	56
3.24	Tratamento com Tamoxifeno.....	56
3.25	Ensaio de depleção <i>in vivo</i>	56
3.26	Sorting de células CD8 para ELISPOT com BMDC	56
3.27	Tolerância periférica.....	57
3.28	Diferenciação de BMDCs	57
3.29	Análise estatística	57
4	RESULTADOS	59
4.1	Identificação de epítomos subdominantes na proteína ASP-2 de <i>T. cruzi</i>	60
4.2	Geração de plasmídios e vetores adenovirais nos quais a sequencia que codifica o epítomo CD8 imunodominante da ASP-2 de <i>T. cruzi</i> foi modificada.....	65
4.3	Imunogenicidade, especificidade da resposta imune e a capacidade imuno protetora contra a infecção experimental induzida pelos novos plasmídios e vetores adenovirais	66
4.4	Indução de tolerância ao epítomo imunodominante não altera a suscetibilidade à infecção experimental	74
4.5	Apresentação de epítomos subdominantes por células dendríticas de medula óssea (BMDC) expostas ao <i>T. cruzi</i>	77
4.6	A proliferação dos linfócitos não é critica na resposta imune protetora após a vacinação genética utilizando o protocolo de <i>prime-boost</i> heterólogo	79
4.7	Tratamento com a droga FTY720 que reduz a recirculação de linfócitos leva ao acúmulo de linfócitos T CD8+ específicos nos linfonodos e uma maior suscetibilidade à infecção pelo <i>T. cruzi</i>	90
5	DISCUSSÃO	93
5.1	Contribuição dos epítomos subdominantes na resistência a infecção experimental com <i>Trypanosoma cruzi</i>	94

5.2 Importância da proliferação e da recirculação de linfócitos na resposta imune protetora após a vacinação genética utilizando o protocolo de <i>prime-boost</i> heterólogo	96
6 CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS	103
APÊNDICES:	113
APÊNDICE A - “Subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes contribute to resistance against experimental infection with a human protozoan parasite.”	114
APÊNDICE B - “Re-circulation of lymphocytes mediated by sphingosine-1-phosphate receptor-1 contributes to resistance against experimental infection with the protozoan parasite <i>Trypanosoma cruzi</i> .”	127
APÊNDICE C - “Relevance of long-lived CD8 ⁺ T effector memory cells for protective immunity elicited by heterologous <i>prime-boost</i> vaccination.”	138

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado da ordem *Kinetoplastida* e da família *Trypanosomatidae*. O *T. cruzi* é um organismo digenético apresentando um hospedeiro vertebrado (mamífero) e um hospedeiro invertebrado (insetos da família *Reduviidae*). Seu ciclo no hospedeiro mamífero se inicia pela infecção destes com formas tripomastigotas metacíclicas presente nas fezes e urina do inseto vetor. Sua penetração ocorre por meio de mucosas ou lesões cutâneas. No hospedeiro mamífero, o parasita invade células e se diferencia na forma amastigota intracelular replicativa. Após diversos ciclos de divisão binária, estas formas se diferenciam em tripomastigotas que lisam a célula e caem na corrente sanguínea disseminando a infecção.

O inseto vetor adquire o parasita pela alimentação com sangue de um hospedeiro mamífero infectado. Tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* são ingeridos e no intestino do vetor se diferenciam em formas epimastigotas (replicativas). Os epimastigotas sofrem o processo de metaciclogênese, diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicos na porção posterior do intestino e são eliminados nas fezes e urina do inseto. Na Fig. 1 pode ser vista uma representação esquemática do ciclo de vida do *T. cruzi* (2).

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida do *T. cruzi*

Fonte: Adaptado de (2).

1.2 Relevância da doença de Chagas

O *T. cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana. A infecção por esse protozoário atualmente atinge cerca de 10 milhões de pessoas (3) e é a principal causa de doença cardíaca não isquêmica no mundo todo (4).

Na América Latina, a doença de Chagas causa anualmente a perda de 750.000 anos de produtividade além da perda de 1,2 bilhões de dólares. Apesar de a maioria dos casos de pessoas infectadas se encontrar nas áreas endêmicas da América Latina, nas últimas décadas tem-se observado um número crescente de casos fora dessas áreas devido principalmente ao fluxo migratório de pessoas infectadas para outras regiões e países. Dessa forma, estima-se que existam hoje cerca de 300.000 pessoas infectadas nos Estados Unidos, 5.500 no Canadá, 80.000 na Europa, 1.500 na Austrália e 3.000 no Japão (5).

Além do impacto econômico que causa, do número de pessoas infectadas e da sua dispersão não há tratamento quimioterápico eficiente contra essa doença. Os fármacos convencionalmente utilizados no tratamento de pessoas infectadas foram desenvolvidos em 1960 (Benznidazol e Nifurtimox). Antiquados, esses fármacos são altamente tóxicos, possuem eficácia variável, tem pouca atividade em pacientes imunossuprimidos, requerem tratamento por períodos muito longos e o custo do tratamento é alto, a partir de 1.000 USD por ano por paciente (6, 7).

Atualmente, o controle vetorial com a utilização de inseticidas é a principal forma de combate à infecção pelo *T. cruzi*. Mesmo que a infecção vetorial tenha sido controlada em alguns países do cone sul (como o Brasil) através desse método (8) há relatos de insetos vetores resistentes ao tratamento com inseticidas em outras regiões como no Gran Chaco (9). Ainda, algumas espécies do inseto vetor são particularmente difíceis de controlar dessa forma, assim, o mais provável é que o controle por inseticida mantenha a transmissão a níveis baixos em diversas regiões (9).

Também há que se considerar que o controle vetorial não combate a transmissão pelas rotas secundárias. Essas são as principais formas de infecção em locais fora das áreas endêmicas ou em locais onde a presença do inseto vetor foi controlada. São rotas secundárias: a infecção oral, transmissão materno-fetal,

transfusão de sangue e transplante de órgãos de pessoas infectadas. Para combater a infecção por sangue ou transplante de órgão há que se fazer a análise de todo sangue e órgão doado para avaliar a presença do parasita (5).

Assim, o número de pessoas afetadas, o impacto econômico nas áreas endêmicas, a recente dispersão das pessoas infectadas, a ineficiência e o custo do tratamento, a falta de métodos eficazes de controle da transmissão, todos esses fatores conjuntamente tem motivado o desenvolvimento de uma vacina capaz de proteger da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

1.3 Relevância do desenvolvimento de uma vacina para a doença de Chagas

Em um estudo recente, Lee et. al. (2010), foi construído um modelo computacional para simular o impacto econômico de uma vacina profilática para a doença de Chagas na América Latina. Esse estudo demonstra que uma vacina ainda traz vantagem econômica mesmo se tiver eficácia de proteção baixa (25%) ainda que em lugares onde o risco de se infectar é menor que 1% e isso mesmo que a vacina custe US\$20,00. Já vacinas com custos maior que US\$200,00 só trazem vantagem econômica se possuírem uma eficácia de proteção superior a 50% e em lugares onde o risco de se infectar é maior que 20% (10).

Conforme o observado nos ensaios de imunização experimental uma resposta imune protetora contra essa doença requer a indução de resposta imune celular, principalmente com a indução de células Th1 e TCD8 (11). Isso significa que uma vacina para ter 100% de eficiência tem de possuir epítomos capazes de serem reconhecidos por toda a população. Ou seja, a vacina tem que induzir resposta imune protetora em toda a população a despeito do alto grau de polimorfismo do HLA humano e essa resposta precisa proteger contra as diversas cepas existentes de *Trypanosoma cruzi* apesar diversidade de antígenos presentes nas diferentes cepas (12, 13). Esse alto grau de variação dificulta a escolha do antígeno a ser utilizado para vacinação.

Além disso, para que se possa desenvolver estudos clínicos para uma vacina contra a doença de Chagas é preciso definir correlatos de proteção ou, pelo menos, biomarcadores de imunogenicidade. Há trabalhos que indicam que um estudo clínico para o desenvolvimento de uma vacina profilática levaria ao menos 20 anos para ser

realizado e exigiria o recrutamento de um grande numero de voluntários uma vez que a infecção é crônica e apenas 40% das pessoas infectadas apresentam patologia decorrente da infecção (14). Dessa perspectiva, um estudo clínico para uma vacina terapêutica ainda que em conjunto com o tratamento quimioterápico existente seria muito mais fácil de ser realizado, ainda sim haveria que se desenvolver biomarcadores para avaliar a eficácia da vacinação (15).

Sendo assim, para o desenvolvimento de uma vacina é imprescindível se considerar o que se sabe da resposta imune observada em pacientes infectados e os dados obtidos dos diferentes modelos experimentais.

1.4 Dados clínicos da doença de Chagas

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas distintas: aguda e crônica. Na fase aguda os indivíduos apresentam uma parasitemia patente que tem início de uma a duas semanas após a infecção. Nessa fase a infecção possui sintomatologia variável, podendo ser intensamente sintomática e levar a morte ou mesmo ser assintomática. Na fase aguda há uma super-ativação do sistema imunológico, com altos níveis de citocinas no plasma dos pacientes, intensa ativação de linfócitos B e T e reações inflamatórias nos tecidos infectados (3).

Na grande maioria dos casos, a parasitemia da fase aguda é gradualmente controlada presumivelmente devido à resposta imune adaptativa do hospedeiro e desce a níveis sub-patentes. O controle da parasitemia patente dá início à fase crônica. Nessa fase é possível detectar anticorpos específicos por diferentes testes sorológicos e, em grande parte dos pacientes, os parasitas podem ser isolados por hemocultura ou por xenodiagnóstico. Estes testes são rotineiramente usados para exames parasitológicos (3). A fase crônica pode perdurar por toda a vida do paciente, sendo assintomática no início. Após muitos anos do contato inicial com o parasita 40% das pessoas infectadas desenvolvem alguma sintomatologia, já os 60% restantes permanecem assintomáticos por toda a vida.

Em cerca de 30% dos casos, os pacientes desenvolvem sintomas cardíacos (associados a uma intensa miocardite), e nos 10% restantes há danos no sistema digestivo com infiltração de linfócitos e degeneração neuronal, levando ao desenvolvimento de megacolon e/ou megaesôfago (16). Apesar de não se saber ao

certo, há muitas evidências de que a persistência do parasita pode ser um fator crítico para o desenvolvimento da patologia chagásica (16).

Ainda não são conhecidos os mecanismos induzidos pelo parasita que levam ao desenvolvimento da patologia observada na fase crônica em uma pequena parte das pessoas infectadas. Apesar disso, a inflamação e a lise das células do tecido infectado são atribuídas a ativação do sistema imune direcionada pela presença do parasita (17).

Mesmo que uma parte das pessoas desenvolva uma patologia na fase crônica, poucas pessoas infectadas morrem em decorrência da infecção. É importante para o parasita que a fase crônica seja estabelecida e que a pessoa infectada não morra em decorrência dela, pois a transmissão para o inseto vetor ocorre na maioria das vezes nesse período (12). Para que a infecção se estabeleça e se torne crônica, é necessário que haja um equilíbrio entre a multiplicação do parasita nos tecidos e a resposta imune do hospedeiro, de forma a favorecer o parasitismo ao mesmo tempo mantendo o hospedeiro vivo (12).

1.5 Resposta Imune na infecção pelo *T. cruzi*

A) Indivíduos chagásicos

Durante a infecção humana, anticorpos protetores são principalmente direcionados para o epítopo contendo a estrutura α Gal α 1,3- Gal β 1,4-GlcNAc que está presente na glicoproteína mucina majoritária na superfície dos tripomastigotas do *T. cruzi* (18). Estes anticorpos, presentes em altas concentrações durante a infecção patente e toda a fase crônica, são marcadores para a infecção humana ativa (19). Estes agem de maneira independente da presença de complemento ou da resposta celular e sua atividade é facilitada pela presença de anticorpos específicos para o domínio catalítico da enzima TS que inibe a adição de ácido siálico na superfície dos tripomastigotas (20). Se a presença de anticorpos dirigidos a outros alvos é também importante na imunidade contra a infecção continua a ser avaliada.

Linfócitos T específicos para antígenos de *T. cruzi* foram detectados na maioria dos indivíduos na fase crônica da infecção. Não há evidências diretas que

estas células são importantes para a resistência do hospedeiro. É plausível propor que exercem um papel antiparasitário semelhante ao observado no modelo da infecção experimental (ver abaixo). Durante a fase crônica da doença, a maioria dos indivíduos tem uma resposta imune celular forte para antígenos do parasita (21). Eventos causando a depressão da resposta imune, como tratamentos imunossupressores ou imunodeficiência adquirida (ex. AIDS), causam o aparecimento relativamente rápido de formas sintomáticas da doença em uma porcentagem dos pacientes chagásicos (22). Em alguns casos, observa-se o reaparecimento da parasitemia patente característica da fase aguda da infecção (23). Assim, parece claro que a resposta imune mantém os níveis baixos de parasitemia observada em pacientes chagásicos crônicos.

Comparações da resposta imune celular em pacientes que desenvolvem sintomas clínicos polares (forma indeterminada ou cardiomiopatia chagásica crônica-CCC) levaram a resultados conflitantes. Alguns pesquisadores associaram a alta produção de IFN- γ à CCC (24, 25). Nesta mesma linha, o polimorfismo na região promotora dos genes que codificam as proteínas anti-inflamatórias BAT-1 e IL-10 sugere que os indivíduos com baixa produção são mais frequentes em pacientes com CCC (26, 27). Também, T regs foram correlacionadas com a melhora do quadro clínico da CCC (28). Assim, os pacientes capazes de controlar a resposta inflamatória no miocárdio teriam então menos danos teciduais e, por conseguinte uma doença mais branda.

Em contraste, outros grupos propõem o contrário: a maior produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e IL-17 correlaciona-se com uma melhora no quadro clínico da Doença de Chagas crônica (29, 30). Nestes casos, a CCC se desenvolveria devido ao aumento da expressão de moléculas inibitórias da ativação de linfócitos T específicos e a exaustão desta resposta imune específica (31, 32).

B) Modelos experimentais murinos

Na tentativa de determinar quais moléculas e mecanismos estão relacionados com a resistência à infecção pelo *T. cruzi*, tem se utilizado ferramentas tais como anticorpos monoclonais e camundongos geneticamente modificados (33). Dessa forma, o que se observa é que a resistência à infecção pelo *T. cruzi* requer ativação

de mecanismos tanto da resposta imune inata quanto da resposta adaptativa direcionadas aos diferentes estágios de desenvolvimento do parasita.

No caso da resposta imune inata, diversos mecanismos operam no sentido de controlar parcialmente a multiplicação do parasita. Desta forma, foi descrito que animais geneticamente deficientes que não expressam moléculas semelhantes ao Toll (TLRs) e seus adaptadores (MyD88 e TRIF), os receptores semelhantes ao NOD (NLRs) ou ativadores de inflamassomas são mais suscetíveis à infecção experimental pelo *T. cruzi* (16, 34, 35). Estas moléculas levam sinais para a secreção de mediadores como TNF- α , IFN- γ e IL-12 que por sua vez são críticos na resistência a infecção experimental pelo *T. cruzi* (6).

Após a ativação da resposta imune inata, há intensa ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Da mesma forma que no caso da imunidade inata, os animais geneticamente deficientes são extremamente suscetíveis à infecção experimental (36). Estes linfócitos T agem, sobretudo pela produção de citocinas do tipo 1 como, por exemplo, IFN- γ . Entretanto, no caso de linfócitos T CD8⁺, a citotoxicidade direta mediada por perforina pode ser importante na resistência à infecção contra algumas cepas de *T. cruzi* (37, 38). Finalmente, em adição a resposta imune adaptativa, células NK também são ativadas e produzem o mediador antiparasitário IFN- γ (39).

1.6 Relevância dos linfócitos T CD8⁺ na infecção pelo *T. cruzi*

A) Indivíduos chagásicos

Quando analisado o fenótipo das células que compõem o infiltrado inflamatório das lesões cardíacas de pessoas infectadas na fase crônica o que se observa é uma maior quantidade de linfócitos T CD8⁺, e uma menor proporção de linfócitos T CD4⁺, células B, plasmócitos, macrófagos, eosinófilos e mastócitos (32). Esse predomínio sugere um papel importante dos linfócitos T CD8⁺ durante a infecção (40-42). Devido à dificuldade de se obter tecido cardíaco de pessoas chagásicas, a análise da especificidade dos linfócitos T CD8⁺ intracardíaca de pacientes com cardiomiopatia chagásica é limitada a um único estudo, envolvendo um pequeno grupo de pacientes HLA-A0201 (43). Nesse estudo foi demonstrado que os pacientes observados possuíam no sangue periférico linfócitos T CD8⁺

específicos para alguns dos 26 peptídeos preditos das proteínas de FL-160 e cruzipaina (sendo que um paciente respondeu para todos os 26). Nesse mesmo estudo, no tecido cardíaco de um dos pacientes foi observada a presença de células específicas para um dos peptídeos da cruzipaina 60-68. Essas mesmas células específicas também estavam presentes na circulação periférica (43).

Quando analisada a frequência de linfócitos T CD8⁺ específicos, vê-se que há menos dessas células no sangue periférico de pacientes chagásicos com doença severa que em pacientes assintomáticos ou com sintomas leves. Além disso, o estágio de diferenciação dessas células parece ser diferente nesses dois grupos, pacientes com doença severa apresentam menos células de memória recentes (CD45RA⁻, CD27⁺, CD28⁺) e um número mais alto de células de memória tardias (CD45RA⁻, CD27⁻ e CD28⁻). Esses resultados sugerem que a proteção contra essa doença pode estar associada com um aumento na frequência de linfócitos T CD8⁺ altamente competentes no início do estado de diferenciação (44). Foi inclusive demonstrado que pessoas infectadas na fase crônica sem sintomas cardíacos ou com sintomas leves têm maior frequência de linfócitos T CD8⁺ específicas produtoras de IFN- γ que pessoas que desenvolvem sintomas severos. Ou seja, a severidade da doença pode estar relacionada com a especificidade e a qualidade da resposta CD8⁺ gerada durante a infecção (29). Além disso, uma vez que se trata de uma infecção crônica em que o antígeno persiste é possível que a resposta celular seja conduzida à exaustão.

Já quando analisada a especificidade da resposta de linfócitos T CD8⁺ foi descrito a presença a diversos os epítomos da TS restritos ao HLA-A0201. No entanto, com o alto grau de polimorfismo do HLA humano somado à resposta específica divergente entre diferentes cepas de *T. cruzi* dificulta o estabelecimento de uma correlação entre a resposta imune humana e a resistência (45). Com o objetivo de identificar a especificidade do alvo da resposta de linfócitos T CD8⁺ de pacientes na fase crônica Alvarez et al. (2008) realizaram um grande *screening* de peptídeos derivados da TS preditos de se ligar nas moléculas de HLA mais comuns (os HLAs mais prevalentes na população foram divididos em seis supertipos abrangendo um ou mais alelos de HLA presentes em 95% da população humana independentemente da origem étnica). Os resultados desse estudo indicam que os epítomos promíscuos da TS (os quais eram capazes de se ligar nas moléculas HLA-

A02, HLA-A03 e HLA-A24) são os principais alvos das linfócitos T CD8⁺ de memória em pacientes chagásicos crônicos. Respostas contra esses epítomos foram detectadas em 13 dos 25 indivíduos assintomáticos. Essa abordagem sugere que um conjunto específico de peptídeos restritos a esses HLAs podem ser usados para medir a atividade funcional e a frequência de linfócitos T CD8⁺ específicas para o *T. cruzi* em uma ampla gama de pacientes com doença de Chagas sem se ter de realizar tipagem HLA. Além disso, foi apontado pelos autores que a frequência de linfócitos T CD8⁺ específicas para a TS produtora de IL-2 é significativamente reduzida em pacientes cronicamente infectados (45). Considerando-se que a carga parasitária é extremamente baixa nesses indivíduos, os autores propuseram que a persistência em longo prazo do parasita pode conduzir a população de linfócitos T específicas para um perfil com menor capacidade de auto-renovação. Embora esse trabalho enfoque apenas a resposta contra a proteína TS, ou seja, teste apenas uma fração de toda a possível resposta de linfócitos T CD8⁺ específica para o *T. cruzi*, é significativo que mais de 50% das pessoas avaliadas respondem para pelo menos um epítomo da TS.

B) Modelos experimentais murinos

Poucas horas após invadir a célula do hospedeiro, o *T. cruzi* escapa do vacúolo parasitóforo para o citosol onde se diferencia em amastigotas e inicia a sua replicação (16). Uma vez o parasita no citosol, seus antígenos secretados tornam-se disponíveis para serem processados e apresentados via MHC de classe I (46). A importância dos linfócitos T CD8⁺ na imunidade à infecção experimental pelo *T. cruzi* foi demonstrada por diferentes métodos. Os estudos utilizaram camundongos β 2-microglobulina deficientes, que não possuem linfócitos T restritos às moléculas de MHC-I (como T CD8⁺ e NK), ou deficientes da molécula de CD8 ou depletados de linfócitos T CD8⁺ utilizando anticorpos monoclonais. Em todos os casos, a ausência dos linfócitos T CD8⁺ levou a uma suscetibilidade extrema à infecção experimental (16). Os linfócitos T CD8⁺ específicos promovem resistência à infecção pelo *T. cruzi* principalmente através da produção de IFN- γ , mas a atividade citotóxica direta mediada por perforina também podem ter um papel importante dependendo da cepa de *T. cruzi* (16, 37).

Os mecanismos envolvidos no processamento e na apresentação desses antígenos para a célula T CD8⁺ não são conhecidos. Há evidências de que células dendríticas CD11c são importantes para o início da resposta imune que ocorre nos linfonodos drenantes próximos à infecção (47, 48). Posteriormente, estes linfócitos T CD8⁺ recirculam e vão para o baço. Esse egresso requer não só a expressão do receptor quimiotático S1PR1 (receptor de esfingosina 1 fostato) na superfície de linfócitos, mas também depende de um gradiente do seu ligante S1P, cuja concentração é muito baixa no parênquima dos órgãos linfoides secundários e elevada no local de saída (linfa e sangue). O egresso pode ser bloqueado através da inibição da enzima que degrada S1P no parênquima dos órgãos linfoides secundários, S1P liase. Uma vez que S1P não é degradado, a sua concentração aumenta, chegando a dobrar, com isso há uma diminuição na expressão de S1PR1 na superfície das células T e B (49). O egresso também é similarmente bloqueado em camundongos deficientes em ambas as enzimas esfingosino quinases endoteliais, que produzem S1P presente na linfa (50) ou através da utilização do fármaco FTY720.

Sabemos também que a resposta de linfócitos T CD8⁺ durante a infecção experimental pelo *T. cruzi* apresenta uma cinética distinta da observada com vírus ou bactérias que causam infecções capazes de serem espontaneamente curadas como influenza, LCMV, Listeria, etc.. Nestes casos o pico da resposta imune medida pela frequência dos linfócitos T CD8⁺ específicos é de 7 a 15 dias (51). Já no caso da infecção pelo *T. cruzi* observamos que o pico da resposta imune ocorre por volta do dia 30 (52-55). Esta cinética atrasada da resposta imune permite que o parasita estabeleça uma infecção tissular antes que os linfócitos T CD8⁺ os eliminem. Os mecanismos precisos que controlam esta cinética alterada não são conhecidos, mas observamos que a carga parasitária é um fator importante que controla o tempo de indução da resposta imune. Assim, o aumento do inoculo de parasitas leva a uma aceleração no aparecimento da parasitemia/ infecção que por sua vez causa uma aceleração na geração de linfócitos T CD8⁺ específicos (54).

Além de a resposta imune aparecer com uma cinética distinta da observada em infecções comuns virais e bacterianas, não observamos uma queda acentuada na resposta imune como é descrita para estas infecções (contração da resposta imune). Assim, esta se mantém alta por longo período de tempo. Além disto, o

fenótipo destes linfócitos T CD8⁺ se mantém como T efectoras de memória por este período (53).

Figura 2 - Cinética da resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ após a infecção experimental com vírus ou com *T. cruzi*

Um fator importante de ressaltar é que a resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ gerada após a infecção experimental pelo *T. cruzi* não é capaz de levar a sobrevivência dos animais suscetíveis como, por exemplo, da linhagem de camundongos A/Sn. Neste caso, apesar dos animais desenvolverem uma resposta imune específica, todos morrem (56). No caso de camundongos resistentes, após a infecção, a resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ leva a sobrevivência dos animais como descrito acima. Entretanto, estes animais não são incapazes de eliminar completamente os parasitas o que os leva para a fase crônica da infecção. Desta forma, em nenhuma circunstância, a resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ é capaz de eliminar o *T. cruzi*.

Em contraste, a vacinação genética com DNA plasmidial e adenovírus recombinante expressando um antígeno imunodominante do *T. cruzi* (proteína 2 da superfície de amastigotas) é capaz de induzir potente resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ e forte imunidade que protege camundongos altamente suscetíveis A/Sn (37, 57). Não só estes animais sobrevivem à infecção aguda, mas também não desenvolvem a patologia chagásica crônica e não apresentam parasitas circulantes detectáveis. Esta observação criou um paradoxo uma vez que tanto a infecção

experimental como a vacinação genética induzem linfócitos T CD8⁺ capazes de secretar o mediador antiparasitário IFN- γ e mediar potente atividade citotóxica *in vivo*.

A fim de explicar este paradoxo, postulamos que possivelmente os linfócitos T CD8⁺ específicos induzidos pelo vetor adenoviral recombinante AdASP-2 ou pela infecção experimental apresentariam propriedades distintas que confeririam uma capacidade imuno-protetora aos primeiros e/ou que impediriam uma resposta efetiva no segundo caso. Para identificar qual seria este fator, fizemos uma detalhada comparação das duas respostas imunes. Observamos que havia uma grande similaridade na resposta imune induzida pelo vetor adenoviral recombinante AdASP-2 e pela infecção com *T. cruzi*. A resposta imune após 19 dias era de magnitude semelhante e mediada por linfócitos T multifuncionais capazes de expressar na superfície a molécula CD107a, assim como acumular IFN- γ e TNF- α após a estimulação *in vitro* com o peptídeo cognato (56). Além disto, estes linfócitos T específicos eram altamente citotóxicos *in vivo*. Dentre as poucas diferenças observadas, houve uma nítida aceleração da resposta imune induzida pelo vetor adenoviral AdASP-2 quando comparado com a infecção experimental (56). Apesar de que os linfócitos T CD8⁺ específicos induzidos pela infecção proliferavam em maior quantidade que dos animais imunizados com vetor adenoviral AdASP-2, as frequências de células específicas após 19 dias eram semelhantes nos dois casos. Esta frequência semelhante de células se explicou devido a um significativo aumento dos linfócitos T CD8⁺ com fenótipo pró-apoptótico nos animais infectados. Desta forma, a principal diferença que observamos ao compararmos as duas respostas imunes foi o estado de viabilidade dos linfócitos T CD8⁺ específicos. Enquanto a imunização com o vetor adenoviral AdASP-2 induzia linfócitos T CD8⁺ específicos com alta viabilidade, a infecção levava a expansão acelerada e apoptose destes linfócitos específicos.

A fim de determinar as bases moleculares para este fenômeno, analisamos um total de 28 moléculas de superfície incluindo moléculas de adesão, marcadores funcionais e receptores envolvidos na sobrevivência dos linfócitos T. A principal diferença observada foi que linfócitos T CD8⁺ induzidos pela infecção experimental apresentavam grande quantidade do receptor de apoptose CD95 (Fas) quando comparado com linfócitos T CD8⁺ específicos de camundongos vacinados com o

vetor adenoviral AdASP2 (56). Não só estas células apresentavam grande quantidade de CD95 na superfície, mas o reconhecimento desta molécula *in vitro* por um anticorpo monoclonal anti-CD95 levou a morte destes linfócitos. Em contraste, linfócitos T CD8⁺ específicos induzidos pela vacinação com vetor adenoviral AdASP2 foram refratários a morte induzida por anti-CD95 (56).

Esta diferença marcante na qualidade da resposta imune induzida pela imunização com o vetor adenoviral AdASP2 e pela infecção pelo *T. cruzi* provavelmente são bases importantes que explicam a ineficiente resposta imune mediada por células T CD8⁺ durante a infecção pelo *T. cruzi*. Em adição, esta diferença poderia também explicar o sucesso da vacinação genética com o vetor adenoviral recombinante. De fato, a injeção concomitante do vetor adenoviral AdASP2 e do *T. cruzi* levou a: i) uma intensa resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ específicos; ii) menor expressão de CD95; o que leva a resistência a apoptose induzida por anti-CD95; iii) imunidade protetora contra a infecção experimental pelo *T. cruzi* (58) (Figura 4).

Figura 3 - Fenótipo dos linfócitos T CD8⁺ expandidos pela infecção com *T. cruzi* ou pela imunização com vetor adenoviral AdASP2

CD8 ⁺ T Naive	CD8 ⁺ T específicas Infectado	CD8 ⁺ T específicas Imunizado
CD11a Low	CD11a High	CD11a High
CD11c Low	CD11c Int.	CD11c Low
CD25 Low	CD25 Low	CD25 Low
CD27 High	CD27 Low	CD27 Low
CD43 Low	CD43 High	CD43 High
CD43l Low	CD43l High	CD43l High
CD44 Low	CD44 High	CD44 High
CD49d Low	CD49d High	CD49d High
CD69 Low	CD69 Low	CD69 Low
CD62L High	CD62L Low	CD62L Low
CD70 Low	CD70 Low	CD70 Low
CD95 Low	CD95 High	CD95 Low
CD95L Low	CD95L Low	CD95L Low
CD122 Low	CD122 Low	CD122 Int.
CD127 High	CD127 Low	CD127 Low
CD183 Low	CD183 Low	CD183 Low
CCR5 Low	CCR5 Low	CCR5 Low
CCR9 Low	CCR9 Low	CCR9 Low
KLRG-1 Low	KLRG-1 High	KLRG-1 Low/High
PD1 Low	PD1 Low/Int	PD1 Low/Int
CTLA-4 Low	CTLA-4 Low	CTLA-4 Low
BTLA Int.	BTLA Low	BTLA Low
PDL1 Low	PDL1 Low	PDL1 Low
TRAIL Low	TRAIL Low	TRAIL Low
TRANCE Low	TRANCE Low	TRANCE Low
LAG-3 Low	LAG-3 Low	LAG-3 Low
PNAD Low	PNAD Low	PNAD Low
OX-40 Low	OX-40 Low	OX-40 Low
T Naive	TE	TE

Figura 4 - Proposta de modelo para a ativação de linfócitos T CD8⁺ específicos durante a infecção de *T. cruzi* em camundongos *naïves* e vacinados com o vetor adenoviral AdASP2.

O contato inicial de células T CD8⁺ específicas com APC infectadas com o *T. cruzi* induz maiores níveis de expressão de CD95 e baixa viabilidade destas células T (Figura 4A). Esta baixa viabilidade levou a uma resposta sub-ótima e a patologia do hospedeiro (morte ou infecção crônica). Em contraste, o contato da APC carregado com vetor adenoviral recombinante bloqueia a expressão de CD95 em células T CD8⁺ específicas. No segundo contato com APC infectadas com o *T. cruzi*, células T CD8⁺ específicas CD95^{low} desenvolvem uma resposta imune intensa, eliminação de parasitas e cura (Figura 4B).

Outro fator importante que caracteriza a resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ durante a infecção experimental pelo *T. cruzi* em camundongos é o fato de ser restrita a alguns poucos epítomos. Isto ocorre a despeito da grande variedade de possíveis epítomos CD8 presentes nos antígenos do parasita. A esse fenômeno dá-se o nome de imunodominância (16). Todos os epítomos imunodominantes até agora descritos são expressos por antígenos membros da família das TS de *T. cruzi*.

No que diz respeito às bases celulares e moleculares que definem a imunodominância da resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ frente a uma infecção diferentes aspectos são conhecidos. O primeiro aspecto diz respeito à formação do complexo peptídeo-MHC-I na superfície das APC: São importantes para formação destes complexos: i) abundância do antígeno; ii) disponibilidade destes para as APC; iii) processamento enzimático por proteassomas e outras enzimas proteolíticas; iv) translocação destes peptídeos para o retículo endoplasmático pelas proteínas transportadoras; iv) ligação dos peptídeos na molécula de MHC-I. O segundo grupo de fatores que influenciam a imunodominância são relacionados com a ativação dos linfócitos T CD8⁺: i) frequência das células precursoras no repertório capazes de reconhecer o complexo peptídeo-MHC-I; ii) afinidade dos receptores de linfócitos T específicos; iii) competição dos linfócitos T CD8⁺ pelas APC durante o *priming*. Outros fatores como regulação da resposta específica, capacidade dos patógenos de mutarem seus epítomos reconhecidos, expressão de antígenos específicos para os diferentes estágios evolutivos, modulação da expressão dos antígenos em diferentes fases da infecção e inibição direta dos mecanismos envolvidos com a formação do complexo

peptídeo-MHC-I podem também em tese influenciar a imunodominância, mas exemplos detalhados destes não foram descritos.

Contudo, no caso de linfócitos T CD8⁺, devido à sua restrição genética por moléculas de MHC-I, 90% da imunodominância está vinculada ao fato de apenas uma fração estimada em 1% dos peptídeos normalmente disponibilizados ao MHC-I conseguir se ligar a essa molécula com afinidade suficiente para induzir resposta mediada por linfócitos T CD8⁺. Aparentemente isso não está relacionado com uma pressão seletiva dos organismos infecciosos para evitar a resposta de linfócitos T CD8⁺ do hospedeiro e sim com a estrutura do próprio MHC-I (59).

Devido a complexidade dos genomas dos agentes infecciosos, a maioria dos trabalhos realizados para definir as bases moleculares da imunodominância da resposta CD8 utilizam infecções virais como modelo. Um seu artigo de revisão sobre imunodominância Yewdell et. al. (2006) expõem de modo bastante ilustrativo como ocorre à restrição da resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ durante a infecção pelo vírus vaccinia (Figura 5). É observado que genoma do vírus vaccinia tem capacidade para gerar cerca de 175.000 peptídeos de 8, 9 ou 10 mer (sem considerar a possibilidade de as sequencias alternativas de leituras e modificações pós-translacionais). No entanto, em trabalho anterior Yewdell e Bennink (1999) demonstraram que apenas 20% desses peptídeos são liberados após processamento pelo proteassoma e outras proteases (35.000 peptídeos). Apesar de o transporte para o reticulo endoplasmático via TAP influenciar na seleção de peptídeos que são disponibilizados para se ligar no MHC classe I, esse transporte teve pouco efeito na restrição de epítomos durante a infecção pelo vírus vaccinia (cerca de 30.000 são transportados). Mesmo assim, cerca de 1% desses peptídeos se liga no MHC classe I (150 peptídeos). Uma vez o complexo peptídeo-MHC-I exposto na superfície da APC o repertório de linfócitos T CD8 tem capacidade para reconhecer pelo menos 50% desses epítomos (75 peptídeos). Porém, apenas 50 são reconhecidos e correspondem a 90% da resposta ao vírus vaccinia. Em outro trabalho é demonstrado que desses 50 peptídeos do vaccinia que são reconhecidos durante infecção experimental apenas oito correspondem por mais de 50% da resposta CD8 observada contra a infecção (Figura 5)(60).

Figure 5 - Representação esquemática da restrição do alvo da resposta imune observada durante a infecção de camundongos C57Bl/6 pelo vírus Vaccinia

Retirado de (61).

Como mencionado acima, os antígenos alvos da resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ durante a infecção experimental pelo *T. cruzi* são proteínas da família das TS (52-54, 62, 63). Esta resposta imune é dirigida contra um número relativamente pequeno de epítomos após a infecção com cada cepa do parasita. Não se sabe ao certo quais as bases moleculares e o significado biológico da imunodominância. É possível que a restrição do número de epítomos reconhecidos do parasita seja importante para estabelecer o equilíbrio necessário entre o parasita e o hospedeiro com intuito de propiciar uma resposta imune que ao mesmo tempo

mantenha o hospedeiro vivo e seja incapaz de eliminar o patógeno levando a uma infecção crônica (12, 16). Os epítomos imunodominantes variam de acordo com as cepas de *T. cruzi* de tal forma que um epítomo pode ser imunodominante na infecção com uma cepa e subdominante na infecção com outra cepa em hospedeiros geneticamente idênticos (52, 55).

Tabela 1 - Epítomos imunodominantes reconhecidos por linfócitos T CD8⁺ murinos após a infecção pelo *T. cruzi*

Antígeno	Epítomo	MHC	Cepa de <i>T. cruzi</i>	Referência
TS	IYNVGQVSI	H-2K ^d	Y	(11)
ASP-2	VNHRFTLV	H-2K ^b	Y	(53)
ASP-2	TEWETGQI	H-2K ^k	Y	(64)
TSA	ANYDFTLV	H-2K ^b	Brazil	(55)
TSA	ANYKFTLV	H-2K ^b	Brazil	(55)

Apesar das evidências de que há um forte processo de imunodominância durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*, até o momento um único estudo buscou determinar as bases celulares/ moleculares desse fenômeno. Nesse estudo foi descrito que camundongos homozigotos C57BL/6 ou heterozigotos F1 (C57BL/6 X BALB/c) infectados apresentavam uma resposta imune similar de linfócitos T CD8⁺ contra o epítomo VNHRFTLV restrito pelo MHC-I H-2K^b. Por outro lado, a resposta imune contra o epítomo IYNVGQVSI, restrito pelo MHC-I H-2K^d, era bastante reduzida nos animais heterozigotos quando comparados com os camundongos homozigotos BALB/c (52). Essa discrepância não podia ser atribuída a falha no repertório de linfócitos T CD8⁺ ou a baixa expressão de MHC-I H-2K^d por APC de camundongos heterozigotos. Esse fenômeno que restringia a resposta imune e gerava forte imunodominância podia ser reproduzido em outras linhagens de heterozigotos após infecção pelo *T. cruzi*. Entretanto, em camundongos imunizados com adenovírus recombinante AdASP-2 expressando o antígeno de *T. cruzi* não houve diferença na resposta imune dos animais homozigotos e heterozigotos (52).

Por fim, nesse mesmo trabalho, camundongos C57BL/6 infectados com duas cepas distintas de *T. cruzi* simultaneamente, as cepas Y e CL-Brener, apresentaram

resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ contra dois epítomos imunodominantes ao mesmo tempo. Com base nesses resultados foi proposto que o mecanismo envolvido na forte imunodominância induzida durante a infecção pelo *T. cruzi* ocorreria pela competição dos linfócitos T CD8⁺ durante o *priming* por um número limitado de APCs infectadas. Esse tipo de imunodominância, competição por APC, também é chamado *priming* competitivo ou imunodominância e é relatada em alguns casos de infecções experimentais (52, 65).

Figura 6 - Modelo de *priming* competitivo como o mecanismo que controla a forte imunodominância observada durante a infecção pelo *T. cruzi*

Camundongos BALB/c, C57BL/6 e F1 (C57BL/6 X BALB/c) foram infectados com *T. cruzi* (A) ou imunizados com tipo adenovírus humano 5 (AdHu5) expressando β-galactosidase (B). A resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ específicos T foi avaliada 15 dias após a imunização ou infecção por citotoxicidade *in vivo* usando células alvos recobertas com os peptídeos indicados representando os epítopos CD8. Partes dos dados foram obtidos a partir da publicação de Tzelepis *et al*, 2008 (52).

Apesar do papel imunoprotetor dos linfócitos T CD8⁺ durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*, estudos recentes propõe que partes destes linfócitos acabem por ser responsáveis por danos ao tecido cardíaco mais adiante na fase crônica. Estes linfócitos seriam capazes de produzir perforina mas não IFN-γ e teriam maior propensão a migrarem para o tecido cardíaco causando então danos tissulares que levariam a CCC (66).

1.7 Imunização genética contra a infecção experimental pelo *T. cruzi* com gene da proteína 2 da superfície de amastigotas (ASP-2)

Como mencionado anteriormente, estudos de imunização genética foram por nós realizados utilizando o gene que codifica o antígeno de *T. cruzi* ASP-2, expresso exclusivamente nas formas amastigotas (Figura 7). As imunizações com esse gene induziram imunidade medida pela presença de anticorpos, linfócitos T CD4 Th1 e CD8 Tc1 específicos, além de reduzir a mortalidade após a infecção experimental pelo *T. cruzi*. As imunizações genéticas foram feitas inicialmente com repetidas doses de DNA plasmidial (11, 67-71) e mais recentemente com um protocolo de imunização e reforço (*prime-boost*) heterólogo no qual o *priming* consistiu em DNA plasmidial e o *boosting* foi feito com um vetor adenoviral humano tipo 5 recombinante, AdASP-2 (53).

Durante os estudos de vacinação genética, observamos que este protocolo de imunização induz linfócitos T CD8⁺ do tipo efetores (TE) e efetores de memória (TEM). Estes linfócitos TEM CD8⁺ específicos se mantêm por longos períodos de tempos e são mediadores da imunoproteção contra o desafio experimental com *T. cruzi* (37, 57). A imunidade mediada por estes linfócitos é dependente de IFN- γ e perforina já que camundongos geneticamente modificados que não expressam estas moléculas são incapazes de desenvolver imunidade protetora (37).

Figura 7 - Representação esquemática do antígeno ASP-2 de *T. cruzi* e sua expressão em amastigotas intracelulares do *T. cruzi*

A) a proteína é um protótipo membro da família de antígenos de superfície denominadas TS que contém um peptídeo sinal putativo na região N-terminal, 2 sequências de ASP-Box e uma VTV-box no domínio C-terminal. A proteína é ancorada à membrana através de uma âncora de glicofosfatidil-inositol. B) A expressão de ASP-2 em amastigotas intracelulares foi determinada por imunofluorescência com o MAb K22 em células HeLa infectadas com parasitas da cepa Y. Barra, 14 mM. Fotomicrografia gentilmente fornecida pelo Dr. Carla Claser (Singapore Immunology Network -SIgN, - sinal, Singapura).

Este protocolo de *prime-boost* heterólogo foi por nós explorado durante este trabalho com o intuito de obter informações relevantes para o desenvolvimento de novas estratégias de vacinação contra a infecção ou protozoários patogênicos ou mesmo outros patógenos que causam doenças crônicas.

2 OBJETIVOS

Baseado nos estudos prévios de imunodominância, nós consideramos importante estudar qual seria o impacto da indução de resposta imune aos epítomos CD8 subdominantes na imunidade induzida pela vacinação genética contra a infecção experimental pelo *T. cruzi*. O uso destes epítomos nos permitiu testar a hipótese de que a ampliação da resposta imune para epítomos subdominantes pode ser importante para o desenvolvimento de vacinas genéticas eficazes contra infecções.

Para testar esta hipótese foram os objetivos específicos desta parte do projeto:

- a) Identificar o epítomos subdominantes na proteína ASP-2 de *T. cruzi*;
- b) Gerar plasmídios e vetores adenovirais nos quais a sequência que codifica o epítomo CD8 imunodominante da ASP-2 de *T. cruzi* foi modificada de forma a não ser mais capaz de induzir resposta imune contra o epítomo natural;
- c) Testar a imunogenicidade, a especificidade da resposta imune e a capacidade imuno-protetora contra a infecção experimental induzida pelos novos plasmídios e vetores adenovirais.

Na segunda parte deste trabalho, usando o modelo de vacinação genética do tipo imunização e reforço (*prime-boost*) heterólogo, testamos as hipóteses de que a proliferação e/ou a recirculação das células específicas contribui para a imuno-proteção contra a infecção experimental pelo *T. cruzi*.

Para testar estas hipóteses, foram os objetivos específicos:

- a) Tratar os animais vacinados após o desafio experimental com a droga hidroxiuréia capaz de inibir a proliferação celular e avaliar nestes animais a resistência à infecção experimental;
- b) Tratar os animais vacinados após o desafio experimental com a droga FTY720 capaz de inibir a recirculação dos linfócitos e avaliar nestes animais a resistência à infecção experimental.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Infecção experimental pela cepa Y de *T. cruzi* e parasitemia

Camundongos foram desafiados pelas vias intraperitoneal (i.p.) ou subcutânea (s.c.) com formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Os parasitas foram gentilmente cedidos pelo Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese. A quantidade de parasitas foi monitorada do 5º ao 15º dia através de microscopia óptica, contando o número de tripomastigotas em 5µL de sangue coletados da cauda dos camundongos. A mortalidade dos animais desafiados foi seguida por observação diária durante 50 dias.

3.2 Camundongos

Foram utilizados camundongos machos ou fêmeas com 8 a 12 semanas de idade das linhagens descritas na tabela 2 abaixo. Os camundongos foram obtidos, mantidos e manipulados de acordo com os procedimentos aprovados pelos comitês de ética de animais de experimentação da Universidade Federal de São Paulo e da Universidade de São Paulo (Id # CEP 0426/09 e REF.:Protocolo nº 55/08/CEEA respectivamente).

Tabela 2 - Camundongos utilizados neste projeto.

Linhagem de Camundongo
C57BL/6
A/Sn
B10.A,
gzmBCreERT2/ROSA26EYFP

3.3 Plasmídios recombinantes

A partir do gene da ASP-2, geramos plasmídios mutantes no qual o gene *asp-2* (genebank accession number: [AY186572](#)) foi mutado ou não no epítipo CD8. Os plasmídios foram produzidos com base no plasmídio plgSP-clone 9 (69). Através de uma sequência de PCRs o epítipo CD8 imunodominante teve os aminoácidos âncora trocados, o que é crítico para o reconhecimento por linfócitos CD8 específicos.

Tabela 3 - Plasmídeos utilizados neste trabalho

Plasmídeos	Epítipo CD8	Antígeno	Status imunológico
PlgSPclone9	TEWETGQI	ASP-2 original	Imunodominante
PlgSP TAWETGQA	TAWETGQA	ASP-2 mutado	

Os aminoácidos âncoras foram trocados por alaninas da seguinte forma: Foram construídos *primers* com a sequência de codons que codificam os aminoácidos do epítipo dominante, porém os codons que codificam os aminoácidos âncora foram trocados por codons de alanina (tanto no *primer forward* quanto no *reverse*). Construção dos *primers* para mutagênese sítio dirigida na tabela 4 a baixo:

Tabela 4 - *Primers* para metagênese sítio dirigida

Plasmídeo:	Aminoácidos:	Codons
plgSPclone9	TEWETGQI	ACC GAA TGG GAG ACG GGA CAA ATT
Novos Primer:		
plgSP TAWETGQA	TAWETGQA (forward)	GAT CCC CGC ATC ACC GCA TGG GAG ACG GGA CAA GCA CTC ATG ATC GTT C
	TAWETGQA (reverse)	G AAC GAT CAT GAG TGC TTG TCC CGT CTC CCA TGC GGT GAT GCG GGG ATC

3.4 Mutagênese sítio dirigida

Para a mutagênese sítio dirigido foi realizado três PCRs em sequência utilizando-se os seguintes conjuntos de *primers forward* e *reverse*:

Reação 1: *primer asp-2 forward* (flanqueia região 5' da *asp-2* e insere um sítio de KpnI) e o *primer TAWETGQA reverse* (para inserir a mutação)

1. 5'-GGGGGTACCATGCTCTCACGTGTTGCT-3';
2. 5'-GAACGATCATGAGTGCTTGGCCCGTCTCCCATGCGGTGATGCGGGG
ATC-3'

Reação 2: *primer asp-2 reverse* (flanqueia a região 3' da *asp-2* e insere um sítio de XbaI) e o *primer TAWETGQA forward* (para inserir a mutação)

1. 5'-GATCCCCGCATCACCGCATGGGAGACGGGACAAGCACTCATGATCG
TTC-3'
2. 5'-GGGTCTAGATCAGACCATTTTTAGTTCACC-3'

Reação 3: *primer asp-2 forward* e o *primer asp-2 reverse* (para juntar dos fragmentos anteriores, já com a mutação)

3. 5'-GGGGGTACCATGCTCTCACGTGTTGCT-3'
4. 5'-GGGTCTAGATCAGACCATTTTTAGTTCACC-3'

Os segmentos foram amplificados por 18 ciclos e inseridos no vetor de clonagem pMOS. Os plasmídios foram transformados em bactérias pMOS. Foram então realizadas mini-preps (extração do DNA plasmidial por lise alcalina) de cada uma das colônias. Em seguida, foi feita a análise de restrição para a verificação da presença do inserto de 2085 pb. Então, os insertos enquanto presentes nesses plasmídios foram sequenciados para verificação da integridade de cada uma das ORFs. Logo, uma colônia proveniente de cada construção foi subclonada para um plasmídio de expressão (pIgSP) e crescida em larga escala, para amplificação da construção. Por fim, esses DNAs foram purificados por meio de ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério para utilização nos experimentos de imunização

como descrito em COSTA et al. (1998) (67). Cada uma dessas etapas é mais detalhada a seguir.

3.5 Composição das soluções e tampões utilizados

- Gel de agarose: agarose 1% (Life Technologies), TAE (1X), brometo de etídio (0,5 µg/ml, Sigma).
- PBS: NaH₂PO₄ 10 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4.
- Solução A: Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, glicose 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0.
- Solução B: NaOH 200 mM, SDS 1%.
- Solução C: acetato de potássio 3 M, ácido acético 5 M.
- TAE (1X): Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0.
- Tampão de amostra para eletroforese de DNA (6X): azul de bromofenol 0,25%, xileno-cianol 0,25%, glicerol 30%.
- TE (Tris-HCl pH8,0, 10mM e EDTA 1mM).

3.6 Meios de cultura para bactérias

- LB (Luria Bertani): triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, pH 7,0.
- LB sólido: LB, ágar (Difco) 1,5%.
- LB/AMP: LB acrescido de ampicilina 100 µg/ml (Sigma).
- LB/Tetraciclina: LB acrescido de ampicilina 20 µg/ml (Sigma).
- SOC: bactotriptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L e 10 ml de KCl 250 mM, pH 7,0 acrescido de glicose 20 mM e MgCl₂ 10 mM.

3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os genes utilizados nesse trabalho foram amplificados pela técnica de PCR utilizando-se da enzima Pfx Platinum DNA Polimerase, 50 mM de MgSO₄, 10x Pfx buffer (Invitrogen) e 10 mM de dNTP mix e DNA molde (100 ng por reação). O plasmídio utilizado como base nas 2 primeiras reações foi o plgSPclone9 (69)

purificado, na terceira reação os fragmentos da primeira e segunda reação foram usados como molde.

Após a realização das PCRs, seus produtos foram submetidos à eletroforese (80 V e 300 mA) em gel de agarose 1% e analisados. Posteriormente, as bandas correspondentes aos tamanhos dos genes, em pb, foram cortadas com o auxílio de um estilete, sob luz UV de ondas largas, para se fazer a eluição do DNA.

O DNA foi eluído utilizando do Kit Qiaex (Qiagen) adicionando-se Buffer Qiaex II numa quantidade de 3 vezes o volume do gel contido no eppendorf de 1500µL. Esta solução foi ressuspensa no *vortex* e depois foi adicionada sílica. Incubou-se a solução a 50 °C por 10 min. sendo que, a cada 2 minutos, era levada ao *vortex*. Em seguida, centrifugou-se a amostra a 10000rpm por 30 segundos e o sobrenadante foi removido com uma pipeta. Lavou-se o “pellet” com 500µL de Buffer Qiaex II e, mais uma vez, a amostra foi centrifugada. O DNA foi eluído com 12 µL de água bidestilada autoclavada e, por fim, centrifugado por mais 30 segundos a 10000 rpm sendo, posteriormente, o sobrenadante coletado. Ao se utilizar 1µL da amostra fez-se a quantificação por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.8 Clonagem da *asp-2* mutada no plasmídio pMOS e transformação de bactérias competentes pMOS

Após quantificação da eluição do produto da terceira PCR, esse foi clonado no vetor de clonagem pMOS segundo instruções do fabricante utilizando-se o kit Blunt-Ended PCR Cloning da GE.

Em seguida, bactérias competentes *E. coli* da cepa pMOS foram transformadas com o produto da ligação da seguinte forma: foram acrescidos às bactérias, aliqüotadas em 100 µL, 5 µL do produto de ligação. Fez-se incubação no gelo por 30 minutos, banho-maria à 42 °C por 2 min. e gelo por 2 minutos, respectivamente. Às bactérias, agora transformadas, foram acrescidos 400µL de meio SOC (SOB, 4 µL de MgCl₂ e 8 µL de glicose) e, posteriormente, colocadas no *shaker* durante uma hora. Transcorrido este tempo, as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo as quantidades adequadas de tetraciclina e ampicilina onde permaneceram em estufa, *overnight*, à temperatura de 37 °C.

3.9 Extração de DNA plasmidial por lise alcalina (miniprep)

Foram inoculadas colônias de bactérias que continham o inserto em 5 ml de meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina num tubo Falcon. Essas bactérias cresceram *overnight* a 37 °C sob agitação de 200 rpm no *shaker*. Foram coletados 1,5 mL da cultura num tubo eppendorf e centrifugado, por 2 minutos, sob rotação de 10000 rpm. Repetiu-se esta etapa. Colocou-se 100 µL de solução A e homogeneizou-se a amostra no *vortex*. Adicionou-se 200 µL de solução B, incubou-se por 2 min. para posterior acréscimo de 200 µL da solução C ficando sob incubação em gelo por 30 minutos.

Após este tempo, as amostras foram centrifugadas durante 15 min. sob rotação de 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos eppendorfs contendo 300 µL de isopropanol. Após homogeneização por inversão, os tubos foram armazenados a -20 °C por 3 h para que o DNA precipitasse. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos, sob 13000 rpm e a 4 °C. Desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se 500 µL de etanol 70% gelado. Os tubos passam por mais uma centrifugação a 4 °C e durante 5 min. sob 13000 rpm para lavar o *pellet*. O sobrenadante foi descartado e foi acrescentado aos *pellets* 30 µL de água bidestilada contendo RNAase (60 µg/mL). Por fim, estes materiais foram incubados em banho-maria a 37 °C por 1 hora para que a enzima pudesse agir.

3.10 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição para verificação da presença do inserto e sua orientação (*screening* para colônias positivas)

Os plasmídios foram digeridos com as enzimas de restrição KpnI e XbaI para que houvesse a liberação do inserto. No caso da presença deste, uma nova digestão foi feita pra que se verificasse sua orientação. Os constituintes da digestão foram: DNA a ser analisado, tampão (específico para cada enzima), enzima de restrição e água bidestilada autoclavada, totalizando um volume de 10µL. As amostras ficaram em banho-maria durante 3 h e, depois, foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Para a eletroforese, foi adicionado às amostras tampão TAE 6x. O procedimento aconteceu durante 30 min. e sob 80V. Como padrão de peso molecular, foram utilizados fragmentos do bacteriófago λ digeridos com HindIII.

3.11 Sequenciamento

Após verificação da presença do inserto (ORF) na orientação correta, estas construções foram submetidas à reações de sequenciamento através de PCRs de 25 ciclos sob as seguintes condições: 96 °C – 5 minutos; 96 °C – 20 segundos; 50 °C – 15 segundos; 60 °C – 4 minutos; 4 °C - ∞. Para cada tubo, foram utilizados 1 µL da amostra de DNA (cerca de 200 ng), 2 µL de Big Dye (Big Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing kit – Applied Biosystems), 3 µL de *primer* (1 µM), 1 µL de Tampão *Save money* e 10 µL de água bidestilada autoclavada.

Após o término da reação, o DNA passou por um processo de precipitação seguindo os seguintes passos: aos produtos da PCR foram adicionados 40 µL de isopropanol 65% (MERCK), em placa de 96 poços, com incubação de 15 min. protegido da luz à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se a placa por 45 min. sob 2250 g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e, ao *pellet* de DNA, foram adicionados 150 µL de etanol 60% (MERCK). Após nova centrifugação de 5 min. sob 2250 g à temperatura ambiente, a amostra foi concentrada em *speed-vac* por 15 minutos. Finalmente a amostra foi estocada a -20 °C e enviadas para sequenciamento no CINTERGEN – Universidade Federal de São Paulo (laboratório do Prof. Dr. Sang Won Han) ou no Centro de Estudos do Genoma Humano, na Universidade de São Paulo.

3.12 Análise computacional das sequências obtidas

Todos os clones obtidos e sequenciados foram analisados utilizando-se o pacote DNASTAR versão 5.00 (DNASTAR Inc.).

3.13 Sub-clonagem

Constatada a integridade da sequência do inserto no plasmídio pMOS, essa construção foi subclonada em pIgSP e produzida em larga escala para futuro uso nos experimentos de imunização.

As construções com os insertos corretos (sequência da ASP-2 integra e epítipo dominante mutado conforme o esperado) foram digeridas com as enzimas

de restrição KpnI e XbaI para que houvesse a liberação do inserto. As mesmas enzimas foram utilizadas para fazer a digestão do plasmídio plgSP. Os insertos e os plasmídeos plgSP digeridos foram eluídos do gel de agarose 1% e quantificados a reação de ligação foi feita segundo a fórmula

$$X \text{ ng inserto} = [(\text{tamanho do inserto em pb} * 200 \text{ ng vetor}) / 5504 \text{ pb}] * 0,25$$

Foram usados a enzima ligase (Life Technologies) e seu tampão nas condições de reação indicadas pelo fabricante.

3.14 Crescimento em larga escala e método da lise alcalina em larga escala (maxiprep)

Inicialmente, foi preparado um pré-inóculo a partir de 5-8 colônias de bactérias DH5 α transformadas com clones oriundos de diferentes plasmídios. Estas foram inoculadas em 100 mL de SOB (bactotripton 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl 250 mM, glicose 20 mM e MgCl₂ 10 mM) acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina (AMP), incubando-se, a seguir, por 16 h a 37 °C sob agitação constante. No dia seguinte, a partir de 50 mL do pré-inóculo, foram feitos dois inóculos separados em 450 mL de meio TB, cada qual continha (bactotripton 6 g, extrato de levedura 12 g e glicerol 2 mL). Posteriormente, foram acrescidos, a cada um, 50 mL de uma solução de KH₂PO₄ 0,17 M e K₂HPO₄ 0,72 M e incubadas novamente a 37 °C, sob agitação por mais 16 horas.

As bactérias foram centrifugadas em centrífuga Sorvall a 5000 rpm 15 min. A 4 °C. O precipitado resultante de 250 mL de cultura foi ressuspensionado em 21 mL de solução A (Tris 25 mM pH 8,0, glicose 50 mM e EDTA 10 mM) com auxílio do *vortex* e agitação manual até que a solução ficasse completamente solúvel. A seguir, adicionou-se 19,5 mL de uma solução B (NaOH 200 mM e SDS 1%) e o material foi homogeneizado levemente. Posteriormente, acrescentou-se ainda à suspensão bacteriana mais 15 mL de uma solução de acetato de potássio 3 M e ácido acético 5 M, seguindo-se incubação em gelo por 25 minutos. Em seguida, esta suspensão foi centrifugada a 8000 rpm por 20 min. a 4 °C e filtrou-se o sobrenadante caso houvesse restos sólidos. Adicionou-se 1 volume de álcool isopropílico e incubou-se por período *overnight* a 4 °C em geladeira.

No dia seguinte, a solução contendo DNA precipitado foi centrifugada a 12500 rpm por 25 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” de cada tubo foi ressuspendido em 2 mL de tampão TE (Tris-HCl pH8,0, 10 mM e EDTA 1 mM). Em seguida, foi adicionado a cada tubo 1 volume de solução gelada de LiCl 5 M para precipitação de moléculas de RNA. Após uma breve homogeneização por inversão, o material foi centrifugado a 5000 rpm por 15 min. a 4 °C. O sobrenadante, que continha o DNA, foi transferido a outro tubo e precipitado novamente com 1 volume de álcool isopropílico por período “overnight” a 4 °C em geladeira.

No dia seguinte, o “pellet” de DNA foi ressuspendido em 1 mL de tampão TE. Logo, este material foi incubado em banho-maria a 56°C por 15 minutos. Foi acrescentado 10 µL de RNase (10 mg/mL) e o ele foi incubado por 15 min. a 37 °C. Após esta etapa, cerca de 500 µL do material foram transferidos para tubos eppendorf de 1,7 mL. Em seguida, cada tubo recebeu 1 volume de uma solução de PEG 6000/NaCl 1,6 M para nova precipitação do DNA. Os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 25 min. a temperatura ambiente.

O “pellet” de DNA de cada tubo foi finalmente ressuspendido em 500 µL de tampão TE e armazenado em geladeira a 4 °C.

3.15 Purificação de plasmídeo crescido em larga escala por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céso (CsCl)

Os plasmídios foram então crescidos em larga escala e purificado para as imunizações. Para isso, cerca de 6-7 mg do plasmídeo foram adicionados a uma solução de CsCl 1 g/mL mais 200 µL de uma solução de brometo de etídio (10 mg/mL). O material foi homogeneizado, transferido para tubos de ultracentrifugação de 5,1 mL (Beckman) e centrifugado por 12 h a 70000 rpm em ultracentrífuga L8-M (Beckman) a 20 °C (aceleração máxima e sem desaceleração). No dia seguinte, o DNA plasmidial foi coletado com auxílio de seringas e agulhas e transferido para tubo de 50 mL (Falcon). Para que brometo de etídeo fosse completamente retirado da solução de DNA plasmidial, esta foi lavada diversas vezes com solução de butanol-1 saturado em água por centrifugação de 1 minuto a 2000 rpm. Logo, foi acrescentada água bidestilada autoclavada obedecendo a seguinte regra: para cada 1,5 mL de DNA retirados dos tubos após ultracentrifugação, acrescentou-se água bidestilada autoclavada de modo a se obter um volume final de 4 mL. Em seguida,

este DNA plasmidial foi precipitado utilizando-se 2,5 volumes de etanol absoluto. O material foi armazenado em geladeira a 4 °C por período “overnight”. No dia seguinte, este foi centrifugado a 3750 rcf por 30 min. a 4 °C para formação de “pellet”. Posteriormente, o “pellet” de DNA foi lavado com aproximadamente 10 mL de etanol 70% e submetido novamente à centrifugação a 3750 rcf por 5 min. a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e DNA precipitado foi seco à vácuo por cerca de 15 min. e ressuspendido em 1 mL de água bidestilada autoclavada.

3.16 Geração do vetor adenoviral AdTAWETGQA

O novo gene foi sub-clonado no vetor pAdCMV (Invitrogen) e mandado para a empresa Vectors BioLabs (Philadelphia, USA.) Esta empresa então gerou um vetor adenoviral humano tipo 5 recombinante deficiente em replicação. Este novo vetor adenoviral foi denominado AdTAWETGQA.

3.17 Produção e purificação dos vetores adenovirais recombinantes

Três vetores adenovirais foram utilizados neste estudo: i) AdASP-2; ii) Ad β -gal e iii) AdTAWETGQA. Os dois primeiros foram gerados e caracterizados como previamente descrito (72). O terceiro foi gerado com descrito acima.

Produção de estoque viral:

Foram preparadas quatorze garrafas de cultivo grandes (150 cm²) com células HEK293A com confluência $\geq 90\%$. Estimamos que cada garrafa com monocamada confluenta de HEK293 tenha em torno de 10^7 células. As células foram infectadas com amostras purificadas e tituladas de vírus de forma a empregar uma quantidade, multiplicidade de infecção (m.o.i.), em torno de 1 a 10. Dessa forma são necessárias de 10^7 a 10^8 p.f.u./garrafa. Amostras de vírus foram adicionadas em DMEM completo. As garrafas foram incubadas fechadas a 37 °C, por uma hora. Após a incubação, o volume das garrafas foi completado para 35 mL com DMEM fresco.

As garrafas foram incubadas até o desenvolvimento de efeito citopático e desprendimento total das células. O conteúdo das garrafas foi coletado em tubos de

50 mL e centrifugado a 1200rpm a 4 °C, durante 10 min. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspendidos em 3-5 mL de tampão Tris 0,1M pH=8,0. Este material foi congelado a -70 °C imediatamente.

3.18 Purificação dos vetores adenovirais recombinantes em gradiente de cloreto de cézio

A suspensão de células foi descongelada e misturada a uma solução de deoxicolato sódico 5%. O volume de deoxicolato usado correspondeu a 1/10 do volume de suspensão de células. A suspensão foi homogenizada e incubada em gelo por 30 min. O material foi macerado com ajuda de um *potter* de vidro até que a consistência da suspensão ficasse líquida. O volume foi completado para 16,4 ml com Tris 0,1M pH=8 (este volume correspondeu a 63% da solução de cloreto de cézio). Foi adicionado 9,6 ml de solução saturada de cloreto de cézio (a proporção é de 5,8 mL de cloreto de cézio saturado para cada 10 mL de suspensão de células, ou 37% de solução de cloreto de cézio e 63% de suspensão de células). Após homogeneização com *vórtex*, a amostra foi transferida para tubos de ultracentrífuga (PA, Ultracrimp 11,5ml). Os tubos foram centrifugados a 35.000 rpm a 4 °C durante 16 h (Rotor VTI65.1). A banda de adenovírus foi coletada e dialisada contra Tris 0,01 M pH=8, em câmara fria (4 °C) durante 4 h. Foram adicionados 10% glicerol ao volume dialisado (4400 µL + 484 µL de glicerol autoclavado puro), e as suspensões aliquotadas (50-100 µl) e congeladas a -70 °C.

3.19 Titulação de estoques de adenovírus recombinantes

Foram preparadas previamente placas de titulação que consistem em placa de cultivo de 24 poços, no qual foram semeadas células HEK293 numa densidade de 3×10^5 células por poço, em DMEM completo e cultivadas durante 24 h a 37 °C até que os poços atingiram confluência $\geq 90\%$. Foi descongelada uma alíquota de vírus purificado em banho de gelo, sonicada durante 20 segundos em um sonicador de banho, e foi preparada uma diluição inicial de 1:100 (10^{-2}) do estoque de vírus em DMEM completo (10 µL de vírus purificado + 990 µL de DMEM completo). A partir dessa diluição inicial, foram preparadas diluições em série, com fator 10. As diluições foram preparadas em quadruplicata, da seguinte forma: em uma placa de

cultivo de 96 poços, foram adicionados 225 µl de DMEM nas quatro primeiras fileiras completas (linha A até D, colunas 11 até 12, completas), com pipetador multicanal, pipetamos 4 alíquotas de 25 µl da diluição inicial 10^{-2} e foram acrescentados à primeira coluna da placa de 96 wells. Repetimos a operação até que completamos as doze colunas. Dessa forma, as diluições feitas na placa de 96 poços vão de 10^{-3} (coluna 1) até 10^{-14} (coluna 12). Foram usados 200 µL de cada réplica das diluições 10^{-6} a 10^{-11} para infectar um poço da placa de titulação previamente preparada. Incubamos por uma hora a 37 °C. Após a incubação, adicionamos 1500 µL de meio DMEM completo a cada poço da placa de titulação. As placas foram incubadas por 7 dias a 37 °C. O título foi calculado a partir da maior diluição de vírus que leva a formação das placas de lise.

3.20 Protocolo de Imunização

Camundongos de diferentes linhagens de 8-12 semanas de idade foram imunizados pela via intramuscular (i.m.) no *Tibialis anterioris*, com auxílio de seringas de insulina U-100 e uma agulha de calibre 27G (67). As imunizações foram feitas aplicando-se 50 µl em cada músculo.

No caso da imunização homóloga, a dose de DNA plasmidial (pcDNA3 controle, plgSPCI.9 ou plgSPTAWTGQA.9) foi de 100 µg por animal num total de 4 doses com 2 a três semanas de intervalo entre cada uma (70). No caso das imunizações do tipo *prime-boost* heterólogo, a dose de DNA plasmidial (pcDNA3 controle, plgSPCI.9 ou plgSPTAWTGQA.9) consistiu num total de 100 µg. Após três semanas, os animais foram imunizados com 2×10^8 pfu dos vetores adenovirais (Adβ-gal, AdASP-2 e AdTAWETGQA). Os ensaios imunológicos foram realizados 2 semanas após a última dose.

3.21 Medição da resposta imune mediada por linfócitos T CD8

3.21.1 Peptídeos sintéticos

Peptídeos sintéticos foram obtidos da Genscript (Piscataway, NJ). A pureza destes foi determinada como sendo: TEWETGQI (95%); PETLGHEI (97.4%);

YEIVAGYI (99.40%); TPTAGLVGF (98.6%); GSRNGNDRL (97.1%); ESKSGDAPL (96.1%); HEHNLFGI (98.7%); ESSTPTAGL (99.1%); ESEPKRPNM (98.7%); VSWGEPKSL (99.2%); YSDGALHLL (97.3%); AESWPSIV (96.5%); e RPNMSRHLF (99.4%); e VNHRFTLV (>90%).

O pentâmero H2K^b-VNHRFTLV foi obtido da ProImmune Inc. (Oxford, UK).

3.21.2 ELISPOT

Para o ensaio de ELISPOT, foram utilizadas placas de nitrocelulose de 96 poços (Multiscreen HA, Milipore) cobertas com 60 µl/poço de PBS estéril contendo 10 µg/mL do anticorpo monoclonal anti-IFN-γ de camundongo (R4-6A2, Pharmingen). Após incubação durante a noite a temperatura ambiente, a solução contendo o anticorpo monoclonal será removida por aspiração em ambiente estéril e as placas foram então lavadas por 3 vezes com RPMI. As placas foram bloqueadas pela incubação dos poços com 100 µL do meio RPMI contendo 10 % de soro fetal bovino por, pelo menos, 2 h a 37 °C.

As células respondedoras foram obtidas do baço de camundongos imunizados e/ou imunizados e infectados com *T. cruzi*. Estas células foram lavadas 3 vezes em meio RPMI e então ressuspensas em meio RPMI completo na concentração de 0.2 a 1x10⁶ células viáveis/mL. O meio completo contém 1% de NEAS, L-glutamina, vitaminas e piruvato, 5X10⁻⁵ M 2-ME, 10% de soro fetal bovino (Hyclone) e 30 U/mL de interleucina-2 humana recombinante (cedida por Hoffman-La Roche).

As células apresentadoras foram obtidas do baço de camundongos normais. O mesmo procedimento descrito acima foi feito, sendo que a concentração destas foi de 3.5x10⁶ células viáveis/mL. Cem microlitros da suspensão contendo células respondedoras e 100 µL da contendo células apresentadoras de antígeno foram adicionadas em cada poço. A placa foi incubada em condições estáticas por 24 h a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. As estas culturas foi adicionado 20 µL de meio de cultura ou meio de cultura contendo o peptídeo sintético indicado. A concentração final de peptídeo em cultura foi de 10 µg/mL. Foram utilizados os peptídeos IYNVGQVSI, VNHRFTLV, ANYDFTLV, ANYKFTLV, YEIVAGY e TEWETGQI (todos obtidos da GeneScript, USA).

Depois da incubação, as células foram desprezadas. Para remover quaisquer células residuais, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS e 5 vezes com PBS-Tween 20. Cada poço recebeu então 75 μ L do anticorpo monoclonal anti-IFN- γ de camundongo biotinilado XMG1.2 (PharMingen) diluído em PBS-Tween 20 na concentração final de 2 μ g/mL. As placas foram incubadas durante a noite a 4 °C. Os anticorpos não ligados foram removidos pela lavagem das placas por 6 vezes com PBS-Tween 20. Adicionamos então estreptoavidina-peroxidase (KPL) na proporção de 1:800 em PBS-Tween 20, em volume final de 100 μ L/poço. As placas foram incubadas por 1-3 h a ta e então lavadas de 3 a 5 vezes com PBS-Tween 20 e mais 3 vezes com PBS. As placas foram reveladas adicionando-se 100 μ L/poço do substrato da peroxidase (50mM Tris-HCl, pH 7.5, contendo 1 mg/ml de DAB e 1 μ L/mL de 30 % de peróxido de hidrogênio, ambos da SIGMA). Depois de uma incubação de 15 min a temperatura ambiente, a reação foi interrompida descartando-se a solução substrato e lavando-se as placas com água corrente. As placas foram então secas a ta e o número de células produtoras de IFN- γ foram estimadas com a ajuda de uma lupa.

3.21.3 Ensaio de citotoxicidade *in vivo*

Suspensões de células foram preparadas do baço de camundongos normais. Os eritrócitos foram lisados usando tampão de lise (0.15 M NH_4Cl , 1 mM KHCO_3 , 0.1 Mm Na EDTA, pH 7.2-7.3). Depois de duas lavagens com RPMI, as células foram ressuspensas em meio R10 % - RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino. A viabilidade das células foi avaliada utilizando o corante Azul de Tripán (0.2%) como discriminante entre células vivas e mortas. A concentração das células foi estimada em câmara de Neubauer. Metade dos esplenócitos foram corados com 0.5 μ M (CFSE^{low}) e a outra metade com 5 μ M (CFSE^{high}) de CFSE (Molecular Probes) em PBS por 15 min a 37 °C. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em R10% pré-aquecido. A população alvo CFSE^{high} foi pulsada com 10 μ g/mL do peptídio específico. As células foram incubadas com o peptídio em meio R10% por 40 min a 37 °C, lavadas extensivamente, ressuspensas em R10% e contadas novamente. Ambas populações de CFSE foram misturadas na concentração de 1:1, centrifugadas, ressuspensas em RPMI e injetadas intravenosamente (via retro-

orbital) em camundongos numa concentração de $1-2 \times 10^7$ células/camundongo. Depois de aproximadamente 20 horas, os baços dos camundongos que receberam as células marcadas foram retirados, e as suspensões de células foram fixadas em PBS contendo 3.7% de paraformaldeído por 10 min a temperatura ambiente. Após uma lavagem com PBS, foram ressuspensas em tampão de FACS. Cada grupo experimental consistiu de três ou mais animais, e cada camundongo foi analisado individualmente. As populações de linfócitos CFSE^{low} e CFSE^{high} foram detectadas no baço via citometria de fluxo, usando o FACScan e analisadas com o software CellQuest (Becton Dickinson). A porcentagem de lise específica para o peptídeo foi determinada pela fórmula:

$$1 - \frac{\% \text{ CFSE}_{\text{high}} \text{ infectado} / \% \text{ CFSE}_{\text{low}} \text{ infectado}}{\% \text{ CFSE}_{\text{high}} \text{ naíve} / \% \text{ CFSE}_{\text{low}} \text{ naíve}} \times 100 \%$$

3.21.4 Determinação do número de células CD8⁺ esplênicas específicas pela coloração com o pentâmero H-2K^b-VNHRFTLV

Suspensões de células foram preparadas do baço através do processo de maceração. Os eritrócitos foram lisados usando tampão de lise (0.15 M NH₄Cl, 1mM KHCO₃, 0.1Mm Na EDTA, pH 7.2-7.3). Depois de duas lavagens com RPMI, as células foram ressuspensas em meio R10% - RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino. A viabilidade das células foi avaliada utilizando o corante Azul de Tripan (0.2%) como discriminante entre células vivas e mortas. A concentração das células foi estimada em câmara de Neubauer.

As células foram ressuspensas em tampão MAC's e coradas com os multímeros H-2K^b-VNHRFTLV seguindo as instruções do fabricante. O número de linfócitos T CD8 específicos foram determinado por fluorescência com ajuda de um aparelho de citofluorometria (FACS) da BD (52).

3.21.5 Isolamento de linfócitos, coloração na superfície celular e coloração intracelular (ICS)

Suspensões de células foram preparadas do baço através do processo de maceração. Os eritrócitos foram lisados usando tampão de lise (0.15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 Mm Na EDTA, pH 7.2-7.3). Depois de duas lavagens com RPMI, as

células foram ressuspensas em meio R10 % - RPMI 1640 com 10 % de soro fetal bovino. A viabilidade das células foi avaliada utilizando o corante Azul de Tripán (0.2%) como discriminante entre células vivas e mortas. A concentração das células foi estimada em câmara de Neubauer. As células foram ressuspensas em tampão MAC's e coradas para os antígenos de superfície de acordo com a diluição sugerida pelo fabricante. Ou então, as células foram colocadas em cultura em meio DMEM suplementado com ou sem estímulo (10 µg/ml de peptídeo) a 37 °C em 5% CO₂ por 12h. A estas culturas foi adicionado o anticorpo anti-CD28 (2 µg/mL), anti-CD107a (Clone 1D4B, 2 µg/mL; BD Pharmingen), 5 µg/mL de monensina (BD Biosciences) e 10 µg/mL de brefeldina A (BD Biosciences). Depois de 12h de incubação, as células foram coradas para superfície com anti-CD8 marcado com PerCP ou PE, no gelo por 20 min. Para detectar IFN-γ e TNF-α por ICS, as células foram lavadas duas vezes em tampão contendo PBS, 0.5% BSA, e 2 mM EDTA, fixadas em uma solução de 4% de PBS-paraformaldeído por 10 min, e permeabilizadas por 15 min em PBS, 0.1% BSA, e 0.1% saponina. Após serem lavadas duas vezes, as células foram coradas com anti-IFN-γ marcado com APC ou PE (Clone XMG1.2), anti-TNF-α marcado com PE (clone MP6-XT22), anti-IL-2 marcado com APC (clone JES6-5H4) ou anti-IL-10 marcado com APC (JES5-16E3) por 20 min no gelo. Finalmente, as células foram lavadas duas vezes e fixadas em 1% PBS-paraformaldeído. A fluorescência celular foi medida com um FACSCanto II ou FACSCalibur (BD Biosciences) e os dados foram analisados através do software FlowJo (TreeStar, Inc.).

3.22 Tratamento com FTY720

Camundongos imunizados ou imunizados e infectados ou apenas infectados foram tratados a cada 48 horas com 20 µg de FTY720 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) por camundongo (1 mg/Kg) em um volume final de 0,2 mL pela via i.p.. Camundongos controle foram tratados apenas com diluente.

3.23 Tratamento com Hidroxiuréia

Camundongos imunizados e infectados foram tratados 4 vezes com 20 mg de Hydroxyurea (HU, Sigma Aldrich- H8627) por camundongo a cada 48-72 horas. Cada tratamento foi administrado em duas doses i.p. (10mg a cada dose) com intervalo de 7 h entre as doses (73).

3.24 Tratamento com Tamoxifeno

Os camundongos gzmBCreERT2/ROSA26EYFP receberam o tamoxifeno (Sigma) em um volume final de 0,2 mL pela via i.p. na dose de 1 mg por animal diluído em 10% EtOH/ (Sigma) e 90% óleo de semente de girassol. Foi administrada 1 dose diária por animal num total de 7 dias consecutivos.

3.25 Ensaio de depleção *in vivo*

Camundongos A/Sn vacinados foram tratados com o anticorpo monoclonal 53.6.7. Nos dias 2 e 3 antes do desafio com 150 forma sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, esses animais receberam 1mg de mAb anti-CD8 ou isotipo-controle (Rat IgG) pela via i.p.. Sete dias após o desafio, cada camundongo recebeu mais uma dose desse mesmo tratamento. A eficiência desse tratamento reduz as células CD8⁺ do baço para menos de 5% quando comparado com camundongos tratados com anti-CD8 em comparação com o grupo tratado com IgG de rato controle (Sigma).

3.26 Sorting de células CD8 para ELISPOT com BMDC

Células de baço de animais dos diferentes grupos foram isoladas e coradas para a expressão de CD8 conforme o descrito anteriormente. As células marcadas foram então selecionadas por *sorting* utilizando-se o aparelho da BD FACSAria III cell sorter. A análise da pureza após sorting foi detectada pelo mesmo aparelho, foi observado uma pureza de pelo menos 98% das células CD8 positivas obtidas de cada grupo.

3.27 Tolerância periférica

Os peptídios liofilizados foram ressuspensos em DMSO e armazenado a -20 °C na concentração de 100 mg/ml. O peptídeo estoque foi diluído 100 vezes em PBS estéril e 100 µL dessa solução foi injetada pela via i.v. Camundongos B10A foram tolerizados pela administração i.v. de 100 µg dos peptídios nos dias -7, -4, -1, 7, 14 e 21. Os camundongos foram infectados no dia zero pela via s.c. com 10⁴ formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. Trinta e cinco dias após infecção foi realizada a análise da especificidade dessas células.

3.28 Diferenciação de BMDCs

Células de medula óssea foram removidas de camundongos B10.A tipo selvagem. Estas células progenitoras foram cultivadas em presença de GM-CSF 20 ng/mL (PeproTech) em placas de Petri 96 X 21mm (TPP) com troca do meio a cada 3 dias. Após 8 dias em cultura, as células foram então incubadas por 48h em presença ou ausência de tripomastigotos de cultura (TCT, do inglês, tissue culture trypomastigotes) da cepa Y de *T. cruzi* na proporção de 3 parasitos por BMDC ou de 50 pfu por BMDC de adenovírus humano tipo 5 recombinante que expressa β-galactosidade (Adβ-gal) ou proteína ASP-2 (amastigote surface protein-2) de *T. cruzi* (AdASP-2). Como controle, BMDC foram incubadas com 1 µg/mL de LPS (Sigma). Após incubação, BMDC foram examinadas por citometria de fluxo (BD FACSCalibur ou BD FACSCantoII) para expressão de marcadores fenotípicos e de ativação. Foram utilizados os anticorpos conjugados CD11c FITC (HL3), CD8α PE (53- 6.7), H-2Kb PE (AF6-88.5), IAb PE (AF6 120.1), CD11b APC (M1/70), CD40 APC (3/23), CD80 APC (16-10A1), CD86 APC (GL1), IAb biotinilado (25-9-17) e estreptoavidina PerCP ou APC, todos da companhia BD; CD205 biotinilado (205yekta) da companhia eBioscience e PDCA-1 FITC ou PE (JF05-1C2.4.1) da companhia Miltenyi Biotec.

3.29 Análise estatística

Os valores correspondentes ao picos de parasitemia (transformados em log), o número de células produtoras de IFN-γ (ELISPOT), a citotoxicidade *in vivo* observados nos diferentes grupos de animais foram comparados através da análise

de variância (ANOVA) unidirecional e posteriormente utilizando-se o teste Tukey HSD. Teste de Log-Rank será utilizado para a comparação das sobrevivências dos camundongos após o desafio com o *T. cruzi*. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de *P* for $< 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação de epítomos subdominantes na proteína ASP-2 de *T. cruzi*

Ao iniciarmos este trabalho havíamos identificado somente um epítopo imunodominante na ASP-2 de *T. cruzi* reconhecido por linfócitos T CD8⁺ restritos pelo MHC H-2K^k durante a imunização com proteínas recombinantes ou infecção experimental (52, 53, 64, 74). Para identificar novos epítomos subdominantes na ASP-2 restritos pelas moléculas de MHC H-2K^k e H-2D^d, camundongos do haplótipo A foram infectados com *T. cruzi* (B10.A) ou imunizados com o protocolo de *prime-boost* heterólogo com DNA pasmdial plgSP-Cl. 9 seguido do vetor adenoviral AdASP-2 (A/Sn).

Os camundongos B.10A foram usados por que são resistentes a infecção pela cepa Y de *T. cruzi* e assim pudemos estudar a resposta imune induzida pela infecção nos dias 14 e 28. O mesmo não é possível com animais A/Sn que são altamente susceptíveis e morrem rapidamente após a infecção pelo *T. cruzi* e portanto só foram utilizados em ensaios de imunização. Os camundongos A/Sn foram imunizados segundo o protocolo *prime-boost* heterólogo descrito em Materiais e Métodos acima (37). A especificidade da resposta gerada pela infecção ou pela imunização foi avaliada nos dias 14 ou 28 após infecção ou no dia 14 após o *boost* com AdASP-2, respectivamente.

Primeiramente analisamos a resposta imune pela presença de células produtoras de IFN- γ usando o ensaio de ELISPOT. Para esses ensaios os esplenócitos totais foram estimulados com os peptídeos da ASP-2 preditos para se ligar à moléculas MHC H-2K^k e H-2D^d (Tabela 5). Conforme o anteriormente descrito, os animais do haplótipo A infectados com a cepa Y de *T. cruzi* reconheceram apenas o epítopo imunodominante presente na ASP-2, TEWETGQI. Em contraste, os animais imunizados reconheceram além desse epítopo, dois outros epítomos também restritos pela molécula de MHC H-2K^k, PETLGHEI e YEIVAGYI (Figura 8A).

Tabela 5 – Peptídeos utilizados nesse estudo

Peptídeos	Posição dos AA	H-2 (restrição)
T E WETGQ I	320-327	K ^k
P E TLGHE I	650-657	K ^k
Y E IVAGY I	140-147	K ^k
H E HNLF G I	130-137	K ^k
A E SWPS I V	121-128	K ^k
T P TAGLV G E	488-496	L ^d
R P NMSRH L E	36-44	L ^d
G S RNGND R L	172-179	L ^d
E S KSGDAP L	69-77	L ^d
E S EPKR P N M	31-39	L ^d
E S STPTAG L	485-493	L ^d
V S WGEPKS L	239-247	L ^d
Y S DGALH L L	438-446	L ^d

Os peptídeos foram selecionados de acordo com a pontuação determinada pelos programas disponíveis nos sites: <http://syfpeithi.de> e http://wwwbimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/. Os aminoácidos ancora estão representados em negrito e grifados

Figura 8 - Identificação do epítipo CD8 durante a resposta imune de camundongos H-2^a infectados com *T. cruzi* ou geneticamente vacinados com o gene da ASP-2

Camundongos B10.A foram infectados com 10^4 formas sanguíneas de *T. cruzi* i.p.. Camundongos A/Sn foram imunizados pela via i.m. utilizando-se o protocolo *prime-boost* heterólogo (DNA plasmidial/vetor adenoviral recombinante) contendo o gene da ASP-2 nos dias 0 e 21. Grupos controle eram camundongos naives ou imunizados com os vetores sem o gene da ASP-2 (DNA plasmidial: pcDNA3/vetor adenoviral recombinante contendo o gene da β-galactosidase: Adβ-gal). A - Duas e quatro semanas após infecção e duas semanas após o *boost* a especificidade das células de baço foi avaliada através do estímulo *in vitro* com meio ou com os peptídeos indicados na figura na concentração final de 10μM. O número de células específicas produtoras de IFN-γ (*spot forming cells* - SFC) foi estimado pelo ensaio *ex-vivo* ELISPOT. B - A capacidade citotóxica das células com especificidade para os epítipos encontrados na ASP-2 no Painel A foi avaliada *in vivo* com a transferência de células alvo marcadas com CFSE e pulsadas com os peptídeos

Posteriormente, a resposta específica para esses epítipos foi confirmada pelos ensaios de citotoxicidade *in vivo* (Figura 8B) e ICS na qual os esplenócitos totais desses mesmos grupos foram estimulados em cultura com os peptídeos da ASP-2 e, assim, os linfócitos específicos foram avaliadas quanto a produção de IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-10 e expressão de CD107a (Figura 9).

Camundongos B10.A e A/Sn foram infectados ou imunizados assim como descrito na figura anterior. Três semanas após a infecção ou duas semanas após o *boost*, as células de baço desses camundongos foram colocadas em cultura com meio ou com os peptídeos da ASP-2 restritos pelo MHC H-2K^k (TEWETGQI, PETLGHEI e YEIVAGYI). Após 12h de cultura com anti-CD28, CD107a, brefeldina e monensina na presença dos peptídeos ou não, essas células foram coradas para detecção de: CD8, IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-10. São mostrados na figura análises representativas de 4 camundongos por grupo em cada experimento. **A** - exemplo de linfócitos de camundongos B10. *A naïves*, análise da frequência de células específicas produtoras de TNF- α e/ou IFN- γ **B** - Exemplo de linfócitos CD8⁺ de baço de camundongos B10.A infectado, análise da frequência de células específicas produtoras de TNF- α e/ou IFN- γ . **C** - Exemplo de linfócitos CD8⁺ de baço de camundongos B10.A infectado, análise da frequência de células específicas produtoras de IFN- γ e/ou IL-2. **D** - Exemplo de linfócitos CD8⁺ de baço de camundongos B10.A infectado, análise da frequência de células específicas produtoras de IFN- γ e/ou IL-10. **E** - Exemplo de linfócitos CD8⁺ de baço de camundongos A/Sn imunizados com os vetores controles (pcDNA3 e Ad β -gal), análise da frequência de células específicas produtoras de CD107a e/ou IFN- γ . **F** - Exemplo de linfócitos CD8⁺ de baço de camundongos A/Sn imunizados com os vetores controles (pcDNA3 e Ad β -gal), análise da frequência de células específicas produtoras de CD107a e/ou IFN- γ . **G** - Exemplo de linfócitos CD8⁺ de baço de camundongos A/Sn imunizados com o gene da ASP-2 (pIgSPcl.9/AdASP-2), análise da frequência de células específicas produtoras de CD107a e/ou IFN- γ . **H** - Exemplo de linfócitos CD8⁺ de baço de camundongos A/Sn imunizados com o gene da ASP-2 (pIgSPcl.9/AdASP-2), análise da frequência de células específicas produtoras de TNF- α e/ou IFN- γ . **I** - Exemplo de linfócitos CD8⁺IFN- γ ⁺ ou CD8⁺TNF- α ⁺ de baço de camundongos A/Sn imunizados com o gene da ASP-2 (pIgSPcl.9/AdASP-2), análise da frequência de células específicas produtoras de CD107a e/ou TNF- α e CD107a e/ou IFN- γ . **J** - Frequência de linfócitos CD8⁺ de camundongos A/Sn imunizados com o gene da ASP-2 (pIgSPcl.9/AdASP-2) multifuncionais.

Figura 9 - Análise funcional dos linfócitos CD8⁺ de baço específicos induzidos pela infecção ou imunização quanto a mobilização de CD107a e produção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-10

Não foram identificados linfócitos produtores de IL-10 ou IL-2 com especificidade para nenhum desses epítomos em camundongos infectados ou imunizados. No entanto, a maioria (66-80%, Figura 9 I e J) das células específicas para os 3 epítomos geradas tanto pela infecção quanto pela vacinação expressaram CD107a na superfície, acumularam TNF- α e IFN- γ simultaneamente, sendo portanto na sua maioria linfócitos T CD8⁺ multifuncionais.

Dessa forma, nós concluímos que existem 3 epítomos na ASP-2 reconhecidos por linfócitos T CD8⁺ restritos pelas moléculas de MHC H-2K^k. Um deles é o imunodominante (TEWETGQI) já anteriormente descrito, e dois novos epítomos subdominantes ou críticos: PETLGHEI e YEIVAGYI.

4.2 Geração de plasmídios e vetores adenovirais nos quais a sequência que codifica o epítomo CD8 imunodominante da ASP-2 de *T. cruzi* foi modificada

A identificação desses epítomos subdominantes presentes na ASP-2 nos permitiu testar a hipótese de que a indução de resposta a estes epítomos pode contribuir na resistência a infecção. Para testar essa hipótese fizemos mutações no gene da ASP-2 com o intuito de abolir a resposta ao epítomo imunodominante TEWETGQI. Essas mutações foram realizadas de forma a substituir os pares de bases que codificam os aminoácidos ancoras (2º e 8º) do epítomo imunodominante por pares de base que codificam alaninas. Este mesmo gene foi usado para geramos o vetor adenoviral AdTAWETGQA (Tabela 6). Dessa forma possuíamos dois plasmídios e dois vetores adenovirais com o gene da ASP-2. O plasmídio plgSPCI.9 continha o transgene original e o plgSP-TAWETGQA.9 continha o gene da ASP-2 mutado, sem o epítomo imunodominante (Tabela 6). Da mesma forma, o vetor adenoviral AdASP-2 continha o transgene original e o AdTAWETGQA continha o gene da ASP-2 mutado

Tabela 6 - Vetores utilizados neste trabalho:

Nomenclatura	Vetor	Epítomos CD8 da ASP -2		
plgSPCI.9	Plasmídeo	TEWETGQI	PETLGHEI	YEIVAGYI
plgSPTAWETGQA.9	Plasmídeo	TAWETGQA	PETLGHEI	YEIVAGYI
AdASP-2	Adenovirus	TEWETGQI	PETLGHEI	YEIVAGYI
AdTAWETGQA	Adenovirus	TAWETGQA	PETLGHEI	YEIVAGYI

4.3 Imunogenicidade, especificidade da resposta imune e a capacidade imuno protetora contra a infecção experimental induzida pelos novos plasmídios e vetores adenovirais

Inicialmente foram realizados experimentos utilizando o protocolo de imunização *prime-boost* homólogo só com DNA plasmidial (Figura 10A e B). Pode-se observar através dos ensaios de ELISPOT e citotoxicidade *in vivo* que a imunização com o plasmídio plgSP-Cl.9 contendo o gene da ASP-2 original foi capaz de induzir resposta imune para os 3 epítomos da ASP-2. Por outro lado, a imunização com o plasmídio plgSP-TAWETGQA contendo o gene da ASP-2 mutado induziu resposta apenas para os dois novos epítomos subdominantes. Assim, conforme o predito, a mutação no gene da ASP-2 foi capaz de abolir o reconhecimento do epítomo imunodominante TEWETGQI. Dessa forma, os animais imunizados com plgSPCl. 9 tinham resposta para os 3 epítomos da ASP-2 enquanto os animais imunizados com plgSP-TAWETGQA respondiam apenas para os epítomos subdominantes. Os animais imunizados com ambos os plasmídios simultaneamente tinham resposta igual a observada nos animais imunizados como o gene da ASP-2 original.

Após o desafio com *T. cruzi*, avaliamos a parasitemia e a mortalidade desses animais. Os grupos imunizados com o gene da ASP-2 mutado ou original não diferiram quanto ao controle da parasitemia. Houve diferença apenas entre os grupos imunizados com o gene da ASP-2 (original ou mutado) e o grupo controle imunizado com pcDNA3 (plasmídio controle, Figura 10C). Porém, ao analisarmos a mortalidade, observamos que os animais imunizados com o plasmídio plgSP-TAWETGQA (gene da ASP-2 mutado) foi mais rápida que do grupo imunizado com o plasmídio plgSPCl. 9 (gene da ASP-2 original, Figura 10D). Concluímos, portanto, que a imunidade aos epítomos subdominantes induzida pelo gene da ASP-2 mutado não confere o mesmo grau de proteção que a imunização com 3 epítomos (gene da ASP-2 original). Apesar disso, o plasmídio com o gene da ASP-2 mutado conferiu certo grau de imunidade protetora analisada neste sistema.

Camundongos A/Sn foram imunizados com pcDNA3, plgSPcl.9, plgSPTAWETGQA ou com plgSPcl.9 e plgSPTAWETGQA simultaneamente nos dias 0, 21 e 35 pela via i.m.. Duas semanas após a última dose os animais foram infectados com 150 formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. **A** - Duas semanas após infecção foi avaliada a frequência de células produtora de IFN- γ no baço (SFC/ 10^6 esplenócitos) com especificidade para: TEWETGQI, PETLGHEI e YEIVAGYI. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativa entre cada grupo e o grupo controle ($p < 0.01$). **B** - Também foi avaliada a capacidade citotóxica das células com especificidade para TEWETGQI e PETLGHEI através do ensaio de citotoxicidade *in vivo*. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre cada grupo e o grupo controle ($p < 0.01$). **C** - A parasitemia está representada como a média e desvio padrão de cada grupo ($n=5-7$). A curva dos grupos imunizados com plgSPcl.9 (quadrado) ou plgSPTAWETGQA (triângulo para cima) estão sobrepostas. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre cada grupo e o grupo controle ($p < 0.01$). **D** - Através da curva de Kaplan-Meier foi avaliada a sobrevivência desses animais. Animais imunizados com plgSPcl.9, plgSPcl.9 e plgSPTAWETGQA sobreviveram por mais tempo que os animais injetados com pcDNA3 ou plgSPTAWETGQA. Todos os animais imunizados com plgSPcl.9, plgSPTAWETGQA ou com plgSPcl.9 e plgSPTAWETGQA sobreviveram por mais tempo que o grupo controle ($p < 0.05$ em todos os casos utilizando-se LogRank test).

Figura 10 - Resposta imune dos linfócitos CD8⁺ induzidos pela imunização com DNA plasmidial contendo o gene da ASP-2 original ou mutado (só com os epítos subdominantes) e avaliação da proteção através da parasitemia e mortalidade.

Como a imunização somente com DNA plasmidial é relativamente fraca, decidimos testar essa mesma hipótese de que a indução de resposta aos epítomos subdominantes pode contribuir na resistência a infecção com um protocolo de imunização do tipo *prime-boost* heterólogo (DNA plasmidial/vetor adenoviral). Este protocolo é capaz de induzir melhores respostas imunes de linfócitos T CD8⁺ específicos e imunidade protetora contra a infecção (37). Para tal usamos o vetor adenoviral AdTAWETGQA que também continha o gene mutado da ASP-2 cujo o epítoto imunodominante foi removido.

Camundongos A/Sn foram imunizados com DNA plasmidial seguido do reforço com vetor adenoviral recombinante contendo o gene da ASP-2 original ou mutado. Duas semanas após o *boost* foi avaliada a frequência de células específicas produtoras de IFN- γ por ELISPOT, a capacidade citotóxica das células específicas através do ensaio de citotoxicidade *in vivo* e a frequência de linfócitos CD8 específicos produtoras de IFN- γ e TNF- α por ICS (Figura 11A-C).

Camundongos A/Sn foram imunizados com o protocolo de *prime-boost* heterólogo descrito em Métodos: pcDNA3/Ad β -gal, plgSPcl.9/AdASP-2, plgSPTAWETGQA/AdTAWETGQA nos dias 0 e 21 pela via i.m. Duas semana após o *boost* os animais foram infectados com 150 formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. **A** - Duas semanas após infecção foi avaliada a frequência de células produtoras de IFN- γ (SFC) nas células de baço desses animais com especificidade para: TEWETGQI, PETLGHEI e YEIVAGYI. **B** - Também foi avaliada a capacidade citotóxica das células com especificidade para TEWETGQI e PETLGHEI através do ensaio de citotoxicidade *in vivo*. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre cada grupo e o grupo controle ($p < 0.01$). **C** - As mesmas células de baço desses camundongos foram colocadas em cultura com meio ou com TEWETGQI, PETLGHEI, ou YEIVAGYI. Após 12h de cultura com anti-CD28, CD107a, brefeldina e monensina essas células foram coradas para detecção de: CD8, IFN- γ e TNF- α . São mostrados na figura análises representativas de 4 camundongos por grupo em cada experimento. Exemplo de linfócitos CD8⁺ de baço produtoras de TNF- α e/ou IFN- γ .

Figura 11. Resposta efetora dos linfócitos CD8⁺ induzidos pela imunização com *prime-boost* heterólogo (DNA plasmidial/vetor adenoviral recombinante) contendo o gene da ASP-2 original ou mutado (só com os epítomos subdominantes)

Os resultados desse experimento reproduziram o observado no experimento de imunização com DNA plasmidial somente: a imunização com o gene da ASP-2 original é capaz de induzir resposta para os 3 epítomos da ASP-2, já a imunização com o gene da ASP-2 mutado induziu resposta apenas para os dois novos epítomos subdominantes. Após o desafio com *T. cruzi* pela via i.p., avaliamos a parasitemia e a mortalidade dos animais vacinados. Todos os animais vacinados com esse protocolo do tipo *prime-boost* heterólogo (tanto com o gene da ASP-2 original ou mutado) tiveram uma parasitemia significativamente mais baixa que o grupo controle que recebeu DNA plasmidial e vetor adenoviral controle. Quando avaliada a mortalidade desses animais o grupo vacinado com o gene mutado teve a mortalidade significativamente retardada em relação ao grupo controle (Figura 12A e C). Quando a rota de infecção foi por via s.c., observamos que a sobrevivência do grupo vacinado só com os genes da ASP-2 mutados (epítomos subdominantes) subiu de para 90% ficando estatisticamente igual a do grupo imunizado com o gene da ASP-2 original (Figura 12D).

Figura 12 Parasitemia e mortalidade de camundongos A/Sn imunizados com *prime-boost* heterólogo (DNA plasmidial/vetor adenoviral recombinante) com o gene da ASP-2 mutado ou original

Camundongos A/Sn foram imunizados como o descrito na legenda da figura anterior, duas semanas após o *boost* esses animais foram desafiados com 150 formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* pelas vias i.p. (Painéis A e B) ou s.c. (Painéis C e D). **A e C** - A parasitemia está representada como a média e desvio padrão de cada grupo (n=10-11). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre cada grupo e o grupo controle (p<0.01). **B e D** - Através da curva de Kaplan-Meier foi avaliada a sobrevivência desses animais (n=10-11). Animais imunizados com plgSPcl.9/AdASP-2 sobreviveram por mais tempo que os animais imunizados com pcDNA3/Adβ-gal ou plgSPTAWETGQA/AdTAWETGQA (p<0.01 e p=0.01, respectivamente). Os animais imunizados com plgSPTAWETGQA/AdTAWETGQA sobreviveram por mais tempo que o grupo controle (p<0.01). Os resultados são referentes a dois experimentos. Nenhum animal morreu após 40 dias de infecção.

Finalmente, para comprovar que a proteção observada em ambos grupos vacinados com o gene da ASP-2, original ou mutado, era dependente de linfócitos CD8⁺ parte dos animais imunizados e desafiados teve as células CD8⁺ depletadas. Da mesma forma que no experimento representado na Figura 12A e B, após o desafio com *T. cruzi*, os grupos imunizados com o gene da ASP-2 original ou mutado apresentaram a parasitemia mais baixa que o grupo controle. Porém, os animais que tiveram os linfócitos CD8⁺ depletadas tiveram a parasitemia mais alta e morreram rapidamente após a infecção experimental em tempo similar que o grupo controle (Figura 13A a D). Assim, destes experimentos pudemos concluir que a proteção gerada pela imunização com o gene da ASP-2 original e mutado é dependente de linfócitos CD8⁺.

4.4 Indução de tolerância ao epítipo imunodominante não altera a suscetibilidade à infecção experimental

Afim de confirmarmos nossos resultados sobre a importância da imunidade aos epítopos subdominantes de *T. cruzi*, utilizamos uma metodologia distinta baseada na indução de tolerância periférica ao epítipo imunodominante (75). Após tratamento com o peptídeo TEWETGQI solúvel pela via i.v. induzimos tolerância ao epítipo TEWETGQI uma vez que não mais detectamos células produtoras de IFN- γ específicas nos camundongos tolerizados e infectados (Figura 14A). Apesar da tolerância para o epítipo imunodominante TEWETGQI, não observamos o aumento da resposta aos epítopos subdominantes. Também não observamos modificação da suscetibilidade a infecção pelo *T. cruzi* determinada pela parasitemia ou pela sobrevivência já que todos os animais, tolerizados ou não, sobreviveram. Dessa forma, concluímos que a indução de tolerância periférica não altera resposta ao epítopos subdominantes e que a resposta imune as estes epítopos é capaz de conferir resistência a infecção experimental pelo *T. cruzi*.

Figura 13- Dependência de linfócitos CD8⁺ da imunidade protetora induzida pela vacinação tipo *prime-boost* heterólogo (DNA plasmidial/vetor adenoviral recombinante) com o gene da ASP-2 mutado ou original

Camundongos A/Sn foram imunizados como o descrito na legenda da figura 11, duas semanas após o *boost* esses animais foram desafiados com 150 formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* pelas vias i.p. Antes e após o desafio parte dos animais foi tratada com anti-CD8 ou IgG de rato controle conforme descrito em Métodos. **A e B** - A parasitemia está representada como a média e desvio padrão de cada grupo (n=6). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre cada grupo e o grupo controle ($p < 0.01$). **C e D** - Através da curva de Kaplan-Meier foi avaliada a sobrevivência desses animais (n=6). Animais imunizados com plgSPcl.9/AdASP-2 ou com plgSPTAWETGQA/AdTAWETGQA tratados com IgG de rato sobreviveram por mais tempo que os animais tratados com anti-CD8 ($p < 0.01$ em ambos os casos).

Figura 14- Tolerância periférica ao epítipo CD8 imunodominante não altera a resistência ao desafio pelo *T. cruzi*

Camundongos B10.A foram tolerizados ou não com os peptídeos descritos no topo da figura e infectados com 10^4 formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* i.p.. **A** - Quatro semanas após o desafio foi avaliada a resposta imune de linfócitos T CD8⁺ específicos através do ensaio de ICS conforme o descrito em Métodos. As células de baço de cada grupo foram estimuladas com meio ou com peptídeo TEWETGQI. **B** - Curva de parasitemia após o desafio. Nenhum camundongo morreu durante o tempo de observação de 50 dias.

4.5 Apresentação de epítomos subdominantes por células dendríticas de medula óssea (BMDC) expostas ao *T. cruzi*

Baseados nos nossos resultados anteriores de que a indução de resposta aos epítomos subdominantes contribuem na proteção contra infecção questionamos se células apresentadoras de antígeno expostas ao parasita seriam capazes de apresentar também os epítomos subdominantes. Dessa forma, expusemos BMDCs à tripomastigotas por 48h. Utilizamos estas BMDC para o ELISPOT em co-culturas com linfócitos T CD8⁺ purificados de animais infectados, ou imunizados com AdASP-2 ou com AdTAWETGQA. Como controles, fizemos co-culturas de linfócitos CD8⁺ com BMDC não infectadas pulsadas com os peptídios da ASP-2: TEWETGQI, PETLGHEI e YEIVAGYI (Figura 15).

Desse experimento podemos em primeiro lugar concluir que linfócitos T CD8⁺ específicos para os epítomos subdominantes gerados em camundongos imunizados com AdTAWETGQA reconhecem as BMDCs expostas ao *T. cruzi*. Ou seja, estas BMDC apresentam epítomos subdominantes. Outra observação relevante é que BMDCs expostas ao parasita são pobres apresentadoras de antígeno. Isso porque quando os mesmos linfócitos CD8⁺ de camundongos infectados são co-cultivadas com BMDCs expostas ao parasita ou pulsadas com o peptídeo TEWETGQI, observamos que a frequência de células CD8⁺ produtoras de IFN- γ é menor no caso das primeiras do que das segundas (pulsadas com TEWETGQI). Isso indica que há uma grande limitação na capacidade de apresentação de antígeno pelas células BMDC expostas ao parasita.

Figura 15. Apresentação de epítomos subdominantes pela célula BMDC expostas aos parasitas

ELISPOT de BMDCs não pulsadas (preto) ou pulsadas com TEWETGQI (vermelho), PETLGHEI (verde), YEIVAGYI (amarelo), ou infectadas com m.o.i. 3 da cepa Y de *T. cruzi* (azul) cultivadas com linfócitos CD8⁺ purificados de animais: naive, tolerizados para o epítopo imunodominante, infectados ou imunizados (AdASP-2 ou AdTAWEGQA). Animais B10A foram infectados com 10⁴ formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, 14 dias depois outros animais B10A foram imunizados com adenovirus recombinantes contendo o gene original ou o gene mutado da ASP-2 (AdASP-2 ou AdTAWETGQA), o animal tolerizado utilizado havia sido toleriza e infectado a 26 semanas. Paralelamente, BMDC foram diferenciadas a partir da medula óssea de animais B10.A naives, 8 dias serem colocadas em cultra as BMDC foram infectadas ou não com tripomastigotas de cultura da mesma cepa Y. Dois dias após a infecção das BMDC, os linfócitos CD8⁺ dos animais infectados e/ou dos animais imunizados com adenovirus recombinantes foram purificadas por *sorting* e fez-se o ELISPOT desses os linfócitos CD8⁺ em co-cultura com as BMDCs.

4.6 A proliferação dos linfócitos não é crítica na resposta imune protetora após a vacinação genética utilizando o protocolo de *prime-boost* heterólogo

Após a vacinação genética de camundongos com protocolo de *prime-boost* heterólogo usando DNA plasmidial e vetor adenoviral, linfócitos T CD8⁺ específicos são expandidos e se mantêm por longos períodos de tempo (57). Estas células apresentam um fenótipo do tipo linfócitos T efetores de memória (TEM, CD44^{High} CD11a^{High} CD62L^{Low} CD127^{High}) e são responsáveis pela imunidade protetora contra o desafio experimental com *T. cruzi* (57). Após o desafio com *T. cruzi* observamos um aumento na frequência dos linfócitos T CD8⁺ específicos. O que foi determinado através da detecção de células coradas pelo pentâmero H-2K^b-VNHRFFTLV (Figura 16 e 17) ou por ICS após estimulação *in vitro* com o peptídeo VNHRFTLV (dados não apresentados).

Figura 16 - Aumento na frequência de linfócitos T CD8⁺ específicos no baço de camundongos imunizados após o desafio com *T. cruzi*

A - Camundongos transgênicos gzmBCreERT2/ROSA26EYFP foram imunizados com o protocolo de *prime-boost* heterólogo descrito em Métodos e desafiados como esquematizado na figura. **B** - Duas semanas após o desafio, a frequência de linfócitos CD8 específicos para o epítipo imunodominante da ASP-2 foi avaliada através da coloração das células de baço para CD8 e o pentâmero H-2K^b/VNHRFLTIV. **C** - representa cada camundongo individualmente. A frequência de linfócitos CD8⁺ H-2K^b/VNHRFLTIV⁺ nos animais que foram imunizados e desafiados (ASP2/*T. cruzi*) foi estatisticamente mais alta que todos os demais grupos ($P < 0,01$ em todos os casos).

Figura 17 - Frequência de linfócitos T CD8⁺ específicos nos linfonodos de camundongos imunizados após o desafio com *T. cruzi*

A - Camundongos transgênicos gzmBCreERT2/ROSA26EYFP foram imunizados com o protocolo de *prime-boost* heterólogo descrito em Métodos e desafiados como esquematizado na figura. **B** - Duas semanas após o desafio, a frequência de linfócitos CD8 específicos para o epítipo imunodominante da ASP-2 foi avaliada através da coloração das células de linfonodo para CD8 e o pentâmero H-2K^b/VNHRFTLV. C representa cada camundongo individualmente. A frequência de linfócitos CD8⁺ H-2K^b/VNHRFTLV⁺ nos animais dos diferentes grupos infectados e/ou imunizados não foram estatisticamente diferentes ($P > 0,05$).

Estes linfócitos T CD8⁺ específicos detectados após o desafio poderiam ser as próprias TE(M) ou um pool destas células mais os linfócitos específicos naives expandidas pela infecção como em uma resposta imune primária. Para resolver esta questão uma vez que não encontramos marcadores capazes de distinguir essas células, nós utilizamos o modelo experimental gzmBCreERT2/ROSA26EYFP. Esse camundongo do tipo CRE/Lox, após estímulo com antígeno e sobre o tratamento com a droga Tamoxifeno, geram células marcadas com EYFP de modo irreversível. Após o tratamento, são marcadas cerca de 10-20% das células de baço que após o estímulo com o antígeno passam a expressar granzima B (76). Dessa forma, podemos seguir os linfócitos T CD8⁺ específicos TE(M) induzidos pela imunização e distingui-los de linfócitos induzidos pela infecção somente. O experimento foi feito segundo protocolo esquematizado no painel A da Figura 18.

A frequência de linfócitos H-2K^b-VNHRFLTV⁺ CD8⁺ no baço e nos linfonodos de camundongos vacinados foram de 0.42 a 0.86% ou de 0.29 a 0.58%, respectivamente (Figuras 16 e 17). Após o desafio experimental com *T. cruzi*, a frequência de linfócitos H-2K^b-VNHRFLTV⁺ CD8⁺ no baço de camundongos vacinados e desafiados aumentou para 1.1 a 2.4% (Figura 16). Não houve aumento de linfócitos específicos nos linfonodos desses animais (as medias de ambos os grupos foram 0.42% e 0.33%- Figura 17).

O tratamento com Tamoxifeno após o *boost* com o vetor adenoviral AdASP-2 marcou irreversível com EYFP de 12 a 19% da células H-2K^b-VNHRFLTV⁺ CD8⁺ do baço ou de 2.7 a 6.8% dessas mesmas células do linfonodos em animais imunizados e não infectados (Figuras 18 e 19). Após o desafio desses animais imunizados, apesar da frequência de linfócitos H-2K^b-VNHRFLTV⁺ CD8⁺ ter aumentado no baço, a frequência das células marcadas com EYFP não foi alterada significativamente (12-19% X 6.8-20%, Figura 18). Este fato indica que os linfócitos H-2K^b-VNHRFLTV⁺ CD8⁺ são de fato as TE(M) induzidas pela vacinação e não células primárias induzidas pela infecção. O mesmo foi observado com as células EYFP⁺ no linfonodo. Após o desafio a frequência se alterou de 2.7-6.8% para 3.6-12% (Figura 19). Assim concluímos que no baço, mas não no linfonodos, os linfócitos T CD8⁺ TE aumentam sua frequência após o desafio experimental.

Figura 18 - Frequência de linfócitos T CD8⁺ específicos marcados com EYFP no baço de camundongos imunizados após o desafio com *T. cruzi*.

A - Camundongos transgênicos gzmBCreERT2/ROSA26EYFP foram imunizados com o protocolo de *prime-boost* heterólogo descrito em Métodos, tratados e desafiados como esquematizado na figura. **B** - Duas semanas após o desafio, a frequência de células marcadas com EYFP CD8⁺ específicas para o epítipo imunodominante da ASP-2 foi avaliada através da coloração das células de baço para CD8 e o pentâmero H-2K^b/VNHRFLTIV. C representa cada camundongo individualmente. As frequências de células EYFP⁺ CD8⁺ H-2K^b/VNHRFLTIV⁺ nos animais que foram imunizados somente (ASP2) ou imunizados e desafiados (ASP2/*T. cruzi*) não foram estatisticamente diferente ($P > 0,05$).

Figura 19 - Frequência de linfócitos T CD8⁺ específicos marcados com EYFP nos linfonodos de camundongos imunizados após o desafio com *T. cruzi*.

A - Camundongos transgênicos gzmBCreERT2/ROSA26EYFP foram imunizados com o protocolo de *prime-boost* heterólogo descrito em Métodos, tratados e desafiados como descrito na figura. **B** - Duas semanas após o desafio, a frequência de células marcadas com EYFP CD8⁺ específicas para o epítipo imunodominante da ASP-2 foi avaliada através da coloração das células de linfonodo para CD8 e o pentâmero H-2K^b/VNHRFLT. C representa cada camundongo individualmente. As frequências de células EYFP⁺ CD8⁺ H-2K^b/VNHRFLT⁺ nos animais que foram imunizados somente (ASP2) ou imunizados e desafiados (ASP2/*T. cruzi*) não foram estatisticamente diferentes ($P > 0,05$).

Afim de confirmar que células naive não participam da resposta após a infecção, e que são as células TE(M) responsáveis pela proteção observada, os animais imunizados receberam no momento da infecção células de baço de camundongos transgênicos naives que expressam constitutivamente a GFP de acordo com o protocolo descrito na Figura 20A. Vinte dias após o desafio determinamos a frequência dos linfócitos T CD8⁺ específicos capazes de produzir IFN- γ . Como pode ser visto nos histogramas usados como exemplo, a frequência de linfócitos T CD8⁺ capazes de acumular IFN- γ após a estimulação *in vitro* com o peptídeo VNHRFTLV é de 10.5 ou 21% nos baços dos animais infectados ou vacinados e infectados, respectivamente (Figura 20B).

Dentre as células CD8⁺ selecionamos então as que expressavam a GFP (Figura 20, Painel C). Nestas células CD8⁺ GFP⁺ detectamos que nos animais infectados há 16% que produzem IFN- γ (Figura 20, Painel D). Em contraste, nos animais imunizados e infectados encontramos que somente 0.71% das células CD8⁺ GFP⁺ produziam IFN- γ . Ou seja, as células naive CD8⁺ GFP⁺ não participam da resposta imune após o desafio em animais vacinados. Estes dados corroboram com os resultados anteriores no qual observamos que as células específicas TE(M) são as que participam da resposta imune protetora.

Observamos nos experimentos anteriores que após a infecção, os linfócitos CD8⁺ específicos TE(M) aumentam de frequência. Entretanto, não sabíamos até então ao que se devia este aumento de frequência: proliferação ou migração. Para testar o papel da proliferação no aumento da frequência e na proteção, parte dos animais vacinados com o mesmo protocolo *prime-boost* heterólogo utilizado anteriormente foi tratado hidroxiuréia (HU). A HU inibe a enzima ribonucleotídeo redutase e assim bloqueia a replicação do DNA impedindo a proliferação celular. Como essa droga não age especificamente em linfócitos ela é altamente tóxica, assim usamos o mesmo protocolo descrito em trabalho anterior (73) a fim de eliminar as células em proliferação após o desafio experimental pelo *T. cruzi*. O esquema detalhado da imunização seguida do desafio e tratamento com HU pode ser visto na Figura 21A.

Figura 20 - Esplenócitos naíves não aumentam a frequência após o desafio em animais previamente vacinados com o protocolo de *prime-boost* heterólogo.

A- Camundongos C57BL/6 foram imunizados com o protocolo de *prime-boost* heterólogo descrito em Métodos, desafiados e tratados como descrito na figura. **B** - Células de baço foram coletadas no dia 55 e cultivadas na presença ou ausência do peptídeo VNHRFTLV. Após 12 h, as células foram coradas com anti-CD8, anti-IFN-γ and anti-TNF. **C** - As células GFP⁺ foram localizadas dentre as CD8⁺; **D** - Frequência de células CD8⁺ GFP⁺ IFN-γ⁺. **E** - Frequência de células CD8⁺ IFN-γ⁺. **F** - Frequência de células CD8⁺ GFP⁺ IFN-γ⁺.

Paralelamente camundongos controles receberam o tratamento com HU e não foram infectados. Estes animais sobreviveram ao tratamento. Por outro lado, camundongos tratados com HU nos dias 7 a 13 após a infecção morreram. Estes controles indicam que o tratamento com HU: i) não é tóxico para os animais saudáveis; ii) não impede a multiplicação do *T. cruzi* em animais infectados; iii) reduz a resistência de animais naives à infecção pelo *T. cruzi* (dados não mostrados).

Quinze dias após o desafio, a frequência de linfócitos T CD8⁺ específicos foi determinado pela coloração com o pentâmero H-2K^b-VNHRFTLV. Comparamos as frequências de linfócitos T CD8⁺ específicos. Observamos que nos animais vacinados e desafiados a frequência de linfócitos T CD8⁺ específicos foi maior que nos grupos controles imunizados com os vetores plasmidial e adenoiral sem o gene da ASP-2 de *T. cruzi*. Entretanto, dentre os grupos de animais vacinados e desafiados, a frequência de linfócitos T CD8⁺ específicos não foi estatisticamente diferente nos animais tratados ou não com HU (Figura 21 B e C). Assim, concluímos que o aumento da frequência dos T CD8⁺ específicos após o desafio não se deve a proliferação destes pois não foi inibida pelo tratamento com HU.

Este mesmo experimento foi feito em animais altamente suscetíveis A/Sn de acordo com o protocolo experimental descrito na Figura 22A. Após o desafio experimental, os animais controles que receberam DNA plasmidial e vetor adenoviral sem o gene da ASP-2 de *T. cruzi*, não controlaram a parasitemia e morreram antes de 28 dias após o desafio. Os animais vacinados, desafiados e não tratados com HU controlaram efetivamente a parasitemia e todos sobreviveram ao desafio experimental (Figura 22 B e C). Já no caso dos animais vacinados, desafiados e tratados com HU, o controle da parasitemia foi apenas parcial (Figura 22 B). Mesmo sem um controle efetivo da parasitemia, a grande maioria destes animais sobreviveram à infecção experimental (Figura 22 C). Concluímos que o tratamento com HU não interfere drasticamente com a suscetibilidade à infecção de animais vacinados com o protocolo de prime-boost heterólogo.

Figura 21 – Aumento na frequência de linfócitos CD8⁺ específicos após o desafio não é inibido pelo tratamento com Hidroxiuréia (HU)

A - Camundongos C57BL/6 foram imunizados com o protocolo de *prime-boost* heterólogo descrito em Métodos, desafiados e tratados com HU como esquematizado na figura. **B** - Quatorze dias após o desafio, as células de baço foram removidas e as frequências de linfócitos CD8⁺ H-2Kb/VNHRFTLV⁺ estimadas. **C** - Cada barra representa um animal. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos imunizados com plgSPcl.9/AdASP-2 e infectados (ASP2/*T. cruzi*) tratados ou não com HU.

Figura 22 – Imunidade protetora não é inibida pelo tratamento com HU

A - Camundongos A/Sn foram imunizados com o protocolo de *prime-boost* heterólogo descrito em Métodos, desafiados e tratados como esquematizado na figura. **B** - A parasitemia está representada como a média e desvio padrão de cada grupo (n=6). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre cada grupo e o grupo controle ($p < 0.01$). Animais imunizados com plgSPcl.9/AdASP-2 (ASP-2) tratados com HU apresentaram parasitemias maiores que os animais não tratados ($p < 0.01$). **C** - Através da curva de Kaplan-Meier foi avaliada a sobrevivência desses animais (n=10). Animais imunizados com plgSPcl.9/AdASP-2 (ASP-2) tratados ou não com HU sobreviveram por mais tempo que os animais controles ($p < 0.01$ em ambos os casos).

4.7 Tratamento com a droga FTY720 que reduz a recirculação de linfócitos leva ao acúmulo de linfócitos T CD8⁺ específicos nos linfonodos e uma maior suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi*

Para testar a hipótese de que a recirculação de linfócitos é importante na imunidade protetora contra a infecção experimental induzida pela vacinação genética com o protocolo de *prime-boost* heterólogo, tratamos inicialmente camundongos gzmBCreERT2/ROSA26EYFP imunizados e infectados com a droga FTY720 seguindo o protocolo descrito na Figura 23A. O tratamento com essa droga bloqueia o egresso de linfócitos dos órgãos linfóides secundários (77). Em animais vacinados, infectados e tratados com FTY720 observamos um maior acúmulo de linfócitos T CD8⁺ específicos nos linfonodos. A frequência que nos animais não tratados foi de 0.21 a 0.39%, subiu para 1.3 a 1.4% (Figura 23C).

Então, a seguir, avaliamos se a proteção induzida pela vacinação também dependia da recirculação de linfócitos. Para isso camundongos susceptíveis da linhagem A/Sn foram imunizados com o protocolo de *prime-boost* heterólogo, infectados e tratados com FTY720 como descrito na Figura 24A. Então foi seguida a parasitemia e a mortalidade desses animais. Os animais imunizados infectados e tratados tiveram uma parasitemia mais alta que os animais imunizados infectados e não tratados, embora ambos os grupos imunizados tivessem parasitemia mais baixa que o grupo controle (Figura 24B). Além disso, a mortalidade do grupo imunizado infectado e tratado é maior que a observada no grupo não tratado (Figura 24C). Concluimos que os linfócitos recirculam são os que de fato medeiam a imunidade protetora contra a infecção experimental. Assim, confirmamos a nossa hipótese de que a recirculação de linfócitos é crítico na resistência a infecção experimental pelo *T. cruzi*.

Figura 23 - Administração de FTY720 após o desafio experimental causa aumento na frequência de linfócitos T CD8⁺ específicos nos linfonodos.

A - Camundongos gzmBCreERT2/ROSA26EYFP foram imunizados com o protocolo de *prime-boost* heterólogo descrito em Métodos, desafiados e tratados como esquematizado na figura. **B** - No dia 62, células de baço foram coletadas e as frequências de linfócitos CD8⁺ H-2K^b/VNHRFTLV⁺ estimadas. **C** - representa cada camundongo individualmente. **C** - No dia 62, as frequências de células CD8⁺ H-2K^b/VNHRFTLV⁺ nos linfonodos dos animais que foram imunizados com plgSPcl.9/AdASP-2 e desafiados (ASP2/*T. cruzi*) tratados com FTY720 foram significativamente maiores que os animais não tratados ($P < 0,01$).

Figura 24 – Administração de FTY720 após o desafio reverte a imunidade protetora

A - Camundongos A/Sn foram imunizados com o protocolo de prime-boost heterólogo descrito em Métodos, desafiados e tratados como esquematizado na figura. **B** - A parasitemia está representada como a média e desvio padrão de cada grupo (n=6). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre cada grupo e o grupo controle ($p < 0.01$). **C** - Através da curva de Kaplan-Meier foi avaliada a sobrevivência desses animais (n=10). Animais imunizados com plgSPcl.9/AdASP-2 não tratados sobreviveram por mais tempo que os animais tratados com FTY720 ou os controles ($p < 0.01$ em ambos os casos).

5 DISCUSSÃO

5.1 Contribuição dos epítomos subdominantes na resistência a infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*

Através da identificação de novos epítomos presentes na ASP-2 de *T. cruzi* nossos resultados inicialmente confirmam dois dados já anteriormente observados pelo nosso grupo com outras abordagens metodológicas: i) a infecção experimental pelo *T. cruzi* restringe a resposta de linfócitos T CD8⁺ gerando forte imunodominância; ii) em contraste, durante a imunização genética com DNA plasmidial e/ou vetor adenoviral recombinante há indução de uma resposta mais diversificada para os epítomos da ASP-2 expressa como um transgene (52). Assim, durante a infecção experimental, há uma resposta que chega a cerca de 20% dos linfócitos T CD8⁺ contra o epítomo imunodominante TEWETGQI da ASP-2 (Fig. 8). Por outro lado, a imunização genética induziu resposta a 3 epítomos presentes nessa mesma proteína totalizando cerca de 5% dos linfócitos T CD8⁺ (Fig. 8). Entretanto, a resposta a estes epítomos pode ser subdividida em TEWTEGQI (~2,5%), PETLGHEI (~1,5%) e YEIVAGYI (~0,9%).

Não se sabe quais mecanismos estão envolvidos nessa diferença de especificidade das respostas de linfócitos CD8⁺ induzidas pela infecção ou pela imunização. É possível que essa diferença esteja relacionada ao uso de distintas vias de apresentação antígeno. Em um modelo de resposta de linfócitos T CD8⁺ contra antígenos tumorais a apresentação cruzada foi identificada como favorecendo a restrição da resposta ao epítomo imunodominante. Por outro lado, a apresentação direta induziu resposta para outros epítomos presentes na mesma proteína (78). Nesta mesma linha, nosso grupo também descreveu que a vacinação com proteínas recombinantes da ASP-2 de *T. cruzi* induz uma resposta imune presumivelmente por apresentação cruzada que é restrita ao epítomo TEWETGQI (64).

Assim, a forma como o antígeno de *T. cruzi* ASP-2 é adquirido, processado e apresentado durante a infecção pode favorecer prioritariamente a apresentação cruzada. Esta por sua vez favorece a imunodominância. Em contraste, a imunização genética utilizando-se DNA plasmidial e/ou vetor adenoviral recombinante pode favorecer a via de apresentação direta do antígeno ASP-2 expresso como transgene, que por sua vez reduz a imunodominância.

Ao colocarmos BMDC expostas ao *T. cruzi* em cultura com linfócitos CD8⁺ de animais infectados ou imunizados não pudemos observar diferenças quantitativas

que justificassem as diferenças observadas no padrão de imunodominância. Mas pudemos confirmar que os linfócitos CD8⁺ específicos para os epítomos subdominantes PETLGHEI e YEIVAGYI foram capazes de reconhecer BMDC expostas ao *T. cruzi*. Isto demonstra que BMDC expostas ao *T. cruzi* apresentam esses epítomos.

Como nosso objetivo central nesta parte do projeto era testar a importância da imunidade aos epítomos subdominantes induzidos pela vacinação na imunidade protetora, imunizamos camundongos A/Sn altamente suscetíveis a infecção pelo *T. cruzi* com plasmídios e vetores adenovirais recombinantes cujo o gene da ASP-2 foi mutado de forma a expressar um epítomo não funcional (TAWETGQA) no lugar do epítomo imunodominante TEWETGQI. Nós observamos que a vacinação com gene da ASP-2 mutado induz resposta aos epítomos subdominantes. Após o desafio experimental por duas vias distintas (i.p. e s.c.), observamos também significativo grau de imunidade protetora. Entretanto, a vacinação com gene da ASP-2 mutado não conferiu o mesmo grau de imunidade protetora que a imunização com o gene da ASP-2 expressando os três epítomos (gene original). Posteriormente, confirmamos que ambas as respostas protetoras induzidas pela imunização com gene da ASP-2 original e mutado são dependente de células T CD8⁺, o que está de acordo com o publicado anteriormente por nós (37). Assim, concluímos que a resposta aos epítomos subdominantes da ASP-2 induzidos pela vacinação genética contribuem na resistência à infecção experimental pelo *T. cruzi*.

A importância da resposta imune aos epítomos subdominantes durante a imunidade ao *T. cruzi* foi confirmada por uma segunda abordagem na qual induzimos tolerância periférica ao epítomo imunodominante da ASP-2, TEWETGQI (75). Os animais tolerizados perderam a capacidade de responder ao epítomo imunodominante mas continuaram resistentes à infecção pelo *T. cruzi*. Este experimento confirmou também os achados previamente descritos por Rosenberg, *et al* 2010 (75). Nestes, os autores induziram tolerância periférica aos epítomos imunodominantes expressos pela cepa Brazil de *T. cruzi*. Os animais tolerizados também apresentaram resistência à infecção experimental com esta cepa do parasita.

Os resultados desses experimentos confirmaram a nossa hipótese de que os epítomos subdominantes contribuem na resistência a infecção experimental pelo *T. cruzi*, uma vez que a imunização só com esses epítomos conferiu algum grau de

proteção e a tolerância periférica ao epítopo dominante não foi capaz de reverter à resistência.

Independentemente de qual seja o mecanismo molecular que define a imunodominância durante uma infecção e o seu significado biológico, esse fenômeno trás consequências no desenvolvimento da resposta imune protetora, vacinas e imunopatologias. Um exemplo expressivo deste fenômeno foi reportado no caso de dois pacientes que receberam transplante de patela de um doador comum com HCV. Um dos pacientes que recebeu o transplante erradicou a infecção e o outro não. Quando analisada a resposta imune de ambos os transplantados, o paciente que não conseguiu se curar tinha baixíssima resposta de linfócitos T CD4⁺ e uma forte imunodominância na resposta de linfócitos T CD8⁺ com somente um epítopo sendo reconhecido. No vírus isolado deste paciente doente foi detectado uma mutação no epítopo imunodominante CD8 que possibilitou o escape e a evolução da doença. Já o paciente que se curou tinha respostas a múltiplos epítopos CD4 e CD8 que correlacionou com a erradicação do vírus (79). Assim, uma resposta ampla pode ser crítica para o desenvolvimento de imunidade. Em contraste, uma resposta muito restrita (imunodominante) pode levar a seleção de variantes e a imunopatologia.

Mais especificamente no caso do *T. cruzi*, foi descrito que diferentes cepas do parasita podem apresentar epítopos imunodominantes distintos (52-55, 80). Assim, a imunidade contra epítopos subdominantes pode ser crítica no desenvolvimento da imunidade contra re-infecções ou para o desenvolvimento de vacinas.

Nossos achados estão de acordo com estudos que mostram que a resposta direcionada a epítopos subdominantes contribui na imunidade protetora (81-86). A compreensão de que não somente os epítopos dominantes tem um papel na resistência a re-infecção por determinados patógenos pode ter um papel crítico no desenvolvimento de vacinas recombinantes mais eficazes.

5.2 Importância da proliferação e da recirculação de linfócitos na resposta imune protetora após a vacinação genética utilizando o protocolo de *prime-boost* heterólogo

O uso de um único vetor para imunização (“priming”) e reforços (“boosts”) costuma ser a opção tradicional da vacinologia. Entretanto, uma das mais prolíficas

áreas de desenvolvimento de vacina genética é a estratégia conhecida como regime “prime-boost” heterólogo. Esta estratégia usa 2 vetores diferentes, ambos carregando o mesmo gene que codifica a proteína antigênica para imunização (priming) e reforço (boost). Um número de combinações possíveis de vetores melhorou significativamente a imunidade mediada especialmente por linfócitos T CD8⁺. Entre eles, a vacinação do tipo *prime-boost* heteróloga usando o *priming* com DNA plasmidial seguida por um *boost* de vetor adenoviral 5 recombinante humano (AdHu5) deficiente em replicação. Esta estratégia revelou-se bem sucedida em alguns modelos experimentais importantes tais como o vírus da imunodeficiência símia (SIV), malária, Marburg e infecção de vírus Ebola e doença de Chagas (tripanossomíase americana), proporcionando um considerável grau de imunidade protetora (13, 37, 57, 87-97).

Estes êxitos relativos obtidos em modelos experimentais pré-clínicos impulsionaram ensaios clínicos (98-102). Este ano foi publicado o primeiro resultado de um teste clínico de fase II no qual parte dos voluntários vacinados com DNA plasmidial seguido de adenovírus humano do tipo 5 recombinante expressando genes do *P. falciparum* desenvolveram imunidade contra à malária (103).

A razão exata para o desempenho superior da vacinação do tipo *prime-boost* heteróloga em comparação ao uso sequencial do mesmo vetor ainda é uma questão controversa. Algumas evidências indicam a possibilidade de que a imunidade intensa para epítomos presentes no vetor usado no *priming* evita o efeito de *boost*, revisto por Vasconcelos et al. (2012) (58).

Recentemente, desenvolvemos um protocolo de *prime-boost* heterólogo capaz conferir significativo grau de proteção contra infecção letal experimental pelo *T. cruzi* (37, 57, 80). Utilizando este protocolo de vacinação experimental, estudamos recentemente diversos aspectos da resposta imune mediada por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Inicialmente observamos que a imunidade protetora mediada pela vacinação é dependente da ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. A caracterização detalhada dos fenótipos e função destes linfócitos T protetores mostrou que ambos são secretores de IFN- γ . No caso de linfócitos T CD8⁺, além de secretores de IFN- γ , estas células também secretam TNF- α , expressam CD107a na superfície e são altamente citotóxicas *in vivo* (37). Como descrito acima, observamos também que a imunidade é mediada não só contra epítomos reconhecidos por linfócitos T CD8 imunodominantes, mas também contra epítomos subdominantes

(13). Demonstramos que esta imunidade é de longa duração e que é mediada por linfócitos T CD8⁺ do tipo “T effector memory”, TEM (57). Não só esta imunidade é de longa duração mas também é extremamente resistente, não sendo erodida por vacinações posteriores (57).

O paradigma da imunologia de vacinas diz que há indução de células de memória o que possibilita uma resposta secundária ao antígeno que é mais rápida, maior e mais eficiente que a resposta primária (104). O protocolo de vacinação *prime-boost* heterólogo utilizado por nós gera uma população incomum de linfócitos T CD8⁺ de longa duração com um fenótipo TEM (CD44^{High} CD11a^{High} CD62L^{Low} KLRG1^{Low/High} CD127^{High}) que é protetora contra infecção experimental (57). Este fato os torna um modelo importante para o estudo das características destes linfócitos T de memória.

Inicialmente caracterizamos que, após o desafio experimental com *T. cruzi*, há um aumento na frequência dos linfócitos TE(M) específicos no baço, mas não nos linfonodos dos animais vacinados. Entretanto, este aumento na frequência ocorre mesmo em animais tratados com a droga HU. Aparentemente, esta maior frequência não se deve somente a proliferação dos linfócitos T CD8⁺, mas sim a algum tipo de recirculação destes linfócitos. Estudos detalhados *in vivo* estão sendo feitos para solidificar as observações se de fato há ou não multiplicação destes linfócitos. De qualquer forma, pelo tratamento com HU, parece que esta proliferação não é crítica.

Nosso resultado parece inicialmente conflitante com o paradigma atual de imunidade vacinal. Esse conceito estabeleceu que a proliferação é importante para a imunidade e que as células de memória do tipo TCM são as células protetoras em algumas infecções virais agudas como LCMV (105, 106). Nesses modelos, as células TEM seriam células de curta duração cuja presença seria dependente da presença do antígeno e portanto pouco relevantes para as infecções em que há completa eliminação do patógeno como no caso da infecção pelo LCMV.

Entretanto, paradoxalmente, estudos muito recentes, demonstraram justamente o oposto. Utilizando o mesmo modelo de infecção murina pelo LCMV, foi descrito que os linfócitos T CD8⁺ de longa duração que apresentam maior capacidade imuno-protetora são uma sub-população das TEM (CD44^{High} CD62L^{Low} KLRG1^{High} CD27^{Low} CD43(1B1)^{Low} CD183^{Low} T-bet^{High} Eomes^{Low}) e não as TCM clássicas. Estas células apresentam capacidade proliferativa e são críticas na resistência também a infecção por *Listeria monocitogenes* e *Vaccinia* (107).

No caso da vacina clássica contra varíola (vírus vaccínia) também foi demonstrado que os linfócitos T imunoprotetores de longa duração são uma subpopulação das TEM rebatizadas de TRM (T de memória residentes). Estas células persistem nos sítios onde o patógeno pode reinfestar, neste caso a pele, e apresentam um fenótipo $CD44^{High} CD62L^{Low} CD103^{High}$ (108). Portanto, como pode ser visto, ainda há muita polêmica e o que se compreender sobre a imunidade de longa duração que também pode ser ou não a mesma coisa que “memória imunológica”.

Alternativamente à proliferação dos linfócitos T $CD8^{+}$ específicos, testamos a hipótese de que talvez a recirculação fosse na realidade uma etapa crítica na imunidade protetora mediada por estes linfócitos TEM $CD8^{+}$. Induzidos pela vacinação do tipo prime-boost heterólogo. Utilizamos para tal o tratamento com a droga FTY720 que reduz a expressão do receptor de fosfato-1 de esfingosina (S1P1R) na superfície de linfócitos T assim prevenindo estes de migrar pelo gradiente de S1P1 e inibindo o egresso do linfonodo (109). Corroborando com a nossa hipótese, este tratamento, reduziu significativamente a imunidade protetora, identificando que a recirculação de linfócitos é de fato crucial para a proteção induzida pela vacinação do tipo *prime-boost* heterólogo.

Nossas observações corroboram com achados contemporâneos de que a imunidade protetora mediada por linfócitos T $CD8^{+}$ induzida pela imunização com esporozoítas irradiados da malária pela via s.c. também é inibida pelo tratamento com FTY720, o que demonstra a importância da recirculação na imunidade à protozoários patogênicos (110).

Por outro lado, estes resultados contrastam com a imunidade induzida a outros patógenos. Diversos estudos descrevem a recirculação mediada por S1P1 não é crítica para as respostas imunes protetoras para certas infecções virais, bacterianas e por protozoários (111-113).

Mais importantes são achados recentes que a imunidade induzida pela vacina clássica da varíola (vírus vaccínia) é dependente de células $CD8^{+}$ TRM, que não necessitam recircular para exercer sua atividade imunoprotetora duradoura (108). As razões para estas diferenças não estão claras, mas provavelmente reflete diferenças nos locais de infecção, bem como, na imunopatologia causada por cada agente infeccioso.

O fato de que FTY720 interfere na ativação de S1P1 o torna teoricamente capaz de agir em outros tipos de células que expressam este receptor. No entanto, o efeito sobre outros tipos de células é pouco conhecido. A administração de FTY720 pode aumentar ou reduzir a atividade de linfócitos T reguladoras (114). Um estudo recente indicou que esta droga age em astrócitos para reduzir a encefalomielite alérgica experimental. Se estes ou outros tipos de células desempenham um papel no nosso sistema é atualmente desconhecido (115).

Uma limitação atual do modelo experimental de infecção pelo *T. cruzi* é a falta de informações sobre onde os linfócitos T CD8⁺ eliminam as células infectadas pelos parasitas. Este é um aspecto crítico para compreender a resposta imune protetora. Considerando que o *T. cruzi* pode infectar muitos tipos de células e causar infecção sistêmica (ou não), é plausível que muitos tecidos podem servir como locais de infecção e para encontros de células infectadas com os linfócitos T CD8⁺. Em favor desta hipótese, observamos que os animais vacinados foram resistentes ao desafio pelo *T. cruzi* por vias diferentes de infecção (i.p. e s.c.).

Juntos, estas duas observações desafiam o paradigma de que linfócitos T de memória necessitam proliferar para mediar a imunidade protetora e adicionam que a recirculação sim é que é fundamental. Este fato ainda não havia sido devidamente notado e pode ter implicações importantes no desenvolvimento de novas vacinas.

6 CONCLUSÃO

Ao final deste trabalho, nossos resultados experimentais:

- 1- Corroboram com a nossa hipótese de que a resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ aos epítomos subdominantes induzida pela vacinação genética contribuem na resistência à infecção experimental pelo protozoário parasita *T. cruzi*;
- 2- Não corroboram com o paradigma da forma de ação das vacinas clássicas de que os linfócitos de memória necessitam proliferar;
- 3- Corroboram com a nossa hipótese de que a recirculação de linfócitos T é importante para a proteção induzida pela vacinação com o protocolo de *prime-boost* heterólogo.

REFERÊNCIAS*

1. Nish S, Medzhitov R. Host defense pathways: role of redundancy and compensation in infectious disease phenotypes. *Immunity*. 2011 May 27;34(5):629-36.
2. Macedo AM, Oliveira RP, Pena SD. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert reviews in molecular medicine*. 2002 Mar;4(5):1-16.
3. World Health Organization 2013 [Acesso em: 15 Jun 2013]. Disponível em (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>)
4. Sosa-Estani S, Viotti R, Segura EL. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 Suppl 1:167-80.
5. Coura JR, Vinas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 2010 Jun 24;465(7301):S6-7.
6. Boscardin SB, Torrecilhas AC, Manarin R, Revelli S, Rey EG, Tonelli RR, et al. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J Cell Mol Med*. 2010 Jun;14(6B):1373-84.
7. [Chagas disease. American trypanosomiasis. Recommendation for non-endemic zones]. *Med Trop (Mars)*. 2010 Apr;70(2):131-2.
8. Petherick A. Country by country. *Nature*. 2010 Jun 24;465(7301):S10-1.
9. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*. 2006 Dec;22(12):583-8.
10. Lee BY, Bacon KM, Connor DL, Willig AM, Bailey RR. The potential economic value of a *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease) vaccine in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(12):e916.
11. Rodrigues MM, Ribeiro M, Pereira-Chiocola V, Renia L, Costa F. Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect Immun*. 1999 Aug;67(8):3855-63.
12. Rodrigues MM, Alencar BC, Claser C, Tzelepis F. Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease? *Braz J Med Biol Res*. 2009 Mar;42(3):220-3.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

13. Dominguez MR, Silveira EL, de Vasconcelos JR, de Alencar BC, Machado AV, Bruna-Romero O, et al. Subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes contribute to resistance against experimental infection with a human protozoan parasite. *PLoS One*. 2011;6(7):e22011.
14. Camargo EP. Perspectives of vaccination in Chagas disease revisited. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 Suppl 1:275-80.
15. Quijano-Hernandez I, Dumonteil E. Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. *Hum Vaccin*. 2011 Nov;7(11):1184-91.
16. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med*. 2010;12:e29.
17. Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, Lopez-Munoz R, Morello A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol Res*. 2010;43(3):323-31.
18. Almeida IC, Milani SR, Gorin PA, Travassos LR. Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J Immunol*. 1991 Apr 1;146(7):2394-400.
19. Andrade AL, Martelli CM, Oliveira RM, Silva SA, Aires AI, Soussumi LM, et al. Short report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi*-infected adolescents after a six-year follow-up. *Am J Trop Med Hyg*. 2004 Nov;71(5):594-7.
20. Pereira-Chioccia VL, Acosta-Serrano A, Correia de Almeida I, Ferguson MA, Souto-Padron T, Rodrigues MM, et al. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J Cell Sci*. 2000 Apr;113 (Pt 7):1299-307.
21. Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2008 Jun;21(3):287-92.
22. Rocha A, de Meneses AC, da Silva AM, Ferreira MS, Nishioka SA, Burgarelli MK, et al. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Trop Med Hyg*. 1994 Mar;50(3):261-8.
23. Sartori AM, Neto JE, Nunes EV, Braz LM, Caiaffa-Filho HH, Oliveira Oda C, Jr., et al. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic Chagas disease: comparison between human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. *J Infect Dis*. 2002 Sep 15;186(6):872-5.
24. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*. 2003 Mar;71(3):1185-93.

25. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Busek SC, Teixeira MM, Silva JS, et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun*. 2005 Dec;73(12):7960-6.
26. Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae KC, Muller NG, Cavalcanti VL, Drigo SA, et al. BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis*. 2006 May 15;193(10):1394-9.
27. Costa GC, da Costa Rocha MO, Moreira PR, Menezes CA, Silva MR, Gollob KJ, et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis*. 2009 Feb 1;199(3):451-4.
28. de Araujo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PR, Assis Silva Gomes J, Sathler-Avelar R, et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(5):e992.
29. Laucella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, Alvarez MG, et al. Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis*. 2004 Mar 1;189(5):909-18.
30. Magalhaes LM, Villani FN, Nunes Mdo C, Gollob KJ, Rocha MO, Dutra WO. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis*. 2013 Feb 15;207(4):661-5.
31. Who, how, what and where? *Nature*. 2010 Jun 24;465(7301):S8-9.
32. Arguello RJ, Albareda MC, Alvarez MG, Bertocchi G, Armenti AH, Vigliano C, et al. Inhibitory receptors are expressed by *Trypanosoma cruzi*-specific effector T cells and in hearts of subjects with chronic Chagas disease. *PLoS One*. 2012;7(5):e35966.
33. Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol*. 2006 Dec;100(8):663-77.
34. Rodrigues MM, Oliveira AC, Bellio M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *J Parasitol Res*. 2012;2012:507874.
35. Silva GK, Gutierrez FR, Guedes PM, Horta CV, Cunha LD, Mineo TW, et al. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2010 Feb 1;184(3):1148-52.
36. Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol*. 1996 Jan;8(1):13-22.
37. de Alencar BC, Persechini PM, Haolla FA, de Oliveira G, Silverio JC, Lannes-Vieira J, et al. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by

heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect Immun.* 2009 Oct;77(10):4383-95.

38. Muller U, Sobek V, Balkow S, Holscher C, Mullbacher A, Museteanu C, et al. Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. *Eur J Immunol.* 2003 Jan;33(1):70-8.

39. Une C, Andersson J, Eloranta ML, Sunnemark D, Harris RA, Orn A. Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity and induction of NK cell-derived interferon-gamma (IFN-gamma) display different kinetics during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp Immunol.* 2000 Sep;121(3):499-505.

40. Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res.* 2003 Oct 15;60(1):96-107.

41. Higuchi Mde L, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993;423(3):157-60.

42. Reis DD, Jones EM, Tostes S, Jr., Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 May;48(5):637-44.

43. Fonseca SG, Moins-Teisserenc H, Clave E, Ianni B, Nunes VL, Mady C, et al. Identification of multiple HLA-A*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8+ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients. *Microbes Infect.* 2005 Apr;7(4):688-97.

44. Albareda MC, Laucella SA, Alvarez MG, Armenti AH, Bertochi G, Tarleton RL, et al. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol.* 2006 Mar;18(3):465-71.

45. Alvarez MG, Postan M, Weatherly DB, Albareda MC, Sidney J, Sette A, et al. HLA Class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8+ T cells in chronic Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2(9):e288.

46. Garg N, Nunes MP, Tarleton RL. Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway. *J Immunol.* 1997 Apr 1;158(7):3293-302.

47. Padilla AM, Simpson LJ, Tarleton RL. Insufficient TLR activation contributes to the slow development of CD8+ T cell responses in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):1245-52.

48. Dominguez MR, Ersching J, Lemos R, Machado AV, Bruna-Romero O, Rodrigues MM, et al. Re-circulation of lymphocytes mediated by sphingosine-1-phosphate receptor-1

contributes to resistance against experimental infection with the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*. 2012 Apr 16;30(18):2882-91.

49. Schwab SR, Pereira JP, Matloubian M, Xu Y, Huang Y, Cyster JG. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science*. 2005 Sep 9;309(5741):1735-9.

50. Pham TH, Baluk P, Xu Y, Grigorova I, Bankovich AJ, Pappu R, et al. Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *J Exp Med*. 2010 Jan 18;207(1):17-27.

51. Masopust D, Ahmed R. Reflections on CD8 T-cell activation and memory. *Immunol Res*. 2004;29(1-3):151-60.

52. Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Claser C, Machado AV, Bruna-Romero O, et al. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. *J Immunol*. 2008 Feb 1;180(3):1737-48.

53. Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Gazzinelli RT, Persechini PM, Rodrigues MM. Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. *Infect Immun*. 2006 Apr;74(4):2477-81.

54. Tzelepis F, Persechini PM, Rodrigues MM. Modulation of CD4(+) T cell-dependent specific cytotoxic CD8(+) T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. *PLoS One*. 2007;2(4):e393.

55. Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, Sullivan S, et al. CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathog*. 2006 Aug;2(8):e77.

56. Vasconcelos JR, Bruna-Romero O, Araujo AF, Dominguez MR, Ersching J, de Alencar BC, et al. Pathogen-induced proapoptotic phenotype and high CD95 (Fas) expression accompany a suboptimal CD8+ T-cell response: reversal by adenoviral vaccine. *PLoS Pathog*. 2012;8(5):e1002699.

57. Rigato PO, de Alencar BC, de Vasconcelos JR, Dominguez MR, Araujo AF, Machado AV, et al. Heterologous plasmid DNA prime-recombinant human adenovirus 5 boost vaccination generates a stable pool of protective long-lived CD8(+) T effector memory cells specific for a human parasite, *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2011 May;79(5):2120-30.

58. Vasconcelos JR, Dominguez MR, Araujo AF, Ersching J, Tararam CA, Bruna-Romero O, et al. Relevance of long-lived CD8(+) T effector memory cells for protective immunity elicited by heterologous prime-boost vaccination. *Front Immunol*. 2012;3:358.

59. Istrail S, Sutton GG, Florea L, Halpern AL, Mobarry CM, Lippert R, et al. Whole-genome shotgun assembly and comparison of human genome assemblies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 17;101(7):1916-21.

60. Oseroff C, Peters B, Pasquetto V, Moutaftsi M, Sidney J, Panchanathan V, et al. Dissociation between epitope hierarchy and immunoprevalence in CD8 responses to vaccinia virus western reserve. *J Immunol*. 2008 Jun 1;180(11):7193-202.
61. Yewdell JW. Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses. *Immunity*. 2006 Oct;25(4):533-43.
62. Miyahira Y. Trypanosoma cruzi infection from the view of CD8+ T cell immunity--an infection model for developing T cell vaccine. *Parasitol Int*. 2008 Mar;57(1):38-48.
63. Tarleton RL. Immune system recognition of Trypanosoma cruzi. *Curr Opin Immunol*. 2007 Aug;19(4):430-4.
64. Araujo AF, de Alencar BC, Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CR, Penido ML, et al. CD8+-T-cell-dependent control of Trypanosoma cruzi infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. *Infect Immun*. 2005 Sep;73(9):6017-25.
65. Lanzavecchia A. Lack of fair play in the T cell response. *Nat Immunol*. 2002 Jan;3(1):9-10.
66. Silverio JC, Pereira IR, Cipitelli Mda C, Vinagre NF, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, et al. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental Trypanosoma cruzi-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002645.
67. Costa F, Franchin G, Pereira-Chiocola VL, Ribeiro M, Schenkman S, Rodrigues MM. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces Trypanosoma cruzi infection in mice. *Vaccine*. 1998 May;16(8):768-74.
68. Fujimura AE, Kinoshita SS, Pereira-Chiocola VL, Rodrigues MM. DNA sequences encoding CD4+ and CD8+ T-cell epitopes are important for efficient protective immunity induced by DNA vaccination with a Trypanosoma cruzi gene. *Infect Immun*. 2001 Sep;69(9):5477-86.
69. Boscardin SB, Kinoshita SS, Fujimura AE, Rodrigues MM. Immunization with cDNA expressed by amastigotes of Trypanosoma cruzi elicits protective immune response against experimental infection. *Infect Immun*. 2003 May;71(5):2744-57.
70. Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CR, Claser C, Machado AM, Gazzinelli RT, et al. Protective immunity against trypanosoma cruzi infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther*. 2004 Sep;15(9):878-86.
71. Hoft DF, Eickhoff CS, Giddings OK, Vasconcelos JR, Rodrigues MM. Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic trypanosoma cruzi immunity involving CD8+ CTL and B cell-mediated cross-priming. *J Immunol*. 2007 Nov 15;179(10):6889-900.

72. Machado AV, Cardoso JE, Claser C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O. Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther.* 2006 Sep;17(9):898-908.
73. Bellier B, Thomas-Vaslin V, Saron MF, Klatzmann D. Turning immunological memory into amnesia by depletion of dividing T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 9;100(25):15017-22.
74. de Alencar BC, Araujo AF, Penido ML, Gazzinelli RT, Rodrigues MM. Cross-priming of long lived protective CD8+ T cells against *Trypanosoma cruzi* infection: importance of a TLR9 agonist and CD4+ T cells. *Vaccine.* 2007 Aug 10;25(32):6018-27.
75. Rosenberg CS, Martin DL, Tarleton RL. CD8+ T cells specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of *Trypanosoma cruzi* infection but are not required for resistance. *J Immunol.* 2010 Jul 1;185(1):560-8.
76. Bannard O, Kraman M, Fearon DT. Secondary replicative function of CD8+ T cells that had developed an effector phenotype. *Science.* 2009 Jan 23;323(5913):505-9.
77. Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:69-94.
78. Pavelic V, Matter MS, Mumprecht S, Breyer I, Ochsenbein AF. CTL induction by cross-priming is restricted to immunodominant epitopes. *Eur J Immunol.* 2009 Mar;39(3):704-16.
79. Tester I, Smyk-Pearson S, Wang P, Wertheimer A, Yao E, Lewinsohn DM, et al. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *J Exp Med.* 2005 Jun 6;201(11):1725-31.
80. Haolla FA, Claser C, de Alencar BC, Tzelepis F, de Vasconcelos JR, de Oliveira G, et al. Strain-specific protective immunity following vaccination against experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine.* 2009 Sep 18;27(41):5644-53.
81. Vojnov L, Bean AT, Peterson EJ, Chiuchiolo MJ, Sacha JB, Denes FS, et al. DNA/Ad5 vaccination with SIV epitopes induced epitope-specific CD4(+) T cells, but few subdominant epitope-specific CD8(+) T cells. *Vaccine.* 2011 Oct 6;29(43):7483-90.
82. Roman VR, Jensen KJ, Jensen SS, Leo-Hansen C, Jespersen S, Te DD, et al. Therapeutic Vaccination Using Cationic Liposome-Adjuvanted HIV Type 1 Peptides Representing HLA-Supertype-Restricted Subdominant T Cell Epitopes: Safety, Immunogenicity, and Feasibility in Guinea-Bissau. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013 Jun 21.
83. Manuel ER, Yeh WW, Seaman MS, Furr K, Lifton MA, Hulot SL, et al. Dominant CD8+ T-lymphocyte responses suppress expansion of vaccine-elicited subdominant T lymphocytes in rhesus monkeys challenged with pathogenic simian-human immunodeficiency virus. *J Virol.* 2009 Oct;83(19):10028-35.

84. Riedl P, Wieland A, Lamberth K, Buus S, Lemonnier F, Reifenberg K, et al. Elimination of immunodominant epitopes from multispecific DNA-based vaccines allows induction of CD8 T cells that have a striking antiviral potential. *J Immunol.* 2009 Jul 1;183(1):370-80.
85. Remakus S, Rubio D, Ma X, Sette A, Sigal LJ. Memory CD8+ T cells specific for a single immunodominant or subdominant determinant induced by peptide-dendritic cell immunization protect from an acute lethal viral disease. *J Virol.* 2012 Sep;86(18):9748-59.
86. Ruckwardt TJ, Luongo C, Malloy AM, Liu J, Chen M, Collins PL, et al. Responses against a subdominant CD8+ T cell epitope protect against immunopathology caused by a dominant epitope. *J Immunol.* 2010 Oct 15;185(8):4673-80.
87. Chowdhury SF, Guerrero RH, Brun R, Ruiz-Perez LM, Pacanowska DG, Gilbert IH. Synthesis and testing of 5-benzyl-2,4-diaminopyrimidines as potential inhibitors of leishmanial and trypanosomal dihydrofolate reductase. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2002 Oct;17(5):293-302.
88. Casimiro DR, Tang A, Chen L, Fu TM, Evans RK, Davies ME, et al. Vaccine-induced immunity in baboons by using DNA and replication-incompetent adenovirus type 5 vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol.* 2003 Jul;77(13):7663-8.
89. Santra S, Seaman MS, Xu L, Barouch DH, Lord CI, Lifton MA, et al. Replication-defective adenovirus serotype 5 vectors elicit durable cellular and humoral immune responses in nonhuman primates. *J Virol.* 2005 May;79(10):6516-22.
90. Acierno PM, Schmitz JE, Gorgone DA, Sun Y, Santra S, Seaman MS, et al. Preservation of functional virus-specific memory CD8+ T lymphocytes in vaccinated, simian human immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Immunol.* 2006 May 1;176(9):5338-45.
91. Letvin NL, Mascola JR, Sun Y, Gorgone DA, Buzby AP, Xu L, et al. Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. *Science.* 2006 Jun 9;312(5779):1530-3.
92. Mattapallil JJ, Hill B, Douek DC, Roederer M. Systemic vaccination prevents the total destruction of mucosal CD4 T cells during acute SIV challenge. *J Med Primatol.* 2006 Aug;35(4-5):217-24.
93. Suh YS, Park KS, Sauermann U, Franz M, Norley S, Wilfingseder D, et al. Reduction of viral loads by multigenic DNA priming and adenovirus boosting in the SIVmac-macaque model. *Vaccine.* 2006 Mar 10;24(11):1811-20.
94. Wilson NA, Reed J, Napoe GS, Piaskowski S, Szymanski A, Furlott J, et al. Vaccine-induced cellular immune responses reduce plasma viral concentrations after repeated low-dose challenge with pathogenic simian immunodeficiency virus SIVmac239. *J Virol.* 2006 Jun;80(12):5875-85.

95. Hensley LE, Mulangu S, Asiedu C, Johnson J, Honko AN, Stanley D, et al. Demonstration of cross-protective vaccine immunity against an emerging pathogenic Ebolavirus Species. *PLoS Pathog.* 2010 May;6(5):e1000904.
96. Geisbert TW, Bailey M, Geisbert JB, Asiedu C, Roederer M, Grazia-Pau M, et al. Vector choice determines immunogenicity and potency of genetic vaccines against Angola Marburg virus in nonhuman primates. *J Virol.* 2010 Oct;84(19):10386-94.
97. Martins MA, Wilson NA, Reed JS, Ahn CD, Klimentidis YC, Allison DB, et al. T-cell correlates of vaccine efficacy after a heterologous simian immunodeficiency virus challenge. *J Virol.* 2010 May;84(9):4352-65.
98. Freel SA, Lamoreaux L, Chattopadhyay PK, Saunders K, Zarkowsky D, Overman RG, et al. Phenotypic and functional profile of HIV-inhibitory CD8 T cells elicited by natural infection and heterologous prime/boost vaccination. *J Virol.* 2010 May;84(10):4998-5006.
99. Jaoko W, Karita E, Kayitenkore K, Omosa-Manyonyi G, Allen S, Than S, et al. Safety and immunogenicity study of Multiclade HIV-1 adenoviral vector vaccine alone or as boost following a multiclade HIV-1 DNA vaccine in Africa. *PLoS One.* 2010;5(9):e12873.
100. Koup RA, Roederer M, Lamoreaux L, Fischer J, Novik L, Nason MC, et al. Priming immunization with DNA augments immunogenicity of recombinant adenoviral vectors for both HIV-1 specific antibody and T-cell responses. *PLoS One.* 2010;5(2):e9015.
101. Schooley RT, Spritzler J, Wang H, Lederman MM, Havlir D, Kuritzkes DR, et al. AIDS clinical trials group 5197: a placebo-controlled trial of immunization of HIV-1-infected persons with a replication-deficient adenovirus type 5 vaccine expressing the HIV-1 core protein. *J Infect Dis.* 2010 Sep 1;202(5):705-16.
102. De Rosa SC, Thomas EP, Bui J, Huang Y, deCamp A, Morgan C, et al. HIV-DNA priming alters T cell responses to HIV-adenovirus vaccine even when responses to DNA are undetectable. *J Immunol.* 2011 Sep 15;187(6):3391-401.
103. Chuang I, Sedegah M, Cicutelli S, Spring M, Polhemus M, Tamminga C, et al. DNA prime/Adenovirus boost malaria vaccine encoding *P. falciparum* CSP and AMA1 induces sterile protection associated with cell-mediated immunity. *PLoS One.* 2013;8(2):e55571.
104. Harty JT, Badovinac VP. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2008 Feb;8(2):107-19.
105. Zanetti M, Castiglioni P, Ingulli E. Principles of memory CD8 T-cells generation in relation to protective immunity. *Adv Exp Med Biol.* 2010;684:108-25.
106. Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol.* 2003 Mar;4(3):225-34.
107. Olson JA, McDonald-Hyman C, Jameson SC, Hamilton SE. Effector-like CD8(+) T cells in the memory population mediate potent protective immunity. *Immunity.* 2013 Jun 27;38(6):1250-60.

108. Jiang X, Clark RA, Liu L, Wagers AJ, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature*. 2012 Mar 8;483(7388):227-31.
109. Brinkmann V, Pinschewer D, Chiba K, Feng L. FTY720: a novel transplantation drug that modulates lymphocyte traffic rather than activation. *Trends Pharmacol Sci*. 2000 Feb;21(2):49-52.
110. Obeid M, Franetich JF, Lorthiois A, Gego A, Gruner AC, Tefit M, et al. Skin-draining lymph node priming is sufficient to induce sterile immunity against pre-erythrocytic malaria. *EMBO Mol Med*. 2013 Feb;5(2):250-63.
111. Lopes CT, de Paula DM, Cury PM, Valero-Lapchik VB, Bueno V. Leishmania (Leishmania) amazonensis infection in mice treated with FTY720. *Transplant Proc*. 2010 Mar;42(2):578-81.
112. Pinschewer DD, Ochsenbein AF, Odermatt B, Brinkmann V, Hengartner H, Zinkernagel RM. FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory. *J Immunol*. 2000 Jun 1;164(11):5761-70.
113. Kursar M, Janner N, Pfeffer K, Brinkmann V, Kaufmann SH, Mittrucker HW. Requirement of secondary lymphoid tissues for the induction of primary and secondary T cell responses against *Listeria monocytogenes*. *Eur J Immunol*. 2008 Jan;38(1):127-38.
114. Sehrawat S, Rouse BT. Anti-inflammatory effects of FTY720 against viral-induced immunopathology: role of drug-induced conversion of T cells to become Foxp3+ regulators. *J Immunol*. 2008 Jun 1;180(11):7636-47.
115. Choi JW, Gardell SE, Herr DR, Rivera R, Lee CW, Noguchi K, et al. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 11;108(2):751-6.

APÊNDICES:

APÊNDICE A

Subdominant/Cryptic CD8 T Cell Epitopes Contribute to Resistance against Experimental Infection with a Human Protozoan Parasite

Mariana R. Dominguez^{1,2}, Eduardo L. V. Silveira^{1,2,3a}, José Ronnie C. de Vasconcelos^{1,2}, Bruna C. G. de Alencar^{1,2,3b}, Alexandre V. Machado³, Oscar Bruna-Romero⁴, Ricardo T. Gazzinelli^{4,5,6}, Mauricio M. Rodrigues^{1,2*}

1 Centro de Terapia Celular e Molecular (CTCMol), Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brazil, **2** Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brazil, **3** Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **5** Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **6** Division of Infectious Disease and Immunology, Department of Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, United States of America

Abstract

During adaptive immune response, pathogen-specific CD8⁺ T cells recognize preferentially a small number of epitopes, a phenomenon known as immunodominance. Its biological implications during natural or vaccine-induced immune responses are still unclear. Earlier, we have shown that during experimental infection, the human intracellular pathogen *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of CD8⁺ T cells generating strong immunodominance. We hypothesized that this phenomenon could be a mechanism used by the parasite to reduce the breadth and magnitude of the immune response, favoring parasitism, and thus that artificially broadening the T cell repertoire could favor the host. Here, we confirmed our previous observation by showing that CD8⁺ T cells of H-2^a infected mice recognized a single epitope of an immunodominant antigen of the *trans*-sialidase super-family. In sharp contrast, CD8⁺ T cells from mice immunized with recombinant genetic vaccines (plasmid DNA and adenovirus) expressing this same *T. cruzi* antigen recognized, in addition to the immunodominant epitope, two other subdominant epitopes. This unexpected observation allowed us to test the protective role of the immune response to subdominant epitopes. This was accomplished by genetic vaccination of mice with mutated genes that did not express a functional immunodominant epitope. We found that these mice developed immune responses directed solely to the subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes and a significant degree of protective immunity against infection mediated by CD8⁺ T cells. We concluded that artificially broadening the T cell repertoire contributes to host resistance against infection, a finding that has implications for the host-parasite relationship and vaccine development.

Citation: Dominguez MR, Silveira ELV, de Vasconcelos JRC, de Alencar BCG, Machado AV, et al. (2011) Subdominant/Cryptic CD8 T Cell Epitopes Contribute to Resistance against Experimental Infection with a Human Protozoan Parasite. PLoS ONE 6(7): e22011. doi:10.1371/journal.pone.0022011

Editor: Georges Snounou, Université Pierre et Marie Curie, FRANCE

Received: March 29, 2011; **Accepted:** June 11, 2011; **Published:** July 14, 2011

Copyright: © 2011 Dominguez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2009/06820-4), The National Institute for Vaccine Technology (INCTV-CNPq), The Millennium Institute for Vaccine Development and Technology (CNPq - 420067/2005-1) and The Millennium Institute for Gene Therapy (Brazil). EVLS, RTG and MMR are recipients of fellowships from CNPq. MRD and BCA are recipients of fellowships from FAPESP. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mrodrigues@unifesp.br

^a Current address: Yerkes National Primate Research Center/Emory University, Atlanta, Georgia, United States of America

^b Current address: Institut Curie U932, Paris, France

Introduction

MHC class Ia-restricted CD8⁺ T cells are important mediators of the adaptive immune response against infections caused by intracellular microorganisms, including the digenetic intracellular protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease (American trypanosomiasis). During experimental infection, this T cell subpopulation has been shown to be critical for host survival even when small doses of parasites are used in challenges [1–5]. In spite of the CD8⁺ T-cell mediated immune response, the parasite survives within the host and establishes a life-long chronic infection. Parasite persistence is considered one of the critical factors in the development of the complex immuno-

pathology caused by *T. cruzi* that may occur years after the initial infection in ~30% of infected individuals [6–11]. Thus, understanding how the parasites escape the immune response and persist for such long periods may help us to find new means for interventions against Chagas disease that would improve quality of life for millions of infected individuals in Latin America.

Recent studies on the CD8⁺ T-cell immune responses that occur during experimental *T. cruzi* infection in inbred mouse strains described a surprising immunodominance of certain epitopes expressed by members of a large family of *T. cruzi* surface antigens named *trans*-sialidases (TS) [1,5,12–20]. How and why this strong pattern of immunodominance is established is still a matter of debate. In general terms, immunodominance can emerge as a

result of different mechanisms that regulate the formation of the complex of MHC-I-peptide on the surface of antigen presenting cells (APC) such as antigen concentration, stability or epitope availability after processing and translocation to the endoplasmic reticulum, where the MHC-I-peptide complex is assembled to be transported to the APC surface [21–24].

After a stable MHC-I-peptide complex is formed on the surface of the APC, factors related to CD8⁺ T cells, such as the frequency of precursors, their TCR affinities, their capacity to proliferate in response to antigen and, thus, be incorporated into the pool of responder cells, are factors that shape immunodominance hierarchies. These factors transcend the MHC restriction element and may create T-cell competition for APCs and other resources, enabling certain CD8⁺ T cells to dominate and suppress others [23–29].

By comparing the specificity of CD8⁺ T cells of homozygous and heterozygous mouse strains, we observed that the immunodominance that occurs during experimental *T. cruzi* infection could be exerted not only on epitopes restricted by the same MHC molecules but also, unexpectedly, on the immune response to epitopes restricted by different MHC-I molecules. This phenomenon, termed cross-competition, represents a potent means by which T cells with a certain specificity may become immunodominant [30–34]. This strong and unusual phenomenon has been shown to be due to *T. cruzi* infection because following immunization with recombinant adenovirus expressing the same parasite antigens, this pattern of immunodominance was not observed [15].

Based on these observations, we hypothesized that this competition/immunodominance between T cells of different specificities could be a sophisticated strategy that *T. cruzi* developed to reduce the breadth and magnitude of CD8⁺ T-cell responses, suppressing the immune responses of these T cells with other specificities in order to escape complete elimination by host effector cells. Thus, we expected that artificially broadening the immune response to include T cells specific for subdominant or cryptic epitopes could favor the host, counteracting the restriction imposed by the infection. Here, we tested this hypothesis by using mice genetically immunized with a mutated form of the *amastigote surface protein (asp)* - 2 gene in which the immunodominant CD8 T cell epitope is no longer functional. The CD8 T cell-mediated immune response of these mice was directed only to the newly described subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes of ASP-2. Even in the absence of an immune response directed to the immunodominant epitope, these mice displayed a significant degree of protective immunity, albeit not as strong as the immune response elicited by the original gene expressing both the immunodominant and the subdominant epitopes. These results are compatible with our hypothesis that artificially broadening the immune response favors the host. Indirectly, we suggest that immunodominance may in fact be a mechanism to establish a chronic infection.

Materials and Methods

Ethics Statement

All experimental procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Care of the Federal University of São Paulo (Id # CEP 0426/09).

Mice and parasites

Female 8-week-old H-2^a mice (B10.A and A/Sn) were purchased from CEDEME (Federal University of São Paulo). Bloodstream trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi* were obtained from A/Sn mice infected 7–8 days earlier [12]. Each

B10.A or A/Sn mouse was challenged i.p. with a final dose containing 10⁴ or 150 parasites, respectively, in a final volume of 0.2 mL. Parasite development was monitored by counting the number of bloodstream trypomastigotes in 5 µL of fresh blood collected from the tail vein [12].

Peptides

Peptides were purchased from Genscript (Piscataway, NJ). Purity was as follows: TEWETGQI (95%); PETLGHEI (97.4%); YEIVAGYI (99.40%); TPTAGLVGF (98.6%); GSRNGNDRL (97.1%); ESKSGDAPL (96.1%); HEHNLFGI (98.7%); ESSTP-TAGL (99.1%); ESEPKRPNM (98.7%); VSWGEPKSL (99.2%); YSDGALHLL (97.3%); AESWPSIV (96.5%); and RPNMSRHLF (99.4%).

Recombinant plasmids and adenoviruses

Plasmid pIgSPC1.9 and the human replication-defective adenovirus type 5 containing the *asp-2* gene were obtained as described previously [35,36]. Mutated *asp-2* was generated by a series of PCR reactions using DNA encoding the *asp-2 clone 9* gene as a template (Genbank Accession Number: AY186572). In the first reaction, the forward and reverse oligonucleotides were as follows:

- i) 5'-GGGGGTACCATGCTCTCACGTGTTGCT-3';
- ii) 5'-GAACGATCATGAGTGCTTGGCCCGTCTCC-CATGCGGTGATGCGGGGATC-3'

In the second reaction, they were as follows:

- i) 5'-GATCCCCGCATCACCGCATGGGAGACGGGA-CAAGCACTCATGATCGTTC-3'
- ii) 5'-GGGTCTAGATCAGACCATTTCCTAGTTCACC-3'.

PCR products were purified, mixed and subjected to a third PCR reaction. Forward and reverse oligonucleotides were respectively

- i) 5'-GGGGGTACCATGCTCTCACGTGTTGCT-3';
- ii) 5'-GGGTCTAGATCAGACCATTTCCTAGTTCACC-3'.

The final PCR product was completely sequenced. The only modifications found were in the nucleotide sequences encoding the immunodominant epitope TEWETGQI. The new sequence encoded the amino acids (AA) TAWETGQA. This plasmid is referred to as pIgSpTAWETGQA. The new gene was also subcloned into the pAdCMV shuttle vector, and the recombinant replication-defective adenovirus human adenovirus 5 was produced by Vectors BioLabs, Philadelphia, USA. This new recombinant adenovirus is referred to as AdTAWETGQA. Viruses and plasmids were purified as described previously [35–37]. Mice were inoculated intra-muscularly (i.m.) in each *tibialis anterioris* muscle with 50 µg of plasmid DNA 3 times every 3 weeks.

Heterologous prime-boost immunization consisted of priming i.m. with a total of 100 µg of plasmid DNA followed by a dose of viral suspension containing 2×10⁸ plaque forming units (pfu) of adenovirus twenty-one days later in the same locations. Immunological assays or challenges were performed 14 days after viral inoculation.

In vivo depletion of CD8⁺ T cells were performed by treating vaccinated A/Sn mice with 53.6.7 MAb. At days 2 and 3 before challenge with trypomastigotes, mice were injected i.p. with a dose of 1 mg of anti-CD8 or control Rat IgG. Seven days after challenge, each mouse received one more dose of 1 mg of anti-CD8 or Rat IgG. The efficacy of depletion of CD8⁺ spleen cells

Figure 1. Structure and localization of Amastigote Surface Protein-2 (ASP-2). A- Schematic view of the primary structure of *T. cruzi* ASP-2. B- HeLa cells were infected for 48 h with trypomastigotes of the Y strain. After fixation, indirect immunofluorescence or DAPI staining were performed as described using MAb K22 and imaged using fluorescence microscopy [39]. Bar, 14 μ M. doi:10.1371/journal.pone.0022011.g001

before challenge was more than 95% in anti-CD8 treated mice compared to Rat IgG treated ones.

Immunological T cell assays

Ex vivo ELISPOT (IFN- γ) or *in vivo* cytotoxic assays were performed exactly as described previously [12,15]. The surface mobilization of CD107a and the intracellular expression of cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-2 and IL-10) was evaluated after *in vitro* culture of splenocytes in the presence or absence of antigenic stimulus. Cells were washed three times in plain RPMI and re-suspended in cell culture medium consisting of RPMI 1640 medium, pH 7.4, supplemented with 10 mM Hepes, 0.2% sodium bicarbonate, 59 mg/l of penicillin, 133 mg/l of streptomycin, and 10% Hyclone fetal bovine sera (Hyclone, Logan, Utah). The viability of the cells was evaluated using 0.2% Trypan Blue exclusion dye to discriminate between live and dead cells. Cell concentration was adjusted to 5×10^6 cells/mL in cell culture medium containing anti-CD28 (2 μ g/mL), Brefeldin A (10 μ g/mL), Monensin (5 μ g/mL) and FITC-labeled anti-CD107a (Clone 1D4B, 2 μ g/mL, BD Pharmingen). In half of the cultures, a final concentration of 10 μ M of the VNHRFTLV peptide was added. The cells were cultivated in flat-bottom 96-well plates (Corning) in a final volume of 200 μ l in duplicate, at 37°C in a humid environment. After a 20-h incubation, cells were stained for surface markers with Per-CP or PE-labeled anti-CD8 on ice for 20 min. To detect IFN- γ , TNF- α , IL-2 and IL-10 by intra-cellular staining (ICS), cells were then washed twice in buffer containing PBS, 0.5% BSA and 2 mM EDTA, fixed in 4% PBS-paraformaldehyde solution for 10 minutes and permeabilized for 15 minutes in a PBS, 0.1% BSA, 0.1% saponin solution. After being washed twice, cells were stained for intracellular markers using APC or PE-labeled anti-IFN- γ (Clone XMGI.2) and? PE- labeled anti-TNF- α (clone MP6-XT22), APC-labeled anti-IL-2 (clone JES6-5H4) or APC-labeled anti-IL-10 (JES5-16E3) for 20 minutes on ice. Finally, cells were washed twice and fixed in 1% PBS-paraformaldehyde. At least 300,000 cells were acquired on a BD FACSanto flow cytometer and then analyzed with FlowJo.

Statistical analysis

Values were expressed as means $\pm$ SD. These values were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's HSD tests

(<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>). The LogRank test was used to compare mouse survival rates after challenge with *T. cruzi* (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/russell/logrank/>). The differences were considered significant when the *P* value was <0.05 .

Results

During experimental infection of H-2^b or H-2^a inbred mouse strains with parasites of the Y strain of *T. cruzi*, two epitopes were identified within the ASP-2 antigen represented by the VNHRFTLV or TEWETGQI peptides. They were recognized by H-2K^b- or H-2K^k-restricted CD8⁺ cytotoxic T cells, respectively [12,14,15,37,38]. ASP-2 is a member of the large family of TS surface antigens and is abundantly expressed only in the intracellular forms (amastigotes) of *T. cruzi* [39]. Fig. 1A and

Table 1. Peptides used in the study.

Peptide	AA positions	Predicted H-2 restriction
<u>TEWETGQI</u>	320–327	K ^k
<u>PETLGHEI</u>	650–657	K ^k
<u>YEIVAGYI</u>	140–147	K ^k
<u>HEHNLFGI</u>	130–137	K ^k
<u>AESWPSIV</u>	121–128	K ^k
<u>TPTAGLVGF</u>	488–496	L ^d
<u>RPNMSRHLE</u>	36–44	L ^d
<u>GSRNGNDRL</u>	172–179	L ^d
<u>ESKSGDAPL</u>	69–77	L ^d
<u>ESEPKRPNM</u>	31–39	L ^d
<u>ESSTPTAGL</u>	485–493	L ^d
<u>VSWGEPKSL</u>	239–247	L ^d
<u>YSDGALHLL</u>	438–446	L ^d

Peptides were selected by the scores determined by programs available at the sites: <http://www.syfpeithi.de/> and http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/. Putative anchor residues are in bold and underlined. doi:10.1371/journal.pone.0022011.t001

Figure 2. CD8 T-cell epitope identification during immune responses of H-2^a mice infected with *T. cruzi* or genetically vaccinated with *asp-2* gene. B10.A mice were infected with 10⁴ *T. cruzi* blood parasites. A/Sn mice were immunized with plgSPC1.9 followed by AdASP-2 and injected i.m. at 0 and 3 weeks, respectively. Control mice were naïve or injected with pcDNA3 followed by pcDNA3/Adβ-gal. **A**—Two weeks after infection or the final immunizing dose, splenic cells were re-stimulated *in vitro* in the presence of medium or the indicated peptides at a final concentration of 10 μM. The number of splenic IFN-γ spot-forming cells (SFC) was estimated by *ex vivo* ELISPOT assay. **B**—*In*

vivo cytotoxic activity was estimated by injecting each mouse with syngeneic CFSE-labeled splenic cells coated with or without 2 μM of the indicated peptide. Results are expressed as means ± SD of 4 mice per group and are representative of experiments performed at least twice with similar results. Asterisks denote that the number of SFC or *in vivo* cytotoxicity were significantly higher when compared to naïve or pcDNA3/Adβ-gal injected mice ($P < 0.01$, one-way ANOVA). doi:10.1371/journal.pone.0022011.g002

Fig. 1B show, respectively, some of the structural features of ASP-2 antigen and its expression by amastigotes.

To test whether the H-2K^k-restricted epitope TEWETGQI could be an immunodominant epitope, a series of synthetic peptides containing the predicted AA anchor motif for binding to the H-2K^k or H-2L^d alleles of mouse MHC haplotype H-2^a was employed. No epitope was predicted to bind to H-2D^d (Table 1). After infection of H-2^a mice, antigen-specific IFN-γ producing cells could only be detected in the presence of the peptide TEWETGQI (Fig. 2A). We concluded that this epitope was the immunodominant epitope of ASP-2 during infection of H-2^a mice with the Y strain of *T. cruzi*. H-2^a mice used in this experiment were B10.A because they are resistant to infection with *T. cruzi*.

We showed previously that the strong pattern of immunodominance observed following infection with *T. cruzi* was not duplicated in mice genetically immunized with a recombinant adenovirus expressing ASP-2 (AdASP-2, ref. 15). Then, we determined whether genetically immunized H-2^a mice could present a different pattern of immunodominance. We used a genetic immunization approach which consisted of a heterologous prime-boost regimen using plasmid DNA followed by a recombinant adenovirus both containing the same *asp-2* gene. This protocol provided strong and long lasting protective immunity against experimental infection mediated by CD8⁺ T cells [37,38]. In these experiments, we used H-2^a mice of the A/Sn strain. These mice are highly susceptible to infection with *T. cruzi*, allowing us to perform protective immunity studies [37,38]. Nevertheless, it is important to mention that the results were similar when we used B10.A mice.

After *ex vivo* stimulation with our synthetic peptides, as expected, IFN-γ producing cells were detected following stimulation with the TEWETGQI peptide. In addition to this epitope, two other epitopes (PETLGHEI and YEIVAGYI) induced IFN-γ production by immune cells (Fig. 2A). These peptide-specific IFN-γ producing cells were CD8⁺ T cells as determined by simultaneous staining of intra-cellular IFN-γ and the surface marker CD8 (see below).

These peptides were recognized by cytotoxic cells in H-2^a mice as determined by *in vivo* cytotoxicity assays using target cells coated with each of these peptides. B10.A mice infected with *T. cruzi* developed strong *in vivo* cytotoxicity against target cells coated with the peptide TEWETGQI. In contrast, very limited (if any) *in vivo* cytotoxicity was observed against target cells coated with peptides PETLGHEI and YEIVAGYI. These results were not due to different kinetics of the immune response because we observed the same results 14 or 28 days after an infectious challenge (Fig. 2B).

However, A/Sn (H-2^a) mice genetically vaccinated with a heterologous prime-boost vaccination regimen displayed easily detectable *in vivo* cytotoxic activity against target cells coated with any of these three peptides. The elimination of target cells coated with peptide TEWETGQI was always stronger than the two others, suggesting a pattern of immunodominance.

To determine whether other cytokines and/or effector molecules could be secreted by peptide-specific T cells, we performed staining to detect surface mobilization of CD107a (a marker for exocytosis) or intra-cellular accumulation of IFN-γ, TNF-α, IL-2

Figure 3. Surface mobilization of CD107a and expression of IFN- γ , TNF- α , IL-2 or IL-10 by specific CD8⁺ T cells from B10.A mice infected with *T. cruzi* or A/Sn mice immunized with plgSPCI.9/AdASP-2 vaccine. B10.A or A/Sn mice were infected or immunized as described in the legend of Fig. 2. Control mice were either naive mice or mice immunized with pcDNA3/Ad β -gal. Twenty one or fourteen days after infection or immunization, respectively, these mice had their splenic cells cultured in the presence of anti-CD107a and anti-CD28, with or without the peptides TEWETGQI, PETLGHEI or YEIVAGYI. After 12 h, cells were stained for CD8, IFN- γ , TNF- α , IL-2 and IL-10. Representative analyses (medians) are shown from four mice performed per experiment. **A**) Example of splenic CD8⁺ cells from B10.A naive mice cultivated *in vitro* in the presence of medium alone (Medium) or with the indicated peptides and stained for expression of IFN- γ and TNF- α . **B, C and D**) Examples of splenic CD8⁺ cells from B10.A infected mice cultivated *in vitro* in the presence of medium alone (Medium) or with the indicated peptides and stained for expression of: B) IFN- γ and TNF- α ; C) IFN- γ and IL-2; D) IFN- γ and IL-10. **E and F**) Examples of splenic CD8⁺ cells from mice immunized with pcDNA3/Ad β -gal cultivated *in vitro* in the presence of medium alone (Medium) or with the indicated peptides and stained for surface mobilization of CD107a and expression IFN- γ (panel E) or expression of IFN- γ and TNF- α (panel F). **G and H**) Examples of splenic CD8⁺ cells from mice immunized with plgSPCI.9/AdASP-2 cultivated *in vitro* in the presence of medium alone (Medium) or with the indicated peptides and stained for surface mobilization of CD107a and expression IFN- γ (panel G) or expression of IFN- γ and TNF- α (panel H). **I**) Examples of splenic CD8⁺ cells from mice immunized with plgSPCI.9/AdASP-2 cultivated *in vitro* in the presence of medium alone (Medium) or with the indicated peptides and stained for surface mobilization of CD107a and expression IFN- γ (panel I). **J**) Summary of CD8⁺ mobilization in the presence of medium alone (Medium) or with the indicated peptides and stained for surface mobilization of CD107a and expression IFN- γ (panel J).

vitro in the presence of medium alone (Medium) or with the indicated peptides and stained for surface mobilization of CD107a and expression IFN- γ (panel G) and expression IFN- γ and TNF- α (panel H). **I and J**) Determination of multifunctional CD8⁺ cells from mice immunized with pIgSPCL9/AdASP-2 cultivated *in vitro* in the presence of the indicated peptides and stained for surface mobilization of CD107a and expression IFN- γ and TNF- α . doi:10.1371/journal.pone.0022011.g003

or IL-10. When we used splenic cells from B10.A mice infected with *T. cruzi*, we observed that upon stimulation with TEWETGQI, a large fraction of CD8⁺ cells mobilize CD107a to the surface (data not shown) and accumulate intra-cellular IFN- γ and TNF- α (Fig. 3B). These CD8⁺ cells were therefore multifunctional CD107a⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁺ (~35%) or IFN- γ ⁺TNF- α ⁺ (~40%). We were unable to detect the presence of significant numbers of IL-2 or IL-10 expressing cells in these same samples (Fig. 3C and 3D). The expression of these cytokines was dependent on the infection because they were not detected in cells from naive mice (Fig. 3A).

In contrast, a relatively low frequency of CD8⁺ splenic cells stimulated with peptides PETLGHEI or YEIVAGYI mobilized CD107a to the surface (data not shown) or accumulated intra-cellular IFN- γ or TNF- α (Fig. 3B). We were also unable to detect the presence of significant numbers of IL-2 or IL-10 expressing cells in these same cells (Fig. 3C and 3D).

Splenic cells from A/Sn mice genetically vaccinated with heterologous prime-boost regimen were stimulated with peptides TEWETGQI, PETLGHEI or YEIVAGYI. The results shows that a large fraction of the CD8⁺ cells of pIgSPCL9/AdASP-2 immunized mice at the same time mobilize CD107a to the surface and expressed intra-cellular IFN- γ and TNF- α (Fig. 3G to 3J). These cells were therefore multifunctional CD8⁺ T cells as we have previously described [37]. We were unable to detect the presence of intra-cellular IL-2 or IL-10 in these same cells (data not shown). These results confirmed and extended the ones described in Fig. 2).

The description of these two new epitopes allowed us to test whether immunity to the subdominant/cryptic epitope could participate during protective immunity against *T. cruzi* infection, a phenomenon that has not previously been tested experimentally. For this purpose, we generated a plasmid DNA and a recombinant adenovirus containing a mutated form of the *asp-2* gene in which we modified the nucleotides encoding the anchor residues required for the immunodominant TEWETGQI epitope to bind to the H-2K^k molecule. The mutated gene expressed the AA sequence TAWETGQA, where the alanines (A) replaced glutamic acid (E) or isoleucine (I) of the original epitope. In preliminary experiments, we observed that the synthetic peptide TAWETGQA was not recognized by immune cells from genetically vaccinated H-2^a mice (data not shown). Details of the plasmid and recombinant adenovirus containing the mutated form of the *asp-2* gene are shown in Table 2.

Initially, we genetically immunized mice with plasmids containing the original gene (pIgSPCL9), the mutated gene (pIgSPTAWETGQA) or both plasmids simultaneously. Immune responses were estimated by ELISPOT after *ex vivo* stimulation

with the immunodominant epitope TEWETGQI or with the subdominant/cryptic epitopes PETLGHEI or YEIVAGYI two weeks after challenge with *T. cruzi*. We chose this protocol because, as the immune response following plasmid DNA vaccination is usually low, it is easier to detect the anamnestic immune responses after challenge [12]. We observed that all mice immunized with *asp-2* genes (mutated or not) presented specific IFN- γ producing cells when stimulated with subdominant/cryptic epitopes (PETLGHEI or YEIVAGYI, Fig. 4A). The immune response was specific because mice immunized with control plasmid pcDNA3 failed to recognize these peptides. However, we detected IFN- γ producing cells specific to TEWETGQI only in mice immunized with plasmid pIgSPCL9. It is noteworthy that the number of cells detected in mice immunized with pIgSPTAWETGQA was similar to the number of cells in pcDNA3 injected mice (Fig. 4A). These numbers reflect cells primed during infection. Analysis of *in vivo* cytotoxic activity also demonstrated that in mice immunized with the plasmid pIgSPTAWETGQA, the response to the immunodominant epitope TEWETGQI was not different from control mice immunized with pcDNA3 (Fig. 4B). These immunological analyses demonstrated that mice immunized with pIgSPTAWETGQA indeed lost the functional immunodominant TEWETGQI response but had an unaltered ability to elicit immune responses to the subdominant epitopes PETLGHEI and YEIVAGYI.

After challenge, mice immunized with plasmids containing the *asp-2* gene (mutated or not) presented significantly lower parasitemia than control mice immunized with pcDNA3 (Fig. 4C). Although the levels of parasitemia were not statistically different when compared to mice vaccinated with the plasmid containing the mutated *asp-2* gene, the mortality of these animals was significantly faster (Fig. 4D). We therefore concluded that broadening the CD8⁺ T cell immune response by vaccination with a plasmid containing epitopes that elicit immune responses to subdominant/cryptic epitopes of ASP-2 could provide some degree of protective immunity. Nevertheless, because protective immunity elicited by vaccination with pIgSPTAWETGQA was not as efficient, the presence of a functional immunodominant epitope was clearly important for effective protective immunity.

We then sought to test the same hypotheses described above using a distinct approach. For that purpose, H-2^a mice were primed with plasmid pIgSPCL9 followed by a booster immunization with AdASP-2 (heterologous prime-boost regimen). Alternatively, mice were primed with plasmid pIgTAWETGQA followed by a booster immunization with AdTAWETGQA. We consider this approach complementary to the one described above because plasmid or adenovirus may used distinct routes for stimulating CD8⁺ T cells.

Immune responses were estimated 14 days after the booster immunization by ELISPOT following *ex vivo* stimulation with synthetic peptides encoding the immunodominant epitope TEWETGQI, the subdominant/cryptic epitopes PETLGHEI or YEIVAGYI or the mutated epitope TAWETGQA. We chose this protocol because the immune responses following heterologous prime boost immunization generates strong immune responses that can be easily detected after boosting [37]. We observed that mice immunized with *asp-2* genes (mutated or not) had specific IFN- γ producing cells when stimulated with peptides PETLGHEI or YEIVAGYI. The fact that these responses were of similar magnitude strongly argued that the expression/immunogenicity of

Table 2. Genetic vectors used in the study.

Designation	Vector	ASP-2 CD8 epitopes		
pIgSPCL9	Plasmid	TEWETGQI	PETLGHEI	YEIVAGYI
pIgSPTAWETGQA.9	Plasmid	TAWETGQA	PETLGHEI	YEIVAGYI
AdASP-2	Adenovirus	TEWETGQI	PETLGHEI	YEIVAGYI
AdTAWETGQA	Adenovirus	TAWETGQA	PETLGHEI	YEIVAGYI

doi:10.1371/journal.pone.0022011.t002

Figure 4. CD8 immune responses and trypanosome-induced parasitemia and mortality in A/Sn mice genetically immunized with different plasmid DNA containing the *asp-2* gene. A/Sn mice were immunized with pcDNA3, plgSPCI.9, plgSPTAWETGQA or simultaneously with the last two (plgSPCI.9 and plgSPTAWETGQA). Immunization consisted of 3 doses of 100 μ g of DNA each given by the i.m. route in the *tibialis anterioris* three weeks apart. A- Two weeks after the final immunizing dose, mice were challenged i.p. with 150 bloodstream trypanosomes. Two weeks after infection, splenic cells were re-stimulated *in vitro* in the presence of medium only or the indicated peptides at a final concentration of 10 μ M. The number of splenic IFN- γ spot-forming cells (SFC) was estimated by *ex vivo* ELISPOT assay. B- *In vivo* cytotoxic activity was estimated by injecting each mouse with syngeneic CFSE-labeled splenic cells coated with or without 2 μ M of the indicated peptide. Results are expressed as means $\pm$ SD of 4 mice per group and are representative of experiments performed at least twice with similar results. Asterisks denote that the number of SFC, or the *in vivo* cytotoxicity, were significantly higher when compared to SFC found in naïve or pcDNA3/Ad β -gal-injected mice ($P < 0.01$). C- Parasitemia for each mouse group is represented as mean $\pm$ SD ($n = 5-7$). Asterisks denote that mice from groups immunized with plgSPCI.9 or plgSPTAWETGQA or both had significantly lower parasitemia ($P < 0.01$) than animals injected with pcDNA3. The curves of parasitemia of animals immunized with plgSPCI.9 (squares) or plgSPTAWETGQA (triangles) are superimposed. D- Kaplan-Meier curves for the survival of mouse groups immunized and challenged as described above ($n = 5-7$). Mice from groups immunized with plgSPCI.9 or plgSPCI.9/plgSPTAWETGQA survived significantly longer than animals injected with pcDNA3 or plgSPTAWETGQA ($P < 0.05$, in all cases, LogRank test). Mice immunized with plgSPTAWETGQA also survived longer than animals injected with pcDNA3 ($P < 0.05$). No animals died after the 30th day until they were euthanized. Results are representative of two independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0022011.g004

both genes/antigens were very similar. We could detect IFN- γ producing cells specific for the TEWETGQI epitope only in mice immunized with pIgSPCI.9/AdASP-2. In contrast, none of the immunized mice presented IFN- γ producing cells when stimulated with the TAWETGQA peptide (Fig. 5A). The analysis of *in vivo* cytotoxic activity showed a similar picture (Fig. 5B). We also

performed intra-cellular cytokine staining analysis for IFN- γ and TNF- α after *in vitro* peptide stimulation. As depicted in Fig. 5C, we detected CD8⁺ cells expressing IFN- γ and/or TNF- α specific for the TEWETGQI epitope only in mice immunized with pIgSPCI.9/AdASP-2 (Fig. 5C). Similar analyses performed 14 days after an infectious challenge with *T. cruzi* exhibited the same

Figure 5. CD8 immune responses in A/Sn mice immunized with *asp-2* using the heterologous DNA prime-adenovirus boost vaccination regimen. A/Sn mice were primed i.m. with 100 μ g of plasmids pcDNA3, pIgSPC1.9 or pIgSP-TAWETGQA. Three weeks later, these mice were boosted i.m. with 2×10^8 pfu Ad β -gal, AdASP-2 or AdTAWETGQA. A- Two weeks after the last dose, splenic cells were re-stimulated *in vitro* in the presence of medium only or the indicated peptides at a final concentration of 10 μ M. The number of splenic IFN- γ spot forming cells (SFC) was estimated by *ex vivo* ELISPOT assay. B- *In vivo* cytotoxic activity was estimated by injecting each mouse with syngeneic CFSE-labeled splenic cells coated with or without 2 μ M of the indicated peptide. Results are expressed as mean $\pm$ SD of 4 mice per group and are representative of experiments performed at least twice with similar results. Asterisks denote that the number of SFC or *in vivo* cytotoxicity were significantly higher when compared to SFC found in naive or pcDNA3/Ad β -gal injected mice ($P < 0.01$). C- Fourteen days after the last dose, these mice had their splenic cells cultured in the presence of anti-CD28 and Medium or the indicated peptides. After 12 h, cells were stained for CD8, IFN- γ and TNF- α . Examples of splenic CD8⁺ cells from immunized mice. Representative analyses (medians) are shown from four mice performed per experiment. doi:10.1371/journal.pone.0022011.g005

pattern of response (data not shown). Together, these immunological analyses demonstrated that heterologous prime-boost immunization with pIgSP-TAWETGQA/AdTAWETGQA failed to induce an immune response to the immunodominant epitope TEWETGQI but induced almost unaltered immune responses to the subdominant epitopes PETLGHEI or YEIVAGYI.

After challenge, parasitemia in mice immunized with the *asp-2* genes (mutated or not) was significantly lower than in control

mice injected with pcDNA3/Ad β -gal ($P < 0.01$, Fig. 6A). Although most of the mice immunized with pIgSP-TAWETGQA/AdTAWETGQA died after challenge, they survived longer than control mice injected with pcDNA3/Ad β -gal (Fig. 6B, $P < 0.01$, LogRank test). In parallel, vaccinated and control mice were challenged by the s.c. route. We observed that the majority of the mice immunized with pIgSP-TAWETGQA/AdTAWETGQA survived the infectious challenge (Fig. 6D). We therefore conclu-

Figure 6. Trypomastigote-induced parasitemia and mortality in A/Sn mice immunized with *asp-2* using the heterologous DNA prime-adenovirus boost vaccination regimen. A/Sn mice were immunized as depicted in the legend of Fig. 5. Two weeks after the final immunizing dose, mice were challenged i.p. (Panels A and B) or s.c. (Panels C and D) with 150 bloodstream trypomastigotes. Parasitemia for each mouse group is represented as mean $\pm$ SD ($n=10$ or 11). Asterisks denote that mice from groups immunized with plgSPC1.9/AdASP-2 or plgSPTAWETGQA/AdTAWETGQA had significantly lower parasitemia ($P<0.01$) than pcDNA3/Adβ-gal-injected animals. Panels B and D represent Kaplan-Meier curves for survival of the mouse groups immunized and challenged as described above ($n=10$ or 11). Mice immunized with plgSPC1.9/AdASP-2 survived significantly longer than animals immunized with plgSPTAWETGQA/AdTAWETGQA or pcDNA3/Adβ-gal ($P=0.01$ or $P<0.01$, respectively). Mice immunized with plgSPTAWETGQA/AdTAWETGQA survived significantly longer than pcDNA3/Adβ-gal-injected animals ($P<0.01$). Results are representative of two pooled experiments. No animals died after the 40th day. doi:10.1371/journal.pone.0022011.g006

ded that broadening the T cell immune response using a genetic vaccination that elicits immune responses to subdominant/cryptic epitopes of ASP-2 provides protective immunity against infection. Nevertheless, likewise in the case of the plasmid DNA, after an i.p. challenge, in terms of survival, immunization with only genes expressing subdominant epitopes was not as effective as immunization with genes expressing both the dominant and the subdominant epitopes.

Finally, to firmly establish that protective immunity was mediated by CD8⁺ T cells, we performed *in vivo* depletion experiments in mice vaccinated with the pIgSPC1.9/AdASP-2 or pIgSPTAWETGQA/AdTAWETGQA. Treatment with anti-CD8 MAb renders these mice more susceptible to infection. CD8 depleted mice presented higher parasitemia (Fig. 7A and B) and shorter survival times (Fig. 7C and D) when compared to A/Sn mice vaccinated with heterologous prime-boost regimen

(pIgSPC1.9/AdASP-2 or pIgSPTAWETGQA/AdTAWETGQA) and treated with rat IgG. CD8 depleted mice had their survival time reduced to the same time as control mice which were injected with pcDNA3/Adβ-gal.

Discussion

Here, we initially confirmed and extended our previous observation that experimental infection with the human intracellular pathogen *T. cruzi* restricted the repertoire of CD8⁺ T cells. While immune cells of infected H-2^a mice recognized a single immunodominant epitope of ASP-2, cells from mice immunized with recombinant genetic vaccines expressing this same *T. cruzi* antigen recognized, in addition to the immunodominant epitope, two other subdominant/cryptic epitopes. The sub-dominant epitopes not only failed to elicit IFN-γ and *in vivo* cytotoxicity

Figure 7. CD8 T cell dependence of protective immunity of A/Sn mice immunized with *asp-2* using the heterologous DNA prime-adenovirus boost vaccination regimen. A/Sn mice were immunized as described in the legend of Fig. 5. plgSPTAWETGQA/AdTAWETGQA had significantly lower parasitemia ($P < 0.01$) than pcDNA3/Adβ-gal-injected animals. Before and after challenge, mice were treated as described in Methods section with rat IgG (control) or anti-CD8 MAb. The parasitemia for each mouse group is represented as mean $\pm$ SD ($n = 6$). Asterisks denote that mice from groups immunized with plgSPC19/AdASP-2 or plgSPTAWETGQA/AdTAWETGQA and treated with Rat IgG had significantly lower parasitemia ($P < 0.01$) than vaccinated mice treated with anti-CD8 (Panels A and B). Panels C and D represent Kaplan-Meier curves for survival of the mouse groups immunized and challenged as described above ($n = 6$). Mice immunized with plgSPC19/AdASP-2 or plgSPTAWETGQA/AdTAWETGQA and treated with Rat IgG survived significantly longer than vaccinated animals treated with anti-CD8 ($P < 0.01$ in both cases). doi:10.1371/journal.pone.0022011.g007

during infection (Fig. 2), but they also did not stimulate TNF- α , IL-2 or IL-10 secretion by CD8⁺ T cells (Fig. 3). The precise reason for this strong immunodominant pattern during *T. cruzi* infection is unknown at present. One possible explanation for this biased immune response could be to provide an advantage to the parasite by avoiding an even higher and broader immune response. This hypothesis is in agreement with earlier studies showing that immunity to subdominant epitopes can provide an important contribution to protective immunity against viral infection [34,40–43]. Our results also corroborated this hypothesis. Immunity to epitopes that are not commonly recognized during infection (cryptic) provided a significant degree of protective immunity. Nonetheless, immune responses against these cryptic epitopes did

not substitute completely for CD8⁺ T cells specific for the immunodominant TEWETGQI epitope. We observed that immunization with plasmids alone or in combination with a recombinant adenovirus that did not express the immunodominant epitope elicited immune responses to the subdominant/cryptic epitopes but failed to provide optimal protective immunity when compared to a plasmid that expresses both the immunodominant and subdominant epitopes (Fig. 4D, 6B and 7D). These results demonstrate that the response to the immunodominant epitope contributes to the immunity elicited by genetic vaccination and is might be required for highly efficient resistance.

In previous studies, we showed that immunization with short proteins in the presence of the TLR9 agonist CpG elicited CD8⁺

T-cell mediated immunity against *T. cruzi* infection in A/Sn mice [44]. These short proteins contained only the AA 261 to 500 or 261 to 380. In both cases, they did not express the subdominant/cryptic epitopes. Based on that, we concluded that immunization with the immunodominant CD8 epitope alone could provide a high degree of protective immunity even in the absence of the subdominant epitopes [44]. The fact that the immune response directed solely to the immunodominant epitope can provide significant degree of protective immunity against protozoan parasites has been established a long time ago by the use of adoptively transferred T cell clones or heterologous-prime boost vaccination regimen [45–49].

In earlier studies in which we depleted CD8⁺ T cells from genetically vaccinated mice, we observed that these mice were unable to control parasitemia and died at the same time as control unvaccinated animals [37]. Therefore, although genetic immunization elicits effector CD4⁺ T cells, these cells do not account for the protection we observed. This concept was further corroborated with experiments of CD8 T cell-depletion performed here (Fig. 7A to D).

Using a different approach, a similar conclusion was also reached by Rosenberg *et al.*, 2010 [17]. In their study, they induced simultaneous tolerance to two immunodominant *T. cruzi* epitopes in a resistant mouse strain. Following infection, an increased susceptibility to infection was observed. Nevertheless, they were still able to control and survive the experimental infection. This protective immunity was possibly mediated by CD8⁺ T cells specific to subdominant epitopes that substituted for the immunodominant ones. The AA sequences of these subdominant/cryptic epitopes have yet to be identified. Together with our study, they strongly support the notion that the immune responses to both dominant and subdominant/cryptic epitopes can be important for controlling experimental *T. cruzi* infection in inbred mouse strains. These results are in agreement with the observation with other parasites such as *Plasmodium*. Tolerance to or removal of the immunodominant CD8 epitope of *P. yoelii* led to the development of immunity to CD8 subdominant epitopes as well [50,51].

The mechanism operating during *T. cruzi* infection to restrict the immune response leading to immunodominance has yet to be characterized. We provide initial evidence that it could be explained by T cell competition for APCs by showing that in mice infected simultaneously with two different parasite strains containing different immunodominant epitopes, we could generate maximal responses to both epitopes without immunodominance or competition [15]. Our interpretation was that if the epitopes are presented by different APCs, then the immunodominant pattern is

disrupted. However, a more formal demonstration using bone marrow chimeric mice studies is lacking. At the molecular level, this strong immunodominance can be explained by the type of antigen presentation that predominates during *T. cruzi* infection. In recent studies, important evidence has been provided that subdominant epitopes can only be directly presented by the expressing cells, which might occur in the case of the recombinant adenovirus. However, during indirect priming (cross-priming), these epitopes would be at a disadvantage [52]. *T. cruzi* may use cross-priming as the dominant route, drastically reducing the priming of subdominant epitopes.

In addition to shedding some light on the host-parasite relationship, our results may have important implications for the development of T cell vaccines against parasitic diseases. In our earlier studies, we observed that genetic vaccination with a heterologous prime-boost regimen employing plasmid DNA and recombinant adenovirus elicited strong, long lasting CD8⁺ T cell-mediated protective immunity against experimental infection in a mouse strain highly susceptible to *T. cruzi* infection [37,38]. Here, we demonstrated that the CD8 T cell-mediated protective immunity observed was directed to three distinct epitopes, two of which are cryptic. The strategy of redirecting immunity to epitopes that are not usually targets of the naturally acquired immune response has been proposed as a possible means to improve immunity against viral infection [40–43]. Recently, this strategy was also proven useful to improve vaccination against *T. cruzi* infection [53].

Finally, our observations may have important implications regarding the basis for the strong immunodominance pattern observed after experimental infection with other intracellular parasites such as *Plasmodium*, *Toxoplasma gondii* and *Theileria parva* [50,51,54–57].

Acknowledgments

The authors are in debt with Dr. C. Claser for providing the immunofluorescence picture of Fig. 1. We are also in debt with Drs. Laurent Renia (Singapore Immunology Network), Dr. Chris Ibegbu (Emory Vaccine Center), Dr. Fanny Tzelepis (University of Ottawa) and Dr. Silvia B. Boscardin, for careful reviewing the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MRD ELVS JRCdV BCGdA MMR. Performed the experiments: MRD ELVS JRCdV BCGdA. Analyzed the data: MRD ELVS AVM OB-R RTG MMR. Contributed reagents/materials/analysis tools: AVM OB-R RTG. Wrote the paper: MMR.

References

1. Tarleton RL (2007) Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol* 19: 430–4.
2. Miyahira Y (2008) *Trypanosoma cruzi* infection from the view of CD8⁺ T cell immunity—an infection model for developing T cell vaccine. *Parasitol Int* 57: 38–48.
3. Padilla AM, Bustamante JM, Tarleton RL (2009) CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Curr Opin Immunol* 21: 385–90.
4. Boscardin SB, Torrecilhas AC, Manarin R, Revelli S, Rey EG, et al. (2010) Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J Cell Mol Med* 14: 1373–84.
5. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, et al. (2010) The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med* 12: e29.
6. Kierszenbaum F (2005) Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trends Parasitol* 21: 513–6.
7. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV (2008) Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115: 1109–23.
8. Bonney KM, Engman DM (2008) Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr Mol Med* 8: 510–8.
9. Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS (2009) The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol* 31: 673–85.
10. Scharfstein J, Gomes Jde A, Correa-Oliveira R (2009) Mem Inst Oswaldo Cruz. Back to the future in Chagas disease: from animal models to patient cohort studies, progress in immunopathogenesis research 104(Suppl 1): 187–98.
11. Lannes-Vieira J, Silverio JC, Pereira IR, Vinagre NF, Carvalho CM, et al. (2009) Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors—how to make a dream come true. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(Suppl 1): 226–35.
12. Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Gazzinelli RT, Persechini PM, et al. (2006) Distinct kinetics of effector CD8⁺ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. *Infect Immun* 74: 2477–81.
13. Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, et al. (2006) CD8⁺ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathog* 2(8): e77.
14. Tzelepis F, Persechini PM, Rodrigues MM (2007) Modulation of CD4⁺ T cell-dependent specific cytotoxic CD8⁺ T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. *PLoS One* 2(4): e393.
15. Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Claser C, Machado AV, et al. (2008) Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8⁺ T cells leading to immunodominance. *J Immunol* 180: 1737–48.
16. Bixby LM, Tarleton RL (2008) Stable CD8⁺ T cell memory during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 181: 2644–50.

17. Rosenberg CS, Martin DL, Tarleton RL (2010) CD8+ T cells specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of *Trypanosoma cruzi* infection but are not required for resistance. *J Immunol* 185: 560–8.
18. Freire-de-Lima L, Alisson-Silva F, Carvalho ST, Takiya CM, Rodrigues MM, et al. (2010) *Trypanosoma cruzi* subverts host cell sialylation and may compromise antigen-specific CD8+ T cell responses. *J Biol Chem* 285: 13388–96.
19. Oliveira AC, de Alencar BC, Tzelepis F, Klezewsky W, da Silva RN, et al. (2010) Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice 29; 6(4): e1000870.
20. Rodrigues MM, de Alencar BC, Claser C, Tzelepis F (2009) Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease? *Braz J Med Biol Res* 42: 220–3.
21. Chen W, Antón LC, Bennink JR, Yewdell JW (2000) Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity* 12: 83–93.
22. Tenzer S, Wee E, Burgevin A, Stewart-Jones G, Friis L, et al. (2009) Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance. *Nat Immunol* 10: 636–46.
23. Yewdell JW (2006) Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses. *Immunity* 25: 533–43.
24. Irvine K, Bennink J (2006) Factors influencing immunodominance hierarchies in TCD8+ -mediated antiviral responses. *Expert Rev Clin Immunol* 2: 135–47.
25. La Gruta NL, Kedzierska K, Pang K, Webby R, Davenport M, et al. (2006) A virus-specific CD8+ T cell immunodominance hierarchy determined by antigen dose and precursor frequencies. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 994–9.
26. Kotturi MF, Scott I, Wolfe T, Peters B, Sidney J, et al. (2008) Naive precursor frequencies and MHC binding rather than the degree of epitope diversity shape CD8+ T cell immunodominance. *J Immunol* 181: 2124–33.
27. Sacha JB, Reynolds MR, Buechler MB, Chung C, Jonas AK, et al. (2008) Differential antigen presentation kinetics of CD8+ T-cell epitopes derived from the same viral protein. *J Virol* 82: 9293–8.
28. La Gruta NL, Rothwell WT, Cukalac T, Swan NG, Valkenburg SA, et al. (2010) Primary CTL response magnitude in mice is determined by the extent of naive T cell recruitment and subsequent clonal expansion. *J Clin Invest* 120: 1885–94.
29. Chen W, McCluskey J (2009) Immunodominance and immunodomination: critical factors in developing effective CD8+ T-cell-based cancer vaccines. *Adv Cancer Res* 95: 203–47.
30. Jenkins MR, Webby R, Doherty PC, Turner SJ (2009) Addition of a prominent epitope affects influenza A virus-specific CD8+ T cell immunodominance hierarchies when antigen is limiting. *J Immunol* 177: 2917–25.
31. Willis RA, Kappler JW, Marrack PC (2006) CD8 T cell competition for dendritic cells *in vivo* is an early event in activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12063–8.
32. Newberg MH, McEvers KJ, Gorgone DA, Lifton MA, Baumeister SH, et al. (2006) Immunodomination in the evolution of dominant epitope-specific CD8+ T lymphocyte responses in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J. Immunol* 176: 319–28.
33. Kastenmuller W, Gasteiger G, Gronau JH, Baier R, Ljapoci R, et al. (2007) Cross-competition of CD8+ T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination. *J Exp Med* 204: 2187–98.
34. Riedl P, Wieland A, Lamberth K, Buus S, Lemonnier F, et al. (2009) Elimination of immunodominant epitopes from multispecific DNA-based vaccines allows induction of CD8 T cells that have a striking antiviral potential. *J Immunol* 183: 370–80.
35. Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CR, Claser C, Machado AM, et al. (2004) Protective immunity against trypanosoma cruzi infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther* 15: 878–86.
36. Machado AV, Cardoso JE, Claser C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, et al. (2006) Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther* 17: 898–908.
37. de Alencar BC, Persechini PM, Haolla FA, de Oliveira G, Silverio JC, et al. (2009) Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect Immun* 77: 4383–95.
38. Haolla FA, Claser C, de Alencar BC, Tzelepis F, de Vasconcelos JR, et al. (2009) Strain-specific protective immunity following vaccination against experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Strain-specific protective immunity following vaccination against experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* 27: 5644–53.
39. Claser C, Espindola NM, Sasso G, Vaz AJ, Boscardin SB, et al. (2007) Immunologically relevant strain polymorphism in the Amastigote Surface Protein 2 of *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* 9: 1011–9.
40. Oukka M, Manuguerra JC, Livaditis N, Tourdot S, Riche N, et al. (1996) Protection against lethal viral infection by vaccination with nonimmunodominant peptides. *J Immunol* 157: 3039–45.
41. Friedrich TC, Valentine LE, Yant LJ, Rakasz EG, Piskowski SM, et al. (2007) Subdominant CD8+ T-cell responses are involved in durable control of AIDS virus replication. *J Virol* 81: 3465–76.
42. Holtappels R, Simon CO, Munks MW, Thomas D, Deegen P, et al. (2008) Subdominant CD8 T-cell epitopes account for protection against cytomegalovirus independent of immunodomination. *J Virol* 82: 5781–96.
43. Ruckwardt TJ, Luongo C, Malloy AM, Liu J, Chen M, et al. (2010) Responses against a subdominant CD8+ T cell epitope protect against immunopathology caused by a dominant epitope. *J Immunol* 185: 4673–80.
44. Araújo AF, de Alencar BC, Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CR, et al. (2005) CD8+ T-cell-dependent control of *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. *Infect Immun* 73: 6017–25.
45. Rodrigues M, Nussenzweig RS, Romero P, Zavala F (1992) The *in vivo* cytotoxic activity of CD8+ T cell clones correlates with their levels of expression of adhesion molecules. *J Exp Med* 175: 895–905.
46. Li S, Rodrigues M, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, et al. (1993) Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5214–18.
47. Rodrigues M, Li S, Murata K, Rodriguez D, Rodriguez JR, et al. (1994) Influenza and vaccinia viruses expressing malaria CD8+ T and B cell epitopes. Comparison of their immunogenicity and capacity to induce protective immunity. *J Immunol* 153: 4636–48.
48. Sedegah M, Jones TR, Kaur M, Hedstrom R, Hobart P, et al. (1998) Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7648–53.
49. Schneider J, Gilbert SC, Blanchard TJ, Hanke T, Robson KJ, et al. (1998) Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med* 4: 397–402.
50. Kumar KA, Sano G, Boscardin S, Nussenzweig RS, Nussenzweig MC, et al. (2006) The circumsporozoite protein is an immunodominant protective antigen in irradiated sporozoites. *Nature* 444: 937–40.
51. Mauduit M, Grüner AC, Tewari R, Depinay N, Kayibanda M, et al. (2009) A role for immune responses against non-CS components in the cross-species protection induced by immunization with irradiated malaria sporozoites. *PLoS One* 4(11): e7717.
52. Pavelic V, Matter MS, Mumprecht S, Breyer I, Ochsenbein AF (2009) CTL induction by cross-priming is restricted to immunodominant epitopes. *Eur J Immunol* 39: 704–16.
53. Cazorla SI, Frank FM, Becker PD, Arnaiz M, Mirkin GA, et al. (2010) Redirection of the immune response to the functional catalytic domain of the cysteine proteinase cruzipain improves protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis* 202: 136–44.
54. Blanchard N, Gonzalez F, Schaeffer M, Joncker NT, Cheng T, et al. (2008) Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol* 9: 937–44.
55. Frickel EM, Sahoo N, Hopp J, Gubbels MJ, Craver MP, et al. (2008) Parasite stage-specific recognition of endogenous *Toxoplasma gondii*-derived CD8+ T cell epitopes. *J Infect Dis* 198: 1625–33.
56. Wilson DC, Grotenbreg GM, Liu K, Zhao Y, Frickel EM, et al. (2010) Differential regulation of effector- and central-memory responses to *Toxoplasma gondii* infection by IL-12 revealed by tracking of Tgd057-specific CD8+ T cells. *PLoS Pathog* 6(3): e1000815.
57. MacHugh ND, Connelley T, Graham SP, Pelle R, Formisano P, et al. (2009) CD8+ T-cell responses to *Theileria parva* are preferentially directed to a single dominant antigen: Implications for parasite strain-specific immunity. *Eur J Immunol* 39: 2459–69.

APÊNDICE B

Re-circulation of lymphocytes mediated by sphingosine-1-phosphate receptor-1 contributes to resistance against experimental infection with the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*

Mariana R. Dominguez^{a,b}, Jonatan Ersching^{a,b}, Ramon Lemos^{a,b}, Alexandre V. Machado^c, Oscar Bruna-Romero^d, Mauricio M. Rodrigues^{a,b,*}, José Ronnie C. de Vasconcelos^{a,b,*}

^a Centro de Terapia Celular e Molecular (CTCMol), Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina, Brazil

^b Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina, Brazil

^c Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 December 2011

Received in revised form 26 January 2012

Accepted 15 February 2012

Available online 28 February 2012

Keywords:

CD8

Protozoan

FTY720

Gene-based vaccines

ABSTRACT

T-cell mediated immune responses are critical for acquired immunity against infection by the intracellular protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. Despite its importance, it is currently unknown where protective T cells are primed and whether they need to re-circulate in order to exert their anti-parasitic effector functions. Here, we show that after subcutaneous challenge, CD11c⁺-dependent specific CD8⁺ T-cell immune response to immunodominant parasite epitopes arises almost simultaneously in the draining lymph node (LN) and the spleen. However, until day 10 after infection, we observed a clear upregulation of activation markers only on the surface of CD11c⁺PDCA1⁺ cells present in the LN and not in the spleen. Therefore, we hypothesized that CD8⁺ T cells re-circulated rapidly from the LN to the spleen. We investigated this phenomenon by administering FTY720 to *T. cruzi*-infected mice to prevent egress of T cells from the LN by interfering specifically with signalling through sphingosine-1-phosphate receptor-1. In *T. cruzi*-infected mice receiving FTY720, CD8 T-cell immune responses were higher in the draining LN and significantly reduced in their spleen. Most importantly, FTY720 increased susceptibility to infection, as indicated by elevated parasitemia and accelerated mortality. Similarly, administration of FTY720 to mice genetically vaccinated with an immunodominant parasite antigen significantly reduced their protective immunity, as observed by the parasitemia and survival of vaccinated mice.

We concluded that re-circulation of lymphocytes mediated by sphingosine-1-phosphate receptor-1 greatly contributes to acquired and vaccine-induced protective immunity against experimental infection with a human protozoan parasite.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

T cells are important mediators of the adaptive immune response against infections caused by intracellular microorganisms, including the digenetic intracellular protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease (American trypanosomiasis). Genetic deficiency or specific treatments leading to the depletion of CD4⁺ or CD8⁺ T cells critically impairs the acquired immunity observed during experimental mouse infection [1–4]. Although, the anti-parasitic effect exerted by the T cells is

largely mediated by IFN- γ , other mediators may also participate in the efficient elimination of parasites from the host [1–4].

In inbred mouse strains or humans, MHC class II-restricted CD4⁺ T cells recognize multiple antigens from *T. cruzi* [5–9], whereas MHC class Ia-restricted CD8⁺ T cells are primarily specific for immunodominant epitopes that are expressed by surface antigens members of a large family of *T. cruzi* proteins named *trans*-sialidases (TS) [1,4,9–18]. T cells are not only critical for acquired immunity, but they are also important mediators of protective immunity in response to vaccination with recombinant proteins, plasmid DNA, and bacteria- and virus-based vaccine constructs against *T. cruzi* [19–25]. Additionally, as in the case of immunity acquired during infection, IFN- γ is a key mediator of protective immunity [25]. Despite the important role of T-cell mediated immune responses, it is currently unknown where protective T cells are primed and whether they need to re-circulate in order to exert their anti-parasitic effector functions during acquired immune responses.

* Corresponding authors at: CTCMol, UNIFESP – Escola Paulista de Medicina, Rua Mirassol, 207, São Paulo-SP, 04044-010, Brazil. Tel.: +55 11 5571 1095; fax: +55 11 5571 1095.

E-mail addresses: mrodrigues@unifesp.br (M.M. Rodrigues), jrcvasconcelos@gmail.com (J.R.C. de Vasconcelos).

With this aim, we first evaluated the kinetics of CD8⁺ T-cell activation in the LN and spleen following a subcutaneous parasite challenge. Although the kinetics of activation in both locations were very similar, we detected the presence of clearly activated CD11c⁺ Plasmacytoid Dendritic Cells 1⁺ (PDCA-1) cells only in the LN. CD11c⁺ PDCA-1⁺ are known for their capacity to secrete large amounts of type I IFN upon activation. But most important for our purposes, very recently, they have been implicated in the priming of CD8⁺ T cells [26]. Based on that, we hypothesized that CD8⁺ T cells were activated at the LNs and re-circulated rapidly to the spleen.

To evaluate this possibility, we administered an immunosuppressive drug, FTY720, to interfere with T-cell signalling via the sphingosine-1-phosphate receptor-1 (S1P1). This receptor is expressed on T cells that respond to S1P1 by emigrating out of the thymus, LN, and bone marrow [27–29]. Following T-cell activation, S1P1 is transiently downmodulated, resulting in prolonged residence of T cells within lymphoid tissues and improved priming efficacy. FTY720 interferes with this process, since upon application, it becomes rapidly phosphorylated to FTY720-P, thus behaving as a strong S1P1 agonist. This results in sustained inhibition of S1P1 signalling, effectively trapping naive and recently activated T cells within the secondary lymphoid. Although FTY720 allows T-cell priming, it efficiently blocks migration of activated T cells from the LNs to the peripheral tissues and thereby precludes peripheral T-cell responses [27–29].

Essentially, we observed that administration of FTY720 after challenge with *T. cruzi* in mice that normally survive acute infection (C57BL/6) or susceptible vaccinated A/Sn mice led to a significant increase in the susceptibility to infection, as indicated by elevated parasitemia and accelerated mortality. Together, these results corroborate the hypothesis that re-circulation of T lymphocytes mediated by S1P1 plays an important role during acquired or vaccine-induced protective immune responses to *T. cruzi* infection.

2. Methods

2.1. Ethics statement

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation (<http://www.cobea.org.br/>). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Institutional Animal Care and Use Committee at the Federal University of Sao Paulo (Id # CEP 0426/09).

2.2. Mice and parasites

Female 8-week-old mice (C57BL/6 and A/Sn) were purchased from CEDEME (Federal University of São Paulo). Transgenic mice expressing the diphtheria toxin receptor (DTR) under control of the CD11c promoter (CD11c-DTR) on a C57BL/6 background were derived as described and were maintained in our colony as heterozygotes [30]. Blood-derived trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi* were obtained from A/Sn mice infected 7–8 days earlier. Each C57BL/6 or A/Sn mouse was challenged sub-cutaneously (s.c.) at the base of the tail with a final dose containing 10^4 – 10^5 or 150 parasites, respectively, in a final volume of 0.1 mL. Parasite development was monitored by counting the number of blood-derived trypomastigotes in 5 μ L of fresh blood collected from the tail vein [10].

2.3. Administration of DT or FTY720

Wild type (WT) and CD11c-DTR mice were treated i.p. with 2 doses of 50 ng diphtheria toxin from *Corynebacterium diphtheriae*

(DT, Sigma), 48 h before and on the same day of challenge. In addition, infected WT mice were treated every other day, beginning on the same day of infection, with doses of 20 μ g FTY720 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) per mouse (1 mg/kg) in a final volume of 0.2 mL. The control mice were injected with the diluent only.

2.4. Peptides

Peptides were purchased from Genscript (Piscataway, NJ). Purity was as follows: VNHRFTLV, 97.2% and TsKb-20 (ANYKFTLV), 99.7%.

2.5. Recombinant plasmids and adenoviruses

Plasmid pIgSPCL9 and the human replication-defective adenovirus type 5 containing the *asp-2* gene were described previously [22,24,25,31]. Heterologous prime-boost immunization involved priming i.m. with 100 μ g of plasmid DNA followed by a dose of viral suspension containing 2×10^8 plaque-forming units (pfu) of adenovirus 21 days later in the same locations. Immunological assays or challenges were performed 14 days after viral inoculation (boost).

2.6. Phenotypic cell analyses by flow cytometry

The panel of conjugated antibodies used for FACS analyses were CD11c-FITC (clone HL3), CD19-PECy7 (clone 1D3), CD8 α -PerCP (clone 53-6.7), CD86-APC (clone GL1), CD80-APC (clone 16-10A1), CD40-APC (clone 3/23) all from BD; PDCA-1-PE (clone JF05-1C2.4.1) from Miltenyi Biotec. Single-cell suspensions from Inguinal lymph nodes or spleen were stained for surface markers on ice for 20 min, and then washed twice in buffer containing PBS, 0.5% BSA, and 2 mM EDTA fixed in 4% PBS-paraformaldehyde solution for 10 min. At least 300,000 events were acquired on a BD FACSCanto II flow cytometer and then analyzed with FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

2.7. Sorting of cells by flow cytometry

PDCA-1⁺ cells were isolated from LN collected from C57BL/6 mice infected 5 days earlier s.c. with 10^4 *T. cruzi* parasites. As controls, we used PDCA-1⁺ cells isolated from LN of naïve C57BL/6 mice ($n = 15$). Inguinal lymph nodes were removed, collagenase-treated, and the single cell suspension was stained with the following antibodies: CD3 Pacific Blue (500A2), IAb FITC (25-9-17), CD11c APCCy7 (HL3) all from BD, and PDCA-1 PE (JF05-1C2.4.1) from Miltenyi Biotec. CD3⁺ IAb⁺ CD11c⁺ PDCA-1⁺ cells were then sorted in a BD FACSaria III cell sorter.

CD8⁺ cells were obtained from C57BL/6 mice ($n = 2$) s.c. infected with 10^4 *T. cruzi* parasites. Spleens were removed 15 days after infection. Following red blood cell lysis, a single cell suspension was stained with CD8 PE (53-6.7) from BD and positive cells were subjected to sorting in a BD FACSaria III cell sorter. As determined by FACS analysis, the purity of the CD8⁺ was 98%.

2.8. Immunological T-cell assays

Ex vivo ELISPOT (IFN- γ) or *in vivo* cytotoxicity assays were performed exactly as described previously [13,25]. Briefly, the *in vivo* cytotoxicity assays, C57BL/6 splenocytes were divided into two populations and labeled with the fluorogenic dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl diester (CFSE Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) at a final concentration of 10 μ M (CFSE^{high}) or 1 μ M (CFSE^{low}). CFSE^{high} cells were pulsed for 40 min at 37 °C with 1 μ M of the H-2 K^b ASP-2 peptide (VNHRFTLV) or TsKb-20. CFSE^{low} cells remained unpulsed. Subsequently, CFSE^{high} cells were washed and mixed with equal numbers of CFSE^{low} cells before injecting intravenously (i.v.) 30×10^6 total cells per mouse. Recipient animals were mice that had been infected or not with *T. cruzi*. Spleen cells or

Fig. 1. Kinetics of the specific CD8⁺ T-cell-mediated immune responses in mice infected with *T. cruzi*

C57BL/6 mice were challenged s.c. with 10⁴ blood-borne trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi*. At the indicated days, IFN-γ-producing cells were estimated *ex vivo* by using the ELISPOT assay in the presence of peptides VNHRFTLV (Panel A) or TsKb-20 (Panel B). The *in vivo* cytotoxic activities were estimated against target cells coated with peptides VNHRFTLV (Panel C) or TsKb-20 (D). The results are presented as the mean of the values of 4 mice ± SD per group, except for the *in vivo* cytotoxic activity of LN cells. In that case, we pooled cells from 4 mice for analysis. Asterisks denote the frequency of SFCs in the spleen of infected mice were significantly higher than the LN cells ($P < 0.05$).

lymph node cells of recipient mice were collected 20 h after transfer, fixed with 3.7% paraformaldehyde and analyzed by FACS as described above. The percentage of specific lysis was determined using the formula:

$$1 - \frac{\%CFSE_{high} \text{ infected} / \%CFSE_{low} \text{ infected}}{\%CFSE_{high} \text{ naive} / \%CFSE_{low} \text{ naive}} \times 100\%$$

The surface mobilization of CD107a and the intracellular expression of cytokines (IFN-γ and TNF-α) were evaluated after *in vitro* culture of splenocytes in the presence or absence of an antigenic stimulus. Cells were washed 3 times in plain RPMI and resuspended in cell culture medium containing RPMI 1640 medium (pH 7.4), supplemented with 10 mM Hepes, 0.2% sodium bicarbonate, 59 mg/L penicillin, 133 mg/L streptomycin, and 10% Hyclone fetal bovine sera (Hyclone, Logan, Utah). The viability of cells was evaluated using 0.2% Trypan Blue exclusion dye to discriminate between live and dead cells. The cell concentration was adjusted to 5 × 10⁶ cells/mL in a cell culture medium containing anti-CD28 (2 μg/mL, BD Pharmingen), brefeldin A (10 μg/mL, BD Pharmingen), monensin (5 μg/mL, Sigma, St. Louis, MO), and FITC-labeled anti-CD107a (Clone 1D4B, 2 μg/mL, BD Pharmingen). In half of the cultures, VNHRFTLV peptide was added at a final concentration of 10 μM. Cells were cultivated in V-bottom 96-well plates (Corning)

in a final volume of 200 μL in duplicates, at 37 °C in a humid environment containing 5% CO₂. After no more than 12 h incubation, cells were harvested and stained for surface markers with Per-CP or PE-labeled anti-CD8 on ice for 20 min. To detect IFN-γ, or TNF-α by intracellular staining (ICS), cells were then washed twice in buffer containing PBS, 0.5% BSA, and 2 mM EDTA and then fixed and permeabilized for 20 min on ice with 100 μL Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen). After washing twice with 250 μL permwash buffer (BD Pharmingen), the cells were stained to detect intracellular markers using APC or PE-labeled anti-IFN-γ (clone XMG1.2) and PE-labeled anti-TNF-α (clone MP6-XT22). Finally, cells were washed twice and fixed in 1% PBS-paraformaldehyde. At least 300,000 events were acquired on a BD FACSCanto II flow cytometer and then analyzed with FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

2.9. Statistical analysis

Values are expressed as means ± SD. These values were compared using One-way ANOVA followed by Tukey's HSD tests (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>). The Logrank test was used to compare mouse survival rates after challenge with *T. cruzi* (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/russell/logrank/>). The differences were considered significant when the *P* value was <0.05.

Fig. 2. CD11c⁺ cells are required for the CD8 T-cell immune responses of mice infected with *T. cruzi*.

WT or CD11c-DTR mice were infected s.c. with 10^4 *T. cruzi* blood parasites. 48 h before and on the day of challenge, WT and CD11c-DTR mice were treated i.p. with 50 ng of DT. One week later, IFN- γ -producing spleen cells were estimated *ex vivo* by ELISPOT in the presence of peptides VNHRFTLV or TsKb-20. Results are expressed as means $\pm$ SD of 4 mice per group and are representative of experiments performed at twice with similar results. Asterisks denote that the number of spots forming cells (SFC) from infected WT mice were significantly higher when compared to naïve or infected CD11c-DTR mice ($P < 0.01$, one-way ANOVA).

3. Results

During experimental infection of H-2^b inbred mouse strains with parasites of the Y strain of *T. cruzi*, epitopes VNHRFTLV and TsKb-20 (ANYKFTLV) are recognized by H-2K^b-restricted CD8⁺ cytotoxic T cells. In previous studies we have described that the first is the immunodominant epitope leading to a higher immune response and the second a sub-dominant epitope [10,12,13]. After s.c. challenge with infective trypomastigote forms of the parasite, detailed analyses of the kinetics of peptide-specific immune responses were determined *ex vivo* by ELISPOT and *in vivo* by cytotoxicity assays. At the indicated time points, spleen or LN cells were incubated *in vitro* with medium (control) or peptides (VNHRFTLV or TsKb-20). The number of peptide-specific IFN- γ secreting cells was determined by ELISPOT assay (13). Alternatively, at the indicated time points, target cells were labeled with CFSE and coated with peptides VNHRFTLV or TsKb-20 as described in Section 2. These cells were transferred to infected or naïve mice. Twenty hours later, spleen or LN cells were collected and the *in vivo* cytotoxicity estimated.

The results showed that the effector peptide-specific immune cells developed at a similar rate in both the draining LN and the spleen (Fig. 1A–D). The main transition occurred from days 4 to 12 in both organs, for both peptides.

To determine the role of CD11c⁺ cells during the expansion/maturation phase of the adaptive immune response, we used transgenic mice expressing the DTR under control of the CD11c promoter. When infected mice were subjected to diphtheria toxin (DT), the peptide-specific immune response in their spleen 12 days after infection was severely compromised, as measured using the ELISPOT assay (Fig. 2). These results strongly suggest that CD11c⁺ cells are important for priming of peptide-specific cells following *T. cruzi* infection.

To further evaluate the subpopulation of CD11c⁺ cells that could potentially be involved in the priming of the peptide-specific T

cells, we stained LN and spleen cells with antibodies to CD11c and PDCA-1 and the activation markers CD40, CD40L, CD80, and CD86 at different times after challenge. As depicted in Fig. 3A, a clear upregulated pattern of expression of CD40, CD80 and CD86, but not CD40L, can be seen on the surface of CD11c⁺PDCA-1⁺ cells obtained from the LN. In contrast, we detect only the upregulation of CD40 on CD11c⁺PDCA-1⁺ splenocytes at day 10 after infection (Fig. 3B).

In addition, we also stained LN and spleen cells for CD11c expression in conjunction with CD8 α in addition to the activation markers CD40, CD40L, and CD86 at different times after infection. A limited pattern of upregulation of expression of CD86 can be seen on the surface of CD11c⁺CD8 α ⁺ cells collected from the LN or spleen on days 3–7 following infection (Fig. 4A and B).

Similar analyses were also conducted for CD11c⁺CD8 α ⁺ cells collected from the spleen and LN, but we did not detect an upregulation of expression of the activation markers CD40, CD40L, CD80, or CD86 at any time point from 3 to 30 days in the spleen or LN (data not shown).

To determine whether indeed CD11c⁺PDCA-1⁺ cells could present antigen for specific CD8 lymphocytes, we purified CD11c⁺PDCA-1⁺. After sorting the cells from naïve or 5-day infected LN cells, we obtained cells that were 95.3 and 83% pure as determined by the PDCA-1 marker (Fig. 5A and B, respectively). For some unknown reason, during the purification process, some cells become negative for the marker for CD11c marker but still retained the PDCA-1 marker. The PDCA-1⁺ cells obtained from mice that were infected expressed significantly higher amounts of MHC-II-IA^b and CD80 (Fig. 5C and D, respectively). PDCA-1⁺ cells were used to stimulate purified CD8⁺ splenic cells obtained from *T. cruzi* infected mice. As shown in Fig. 5E, IFN- γ producing cells were detected only when CD8⁺ were incubated with PDCA-1⁺ cells obtained from infected mice.

The fact that CD11c⁺ cells from the spleen exhibit a limited activation phenotype suggested that perhaps most of the specific T cells found in the spleen might not be primed there. If this assumption is correct, the re-circulation of T cells could account for the CD8⁺ T-cell mediated functions detected in this organ. To test whether lymphocyte re-circulation was responsible for the immune response observed in the spleen, we treated infected mice with FTY720. This immunosuppressive drug inhibits S1P1 signalling, thus efficiently blocking re-circulation of naïve and activated T cells from the LNs into peripheral tissues, thereby preventing development peripheral T-cell responses [27–29].

Mice were infected with *T. cruzi* parasites and FTY720 or diluent were administered on the same day of challenge and every 2 days thereafter as described in Section 2. Two weeks later, the frequency of IFN- γ -producing cells were estimated *ex vivo* by using ELISPOT assay in the presence of peptides VNHRFTLV or TsKb-20. Alternatively, splenocytes were cultured in the presence or absence of peptides VNHRFTLV or TsKb-20 and the expression of surface CD107a, IFN- γ and TNF- α by ICS.

In infected mice, administration of FTY720 resulted in 2.52- or 3.05-fold increases in the frequency of IFN- γ -secreting cells from the LNs specific for VNHRFTLV or TsKb-20, respectively, as detected using the ELISPOT assay (Fig. 6). In contrast, this increase in the frequency IFN- γ -secreting peptide-specific cells in the LN was accompanied by a significant decrease of immune responses of splenic lymphocytes. Immune responses were initially determined by the frequency of IFN- γ -producing cells as measured by the ELISPOT assay (Fig. 7A). The frequency of IFN- γ -producing cells found in the spleen after FTY720 administration was reduced by 74.55% or 100% upon stimulation with peptides VNHRFTLV or TsKb-20, respectively (Fig. 7A).

Subsequently, we estimated the immune response by the detection of peptide-specific CD8⁺ cells that mobilized CD107a to their surface and expressed IFN- γ and TNF- α upon exposure to the

Fig. 3. Expression of activation markers on CD11c⁺ and PDCA-1⁺ DCs from the LNs or spleens from infected mice. WT C57BL/6 mice were infected s.c. with 10^4 *T. cruzi* blood parasites. At the indicated days after infection, LN (panel A) or splenic (Panel B) cells were collected and co-stained for the expression of CD11c, PDCA-1, and the indicated marker. The expression of the different activation markers were compared between cells collected from infected (blue lines) and naïve (red lines) mice.

peptides *in vitro*. The frequency of CD8⁺ cells that were CD107a⁺, IFN- γ ⁺ or TNF- α ⁺ was reduced by 74.61% or 84.15% after stimulation with VNHRFTLV or TsKb-20, respectively (Fig. 7B). The reduction substantially affected all the different subpopulations of CD8⁺ cells (Fig. 7C). The proportions of each population did not change significantly in the cells collected from infected mice that were administered or not with FTY720 (Fig. 7D).

To evaluate the influence of restricting T-cell re-circulation on the outcome of infection, we also monitored the parasitemia levels and survival of mice that were and were not subjected to FTY720 over the course of infection. We found that drug exposure resulted in increased parasitemia and accelerated mortality of infected mice (Fig. 8A and B, respectively). Therefore, we concluded that lymphocyte re-circulation is indeed important for the acquired protective immune response in this mouse model of acute infection.

We then sought to test the same hypothesis by applying a distinctly different approach. In this case, we used highly susceptible A/Sn mice that were genetically vaccinated by priming with

plasmid pIgSPCL9 followed by a booster immunization with AdASP-2. We previously showed that this heterologous prime-boost regimen reproducibly conferred protective immunity against a lethal challenge with *T. cruzi* [25]. Immunity was mediated by CD8⁺ T cells as depletion of these T cells renders these mice completely susceptible to infection. These CD8⁺ T cells are specific for the ASP-2 H-K^k restricted epitopes TEWETGQI, PETLGHEI or YEIVAGYI [31]. Prior to challenge, these mice exhibit a strong immune response to all three epitopes [31].

Following infection (s.c.), some of these vaccinated mice were subjected to FTY720. We then monitored the parasitemia levels and survival. We observed that drug exposure caused an increase in the parasitemia levels and accelerated the mortality of vaccinated mice (Fig. 9A and B, respectively). This observation indicates that vaccinated mice still require lymphocyte re-circulation to mount an effective immune response on subsequent challenge. This finding further corroborated our initial conclusions regarding the importance of re-circulation activity, even for the vaccine-supported

Fig. 4. Expression of activation markers on CD11c⁺ and CD8- α ⁺ DCs from the LNs or spleens of infected mice. WT C57BL/6 mice were infected s.c. with 10^4 *T. cruzi* blood parasites. At the indicated days after infection, LN (panel A) or splenic (Panel B) cells were collected and co-stained for the expression of CD11c, CD8- α , and the indicated marker. The expression of the different activation markers were compared on cells collected from infected (blue lines) and naïve (red lines) mice.

protective immune response, as seen in this second mouse model of acute infection.

4. Discussion

The CD8⁺ T-cell immune response elicited by *T. cruzi* infection in most inbred mouse strains can control multiplication of this intracellular pathogen and preclude acute-phase pathologies such as death [1,10–17]. The time at which acquired immunity develops is highly dependent on the parasite load [12,32]. In our model, with the Y strain of *T. cruzi*, we observed that the CD8⁺ T-cell immune response is only triggered at the time of the peak parasitemia [10,12]. Because the number of circulating parasites at this time is high, antigen presentation could occur in the draining LN or the spleen. However, the results of our experiments that involved the use of the immunosuppressive drug FTY720, in combination with the identification of activated CD11c⁺ cells, found mostly in the LN, clearly demonstrated that the LNs draining the parasite entrance are where the specific CD8⁺ T cells are primed. Then, they exit the LN and reach the spleen. Our results are similar to those of experimental vaccination studies with radiation-attenuated malaria parasites

[33]. In this case, the CD8⁺ T-cell response originates in the LN draining site at the site of parasite entrance in the skin, and then these cells migrate to other peripheral organs. Similar to our results, exposure to FTY720 led to accumulation of specific T cells in the draining LN and a ~85% reduction of the specific CD8⁺ T cells in the spleen [33]. Together, these results provide compelling evidence that the priming of CD8⁺ T cells can take place in the local lymphoid tissue during protozoan infection/vaccination and that a rapid re-circulation to the spleen is likely to occur. As in our case, the authors conclude that this rapid re-circulation during infection was critical for protective immunity mediated by malaria-specific CD8⁺ T cells [33].

Both studies used parasites that infect mice (*T. cruzi* or *Plasmodium yoelii*). Nevertheless, it is important to highlight that only *T. cruzi* infects humans. Also, the studies of malaria used radiation-attenuated parasites as vaccine because they do not cause infection. Therefore, it is unknown whether the same occurs during acquired immunity to experimental infection as in our case. These observations with *T. cruzi* and malaria parasites stand in contrast to other pathogens. Several studies describe re-circulation mediated by S1P1 is not critical for the protective immune responses to certain viral, bacterial and protozoan

Fig. 5. PDCA-1⁺ cells purified from infected mice present antigen to specific CD8⁺ cells.

PDCA-1⁺ cells were sorted from LN cells from mice infected 5 days earlier s.c. with *T. cruzi* parasites as described in Section 2. As controls, we used PDCA-1⁺ cells isolated from LN of naïve mice.

(A and B) Sorted cells from naïve or infected mice were stained with antibodies to CD11c and PDCA-1. Numbers represent the frequency of cells in each gate.

(C and D) PDCA-1⁺ cells were stained with antibodies to IA^b or CD80.

(E) Purified PDCA-1⁺ cells from naïve or infected mice were used in quadruplicate cultures to stimulate specific CD8⁺ cells. Asterisk denotes the that number of SFCs of CD8⁺ cells stimulated with PDCA-1⁺ cells purified from infected mice were significantly higher the one stimulated with PDCA-1⁺ cells from naïve animals ($P < 0.01$).

infections [34–36]. The precise reasons for these divergent responses are not clear but probably reflect differences in the priming sites as well as, the immunopathologies caused by the different infectious agents.

In addition to the role of S1P1-dependent circulation during protective immunity acquired during *T. cruzi* infection, we also

Fig. 6. Administration of FTY720 increases the number of peptide-specific cells in the LN of mice infected with *T. cruzi*.

C57BL/6 mice were infected s.c. with 10^5 *T. cruzi* blood-borne parasites. Mice were administered on the same day of challenge and every 2 days thereafter 20 μ g of FTY720 or diluent i.p. Two weeks later, the frequency of IFN- γ -producing cells were estimated *ex vivo* by using ELISPOT assay in the presence of peptides VNHRFTLV or TsKb-20. The results are presented as means $\pm$ SD of 4 mice per group and are representative of experiments performed at least twice with similar results. Asterisks denote the number of SFCs from infected mice given FTY720 were significantly higher than infected mice treated with the diluent only ($P < 0.01$).

observed that previously vaccinated mice became more susceptible to infection when subjected to FTY720 exposure. For vaccination, we used a heterologous prime-boost regimen consisting of an initial immunization with plasmid DNA and a booster immunization with a replication-defective recombinant human adenovirus type 5 (HuAd5), both encoding the *asp-2* gene. Immunity elicited by this vaccination protocol is long lived and mediated by Th1 CD4⁺ as well as CD8⁺ Tc1 cells [25,31,37].

The heterologous prime-boosting regimen of vaccination using plasmid DNA and replication-defective recombinant HuAd5 provides protective immunity in some other important pre-clinical experimental models such as SIV, malaria, Ebola, and Marburg viruses [38–45]. Based on these pre-clinical experimental models, human trials have been initiated [46–49]. Our observation that S1P1 is important for protective activity of T cells in previously vaccinated animals is completely new and should be studied further in these experimental models.

Although we measured only CD8 T-cell mediated immune responses only, it is highly possible that the same pattern would happen to specific CD4⁺ T cells. This T-cell sub-population is very important for protective immunity during to *T. cruzi* infection [25]. The absence of re-circulation of both types of lymphocytes probably account for the sub-optimal protective immunity observed after administration of FTY720. Possibly, both cells promote the processes required for parasite elimination on the tissue.

The fact that FTY720 interfere with S1P1 activation makes it theoretically capable of act on other cells types that express this receptor. However, the effect on other cell types is poorly known at present. It has been previously described that FTY720 administration may increase or reduce the activity of regulatory T cells [50,51]. A recent study indicated that this drug act on astrocytes S1P1 to reduce experimental allergic encephalomyelitis clinical scores [52]. Whether these or other cell types play a role in our system is currently unknown.

Fig. 7. Administration of FTY720 reduces the number of peptide-specific cells in the spleen of mice infected with *T. cruzi*

C57BL/6 mice were infected s.c. with 10^4 *T. cruzi* blood-borne parasites. Mice were administered on the same day of challenge and every 2 days thereafter 20 μ g of FTY720 or diluent i.p. Two weeks later, the frequency of IFN- γ -producing cells were estimated *ex vivo* by using ELISPOT assay in the presence of peptides VNHRFTLV or TsKb-20 (Panels A and B).

Alternatively, splenocytes from these mice were cultured in the presence of anti-CD107a and anti-CD28, with or without the peptides VNHRFTLV or TsKb-20. After 12 h, the cells were stained to detect CD8, IFN- γ , and TNF- α (Panels C and D). The results are presented as means $\pm$ SD of 4 mice per group and are representative of experiments performed at least twice with similar results. Asterisks denote that the number of SFCs from infected mice receiving FTY720 were significantly lower than the infected mice treated with the diluent alone ($P < 0.01$).

A current limitation of this experimental model for *T. cruzi* infection is the lack of information on where CD8⁺ T cells encounter and eliminate parasite-infected cells; this is an aspect that may be critical to fully understand immune responses. Considering

Fig. 8. Administration of FTY720 increases susceptibility to *T. cruzi* infection. C57BL/6 mice were infected s.c. with 10^5 *T. cruzi* blood parasites. Mice were treated on the same day of challenge and every 2 days thereafter with 20 μ g of FTY720 i.p. or diluent only. (A) Parasitemia levels for each mouse group is presented as the mean $\pm$ SD ($n = 6$). Asterisks denote that mice from groups injected with diluent only exhibited significantly lower parasitemia ($P < 0.01$) than animals receiving FTY720. (B) Kaplan–Meier survival curves for the mouse groups treated as described above ($n = 6$). Mice from groups injected with diluent only survived longer than animals receiving FTY720 ($P < 0.01$, Logrank test). No animals died after the 30th day until the termination of the experiment. The results are representative of 2 independent experiments.

that *T. cruzi* can infect many cell types and cause systemic infection, it is plausible that many tissues may serve as sites of infection and for parasite/T-cell encounters. Supporting this hypothesis, we observed that vaccinated animals were resistant to *T. cruzi* challenge by different routes of infection (i.p. and s.c. [25,37]).

The finding that the administration of FTY720 significantly reduces protective immunity against *T. cruzi* infection and impairs the protective immunity afforded by vaccination may also have clinical implications for the use of this immunosuppressive drug. Certainly, its use in regions where Chagas disease is endemic should be done with caution considering the potential increase in susceptibility of treated individuals. Finally, treatment of organ-transplanted patients with FTY720 may interfere with immunity elicited by previous vaccination.

In conclusion, our study provides useful information on the importance of S1P1 for resistance against experimental infection with human protozoan parasites.

Fig. 9. Administration of FTY720 increases susceptibility to *T. cruzi* infection in previously vaccinated A/Sn mice

A/Sn mice were primed i.m. with 100 µg of plasmids, pcDNA3 or plgSPCL.9. Three weeks later, these mice were boosted i.m. with 2×10^8 pfu Adβ-gal or AdASP-2. All mice were challenged s.c. with 150 bloodstream trypomastigotes. Half of the vaccinated mice received 20 µg of FTY720 every other day, and the other half received diluent only. (A) Parasitemia levels for each mouse group is presented as the mean $\pm$ SD ($n=5$). Asterisks denote that mice from groups immunized with plgSPCL.9/AdASP-2 and who received diluent only had significantly lower parasitemia than other mouse groups ($P<0.01$). (B) Kaplan–Meier survival curves for the mouse groups immunized and challenged as described above ($n=10$). Mice immunized with plgSPCL.9/AdASP-2 and receiving diluent only survived significantly longer than those immunized with plgSPCL.9/AdASP-2 and administered FTY720 ($P<0.01$). The results shown are combined from 2 experiments. No animals died after the 50th day of challenge.

Acknowledgments

Funding: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2009/06820-4), The National Institute for Vaccine Technology (INCTV-CNPq), The Millennium Institute for Vaccine Development and Technology (CNPq – 420067/2005-1) and The Millennium Institute for Gene Therapy (Brazil). MMR, OBR and RL are recipients of fellowships from CNPq. MRD, JE and JRV are recipients of fellowships from FAPESP. **Conflict of interest:** The authors declare no competing interest. **Authors' contributions:** MRD, JE, RL, and JRV performed the experimental work; AVM and OBR provided essential reagents; MRD, JE, RL, MMR and JRV were responsible for conception and design, as well as writing the first and final versions of the manuscript. All authors have read and approve of the final version of the manuscript.

References

- [1] Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol* 2007;9:430–4.
- [2] Miyahira Y. *Trypanosoma cruzi* infection from the view of CD8⁺ T cell immunity – an infection model for developing T cell vaccine. *Parasitol Int* 2008;57:38–48.
- [3] Padilla AM, Bustamante JM, Tarleton RL. CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Curr Opin Immunol* 2009;21:385–90.
- [4] Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med* 2010;12:e29.
- [5] Arnholdt AC, Piuvezam MR, Russo DM, Lima AP, Pedrosa RC, Reed SG, et al. Analysis and partial epitope mapping of human T cell responses to *Trypanosoma cruzi* cysteinyl proteinase. *J Immunol* 1993;151:3171–9.
- [6] Michailowsky V, Luhrs K, Rocha MO, Fouts D, Gazzinelli RT, Manning JE. Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. *Infect Immun* 2003;71:3165–71.
- [7] Millar AE, Wleklinski-Lee M, Kahn SJ. The surface protein superfamily of *Trypanosoma cruzi* stimulates a polarized Th1 response that becomes anergic. *J Immunol* 1999;162:6092–9.
- [8] Ribeiro M, Pereira-Chioccola VL, Rênia L, Schenkman S, Rodrigues MM. Chagasic patients develop type I immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunol* 2000;22:49–53.
- [9] Cuellar A, Rojas F, Bolaños N, et al. Natural CD4(+) T-cell responses against *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein in chronic chagasic patients. *Immunol Cell Biol* 2009;87:149–53.
- [10] Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Gazzinelli RT, Persechini PM, et al. Distinct kinetics of effector CD8⁺ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. *Infect Immun* 2006;74:2477–81.
- [11] Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, et al. CD8⁺ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathog* 2006;2(8):e77.
- [12] Tzelepis F, Persechini PM, Rodrigues MM. Modulation of CD4(+) T cell-dependent specific cytotoxic CD8(+) T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. *PLoS One* 2007;2(4):e393.
- [13] Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, et al. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8⁺ T cells leading to immunodominance. *J Immunol* 2008;180:1737–48.
- [14] Bixby LM, Tarleton RL. Stable CD8⁺ T cell memory during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 2008;181:2644–50.
- [15] Rosenberg CS, Martin DL, Tarleton RL. CD8⁺ T cells specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of *Trypanosoma cruzi* infection but are not required for resistance. *J Immunol* 2010;185:560–8.
- [16] Freire-de-Lima L, Alisson-Silva F, Carvalho ST, et al. *Trypanosoma cruzi* subverts host cell sialylation and may compromise antigen-specific CD8⁺ T cell responses. *J Biol Chem* 2010;285:13388–96.
- [17] Oliveira AC, de Alencar BC, Tzelepis F, et al. Impaired innate immunity in Tlr4(–/–) mice but preserved CD8⁺ T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4–, Tlr2–, Tlr9– or Myd88-deficient mice. *PLoS Pathog* 2010;6(4):e1000870.
- [18] Rodrigues MM, de Alencar BC, Claser C, Tzelepis F. Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res* 2009;42:220–3.
- [19] Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CR, et al. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther* 2004;15:878–86.
- [20] Miyahira Y, Takashima Y, Kobayashi S, et al. Immune responses against a single CD8⁺-T-cell epitope induced by virus vector vaccination can successfully control *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 2005;73:7356–65.
- [21] Hoft DF, Eickhoff CS, Giddings OK, Vasconcelos JR, Rodrigues MM. Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* immunity involving CD8⁺ CTL and B cell-mediated cross-priming. *J Immunol* 2007;179:6889–900.
- [22] Machado AV, Cardoso JE, Claser C, et al. Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther* 2006;17:898–908.
- [23] Araújo AF, de Alencar BC, Vasconcelos JR, et al. CD8⁺-T-cell-dependent control of *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein 2. *Infect Immun* 2005;73:6017–25.
- [24] Cazorla SI, Frank FM, Becker PD, et al. Redirection of the immune response to the functional catalytic domain of the cysteine proteinase cruzipain improves protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis* 2010;202:136–44.
- [25] de Alencar BC, Persechini PM, Haolla FA, et al. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4⁺ and CD8⁺ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect Immun* 2009;77:4383–95.
- [26] Takagi H, Fukaya T, Eizumi K, et al. Plasmacytoid dendritic cells are crucial for the initiation of inflammation and T cell immunity in vivo. *Immunity* 2011;35(6):958–71.

- [27] Rosen H, Sanna G, Alfonso C. Egress: a receptor-regulated step in lymphocyte trafficking. *Immunol Rev* 2003;195:160–77.
- [28] Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2005;23:127–59.
- [29] Brinkmann V, Cyster JG, Hla T. FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. *Am J Transplant* 2004;4:1019–25.
- [30] Jung S, Unutmaz D, Wong P, et al. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 2002;17:211–20.
- [31] Dominguez MR, Silveira EL, de Vasconcelos JR, de Alencar BC, Machado AV, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Rodrigues MM. Subdominant/ cryptic CD8T cell epitopes contribute to resistance against experimental infection with a human protozoan parasite. *PLoS One* 2011;6:e22011.
- [32] Padilla AM, Simpson LJ, Tarleton RL. Insufficient TLR activation contributes to the slow development of CD8⁺ T cell responses in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 2009;183:1245–52.
- [33] Chakravarty S, Cockburn IA, Kuk S, Overstreet MG, Sacchi JB, Zavala F. CD8⁺ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining LN. *Nat Med* 2007;13:1035–41.
- [34] Pinschewer DD, Ochsenbein AF, Odermatt B, Brinkmann V, Hengartner H, et al. FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory. *J Immunol* 2000;164:5761–70.
- [35] Kursar M, Jenner N, Pfeffer K, Brinkmann V, Kaufmann SH, et al. Requirement of secondary lymphoid tissues for the induction of primary and secondary T cell responses against *Listeria monocytogenes*. *Eur J Immunol* 2008;38:127–38.
- [36] Lopes CT, de Paula DMB, Cury PM, Valero-Lapchik VB, Bueno V. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in mice treated with FTY720. *Transplant Proc* 2010;42:578–81.
- [37] Rigato PO, de Alencar BC, de Vasconcelos JR, et al. Heterologous plasmid DNA prime-recombinant human adenovirus 5 boost vaccination generates a stable pool of protective long-lived CD8(+) T effector memory cells specific for a human parasite, *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 2011;79:2120–30.
- [38] Acierno PM, Schmitz JE, Gorgone DA, et al. Preservation of functional virus-specific memory CD8⁺ T lymphocytes in vaccinated, simian human immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Immunol* 2006;176:5338–45.
- [39] Casimiro DR, Chen L, Fu TM, et al. Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol* 2003;77:6305–13.
- [40] Casimiro DR, Wang F, Schleif WA, et al. Attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection by prophylactic immunization with DNA and recombinant adenoviral vaccine vectors expressing Gag. *J Virol* 2005;79:15547–55.
- [41] Geisbert TW, Bailey M, Geisbert JB, et al. Vector choice determines immunogenicity and potency of genetic vaccines against Angola Marburg virus in nonhuman primates. *J Virol* 2010;84:10386–94.
- [42] Gilbert SC, Schneider J, Hannan CM, et al. Enhanced CD8T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunization regimes. *Vaccine* 2002;20:1039–45.
- [43] Hensley LE, Mulangu S, Asiedu C, et al. Demonstration of cross-protective vaccine immunity against an emerging pathogenic Ebolavirus Species. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000904.
- [44] Letvin NL, Mascola JR, Sun Y, et al. Preserved CD4⁺ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. *Science* 2006;312:1530–3.
- [45] Wilson NA, Reed J, Napoe GS, et al. Vaccine-induced cellular immune responses reduce plasma viral concentrations after repeated low-dose challenge with pathogenic simian immunodeficiency virus SIVmac239. *J Virol* 2006;80:5875–85.
- [46] Freel SA, Lamoreaux L, Chattopadhyay PK, et al. Phenotypic and functional profile of HIV-inhibitory CD8T cells elicited by natural infection and heterologous prime/boost vaccination. *J Virol* 2010;84:4998–5006.
- [47] Jaoko W, Karita E, Kayitenkore K, et al. Safety and immunogenicity study of Multiclade HIV-1 adenoviral vector vaccine alone or as boost following a multiclade HIV-1 DNA vaccine in Africa. *PLoS One* 2010;5:e12873.
- [48] Koup RA, Roederer M, Lamoreaux L, Fischer J, Novik L, et al. Priming immunization with DNA augments immunogenicity of recombinant adenoviral vectors for both HIV-1 specific antibody and T-cell responses. *PLoS One* 2010;5(2):e9015.
- [49] Schooley RT, Spritzler J, Wang H, et al. AIDS clinical trials group 5197: a placebo-controlled trial of immunization of HIV-1-infected persons with a replication-deficient adenovirus type 5 vaccine expressing the HIV-1 core protein. *J Infect Dis* 2010;202:705–16.
- [50] Wolf AM, Eller K, Zeiser R, Dürr C, Gerlach UV, Sixt M, et al. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 potentially inhibits regulatory T cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 2009;183:3751–60.
- [51] Sehrawat S, Rouse BT. Anti-inflammatory effects of FTY720 against viral-induced immunopathology: role of drug-induced conversion of T cells to become Foxp3⁺ regulators. *J Immunol* 2008;180:7636–47.
- [52] Choi JW, Gardell SE, Herr DR, Rivera R, Lee CW, Noguchi K, et al. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:751–6.

APÊNDICE C

Relevance of long-lived CD8⁺ T effector memory cells for protective immunity elicited by heterologous prime-boost vaccination

José R. Vasconcelos^{1,2}, Mariana R. Dominguez^{1,2}, Adriano F. Araújo^{1,2}, Jonatan Ersching^{1,2}, Cibele A. Tararam^{1,2}, Oscar Bruna-Romero³ and Mauricio M. Rodrigues^{1,2}*

¹ Centro de Terapia Celular e Molecular, Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, São Paulo, Brazil

² Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, São Paulo, Brazil

³ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Edited by:

Gabrielle Belz, Walter and Eliza Hall
Institute of Medical Research,
Australia

Reviewed by:

Allan Zajac, University of Alabama at
Birmingham, USA
Vladimir Badovinac, University of
Iowa, USA

*Correspondence:

Mauricio M. Rodrigues, Centro de
Terapia Celular e Molecular,
Universidade Federal de São Paulo -
Escola Paulista de Medicina,
Rua Mirassol 207, São Paulo
04044-010, São Paulo, Brazil.
e-mail: mrodrigues@unifesp.br

Owing to the importance of major histocompatibility complex class Ia-restricted CD8⁺ T cells for host survival following viral, bacterial, fungal, or parasitic infection, it has become largely accepted that these cells should be considered in the design of a new generation of vaccines. For the past 20 years, solid evidence has been provided that the heterologous prime-boost regimen achieves the best results in terms of induction of long-lived protective CD8⁺ T cells against a variety of experimental infections. Although this regimen has often been used experimentally, as is the case for many vaccines, the mechanism behind the efficacy of this vaccination regimen is still largely unknown. The main purpose of this review is to examine the characteristics of the protective CD8⁺ T cells generated by this vaccination regimen. Part of its efficacy certainly relies on the generation and maintenance of large numbers of specific lymphocytes. Other specific characteristics may also be important, and studies on this direction have only recently been initiated. So far, the characterization of these protective, long-lived T cell populations suggests that there is a high frequency of polyfunctional T cells; these cells cover a large breadth and display a T effector memory (TEM) phenotype. These TEM cells are capable of proliferating after an infectious challenge and are highly refractory to apoptosis due to a control of the expression of pro-apoptotic receptors such as CD95. Also, they do not undergo significant long-term immunological erosion. Understanding the mechanisms that control the generation and maintenance of the protective activity of these long-lived TEM cells will certainly provide important insights into the physiology of CD8⁺ T cells and pave the way for the design of new or improved vaccines.

Keywords: memory, vaccines, CD8, adenovirus

GENETIC VACCINATION USING THE HETEROLOGOUS PRIME-BOOST REGIMEN

Genetic vaccination using naked DNA or recombinant viruses is being pursued as an alternative to traditional vaccines. This strategy could be particularly important in the case of intracellular pathogens and neoplastic cells, where the effectiveness relies heavily on the capacity of the vaccine to elicit specific immune responses mediated by cytotoxic CD8⁺ T cells (reviewed in Rice et al., 2008; Lasaro and Ertl, 2009; Bassett et al., 2011; Gómez et al., 2011; Mudd and Watkins, 2011; Saade and Petrovsky, 2012).

Whereas the use of single-vector delivery for priming and boosting is usually the initial option, one of the most prolific areas of genetic vaccine development is the strategy known as the heterologous prime-boost regimen. This strategy uses two different vectors, each carrying a gene that encodes the same antigenic protein for priming and boosting immunizations. The utility and importance of this strategy was first proposed in the early 1990s using a combination of recombinant viruses (influenza and vaccinia) to induce protective immunity against

malaria (Li et al., 1993; Rodrigues et al., 1994). Subsequently, this approach was extended and simplified by incorporating naked DNA for priming followed by a booster injection of a recombinant poxviral vector (i.e., modified vaccinia Ankara, MVA); this was also used to generate sterile protective immunity against rodent malaria (Schneider et al., 1998; Sedegah et al., 1998). Collectively, these studies demonstrated that the heterologous prime-boost regimen generated significantly higher immune responses and proved more effective than the use of any of these genetic vectors individually. The initial use of rodent malaria parasites as a model system may have delayed the development of the field, because malaria is not a conventional model system for developing antiviral or antibacterial vaccines. Nevertheless, this fortuitous fact established the important concept that the difficulty in generating immunity to malaria, and perhaps to other intracellular parasites, in many ways recapitulates the struggles encountered to elicit protective immunity against viruses and bacteria that cause chronic infections such as HIV and tuberculosis (TB).

In subsequent years, the heterologous prime-boost vaccination regimen was adopted worldwide as a powerful means to elicit strong type 1 effector CD8⁺ T cell-mediated immune responses (Tc1) against viral, parasitic, and neoplastic antigens in rodents and non-human primates (NHP; Irvine et al., 1997; Amara et al., 2001; McShane et al., 2001; Zavala et al., 2001; Moore and Hill, 2004; Ellenberger et al., 2006; Gilbert et al., 2006; Aidoo et al., 2007; Nigam et al., 2007; Martinon et al., 2008; Sadagopal et al., 2008). Based on pre-clinical studies, a number of human clinical trials have also been initiated. However, to our knowledge, heterologous prime-boost regimens using plasmid DNA and recombinant poxviruses have not yet provided meaningful protective immunity in humans (McConkey et al., 2003; Moorthy et al., 2004; Keating et al., 2005; Vuola et al., 2005; Cebere et al., 2006; Dunachie et al., 2006; Goonetilleke et al., 2006). The precise reason for such failures is not yet clear. It may be due to the target antigens chosen or to the possibility that the combination of vectors may elicit a type of effector CD8⁺ T cells in humans that are not functionally and/or phenotypically related to mice, as discussed below.

A number of possible vector combinations that significantly improved cell-mediated immunity, particularly the generation of specific CD8⁺ T cells, have been described in parallel. Among them, heterologous prime-boost vaccination using naked plasmid DNA for priming followed by a booster injection of recombinant replication-deficient human adenovirus 5 (AdHu5) has recently received significant attention. This strategy has proved successful in some relevant experimental models such as simian immunodeficiency virus (SIV), malaria, Marburg, and Ebola virus infection, and Chagas disease (American trypanosomiasis), providing a considerable degree of protective immunity (Gilbert et al., 2002; Casimiro et al., 2003, 2005; Santra et al., 2005; Acierno et al., 2006; Letvin et al., 2006; Mattapallil et al., 2006; Sun et al., 2006; Wilson et al., 2006; de Alencar et al., 2009; Geisbert et al., 2010; Hensley et al., 2010; Martins et al., 2010; Dominguez et al., 2011; Rigato et al., 2011). These relative successes obtained in pre-clinical experimental models fueled human phase I trials (Freel et al., 2010; Jaoko et al., 2010; Koup et al., 2010; Schooley et al., 2010; Churchyard et al., 2011; De Rosa et al., 2011).

Very recently, improved vector combinations have yielded results (measured in terms of protective immunity) that are slightly better than the results obtained by using plasmid DNA followed by replication-deficient AdHu5 viruses. These new strategies include (i) prime with plasmid DNA in the presence of cytokine genes such as IL-12 or GM-CSF (Lai et al., 2011; Winstone et al., 2011), (ii) genes encoding multimeric proteins (Lakhashe et al., 2011), (iii) boost of adenovirus-immunized animals with an optimized plasmid DNA (Hutnick et al., 2012), (iv) prime with rhesus cytomegalovirus (Hansen et al., 2011), and (v) prime with a different heterologous strain of adenovirus (Barouch et al., 2012).

The precise reason for the superior performance of the heterologous prime-boost vaccination compared to the sequential use of the same vector is still a matter of controversy. Some evidence indicates the possibility that the intense immunity to epitopes present on the priming vector prevents the boosting effect. For example, a recent study in humans shows that a second dose of a recombinant AdHu5 does not provide significant boosting.

In parallel, recombinant AdHu5 boosting of DNA-primed individuals resulted in significantly higher immune responses (De Rosa et al., 2011). The anti-vector immunity can be either antibody mediated or independent (Cockburn et al., 2008; Schirmbeck et al., 2008; Frahm et al., 2012). Haut et al. (2011) found that in B cell-deficient mice transgene-specific CD8⁺ T cell responses were significantly higher in systemic compartments. In contrast, recent studies in humans showed that neutralizing antibodies titers to AdHu5 did not correlate with the magnitude of specific CD8⁺ T cell of priming after immunization with a recombinant AdHu5. In these experiments, the frequency of specific CD4⁺ T cells negatively correlated with the intensity of specific CD8⁺ T cells priming (Frahm et al., 2012).

In spite of the clear evidences that pre-existing immunity may interfere with the use of viral vectors, still, the heterologous prime-boost regimen of immunization is described as a possible solution to this problem. This can be achieved by strong priming with cytokine genes (for example, see Barouch et al., 2003).

Independent of the reasons why the heterologous prime-boost vaccination regimen is superior to the sequential use of the same vector, the main purpose of this review is to examine the characteristics of the protective CD8⁺ T cells generated by this vaccination regimen.

CHARACTERISTICS OF PROTECTIVE CD8⁺ T CELLS ELICITED AFTER HETEROLOGOUS PRIME-BOOST VACCINATION

HIGH FREQUENCIES OF SPECIFIC CD8⁺ T CELLS

One hallmark of the heterologous prime-boost regimen is the elicitation of a higher frequency of epitope-specific CD8⁺ T cells across multiple models. This high number of effector T cells was initially estimated by the presence of epitope-specific IFN- γ -producing cells using the *ex vivo* ELISPOT assay (Murata et al., 1996; Schneider et al., 1998; Sedegah et al., 1998; Bruña-Romero et al., 2001). Subsequently, the hypothesis was further validated by intracellular staining for IFN- γ (Pinto et al., 2003) and tetramer staining of epitope-specific CD8⁺ T cells (Tao et al., 2005). More recently, intracellular staining for TNF, IL-2, MIP1- β , T cell surface mobilization of CD107a, and *in vivo* cytotoxicity provided extended evidence (for examples, see Masopust et al., 2006; Mattapallil et al., 2006; Cox et al., 2008; de Alencar et al., 2009; Freel et al., 2010; Reyes-Sandoval et al., 2010; Rigato et al., 2011).

Because most studies are performed with T cells collected from the spleen or peripheral blood lymphocytes (PBL) of mice or NHP, respectively, it is not clear whether these results reflect an overall increase in every tissue. The presence of a large number of epitope-specific T cells in several tissues has been documented in the case of mouse lung, liver, intraepithelial lymphocytes, and PBL (Masopust et al., 2006; Reyes-Sandoval et al., 2011); however, because parallel comparison was not performed with animals that were immunized with a single vector, it is not clear whether these levels were particularly higher than the other vaccination protocols. Conversely, the frequency of epitope-specific CD8⁺ T cells seems to decrease in mouse lymph nodes (Masopust et al., 2006). This may be due to the lack of CD62L expression on the surface of these activated T cells, as discussed below. In addition, the pattern of circulation and recirculation of these lymphocytes has

been poorly explored. A single study, however, demonstrated that, after a recombinant plasmid DNA prime-AdHu5 boost, CD8⁺ T cells need to recirculate in order to exert protective immunity against an infectious challenge with the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. In these vaccinated mice, treatment with the drug FTY720 significantly reduced the efficacy of the protective immunity by interfering specifically with signaling through sphingosine-1-phosphate receptor-1, thereby inhibiting the egress of T cells from the lymph nodes (Dominguez et al., 2012). This observation is important because immunity to certain pathogens is not dependent on the recirculation of T lymphocytes (Pinschewer et al., 2000; Kursar et al., 2008; Jiang et al., 2012).

The importance of recirculation is likely dependent on factors such as (i) the host, (ii) the vectors used for prime and/or boost, and (iii) the route of administration of each vector (for examples, see Mattapallil et al., 2006; Kaufman et al., 2010). These are important characteristics that will certainly influence the protective immunity, as pathogens can cause either tissue-specific or systemic infections.

The T cell protective immunity elicited by heterologous prime-boost regimen is not only significantly higher than the immunity elicited by the traditional vaccine regimen but is also longer-lived. Several experimental models have shown that the immunity lasts for significant periods of time (Amara et al., 2001; Bruña-Romero et al., 2001; de Alencar et al., 2009; Reyes-Sandoval et al., 2010; Rigato et al., 2011).

POLYFUNCTIONALITY OF SPECIFIC CD8⁺ T CELLS

Based on the assays described above, it became clear that the specific CD8⁺ T cells elicited by the heterologous prime-boost regimen could exert different immunological functions, as measured by *ex vivo* or *in vivo* assays. Confirmation of the polyfunctionality of these cells was made possible through FACS analyses coupling intracellular cytokine staining and cell surface mobilization of the degranulation marker CD107a.

Accordingly, a number of studies confirmed that distinct heterologous prime-boost regimens elicited polyfunctional CD8⁺ T cells as defined by the cells' capability to exert two or more functions at the same time. The most frequent example of this across different models is specific CD8⁺ T cells producing IFN- γ and TNF simultaneously. High frequencies of polyfunctional specific CD8⁺ T cells were described in (i) mice (Masopust et al., 2006; Duke et al., 2007; de Alencar et al., 2009; Elvang et al., 2009; Reyes-Sandoval et al., 2010; Rigato et al., 2011; Rodríguez et al., 2012; Vijayan et al., 2012), (ii) NHP (Mattapallil et al., 2006; Sun et al., 2006; Cox et al., 2008; Liu et al., 2008; Magalhaes et al., 2008; Cayabyab et al., 2009; Wilks et al., 2010; Hutnick et al., 2012), and (iii) humans (Beveridge et al., 2007; Harari et al., 2008; Winstone et al., 2009; Freel et al., 2010; Jaoko et al., 2010; Koup et al., 2010; Schooley et al., 2010; Churchyard et al., 2011; De Rosa et al., 2011).

It is noteworthy that although these T cells have a high frequency of polyfunctionality, their ability to mediate multiple immunological functions has never been clearly linked to their protective capacity. It is possible that this characteristic aids in but is not critical for their effector functions, depending on the mechanism necessary for pathogen elimination. In a single study

performed using genetically deficient mice, in the absence of either IFN- γ or perforin, heterologous prime-boost vaccination failed to mediate protective immunity against infection with the intracellular parasite *T. cruzi*. In the case of perforin-deficient mice, the lack of protective immunity was associated mainly with a significant decrease in the induction of polyfunctional T cells (de Alencar et al., 2009). A second study correlated the presence of higher frequencies of polyfunctional T cells to protective immunity against liver stages of malaria parasite (Reyes-Sandoval et al., 2010). Although these studies may suggest a role for polyfunctional T cells during protective immunity, it is still too early to conclude that they are critical for the protective immunity exerted by CD8⁺ T cells elicited following the heterologous prime-boost vaccination regimen.

BREADTH OF SPECIFIC CD8⁺ T CELLS

T cell immune responses are often restricted to a few immunodominant epitopes, a phenomenon termed immunodominance (Akram and Inman, 2012). The precise reason for such a restriction is not clear; however, it may have evolved to maximize the immune response, while at the same time reducing the risk of autoimmunity. For the purpose of vaccine development, having only a narrow number of recognized epitopes may be dangerous, as the pathogens will rapidly select for escape mutants to avoid effector immune responses (reviewed in Streeck and Nixon, 2010; Chopera et al., 2011).

Although it has been possible to increase the frequency of T cells specific for immunodominant epitopes, it is still a challenge to broaden the vaccine-induced CD8⁺ T cell response to a number of subdominant T cell epitopes. There is evidence that heterologous rAdHu5 boosting improved not only the magnitude but also the breadth of specific CD8⁺ cells (Liu et al., 2008). However, the impact of this response on protective immunity is not clear. Two recent studies indicated that immunity to subdominant epitopes might participate in vaccine-induced protective immunity following a DNA prime-AdHu5 boost vaccination regimen. The first study provided a correlation between the breadth of the immune response and the protective immunity observed in individual rhesus monkeys vaccinated with SIV genes (Martins et al., 2010). A second study formally demonstrated that heterologous prime-boost vaccination with plasmid DNA followed by recombinant AdHu5 elicited strong immune response to two subdominant epitopes that were not recognized during infection (Dominguez et al., 2011). Based on these observations, mutant genes were generated in which the dominant epitope was removed. Heterologous prime-boost vaccination with these mutant genes induced CD8⁺ T cell immune responses only to the subdominant epitopes. Most importantly, strong CD8⁺ T cell-mediated immunity was still observed (Dominguez et al., 2011). These results unequivocally demonstrate the importance of immunity to the subdominant epitopes and the ability of the heterologous prime-boost to elicit them. Nevertheless, other groups still have difficulty improving the immune response to subdominant epitopes following heterologous prime-boost vaccination of NHP (Vojnov et al., 2011). Therefore, new strategies to improve the breadth of the immune response might be developed in order to potentiate vaccine formulation.

TEM PHENOTYPE OF SPECIFIC LONG-LIVED CD8⁺ T CELLS

The current immunological paradigm divides antigen-experienced CD8⁺ T cells into three main types: (i) T effector (TE), (ii) T effector memory (TEM), and (iii) T central memory (TCM). These populations of T cells can be distinguished by the presence of activation markers, as well as by differences observed in their localization and recirculation patterns and their ability to proliferate and present certain effector functions/molecules (Angelosanto and Wherry, 2010; Cui and Kaech, 2010; Ahmed and Akondy, 2011; Sheridan and Lefrançois, 2011). More recently, other subpopulations of CD8⁺ T cells have also been described (Wakim et al., 2010; Sheridan and Lefrançois, 2011; Jiang et al., 2012). The concept of TE/TEM/TCM was primarily established by experimental infections with self-curing pathogens. In these cases, TE are short-lived effector cells (CD44^{High} CD11a^{High} CD62L^{Low} CD127^{Low} KLRG1^{High}); TCM are long-lived memory cells (CD44^{High} CD11a^{High} CD62L^{High} CD127^{High} KLRG1^{High}); and TEM are transitional cells that exist for a short period of time and have distinct surface marker expression (CD44^{High} CD11a^{High} CD62L^{Low} CD127^{High} KLRG1^{High}). However, even by using models of self-curing infections, the existence of other memory T cell subpopulations that might be more relevant for long-term T cell immunity have been proposed (Hikono et al., 2007).

In addition, very recently, considerable interest has been placed on tissue-resident memory T (TRM) cells. These cells are potent long-lived effector cells present in a variety of peripheral tissues including the skin and sensory ganglia, gut, brain, lung, etc. (Wakim et al., 2008; Gebhardt et al., 2009; Masopust et al., 2010; Purwar et al., 2011). They mediate protective immunity against brain infection with vesicular stomatitis virus or skin infection with vaccinia or herpes simplex virus (Wakim et al., 2010; Jiang et al., 2012; Mackay et al., 2012). Their phenotype is CD44^{High}, CD62L^{Low}, CD103^{High}, CD69^{High}, CD127^{Low}, and PD-1^{Low}. The relationship of TRM cells with TEM or TCM is yet to be determined. Some authors propose that these cells constitute an independent lineage primed within the tissue (Wakim et al., 2010, 2012).

Very recently, the development of a methodology to perform transcriptional profiling at the single cell level has detected further differentiation profiles among TEM and TCM. The analysis of specific splenic CD8⁺ T cells from mice immunized with distinct vaccination protocols yields significant differences among these subpopulations (Fratz et al., 2011). For example, while 74% of the specific TEM elicited by the heterologous DNA prime-recombinant AdHu5 boost vaccination were Klrk1⁺ Klrp1⁺ Ccr5⁺, only 20% of the cells generated by HuAd5-prime-recombinant LCMV boost had a similar phenotype (Fratz et al., 2011). This type of analysis further highlights the heterogeneity still being uncovered within these memory cells.

It has been observed on multiple occasions that after heterologous prime-boost vaccination, the boosting immunization drives not only an expansion of the T cells but also a different phenotype in the long-lived memory T cells. Different doses of the vaccine also caused a significant increase in the frequency of specific CD8⁺ T cells with a TEM phenotype (CD44^{High} CD11a^{High} CD62L^{Low} CD127^{High} KLRG1^{High}; Masopust et al., 2006). TEM cells were described initially as highly protective against certain viral and

bacterial infections (Bachmann et al., 2005a,b; Huster et al., 2006). Likewise, protective immunity afforded by the different heterologous prime-boost vaccination protocols has been associated with the presence of this type of T cell (Hansen et al., 2011; Reyes-Sandoval et al., 2011; Rigato et al., 2011; Xiao et al., 2011; Barouch et al., 2012; Yamamoto et al., 2012).

Based on the relatively poor knowledge of the surface activation markers present on long-lived specific TEM CD8⁺ T cells, we performed a detailed analysis of the different T cells markers following intramuscular DNA prime-adenovirus boost immunization. We identified transgenic epitope-specific T cells in the spleen of immunized mice 14 or 98 days after the boost vaccination. **Figure 1** summarizes the surface marker phenotype of these epitope-specific T cells compared to the phenotype of the naïve cells.

PROLIFERATIVE CAPACITY OF SPECIFIC CD8⁺ T CELLS

The proliferative capacity of specific T cells elicited by heterologous prime-boost vaccination has not been thoroughly studied to date. In general, after resolution of experimental self-curing infections, the frequency of total CD8⁺ T cells declines to less than 10% of the maximal number of specific T cells observed during the peak of the immune response; this is known as the contraction phase. The decrease in the number of specific T cells occurs mainly among the short-lived effector cells (Angelosanto and Wherry, 2010; Cui and Kaech, 2010; Ahmed and Akondy, 2011; Sheridan and Lefrançois,

Naïve CD8 ⁺ T cells	Specific CD8 ⁺ T cells 14 days	Specific CD8 ⁺ T cells 98 days
CD11a Low	CD11a High	CD11a High
CD11c Low	CD11c Int.	CD11c Low
CD25 Low	CD25 High	CD25 Low
CD27 High	CD27 Low/High	CD27 Low/High
CD31 High	CD31 Low	CD31 Low
CD43 Low	CD43 High	CD43 High
CD44 Low	CD44 High	CD44 High
CD49d Low	CD49d High	CD49d High
CD69 Low	CD69 Low	CD69 Low
CD62L High	CD62L Low	CD62L Low
CD95 Low	CD95 Low	CD95 Low
CD122 Low	CD122 High	CD122 Int.
CD127 High	CD127 Low	CD127 High
CCR5 Low	CCR5 Low	CCR5 Low
KLRG-1 Low	KLRG-1 Low/High	KLRG-1 Low/High
T Naïve	TE	TEM

FIGURE 1 | Phenotype of specific CD8⁺ T cells elicited by heterologous prime-boost vaccination using recombinant plasmid DNA and AdHu5. Prime-boost regimen was performed as detailed described by Rigato et al. (2011). Mice were primed i.m. with plasmid DNA (100 µg) and boosted 21 days later with AdHu5 (2 × 10⁹) both expressing the gene encoding the amastigote surface protein-2 of *T. cruzi*. Expression of distinct adhesion/activation receptors on the surface of splenic CD8⁺ specific T cells is shown at day 14 or day 98 after the boost immunization.

2011). However, this does not seem to be the case for the TE cells elicited by the heterologous prime-boost vaccination regimen (Jameson and Masopust, 2009). In this case, the cells expand and are maintained at a high frequency in the spleen for a long period of time (Masopust et al., 2006; Vezys et al., 2009; Rigato et al., 2011). This is a somewhat unexpected finding and might be of great relevance for the success of this vaccination protocol. Because this expansion and maintenance contrasts with the retraction observed after self-curing infections, it opens a number of questions that should be studied in depth: (i) How can cells expand out of control to reach frequencies higher than the primary immune response? (ii) How do T cells avoid the apoptotic process observed for the short-lived effector cells during the contraction phase? (iii) How are T cells maintained for these long periods? These questions are keys to understanding the physiology of CD8⁺ T cells and developing better T cell vaccines.

After an infectious challenge, specific T cells proliferate. However, it is still unknown whether this proliferative response occurs among the antigen-primed TE(M) cells, rare TCM or naïve T cells. To address this question, it is now possible to use the *gzm-BCreERT2/Rosa26EYFP* transgenic mouse line (Bannard et al., 2009). Specific TE CD8⁺ T lymphocytes can be indelibly labeled with enhanced yellow fluorescent protein (EYFP). Following an infectious challenge, it will be possible to follow the expansion of EYFP-labeled TE cells. This result will confirm or not whether the cells that expand after the infectious challenge are indeed mainly antigen-experienced TE. Also, by the adoptive transference of green-fluorescent naïve specific T cells prior to the infectious challenge it will be possible to determine whether these cells proliferate or not together with the specific TE cells. Whether this is true for all different protocols of heterologous prime-boost vaccination strategies is still unknown and might be relevant for the development of vaccines to be used in individuals primed with conventional vaccines such as *Bacillus Calmette–Guérin* (BCG; Hoft et al., 2012).

REFRACTORINESS TO APOPTOSIS OF SPECIFIC CD8⁺ T CELLS

As mentioned above, after an intense immune response and pathogen elimination, the number of specific CD8⁺ T cell is drastically reduced during a period called the contraction phase. In that period, TE or short-lived effector cells are eliminated by mechanisms that involve apoptosis mediated by BCL-2-interacting mediator of cell death (Bim) and CD95 (also known as FAS; Green, 2008; Hughes et al., 2008; Weant et al., 2008; Bouillet and O'Reilly, 2009). We observed that following prime-boost immunization with recombinant plasmid DNA and AdHu5, TEM cells do not upregulate surface CD95 expression and are refractory to anti-CD95-induced apoptosis *in vitro* (Rigato et al., 2011). Because CD95 is an important initiator of the intrinsic pathway of apoptosis in T lymphocytes, low levels of expression may protect T cells from apoptotic death.

Decreased levels of expression or resistance to activation of other receptors that control T cell death, such as TNF receptor and TRAIL, might also play a role during the survival of specific TEM cells. In contrast, increased expression of other receptors may act to protect these specific T cells. Recently, expression of PDL-1 (B7-H1) on antigen-activated CD8⁺ T cells made these

cells more resistant to Ca²⁺-dependent and Fas ligand-dependent killing by cytotoxic T lymphocytes (Pulko et al., 2011). However, more details are necessary to understand the expression levels of many of these molecules controlling T cell survival.

It is plausible that Bim is poorly activated, or not activated at all, on these cells. Because Bim is activated in response to the lack of certain external stimuli, these activation signals might be maintained for long-term. One such mechanism is antigen presentation by dendritic cells. Using a replication-deficient adenoviral vector, Tatsis et al. (2007) demonstrated that the transgene product remains available for antigen presentation for as long as 16 weeks after a single immunizing dose. The importance of continuous transgene expression in the maintenance of the specific CD8⁺ T cells after AdHu5 vaccination was also demonstrated by a causal relationship between both using an inducible system to turn off the transgene expression (Finn et al., 2009). Bassett et al. (2011) showed that both hematopoietic and non-hematopoietic antigen-presenting cells are necessary for the maintenance of CD8⁺ T cells following immunization with recombinant adenovirus. However, it is not clear whether antigen persistence is also observed with other vectors.

We tested whether the IFN- γ or IL12/IL23 signaling pathways might be important for maintaining these long-lived CD8⁺ TEM cells. The absence of either pathway individually made little difference in the generation of specific CD8⁺ T cells. The absence of the IL12/IL23 pathway, but not the IFN- γ pathway, was important for the long-term survival of these cells (Rigato et al., 2011). Further details regarding the relevance of these signaling pathways in maintaining a high frequency of CD8⁺ T cells are unknown. In addition, little is known about the impact of the lack of the IL12/IL23 pathway in the maintenance of specific CD8⁺ T cells after other heterologous prime-boost vaccination regimens. We consider this area of critical importance in understanding how T cells can be maintained at high frequencies for long periods of time. A possible explanation that remains to be tested is whether the lack of contraction could be due to the fact that many specific long-lived CD8⁺ T cells express low levels of the chemokine receptors CXCR3 and CCR5 (Flatz et al., 2011). This possibility is supported by recent observations that genetically deficient CD8⁺ T cells that do not express both these receptors were refractory to contraction and accumulated in higher numbers in the spleen (Kohlmeier et al., 2011).

Recently, we described a new and potentially very important aspect of CD8⁺ TE cells. After recombinant AdHu5 vaccination, CD8⁺ TE cells do not undergo apoptosis, as well as prevent the development of a pro-apoptotic phenotype that occurs during experimental infection with the protozoan parasite *T. cruzi*. This phenomenon was observed when the administration of the recombinant AdHu5 vaccine was provided before (as part of a prime-boost regimen or alone) or at the time of the infectious challenge. AdHu5 treatment modulated specifically the CD8⁺ TE cells to express lower levels of CD95 (FAS) and become resistant to CD95-induced apoptosis. The determination of the distinct adhesion/activation receptors on the surface of the CD8⁺-specific T cells elicited by either infection or recombinant AdHu5 immunization showed very limited differences that were almost exclusively confined to the apoptotic receptor CD95 (Figure 2).

Naive CD8 ⁺ T cells	Specific CD8 ⁺ T cells Infected	Specific CD8 ⁺ T cells Immunized
CD11a Low	CD11a High	CD11a High
CD11c Low	CD11c Int.	CD11c Low
CD25 Low	CD25 Low	CD25 Low
CD27 High	CD27 Low	CD27 Low
CD43 Low	CD43 High	CD43 High
CD44 Low	CD44 High	CD44 High
CD49d Low	CD49d High	CD49d High
CD69 Low	CD69 Low	CD69 Low
CD62L High	CD62L Low	CD62L Low
CD95 Low	CD95 High	CD95 Low
CD122 Low	CD122 Low	CD122 Int.
CD127 High	CD127 Low	CD127 Low
CCR5 Low	CCR5 Low	CCR5 Low
KLRG-1 Low	KLRG-1 High	KLRG-1 High
PD1 Low	PD1 Low	PD1 Low/Int
CTLA-4 Low	CTLA-4 Low	CTLA-4 Low
BTLA Low	BTLA Low	BTLA Low
T Naive	TE	TE

FIGURE 2 | Expression of distinct adhesion/activation receptors on the surface of specific CD8⁺ T cells elicited by either *T. cruzi* infection or recombinant AdHu5 immunization (Vasconcelos et al., 2012). Mice were infected s.c. with *T. cruzi* (150 blood stream trypomastigotes) or immunized i.m. with AdHu5 (2×10^8 pfu) expressing the gene encoding the amastigote surface protein-2 of *T. cruzi* 19 days earlier.

Despite the above results, we have not ruled out that other pro-apoptotic signaling pathways might also be altered. In these immunized and challenged mice, the CD8⁺ T cell population expanded largely and protected mice against an otherwise lethal infection (Vasconcelos et al., 2012). An important mechanism that controls the expression of CD95 on the surface of specific CD8⁺ T cells has just been described during development of immune responses to viral infections. TCR activation led to an increase of the RIG-I-like receptor LGP2 expression which down-regulated CD95 expression. In KO mice, the absence of this molecule significantly increased the apoptosis reducing the effectiveness of the immune response and resistance to the viral infection (Suthar et al., 2012). We consider this a promising area of study because it suggests that perhaps the control of T cell survival might be the key element for the development of new or improved vaccines. The proposed pathway of specific CD8⁺ T cell activation following prime-boost vaccination and infection is shown in **Figure 3** (based on Vasconcelos et al., 2012).

REDUCED IMMUNOLOGICAL EROSION OF SPECIFIC CD8⁺ T CELLS

Memory CD8⁺ T cells are not a stable pool; subsequent infections may cause attrition and erosion of the memory T cell pool (Selin et al., 1996, 1999; Dudani et al., 2008; Huster et al., 2009; Schmidt and Harty, 2011). However, different heterologous

prime-boost regimens generated a pool of CD8⁺ T cells that was not eroded by subsequent viral infections (Vezys et al., 2009; Rigato et al., 2011). After a vaccination regimen consisting of recombinant plasmid DNA prime-AdHu5 boost, we observed that viral infections had limited impact on the number or quality of the TEM cells as measured by different functional immunological assays. Most importantly, protective immunity mediated by these CD8⁺ TEM cells was not altered in these mice (Rigato et al., 2011).

In contrast, using a different prime-boost vaccination protocol consisting of dendritic cells coated with circumsporozoite protein peptide and a booster immunization with recombinant *actA-inlB*-deficient *Listeria monocytogenes* expressing the same epitope elicited an immune response that could be eroded by multiple subsequent infections (Schmidt and Harty, 2011). The discrepant results highlight the importance of determining the characteristic of each TEM elicited by the distinct regimen of vaccination, as suggested earlier (Flatz et al., 2011).

The resistance to immunological erosion is one more interesting characteristic of these long-lived TEM cells that has been poorly explored and may have an important impact in the development of efficient vaccines. As mentioned above, this high-resistance immunological erosion can be linked to the differential expression of surface molecules (death receptors such as CD95/FAS) or apoptosis mediators (such as Bim).

UNKNOWN FATE OF THE SPECIFIC CD8⁺ TEM CELLS

Although some studies described that these TEM can be long-lived in some mouse models, it is not clear what will be the fate of these cells on extended periods of time. Will they become TCM by upregulating CD62L? Will they simply die? Can they be boosted? Perhaps these questions can be addressed by using the *gzmBCreERT2/Rosa26EYFP* transgenic mouse line (Bannard et al., 2009). Labeling specific TE CD8⁺ T lymphocytes will allow us to follow these cells for longer periods of time.

Also, their long-term fate in NHP or humans is even more important for the purpose of development of practical vaccines. Due to the obvious constraints, few studies so far have addressed this issue.

CONCLUDING REMARKS AND PERSPECTIVES

Genetic vaccination using heterologous prime-boost regimen protocols has the potential to serve as the basis for the development of new vaccines against many pathogens. In spite of the progress over the past 20 years, much work is required to improve the relevance of vaccine research, considering that human immune response is still at least one order of magnitude lower than that observed in mouse or even NHP models.

Several areas can be pursued for this matter. So far, protective immunity is clearly associated with the presence of a high number of long-lived specific polyfunctional TEM cells. Nevertheless, several points should be considered. First, TEM may vary from one protocol to the other. It is also important to improve the number of specific TCM cells, for example, by using pharmacological modulators (Li et al., 2012; Takai et al., 2012). However, it will be a challenge to increase the number of TCM cells without reducing the number of TEM cells. Fine tuning the TEM

FIGURE 3 | The proposed pathway of activation of specific CD8⁺ T cells following prime-boost vaccination and infection (based on Vasconcelos et al., 2012). Prime-boost regimen was performed as detailed described by Rigato et al. (2011). Mice were primed i.m. with

plasmid DNA (100 μ g) and boosted 21 days later with AdHu5 (2×10^8) both expressing the gene encoding the amastigote surface protein-2 of *T. cruzi*. Mice were infected s.c. with *T. cruzi* (150 blood stream trypomastigotes).

subpopulations and increasing the number of TCM cells could further improve and prolong protective immunity beyond the levels currently achieved. Furthermore, new strategies to broaden the epitopes recognized by protective T cells would also improve both the quantity and the quality of the immune response. Finally, the circulation of these cells should be further studied for the purpose of personalizing the vaccination regimen for different types of infections, considering that the site of entry of each pathogen will vary, as will the localization of the T cells at the time of the infection.

In summary, the study of the control of memory T cell generation, maintenance, quality, and recirculation after distinct heterologous prime-boost vaccination regimens will provide important clues regarding the physiology of lymphocytes

and the immune system, with potential applications in public health.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2009/06820-4), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Vacinas (INCTV-CNPq), The Millennium Institute for Vaccine Development and Technology (CNPq - 420067/2005-1), The Millennium Institute for Gene Therapy (Brazil), Malaria-PRONEX and PNPd. José R. Vasconcelos, Adriano F. Araújo, Mariana R. Dominguez, and Cibele A. Tararam are recipients of fellowship from FAPESP. José R. Vasconcelos, Oscar Bruna-Romero, and Mauricio M. Rodrigues are recipients of fellowships from CNPq.

REFERENCES

- Acierno, P. M., Schmitz, J. E., Gorgone, D. A., Sun, Y., Santra, S., Seaman, M. S., et al. (2006). Preservation of functional virus-specific memory CD8⁺ T lymphocytes in vaccinated, simian human immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J. Immunol.* 176, 5338–5345.
- Ahmed, R., and Akondy, R. S. (2011). Insights into human CD8⁺ cell memory using the yellow fever and smallpox vaccines. *Immunol. Cell Biol.* 89, 340–345.
- Aidoo, M., Otten, R. A., Rodriguez, V., Sariol, C. A., Martinez, M., Kraisel-burd, E., et al. (2007). Absence of SHIV infection in gut and lymph node tissues in rhesus monkeys after repeated rectal challenges following HIV-1 DNA/MVA immunizations. *Vaccine* 25, 6474–6481.
- Akram, A., and Inman, R. D. (2012). Immunodominance: a pivotal

- principle in host response to viral infections. *Clin. Immunol.* 143, 99–115.
- Amara, R. R., Villingier, F., Altman, J. D., Lydy, S. L., O'Neil, S. P., Staprans, S. L., et al. (2001). Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292, 69–74.
- Angelosanto, J. M., and Wherry, E. J. (2010). Transcription factor regulation of CD8+ T-cell memory and exhaustion. *Immunol. Rev.* 236, 167–175.
- Bachmann, M. F., Wolint, P., Schwarz, K., Jäger, P., and Oxenius, A. (2005a). Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. *J. Immunol.* 175, 4686–4696.
- Bachmann, M. F., Wolint, P., Schwarz, K., and Oxenius, A. (2005b). Recall proliferation potential of memory CD8+ T cells and antiviral protection. *J. Immunol.* 175, 4677–4685.
- Bannard, O., Kraman, M., and Fearon, D. T. (2009). Secondary replicative function of CD8+ T cells that had developed an effector phenotype. *Science* 323, 505–509.
- Barouch, D. H. (2010). Novel adenovirus vector-based vaccines for HIV-1. *Curr. Opin. HIV AIDS* 5, 386–390.
- Barouch, D. H., Liu, J., Li, H., Maxfield, L. F., Abbink, P., Lynch, D. M., et al. (2012). Vaccine protection against acquisition of neutralization-resistant SIV challenges in rhesus monkeys. *Nature* 7383, 89–93.
- Barouch, D. H., McKay, P. F., Sumida, S. M., Santra, S., Jackson, S. S., Gorgone, D. A., et al. (2003). Plasmid chemokines and colony-stimulating factors enhance the immunogenicity of DNA priming-viral vector boosting human immunodeficiency virus type 1 vaccines. *J. Virol.* 77, 8729–8735.
- Bassett, J. D., Yang, T. C., Bernard, D., Millar, J. B., Swift, S. L., McGray, A. J., et al. (2011). CD8+ T-cell expansion and maintenance after recombinant adenovirus immunization rely upon cooperation between hematopoietic and nonhematopoietic antigen-presenting cells. *Blood* 117, 1146–1155.
- Beveridge, N. E., Price, D. A., Casazza, J. P., Pathan, A. A., Sander, C. R., Asher, T. E., et al. (2007). Immunisation with BCG and recombinant MVA85A induces long-lasting, polyfunctional *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4+ memory T lymphocyte populations. *Eur. J. Immunol.* 37, 3089–3100.
- Bouillet, P., and O'Reilly, L. A. (2009). CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 514–519.
- Bruña-Romero, O., González-Aseguinolaza, G., Hafalla, J. C., Tsuji, M., and Nussenzweig, R. S. (2001). Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 11491–11496.
- Casey, K. A., Fraser, K. A., Schenkel, J. M., Moran, A., Abt, M. C., Beura, L. K., et al. (2012). Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like resident memory T cells in tissues. *J. Immunol.* 188, 4866–4875.
- Casimiro, D. R., Chen, L., Fu, T. M., Evans, R. K., Caulfield, M. J., Davies, M. E., et al. (2003). Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J. Virol.* 77, 6305–6313.
- Casimiro, D. R., Wang, F., Schleif, W. A., Liang, X., Zhang, Z. Q., Tobery, T. W., et al. (2005). Attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection by prophylactic immunization with DNA and recombinant adenoviral vaccine vectors expressing Gag. *J. Virol.* 79, 15547–15555.
- Cayabyab, M. J., Koriath-Schmitz, B., Sun, Y., Carville, A., Balachandran, H., Miura, A., et al. (2009). Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG prime-recombinant adenovirus boost vaccination in rhesus monkeys elicits robust polyfunctional simian immunodeficiency virus-specific T-cell responses. *J. Virol.* 83, 5505–5513.
- Cebere, I., Dorrell, L., McShane, H., Simmons, A., McCormack, S., Schmidt, C., et al. (2006). Phase I clinical trial safety of DNA- and modified virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccines administered alone and in a prime-boost regime to healthy HIV-1-uninfected volunteers. *Vaccine* 24, 417–425.
- Chopera, D. R., Wright, J. K., Brockman, M. A., and Brumme, Z. L. (2011). Immune-mediated attenuation of HIV-1. *Future Virol.* 6, 917–928.
- Churchyard, G. J., Morgan, C., Adams, E., Hural, J., Graham, B. S., Moodie, Z., et al. (2011). A phase IIA randomized clinical trial of a multiclade HIV-1 DNA prime followed by a multiclade rAd5 HIV-1 vaccine boost in healthy adults (HVTN204). *PLoS ONE* 6, e21225. doi: 10.1371/journal.pone.0021225
- Cockburn, I. A., Chakravarty, S., Overstreet, M. G., García-Sastre, A., and Zavala, F. (2008). Memory CD8+ T cell responses expand when antigen presentation overcomes T cell self-regulation. *J. Immunol.* 180, 64–71.
- Cox, K. S., Clair, J. H., Prokop, M. T., Sykes, K. J., Dubey, S. A., Shiver, J. H., et al. (2008). DNA gag/adenovirus type 5 (Ad5) gag and Ad5 gag/Ad5 gag vaccines induce distinct T-cell response profiles. *J. Virol.* 82, 8161–8171.
- Cui, W., and Kaech, S. M. (2010). Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol. Rev.* 236, 151–166.
- de Alencar, B. C. G., Persechini, P. M., Haolla, F. A., De Oliveira, G., Silveiro, J. C., Lannes-Vieira, J., et al. (2009). Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-Cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect. Immun.* 77, 4383–4395.
- De Rosa, S. C., Thomas, E. P., Bui, J., Huang, Y., deCamp, A., Morgan, C., et al. (2011). National institute of allergy and infectious diseases HIV vaccine trials network. V-DNA priming alters T cell responses to HIV-adenovirus vaccine even when responses to DNA are undetectable. *J. Immunol.* 187, 3391–3401.
- Dominguez, M. R., Ersching, J., Lemos, R., Machado, A. V., Bruna-Romero, O., Rodrigues, M. M., et al. (2012). Re-circulation of lymphocytes mediated by sphingosine-1-phosphate receptor-1 contributes to resistance against experimental infection with the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine* 30, 2882–2891.
- Dominguez, M. R., Silveira, E. L., de Vasconcelos, J. R., de Alencar, B. C., Machado, A. V., Bruna-Romero, O., et al. (2011). Subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes contribute to resistance against experimental infection with a human protozoan parasite. *PLoS ONE* 6, e22011. doi: 10.1371/journal.pone.0022011
- Dudani, R., Murali-Krishna, K., Krishnan, L., and Sad, S. (2008). IFN-gamma induces the erosion of pre-existing CD8 T cell memory during infection with a heterologous intracellular bacterium. *J. Immunol.* 181, 1700–1709.
- Duke, C. M., Maguire, C. A., Keefer, M. C., Federoff, H. J., Bowers, W. J., and Dewhurst, S. (2007). HSV-1 amplicon vectors elicit polyfunctional T cell responses to HIV-1 Env, and strongly boost responses to an adenovirus prime. *Vaccine* 25, 7410–7421.
- Dunachie, S. J., Walther, M., Epstein, J. E., Keating, S., Berthoud, T., Andrews, L., et al. (2006). DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccine encoding thrombospondin-related adhesion protein but not circumsporozoite protein partially protects healthy malaria-naïve adults against *Plasmodium falciparum* sporozoite challenge. *Infect. Immun.* 74, 5933–5942.
- Ellenberger, D., Otten, R. A., Li, B., Aidoo, M., Rodriguez, I. V., Sariol, C. A., et al. (2006). HIV-1 DNA/MVA vaccination reduces the per exposure probability of infection during repeated mucosal SHIV challenges. *Virology* 352, 216–225.
- Elvang, T., Christensen, J. P., Billeskov, R., Thi Kim Thanh Hoang, T., Holst, P., Thomsen, A. R., et al. (2009). CD4 and CD8 T cell responses to the *M. tuberculosis* Ag85B-TB10.4 promoted by adjuvanted subunit, adenovector or heterologous prime boost vaccination. *PLoS ONE* 4, e5139. doi: 10.1371/journal.pone.0005139
- Finn, J. D., Bassett, J., Millar, J. B., Grinshtein, N., Yang, T. C., Parsons, R., et al. (2009). Persistence of transgene expression influences CD8+ T-cell expansion and maintenance following immunization with recombinant adenovirus. *J. Virol.* 83, 12027–12036.
- Flatz, L., Roychoudhuri, R., Honda, M., Filali-Mouhim, A., Goulet, J. P., Kettaf, N., et al. (2011). Single-cell gene-expression profiling reveals qualitatively distinct CD8 T cells elicited by different gene-based vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 5724–5729.
- Frahm, N., DeCamp, A. C., Friedrich, D. P., Carter, D. K., Defawe, O. D., Kublin, J. G., et al. (2012). Human adenovirus-specific T cells modulate HIV-specific T cell responses to an Ad5-vectored HIV-1 vaccine. *J. Clin. Invest.* 122, 359–367.
- Freel, S. A., Lamoreaux, L., Chattopadhyay, P. K., Saunders, K., Zarkowsky, D., Overman, R. G., et al. (2010). Phenotypic and functional profile of HIV-inhibitory CD8 T cells elicited by natural infection and heterologous prime/boost vaccination. *J. Virol.* 84, 4998–5006.
- Gebhardt, T., Wakim, L. M., Eidsmo, L., Reading, P. C., Heath, W. R., and Carbone F. R. (2009). Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during

- infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol.* 10, 524–530.
- Geisbert, T. W., Bailey, M., Geisbert, J. B., Asiedu, C., Roederer, M., Grazia-Pau, M., et al. (2010). Vector choice determines immunogenicity and potency of genetic vaccines against Angola Marburg virus in non-human primates. *J. Virol.* 84, 10386–10394.
- Gilbert, S. C., Moorthy, V. S., Andrews, L., Pathan, A. A., McConkey, S. J., Vuola, J. M., et al. (2006). Synergistic DNA-MVA prime-boost vaccination regimes for malaria and tuberculosis. *Vaccine* 24, 4554–4561.
- Gilbert, S. C., Schneider, J., Hannan, C. M., Hu, J. T., Plebanski, M., Sinden, R., et al. (2002). Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimes. *Vaccine* 20, 1039–1045.
- Gómez, C. E., Nájera, J. L., Krupa, M., Perdiguer, B., and Esteban, M. (2011). MVA and NYVAC as vaccines against emergent infectious diseases and cancer. *Curr. Gene Ther.* 11, 189–217.
- Goonetilleke, N., Moore, S., Dally, L., Winstone, N., Cebere, I., Mahmoud, A., et al. (2006). Induction of multifunctional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T cells capable of proliferation in healthy subjects by using a prime-boost regimen of DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored vaccines expressing HIV-1 Gag coupled to CD8+ T-cell epitopes. *J. Virol.* 80, 4717–4728.
- Green, D. R. (2008). Fas Bim boom! *Immunity* 28, 141–143.
- Hansen, S. G., Ford, J. C., Lewis, M. S., Ventura, A. B., Hughes, C. M., Coyne-Johnson, L., et al. (2011). Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature* 473, 523–527.
- Harari, A., Bart, P. A., Stöhr, W., Tapia, G., Garcia, M., Medjitna-Rais, E., et al. (2008). An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. *J. Exp. Med.* 205, 63–77.
- Haut, L. H., Ratcliffe, S., Pinto, A. R., and Ertl, H. (2011). Effect of pre-existing immunity to adenovirus on transgene product-specific genital T cell responses on vaccination of mice with a homologous vector. *J. Infect. Dis.* 203, 1073–1081.
- Helbig, C., Gentek, R., Backer, R. A., de Souza, Y., Derks, I. A., Eldering, E., et al. (2012). Notch controls the magnitude of T helper cell responses by promoting cellular longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 9041–9046.
- Hensley, L. E., Mulangu, S., Asiedu, C., Johnson, J., Honko, A. N., Stanley, D., et al. (2010). Demonstration of cross-protective vaccine immunity against an emerging pathogenic Ebolavirus species. *PLoS Pathog.* 6, e1000904. doi: 10.1371/journal.ppat.1000904
- Hikono, H., Kohlmeier, J. E., Takamura, S., Wittmer, S. T., Roberts, A. D., and Woodland, D. L. (2007). Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 204, 1625–1636.
- Hoft, D. F., Blazevic, A., Stanley, J., Landry, B., Sizemore, D., Kpamegan, E., et al. (2012). A recombinant adenovirus expressing immunodominant TB antigens can significantly enhance BCG-induced human immunity. *Vaccine* 30, 2098–2108.
- Hughes, P. D., Belz, G. T., Fortner, K. A., Budd, R. C., Strasser, A., and Bouillet, P. (2008). Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity* 28, 197–205.
- Huster, K. M., Koffler, M., Stemberger, C., Schiemann, M., Wagner, H., and Busch, D. H. (2006). Unidirectional development of CD8+ central memory T cells into protective Listeria-specific effector memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 36, 1453–1464.
- Huster, K. M., Stemberger, C., Gasteiger, G., Kastenmüller, W., Drexler, I., and Busch, D. H. (2009). Cutting edge: memory CD8 T cell compartment grows in size with immunological experience but nevertheless can lose function. *J. Immunol.* 183, 6898–6902.
- Hutnick, N. A., Myles, D. J., Hirao, L., Scott, V. L., Ferraro, B., Khan, A. S., et al. (2012). An optimized SIV DNA vaccine can serve as a boost for Ad5 and provide partial protection from a high-dose SIV-mac251 challenge. *Vaccine* 30, 3202–3208.
- Irvine, K. R., Chamberlain, R. S., Shulman, E. P., Surman, D. R., Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (1997). Enhancing efficacy of recombinant anticancer vaccines with prime/boost regimens that use two different vectors. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 1595–1601.
- Jameson, S. C., and Masopust, D. (2009). Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. *Immunity* 31, 859–871.
- Jaoko, W., Karita, E., Kayitenkore, K., Omosa-Manyonyi, G., Allen, S., Than, S., et al. (2010). Safety and immunogenicity study of multiclade HIV-1 adenoviral vector vaccine alone or as boost following a multiclade HIV-1 DNA vaccine in Africa. *PLoS ONE* 5, e12873. doi: 10.1371/journal.pone.0012873
- Jiang, X., Clark, R. A., Liu, L., Wagers, A. J., Fuhlbrigge, R. C., and Kupper, T. S. (2012). Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* 483, 227–231.
- Kaufman, D. R., Bivas-Benita, M., Simmons, N. L., Miller, D., and Barouch, D. H. (2010). Route of adenovirus-based HIV-1 vaccine delivery impacts the phenotype and trafficking of vaccine-elicited CD8+ T lymphocytes. *J. Virol.* 84, 5986–5996.
- Keating, S. M., Bejon, P., Berthoud, T., Vuola, J. M., Todryk, S., Webster, D. P., et al. (2005). Durable human memory T cells quantifiable by cultured enzyme-linked immunospot assays are induced by heterologous prime boost immunization and correlate with protection against malaria. *J. Immunol.* 175, 5675–5680.
- Kohlmeier, J. E., Reiley, W. W., Perona-Wright, G., Freeman, M. L., Yager, E. J., Connor, L. M., et al. (2011). Inflammatory chemokine receptors regulate CD8+ T cell contraction and memory generation following infection. *J. Exp. Med.* 208, 1621–1634.
- Koup, R. A., Roederer, M., Lamoreaux, L., Fischer, J., Novik, L., Nason, M. C., et al. (2010). Priming immunization with DNA augments immunogenicity of recombinant adenoviral vectors for both HIV-1 specific antibody and T-cell responses. *PLoS ONE* 5, e9015. doi: 10.1371/journal.pone.0009015
- Kursar, M., Jnner, N., Pfeffer, K., Brinkmann, V., Kaufmann, S. H., and Mittrücker, H. W. (2008). Requirement of secondary lymphoid tissues for the induction of primary and secondary T cell responses against *Listeria monocytogenes*. *Eur. J. Immunol.* 38, 127–138.
- Lai, L., Kwa, S., Kozlowski, P. A., Montefiori, D. C., Ferrari, G., Johnson, W. E., et al. (2011). Prevention of infection by a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor co-expressing DNA/modified vaccinia Ankara simian immunodeficiency virus vaccine. *J. Infect. Dis.* 204, 164–173.
- Lakhashe, S. K., Velu, V., Sciaranghella, G., Siddappa, N. B., Dipasquale, J. M., Hemashettar, G., et al. (2011). Prime-boost vaccination with heterologous live vectors encoding SIV gag and multimeric HIV-1 gp160 protein: efficacy against repeated mucosal R5 clade C SHIV challenges. *Vaccine* 29, 5611–5622.
- Lasaro, M. O., and Ertl, H. C. (2009). New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Mol. Ther.* 17, 1333–1339.
- Letvin, N. L., Mascola, J. R., Sun, Y., Gorgone, D. A., Buzby, A. P., Xu, L., et al. (2006). Preserved CD4+ central memory T cells and survival in vaccinated SIV-challenged monkeys. *Science* 312, 1530–1533.
- Li, Q., Rao, R., Vazzana, J., Goedegebuure, P., Odunsi, K., Gillanders, W., et al. (2012). Regulating mammalian target of rapamycin to tune vaccination-induced CD8+ T cell responses for tumor immunity. *J. Immunol.* 188, 3080–3087.
- Li, S., Rodrigues, M., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Palese, P., et al. (1993). Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5214–5218.
- Liu, J., Ewald, B. A., Lynch, D. M., Denholtz, M., Abbink, P., Lemckert, A. A., et al. (2008). Magnitude and phenotype of cellular immune responses elicited by recombinant adenovirus vectors and heterologous prime-boost regimens in rhesus monkeys. *J. Virol.* 82, 4844–4852.
- Mackay, L. K., Stock, A. T., Ma, J. Z., Jones, C. M., Kent, S. J., Mueller, S. N., et al. (2012). Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 7037–7042.
- Magalhaes, I., Sizemore, D. R., Ahmed, R. K., Mueller, S., Wehlin, L., Scanga, C., et al. (2008). rBCG induces strong antigen-specific T cell responses in rhesus macaques in a prime-boost setting with an adenovirus 35 tuberculosis vaccine vector. *PLoS ONE* 3, e3790. doi: 10.1371/journal.pone.0003790
- Martinon, F., Brochard, P., Ripaux, M., Delache, B., Aurégan, G., Vaslin, B., et al. (2008). Improved protection against simian immunodeficiency virus mucosal challenge in macaques primed with a DNA vaccine and boosted with the recombinant modified vaccinia virus Ankara and recombinant Semliki Forest virus. *Vaccine* 26, 532–545.

- Martins, M. A., Wilson, N. A., Reed, J. S., Ahn, C. D., Klimentidis, Y. C., Allison, D. B., et al. (2010). T-cell correlates of vaccine efficacy after a heterologous simian immunodeficiency virus challenge. *J. Virol.* 84, 4352–4365.
- Masopust, D., Choo, D., Vezys, V., Wherry, E. J., Duraiswamy, J., Akondy, R., et al. (2010). Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J. Exp. Med.* 207, 553–564.
- Masopust, D., Ha, S. J., Vezys, V., and Ahmed, R. (2006). Stimulation history dictates memory CD8 T cell phenotype: implications for prime-boost vaccination. *J. Immunol.* 177, 831–839.
- Mattapallil, J. J., Douek, D. C., Buckler-White, A., Montefiori, D., Letvin, N. L., Nabel, G. J., et al. (2006). Vaccination preserves CD4 memory T cells during acute simian immunodeficiency virus challenge. *J. Exp. Med.* 203, 1533–1541.
- McConkey, S. J., Reece, W. H., Moorthy, V. S., Webster, D., Dunachie, S., Butcher, G., et al. (2003). Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nat. Med.* 9, 729–735.
- McShane, H., Brookes, R., Gilbert, S. C., and Hill, A. V. (2001). Enhanced immunogenicity of CD4+ T-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. *Infect. Immun.* 69, 681–686.
- Moore, A. C., and Hill, A. V. (2004). Progress in DNA-based heterologous prime-boost immunization strategies for malaria. *Immunol. Rev.* 199, 126–143.
- Moorthy, V. S., Imoukhuede, E. B., Milligan, P., Bojang, K., Keating, S., Kaye, P., et al. (2004). A randomised, double-blind, controlled vaccine efficacy trial of DNA/MVA ME-TRAP against malaria infection in Gambian adults. *PLoS Med.* 1, e33. doi: 10.1371/journal.pmed.0010033
- Mudd, P. A., and Watkins, D. I. (2011). Understanding animal models of elite control: windows on effective immune responses against immunodeficiency viruses. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 197–201.
- Murata, K., García-Sastre, A., Tsuji, M., Rodrigues, M., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., et al. (1996). Characterization of in vivo primary and secondary CD8+ T cell responses induced by recombinant influenza and vaccinia viruses. *Cell. Immunol.* 173, 96–107.
- Nigam, P., Earl, P. L., Americo, J. L., Sharma, S., Wyatt, L. S., Edghill-Spano, Y., et al. (2007). DNA/MVA HIV-1/AIDS vaccine elicits long-lived vaccinia virus-specific immunity and confers protection against a lethal monkeypox challenge. *Virology* 151, 73–83.
- Nolz, J. C., and Harty, J. T. (2011). Strategies and implications for prime-boost vaccination to generate memory CD8 T cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 780, 69–83.
- Peiperl, L., Morgan, C., Moodie, Z., Li, H., Russell, N., Graham, B. S., et al. (2010). Safety and immunogenicity of a replication-defective adenovirus type 5 HIV vaccine in Ad5-seronegative persons: a randomized clinical trial (HVTN 054). *PLoS ONE* 5, e13579. doi: 10.1371/journal.pone.0013579
- Pinschewer, D. D., Ochsenbein, A. F., Odermatt, B., Brinkmann, V., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (2000). FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory. *J. Immunol.* 164, 5761–5770.
- Pinto, A. R., Fitzgerald, J. C., Giles-Davis, W., Gao, G. P., Wilson, J. M., and Ertl, H. C. (2003). Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen through a prime boost regimen with heterologous E1-deleted adenoviral vaccine carriers. *J. Immunol.* 171, 6774–6779.
- Porter, D. W., Thompson, F. M., Berthoud, T. K., Hutchings, C. L., Andrews, L., Biswas, S., et al. (2011). A human phase I/IIa malaria challenge trial of a polypeptide malaria vaccine. *Vaccine* 29, 7514–7522.
- Pulko, V., Harris, K. J., Liu, X., Gibbons, R. M., Harrington, S. M., Krco, C. J., et al. (2011). B7-1 expressed by activated CD8 T cells is essential for their survival. *J. Immunol.* 187, 5606–5614.
- Purwar, R., Campbell, J., Murphy, G., Richards, W. G., Clark, R. A., and Kupper, T. S. (2011). Resident memory T cells (T(RM)) are abundant in human lung: diversity, function, and antigen specificity. *PLoS ONE* 6, e16245. doi: 10.1371/journal.pone.0016245
- Reyes-Sandoval, A., Berthoud, T., Alder, N., Siani, L., Gilbert, S. C., Nicosia, A., et al. (2010). Prime-boost immunization with adenoviral and modified vaccinia virus Ankara vectors enhances the durability and polyfunctionality of protective malaria CD8+ T-cell responses. *Infect. Immun.* 78, 145–153.
- Reyes-Sandoval, A., Wyllie, D. H., Bauza, K., Milicic, A., Forbes, E. K., Rollier, C. S., et al. (2011). CD8+ T effector memory cells protect against liver-stage malaria. *J. Immunol.* 187, 1347–1357.
- Rice, J., Ottensmeier, C. H., and Stevenson, F. K. (2008). DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 108–120.
- Rigato, P. O., De Alencar, B. C., De Vasconcelos, J. R. C., Dominguez, M. R., Araujo, A. F., Machado, A. V., et al. (2011). Heterologous plasmid DNA prime-recombinant human adenovirus 5 boost vaccination generates a stable pool of protective long-lived CD8+ T effector memory cells specific for a human parasite, *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 79, 2120–2130.
- Rodríguez, D., González-Aseguinolaza, G., Rodríguez, J. R., Vijayan, A., Gherardi, M., Rueda, P., et al. (2012). Vaccine efficacy against malaria by the combination of porcine parvovirus-like particles and vaccinia virus vectors expressing CS of *Plasmodium*. *PLoS ONE* 7, e34445. doi: 10.1371/journal.pone.0034445
- Rodrigues, M., Li, S., Murata, K., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Bacik, I., et al. (1994). Influenza and vaccinia viruses expressing malaria CD8+ T and B cell epitopes. Comparison of their immunogenicity and capacity to induce protective immunity. *J. Immunol.* 153, 4636–4648.
- Saade, F., and Petrovsky, N. (2012). Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 11, 189–209.
- Sadagopal, S., Amara, R. R., Kannanganat, S., Sharma, S., Chennareddi, L., and Robinson, H. L. (2008). Expansion and exhaustion of T-cell responses during mutational escape from long-term viral control in two DNA/modified vaccinia virus Ankara-vaccinated and simian-human immunodeficiency virus SHIV-89.6P-challenged macaques. *J. Virol.* 82, 4149–4153.
- Santra, S., Seaman, M. S., Xu, L., Barouch, D. H., Lord, C. I., Lifton, M. A., et al. (2005). Replication-defective adenovirus serotype 5 vectors elicit durable cellular and humoral immune responses in non-human primates. *J. Virol.* 79, 6516–6522.
- Schirmbeck, R., Reimann, J., Kochanek, S., and Kreppel, E. (2008). The immunogenicity of adenovirus vectors limits the multispecificity of CD8 T-cell responses to vector-encoded transgenic antigens. *Mol. Ther.* 16, 1609–1616.
- Schmidt, N. W., and Harty, J. T. (2011). Cutting edge: attrition of *Plasmodium*-specific memory CD8 T cells results in decreased protection that is rescued by booster immunization. *J. Immunol.* 186, 3836–3840.
- Schneider, J., Gilbert, S. C., Blanchard, T. J., Hanke, T., Robson, K. J., Hannan, C. M., et al. (1998). Enhanced immunogenicity for CD8 T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat. Med.* 4, 397–402.
- Schooley, R. T., Spritzler, J., Wang, H., Lederman, M. M., Havlir, D., Kuritzkes, D. R., et al. (2010). AIDS clinical trials group 5197: a placebo-controlled trial of immunization of HIV-1-infected persons with a replication-deficient adenovirus type 5 vaccine expressing the HIV-1 core protein. *J. Infect. Dis.* 202, 705–716.
- Sedegah, M., Jones, T. R., Kaur, M., Hedstrom, R., Hobart, P., Tine, J. A., et al. (1998). Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7648–7653.
- Selin, L. K., Lin, M. Y., Kraemer, K. A., Pardoll, D. M., Schneck, J. P., Varga, S. M., et al. (1999). Attrition of T cell memory: selective loss of LCMV epitope-specific memory CD8 T cells following infections with heterologous viruses. *Immunity* 11, 733–742.
- Selin, L. K., Vergilis, K., Welsh, R. M., and Nahill, S. R. (1996). Reduction of otherwise remarkably stable virus-specific cytotoxic T lymphocyte memory by heterologous viral infections. *J. Exp. Med.* 183, 2489–2499.
- Sheridan, B. S., and Lefrançois, L. (2011). Regional and mucosal memory T cells. *Nat. Immunol.* 12, 485–491.
- Streeck, H., and Nixon, D. F. (2010). T cell immunity in acute HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 202(Suppl. 2), S302–S308.
- Sun, Y., Schmitz, J. E., Buzby, A. P., Barker, B. R., Rao, S. S., Xu, L., et al. (2006). Virus-specific cellular immune correlates of survival in vaccinated monkeys after simian immunodeficiency virus challenge. *J. Virol.* 80, 10950–10956.
- Suthar, M. S., Ramos, H. J., Brassil, M. M., Netland, J., Chappell, C. P., Blahnik, G., et al. (2012). The RIG-I-like receptor LGP2 controls CD8+ T cell survival and fitness. *Immunity* 37, 235–248.
- Takai, S., Sabzevari, H., Farsaci, B., Schlom, J., and Greiner, J. W.

- (2012). Distinct effects of saracatinib on memory CD8⁺ T cell differentiation. *J. Immunol.* 188, 4323–4333.
- Tao, D., Barba-Spaeth, G., Rai, U., Nussenzweig, V., Rice, C. M., and Nussenzweig, R. S. (2005). Yellow fever 17D as a vaccine vector for microbial CTL epitopes: protection in a rodent malaria model. *J. Exp. Med.* 201, 201–209.
- Tatsis, N., Fitzgerald, J. C., Reyes-Sandoval, A., Harris-McCoy, K. C., Hensley, S. E., Zhou, D., et al. (2007). Adenoviral vectors persist in vivo and maintain activated CD8⁺ T cells: implications for their use as vaccines. *Blood* 110, 1916–1923.
- Vasconcelos, J. R., Bruña-Romero, O., Araújo, A. F., Dominguez, M. R., Ersching, J., de Alencar, B. C., et al. (2012). Pathogen-induced proapoptotic phenotype and high CD95 (Fas) expression accompany a suboptimal CD8⁺ T-cell response: reversal by adenoviral vaccine. *PLoS Pathog.* 8, e1002699. doi: 10.1371/journal.ppat.1002699
- Vezys, V., Yates, A., Casey, K. A., Lanier, G., Ahmed, R., Antia, R., et al. (2009). Memory CD8⁺ T-cell compartment grows in size with immunological experience. *Nature* 457, 196–199.
- Vijayan, A., Gómez, C. E., Espinosa, D. A., Goodman, A. G., Sanchez-Sampedro, L., Sorzano, C. O., et al. (2012). Adjuvant-like effect of vaccinia virus 14K protein: a case study with malaria vaccine based on the circumsporozoite protein. *J. Immunol.* 188, 6407–6417.
- Vojnov, L., Bean, A. T., Peterson, E. J., Chiuchiollo, M. J., Sacha, J. B., Denes, F. S., et al. (2011). DNA/Ad5 vaccination with SIV epitopes induced epitope-specific CD4⁺ T cells, but few subdominant epitope-specific CD8⁺ T cells. *Vaccine* 29, 7483–7490.
- Vuola, J. M., Keating, S., Webster, D. P., Berthoud, T., Dunachie, S., Gilbert, S. C., et al. (2005). Differential immunogenicity of various heterologous prime-boost vaccine regimens using DNA and viral vectors in healthy volunteers. *J. Immunol.* 174, 449–455.
- Wakim, L. M., Waithman, J., van Rooijen, N., Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2008). Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science* 319, 198–202.
- Wakim, L. M., Woodward-Davis, A., and Bevan, M. J. (2010). Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 17872–17879.
- Wakim, L. M., Woodward-Davis, A., Liu, R., Hu, Y., Villadangos, J., Smyth, G., et al. (2012). The molecular signature of tissue resident memory CD8⁺ T cells isolated from the brain. *J. Immunol.* 189, 3462–3471.
- Weant, A. E., Michalek, R. D., Khan, I. U., Holbrook, B. C., Willingham, M. C., and Grayson, J. M. (2008). Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8⁺ T cell contraction. *Immunity* 28, 218–230.
- Wiesel, M., Walton, S., Richter, K., and Oxenius, A. (2009). Virus-specific CD8⁺ T cells: activation, differentiation and memory formation. *APMIS* 117, 356–381.
- Wilks, A. B., Christian, E. C., Seaman, M. S., Sircar, P., Carville, A., Gomez, C. E., et al. (2010). Robust vaccine-elicited cellular immune responses in breast milk following systemic simian immunodeficiency virus DNA prime and live virus vector boost vaccination of lactating rhesus monkeys. *J. Immunol.* 185, 7097–7106.
- Wilson, N. A., Reed, J., Napoe, G. S., Piaskowski, S., Szymanski, A., Furlott, J., et al. (2006). Vaccine-induced cellular immune responses reduce plasma viral concentrations after repeated low-dose challenge with pathogenic simian immunodeficiency virus SIVmac239. *J. Virol.* 80, 5875–5885.
- Winstone, N., Guimarães-Walker, A., Roberts, J., Brown, D., Loach, V., Goonetilleke, N., et al. (2009). Increased detection of proliferating, polyfunctional, HIV-1-specific T cells in DNA-modified vaccinia virus Ankara-vaccinated human volunteers by cultured IFN- γ ELISPOT assay. *Eur. J. Immunol.* 39, 975–985.
- Winstone, N., Wilson, A. J., Morrow, G., Boggiano, C., Chiuchiollo, M. J., Lopez, M., et al. (2011). Enhanced control of pathogenic simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication in macaques immunized with an interleukin-12 plasmid and a DNA prime-viral vector boost vaccine regimen. *J. Virol.* 85, 9578–9587.
- Xiao, H., Peng, Y., Hong, Y., Liu, Y., Guo, Z. S., Bartlett, D. L., et al. (2011). Lentivector prime and vaccinia virus vector boost generate high-quality CD8⁺ memory T cells and prevent autochthonous mouse melanoma. *J. Immunol.* 187, 1788–1796.
- Yamamoto, T., Johnson, M. J., Price, D. A., Wolinsky, D. I., Almeida, J. R., Petrovas, C., et al. (2012). Virus inhibition activity of effector memory CD8⁺ T cells determines simian immunodeficiency virus load in vaccinated monkeys after vaccine breakthrough infection. *J. Virol.* 86, 5877–5884.
- Zavala, F., Rodrigues, M., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Nussenzweig, R. S., and Esteban, M. (2001). A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8⁺ T cells. *Virology* 280, 155–159.

Conflict of Interest Statement: Mauricio M. Rodrigues and Oscar Bruna-Romero are named inventors on patent applications covering *Trypanosoma cruzi* vectored vaccines and immunization regimens. The other authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 31 August 2012; paper pending published: 19 September 2012; accepted: 10 November 2012; published online: 04 December 2012.

Citation: Vasconcelos JR, Dominguez MR, Araújo AF, Ersching J, Tararam CA, Bruna-Romero O and Rodrigues MM (2012) Relevance of long-lived CD8⁺ T effector memory cells for protective immunity elicited by heterologous prime-boost vaccination. *Front. Immun.* 3:358. doi: 10.3389/fimmu.2012.00358

This article was submitted to *Frontiers in Immunological Memory*, a specialty of *Frontiers in Immunology*.

Copyright © 2012 Vasconcelos, Dominguez, Araújo, Ersching, Tararam, Bruna-Romero and Rodrigues. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.