MARYANNE MELANIE GONZALES CARAZAS

Papel de BIM na geração de linfócitos T $CD8^+$ antígeno-específicos, em resposta à vacinação com adenovírus recombinante

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

São Paulo
2017

MARYANNE MELANIE GONZALES CARAZAS

Papel de BIM na geração de linfócitos T $CD8^+$ antígeno-específicos, em resposta à vacinação com adenovírus recombinante

Dissertação apresentada ao Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Gustavo P. Amarante-Mendes

Versão original

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gonzales Carazas, Maryanne Melanie
Papel de BIM na geração de linfócitos T CD8+ antígeno-específicos, em resposta à vacinação com adenovírus recombinante / Maryanne Melanie Gonzales Carazas; orientador Gustavo Pessini Amarante-Mendes. -- São Paulo, 2017.
117 p.

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

1. : Linfócitos T CD8+. 2. Apoptose. 3. BIM. 4. Adenovírus. 5. Vacinação. I. Pessini Amarante-Mendes, Gustavo , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Maryanne Melanie Gonzales Carazas

Titulo da Dissertação/Tese: Papel de BIM na geração de linfócitos T $CD8^+$ antígeno-específicos, em resposta à vacinação com adenovírus recombinante

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pessini Amarante-Mendes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o (a) candidato (a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **110** nas fls. **23** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Gustavo P. Amarante-Mendes,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Papel de BIM na geração de linfócitos T CD8 antígeno-específicos, em resposta à vacinação com adenovírus recombinante*" do qual participam o(s) aluno(s) **Maryanne Melanie Gonzales Carazas** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **14.10.2014, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 14 de outubro de 2014.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

“[…] si para conseguir lo conseguido
tuve que soportar lo soportado, […]
tengo por bien sufrido lo sufrido,
tengo por bien llorado lo llorado.

Porque después de todo he comprobado
que no se goza bien de lo gozado
sino después de haberlo padecido.

Porque después de todo he comprendido
que lo que tiene el árbol de florido
vive de lo que tiene sepultado.”

(Francisco Luis Bernárdez)

À minha família: pais e irmã
Por terem desenhado as minhas raízes

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não é só produto do meu esforço pessoal, se não da contribuição de muitas pessoas, que colaboraram no meu desenvolvimento professional e pessoal. Através destas linhas gostaria de mostrar meu agradecimento a todas elas.

A minha família, meus pais Lidia e Jose, e minha irmã Evelyn por apoiar as minhas decisões apesar de que isso signifique ficar longe deles. Por estar perto embora eu esteja distante.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Amarante-Mendes, por ter me aceitado como membro do seu laboratório. Pela confiança e as lesões aprendidas.

Ao meu namorado Victor. Por ter me acompanhado todo este tempo longe de casa e ter sido minha família. E, especialmente, por todos aqueles momentos simples e cotidianos que se tornaram inesquecíveis.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Eliza, Priscila, Isabelinda, Esterzinha, Henry, Felipe, Aamir, Nath e Dani pela alegria e o conhecimento compartido. Por todas aquelas risadas, pelo carinho e os grandes abraços nestes últimos meses. Porque na sua companhia os experimentos pareciam menos longos, e porque, sem saberlo, se tornaram quase uma família para mim.

A Professora Jacquie, pela amizade, os ensinamentos, os conselhos e a ajuda, especialmente na reta final do mestrado.

Aos antigos membros do lab, especialmente a Marcela, Maria Emilia, Luciana, Tiago e Barbara, pelo conhecimento compartido e a amizade. Embora eu tenha chegado ao final do seu periodo no lab, gostei muito da sua companhia e guardo belas lembranzas do meu primeiro ano de mestrado ao lado de vocês.

Ao Prof. Dr. Bryan Strauss do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), por ter aberto as portas do seu laboratório para o desenvolvimento do vetor adenoviral. A seu aluno Sammir Andrade, pela paciência e ajuda no desenvolvimento desta ferramenta.

Ao Prof. Dr. Maurício Rodrigues (*in memoriam*) do Centro de Terapia Celular e Molecular (CTCMol-UNIFESP), por ter aceitado a colaboração no desenvolvimento

da partícula adenoviral. A suas alunas Priscila Denapoli e Marina Gimenez, pelos ensinamentos e acompanhamento neste processo.

Ao Prof. Dr. Ronnie Vasconcelos do Laboratorio de Imunologia Molecular (UNIFESP), por ter disponibilizado alguns reagentes para o desenvolvimento deste projeto. A sua aluna Camila Ferreira, pela ajuda e as conversas de ciência, vida e os sonos.

Aos professores que conformaram minha banca de qualificação, do PAE e das disciplinas que cursei. Por terem compartido comigo sua visão de imunologia, acredito que seus ensinamentos foram fundamentais para minha formação nesta area.

A todo o departamento da imuno, porque as pessoas que trabalham nele fizeram, desde o começo, me sentir confortável.

Aos meus amigos do grupo Hamutay – Young Peruvian Network for Bioscience Research, por ter me ensinado a importância de compatilhar o conhecimento e ter me dado a oportunidade de formar parte de este grande projeto. Pela confianza, amizade, e por ter me trazido um pouco do nosso país. Foi formidável poder contar com vocês.

Às amizades que não foram mencionadas, mas que me acompanharam nestes dois anos longe de casa. Obrigada pelas conversas, brincadeiras, risadas, as festas e as comidas que animaram meus dias.

A minha amiga Yajahaira, por estar sempre ali desde há oito anos. Por me fazer sentir que este tempo longe não reduziu o carinho entre nós.

A Universidade de São Paulo (USP) pelo suporte estrutural.

Agradeço a agencia de fomento CAPES pelo suporte financieiro concedido no âmbito do Programa de Excelência Acadêmica (Proex) durante o período de outubro de 2014 a setembro de 2016.

"Há muitas pessoas de visão perfeita que nada vêem...
O ato de ver não é coisa natural.
Precisa ser aprendido!"

Rubem Alves

RESUMO

Gonzales-Carazas M. Papel de BIM na geração de linfócitos T $CD8^+$ antígeno-específicos, em resposta à vacinação com adenovírus recombinante. [Dissertação (Mestrado em Imunologia)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2017.

BIM é uma proteína membro da família Bcl-2, da subfamília BH3-only, a qual induz a apoptose através da via intrínseca. No sistema imune, BIM tem sido descrita como reguladora da homeostase de linfócitos, sendo chave para a eliminação de células T antígeno-específicas no final da resposta imune, fenómeno conhecido como ACAD (*activated T cell autonomous death*). Porém, ainda não foi estudado o papel do BIM no estabelecimento de respostas imunitárias específicas mediadas por linfócitos T $CD8^+$, particularmente aquelas desencadeadas após estratégias de vacinação. Para a ativação destes linfócitos os vetores adenovirais representam uma boa alternativa que vem sendo utilizada para o desenvolvimento de vacinas devido a sua seguridade e a forte resposta celular antígeno-específica que induzem. Dessa forma, neste trabalho investigamos o papel de BIM na qualidade e freqüência de linfócitos T $CD8^+$ estimulados com um vector adenoviral portador do gene de ovalbumina (Ad.cOVA). Em uma primeira etapa, técnicas de clonagem de genes e DNA recombinante foram aplicadas para construir o vector adenoviral portador do gene cOVA. Posteriormente a partícula adenoviral produzida foi testada, observando-se uma forte indução da resposta citotóxica específica contra OVA. Assim, a dose de 2 x 10^6 PFU / 100 µl foi utilizada para imunizar camundongos C57Bl/6 selvagens, *bim*$^{+/-}$ e *bim*$^{-/-}$. Sete dias após a imunização, foram avaliadas as capacidades efetoras dos linfócitos T $CD8^+$ destes camundongos, observando-se uma redução da lise específica, assim como uma menor freqüência de linfócitos $CD8^+$ produtores de IFNγ nos linfócitos correspondentes a camundongos *bim*$^{-/-}$. Adicionalmente, foi avaliada a resposta imune antitumoral destes camundongos transgênicos. Para isso, os animais foram imunizados e, sete dias depois, desafiados com células tumorais Tm1.cOVA (*s.c.* 2.5 x 10^5 células / 100 µl). O monitoramento do crescimento tumoral com paquímetro indicou que a vacinação com Ad.cOVA induz proteção contra o desenvolvimento do tumor de forma similar para camundongos selvagens e *bim*$^{-/-}$. O estudo da cinética da resposta citotóxica induzida pela vacinação com Ad.cOVA em camundongos *bim*$^{-/-}$ mostrou que a perda das capacidades efetoras se produz em uma taxa menor à observada em camundongos selvagens. Assim, aparentemente, existiria uma compensação entre a reduzida função efetora desenvolvida por linfócitos T $CD8^+$ de camundongos *bim*$^{-/-}$ e o acúmulo de linfócitos efetores durante o controle da progressão tumoral. Em conjunto, nossos resultados indicam que camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentam uma menor freqüência de linfócitos T $CD8^+$ com capacidade efetora, o que sugere um importante papel de BIM na produção de linfócitos T $CD8^+$ antígeno-específicos após vacinação com Ad.cOVA.

Palavras-chave: Linfócitos T $CD8^+$. Apoptose. BIM. Adenovírus. Vacinação.

ABSTRACT

Gonzales-Carazas M. Role of BIM in the generation of antigen-specific $CD8^+$ T lymphocytes in response to vaccination with recombinant adenovirus. Master thesis [(Immunology Program)]. - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2017.

BIM is a BH3-only member of the Bcl-2 family that induces apoptosis via the intrinsic pathway. In the immune system, BIM has been described as lymphocyte homeostasis regulator and a key protein for the elimination of antigen-specific T cells at the end of the immune response, a phenomenon known as ACAD (activated T cell autonomous death). However, we still poorly understand the role of BIM in the establishment of specific CD8-mediated immune response, particularly those triggered by vaccination strategies. For $CD8^+$ T lymphocytes activation the adenoviral vectors represent a good alternative that has been used for the development of vaccines due to their safety and the strong antigen-specific cellular response that they induce. Therefore, in this work we investigated the role of BIM in the quality and frequency of $CD8^+$ T lymphocytes stimulated with an adenoviral vector carrying the ovalbumin gene (Ad.cOVA). In a first step, gene cloning and recombinant DNA techniques were applied to construct the adenoviral vector carrying the cOVA gene. Subsequently, the adenoviral particle was tested, observing a strong induction of the specific cytotoxic response against OVA. Thus, the dose of 2×10^6 PFU / 100 µl) was used to immunize wild-type, *bim*$^{+/-}$ and *bim*$^{-/-}$ C57Bl/6 mice. Seven days after the immunization, the effector capacities of the $CD8^+$ T lymphocytes of these mice were evaluated, showing a reduction of the specific lysis, as well as a lower frequency of IFNγ produced $CD8^+$ T lymphocytes corresponding to *bim*$^{-/-}$ mice. Also, the antitumor immune response of these transgenic mice was evaluated. For this, the animals were immunized and, seven days later, challenged with Tm1.cOVA tumor cells (*s.c.* 2.5×10^5 cells / 100 µl). Monitoring of tumor growth with pachymeter indicated that vaccination with Ad.cOVA induces protection against tumor development similarly for wild-type and *bim*$^{-/-}$ mice. The study of the kinetics of the cytotoxic response induced by vaccination with Ad.cOVA in *bim*$^{-/-}$ mice showed that the loss of effector capacities occurs at a lower rate than that observed in wild mice. Consequently, there appears to be an offset between the reduced effector function developed by $CD8^+$ T lymphocytes from *bim*$^{-/-}$ mice and the accumulation of effector lymphocytes during tumor progression control. Taken together, our results indicate that *bim*$^{-/-}$ mice show a lower frequency of $CD8^+$ T lymphocytes with effector capacity, which suggests an important role of BIM in the production of antigen-specific $CD8^+$ T lymphocytes after vaccination with Ad.cOVA.

Keywords: $CD8^+$ T lymphocytes. Apoptosis. BIM. Adenovirus. Vaccination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de morte celular por apoptose.....27

Figura 2 - Organização dos domínios de vários membros da família Bcl-2.....29

Figura 3 - A estrutura genética de bim e as principais isoformas transcritas.....31

Figura 4 - Mapa do vetor base pCl-neo-cOVA. 38

Figura 5 - Mapa do vetor de entrada pENTR2BΔ. 40

Figura 6 - Mapa do vetor destino pAd/CMV/V5-DEST. 42

Figura 7 - Esquema da diluição viral com fator 10. 48

Figura 8 - Genotipagem de camundongos BIM. 53

Figura 9 - Geração da linhagem de camundongos C57Bl/6 OTI bim$^{-/-}$. 54

Figura 10 - Isolamento do gene de cOVA. 64

Figura 11 - Simulação in silico da clonagem do gene cOVA no vetor pENTR 2BΔ . .66

Figura 12 - Avaliação da clonagem de cOVA no vetor pENTR 2BΔ. 67

Figura 13 - Simulação in silico das possíveis orientações do inserto de cOVA no vetor pENTR2BΔ-cOVA e os pontos de digestão com as enzimas XhoI e SacI. 68

Figura 14 - Orientação correta do inserto cOVA no vetor pEntry2BΔ-cOVA. 68

Figura 15 - Mapa de restrição para XhoI do vetor destino (pAd/CMV/V5-DEST) e do vetor de expressão (pAd.cOVA). 70

Figura 16 - Avaliação da clonagem de cOVA no vetor destino pAd/CMV/V5-DEST. 71

Figura 17 - Digestão com PacI do vetor adenoviral pAd.cOVA. 72

Figura 18 - Resultados da transfecção do plasmídeo controle pMAXGFP em células 293A. 74

Figura 19 - Células 293A transduzidas com partículas adenovirais obtidas do lisado de células transfectadas. 75

Figura 20 - Formação de placas de lise em células 293A após o cultivo com diferentes diluições de Ad.cOVA. 76

Figura 21 - A resposta citotóxica induzida pela imunização com Ad.cOVA é antígeno-específica. 78

Figura 22 - Curva dose-respota para estimulação da resposta imune citotóxica com Ad.cOVA. 80

Figura 23 - Camundongos bim$^{-/-}$ apresentam eliminação deficiente das células pulsadas. 82

Figura 24 - Freqüência de células produtoras de IFNγ em camundongos bim$^{-/-}$ observadas pelo ensaio de ELISPOT. 84

Figura 25 - Freqüência de linfócitos T CD8^{+} produtores de IFNγ em camundongos bim$^{-/-}$. 85

Figura 26 - Células tumorais de melanoma que não expressam OVA (Tm1.Luc) não apresentam diferenças no padrão de crescimento tumoral produto da imunização com Ad.cOVA. 87

Figura 27 - Células tumorais de melanoma que expressam OVA (Tm1.Luc.cOVA) mostram diferenças no padrão de crescimento tumoral produto da imunização com Ad.cOVA. 88

Figura 28 - Camundongos C57Bl/6 selvagens e bim$^{-/-}$ não apresentam diferenças no controle da progressão tumoral após imunização com Ad.cOVA. 89

Figura 29 - Cinética da resposta imune citotóxica mediada por linfócitos T CD8^{+} depois da vacinação de camundongos bim$^{-/-}$ com Ad.cOVA. 91

Figura 30 - Proliferação de linfócitos T CD8^{+} estimulada após a vacinação com Ad.cOVA. 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de vacinas utilizadas para ativação da resposta dos linfócitos T $CD8^+$, e a imunidade que produzem 19

Tabela 2 - Vacinas de adenovírus recombinante atualmente testadas em estudos clínicos. 20

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento do gene de ovalbumina presente no vetor pAd.cOVA..... 44

Tabela 4 - Seqüência dos oligonucleotidos para genotipagem de camundongos bim$^{-/-}$. 52

Tabela 5 - Bandas esperadas da digestão de pEntry2BΔ e pEntr2BΔ-cOVA com EcoRI..... 66

Tabela 6 - Bandas esperadas da digestão de pEntry2BΔ-cOVA com XhoI e SacI. 68

Tabela 7 - Padrão de bandas esperadas da digestão de pAd/CMV/V5-DEST e pAd.cOVA com XhoI...... 71

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO 18

1.1 ADENOVIRUS COMO FERRAMENTAS PARA A ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS T CD8$^+$ 19
1.2 RESPOSTA EFETORA DOS LINFÓCITOS T CD8$^+$ 23
1.3 REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE GERADA PELOS LINFÓCITOS T CD8$^+$ 25
1.4 A VIA INTRÍNSECA DA APOPTOSE 26
1.5 FAMÍLIA DE PROTEÍNAS BCL-2.....28
1.6 A PROTEÍNA BIM 30

2 OBJETIVOS.....35

2.1 OBJETIVO GERAL 36
2.2 METAS ESPECÍFICAS.....36

3 MATERIAL E MÉTODOS 37

3.1 ISOLAMENTO DA SEQÜÊNCIA DA OVALBUMINA 38
3.1.1 TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE ELÉTRICO E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....38
3.1.2 DIGESTÃO DO DNA PLASMIDIAL.....39
3.1.3 ELETROFORESE E PURIFICAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DA COVA 39
3.2 CLONAGEM DA COVA NO VETOR DE ENTRADA PENTR2BΔ 39
3.2.1 DIGESTÃO DO VETOR PENTR2BΔ.....39
3.2.2 PURIFICAÇÃO DO VETOR PENTR2BΔ 40
3.2.3 LIGAÇÃO DO VETOR PENTR 2BΔ E COVA 40
3.2.4 TRANSFORMAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO PLASMÍDEOS PENTR2BΔ-COVA.....41
3.2.5 CONFIRMAÇÃO DOS PRODUTOS DA LIGAÇÃO 41
3.3 RECOMBINAÇÃO DO VETOR PENTR2BΔ-COVA COM O VETOR ADENOVIRAL PAD/CMV/V5-DEST.....41
3.3.1 RECOMBINAÇÃO DO VETOR PENTR2BΔ-COVA COM O VETOR PAD/CMV/V5-DEST 41
3.3.2 TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO 42
3.4 CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM NO VETOR PAD.COVA 43
3.4.1 SEQUENCIAMENTO DE DNA PLASMIDIAL CLONADO 43
3.5 PRODUÇÃO DA PARTÍCULA VIRAL 44
3.5.1 TRANSFECÇÃO DE PAD.COVA EM CÉLULAS 293A.....44
3.5.2 TRANSDUÇÃO VIRAL.....45
3.5.3 PRODUÇÃO DO ESTOQUE VIRAL 46
3.5.4 PURIFICAÇÃO DE ADENOVÍRUS EM GRADIENTE DE CLORETO DE CÉSIO.....46
3.5.5 TITULAÇÃO DE ESTOQUES DE ADENOVÍRUS RECOMBINANTES.....47

3.6 CULTIVO DE CÉLULAS 293A 49
3.6.1 DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS 293A 49
3.6.2 REPIQUE DE CÉLULAS 293A 49
3.6.3 CONGELAMENTO DE CÉLULAS 293A 50
3.7 PADRONIZAÇÃO DA DOSE VIRAL 50
3.8 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO 51
3.8.1 GERAÇÃO DE CAMUNDONGOS BIM$^{-/-}$ 51
3.8.2 GENOTIPAGEM DE CAMUNDONGOS BIM$^{+/-}$ E BIM$^{-/-}$ 51
3.8.3 GERAÇÃO DA LINHAGEM C57BL/6 OTI BIM$^{-/-}$ 53
3.8.4 FENOTIPAGEM DE CAMUNDONGOS OTI BIM$^{-/-}$ 54
3.9 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CITOTÓXICA 55
3.9.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VIVO 55
3.9.2 ENSAIO DE ELISPOT PARA IFNγ 57
3.9.3 MARCAÇÃO INTRACELULAR PARA IFNγ 58
3.9.4 AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO TUMORAL 59
3.9.5 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO IN VIVO 60
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 61

4 RESULTADOS 62

4.1 PRODUÇÃO DO VETOR ADENOVIRAL 63
4.1.1 ISOLAMENTO DO GENE DE COVA 64
4.1.2 CLONAGEM DA SEQÜÊNCIA COVA NO VETOR DE ENTRADA PENTR2BΔ 64
4.1.3 CLONAGEM DE COVA NO GENOMA ADENOVIRAL PAD/CMV/V5-DEST 69
4.1.4 TRANSFECÇÃO DO PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO PAD.COVA EM CÉLULAS 293A 71
4.1.5 TRANSDUÇÃO DE CÉLULAS 293A 74
4.1.6 TITULAÇÃO DA PARTÍCULA ADENOVIRAL 76
4.2 PADRONIZAÇÃO DA DOSE VIRAL PARA ESTIMULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE *IN VIVO* 77
4.2.1 EFETIVIDADE E ESPECIFICIDADE DA VACINA ADENOVIRAL 77
4.2.2 A RESPOSTA IMUNE CITOTÓXICA INDUZIDA POR AD.COVA É DEPENDENTE DA DOSE DE VACINAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTÍDEO PULSADA NAS CÉLULAS-ALVO DURANTE O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VIVO. 79
4.3 CAMUNDONGOS *BIM$^{-/-}$* APRESENTAM LISE DEFICIENTE DAS CÉLULAS PULSADAS COM PEPTÍDEO DE OVA DURANTE O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE *IN VIVO*. 81
4.4 CAMUNDONGOS *BIM$^{-/-}$* APRESENTAM UMA BAIXA FREQÜÊNCIA DE LINFÓCITOS T CD8^{+} PRODUTORES DE IFNγ 83
4.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTITUMORAL DESENVOLVIDA PELOS CAMUNDONGOS *BIM$^{-/-}$* 86
4.6 CINÉTICA DA RESPOSTA CITOTÓXICA DESENCADEADA PELOS LINFÓCITOS T CD8^{+} EM CAMUNDONGOS *BIM$^{-/-}$*. 90
4.7 TRANSFERÊNCIA ADOPTIVA DE ESPLENÓCITOS OTI E OTI *BIM$^{-/-}$*, PARA AVALIAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO APÓS O ESTIMULO COM AD.COVA. 92

5 DISCUSSÃO **95**

6 CONCLUSÕES **103**

REFERÊNCIAS * **105**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Adenovirus como ferramentas para a ativação dos linfócitos T CD8$^+$

Os linfócitos T CD8$^+$, ou também denominados linfócitos T citotóxicos (*cytotoxic T lymphocytes* - CTLs), são células do sistema imune adaptativo, as quais estão encarregadas de proteger ao organismo contra patógenos intracelulares. Dessa forma, os linfócitos T CD8$^+$ tem a capacidade de reconhecer e eliminar células infectadas por vírus (1), bactérias e parasitas intracelulares (2). Além disso, estes linfócitos podem reconhecer células mutadas, e induzir a eliminação destas, evitando assim o surgimento de tumores (3).

Tendo em consideração a importância dos linfócitos T CD8$^+$ para o controle de infecções virais e a progressão do cancer, diversos tipos de vacinas têm sido desenhadas visando a ativação destas células, algumas das quais são relatadas na **Tabela 1**. Sendo que a indução da resposta dos linfócitos T citotóxicos é restrita ao complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) (4), os protocolos de vacinação que induzem a expressão endógena do antígeno de interesse são os mais sucedidos; já que a apresentação de peptídeos endogenos nas moléculas de MHC-I resulta mais eficiente do que a apresentação cruzada de um antígeno exogeno (5). Dessa forma, os vetores virais vivos se mostram como ferramentas promissórias para uma forte ativação dos linfócitos T CD8$^+$. Assim, diversos tipos de estes vetores (adenovírus, virus adeno-associados, herpesvirus, poxvirus) têm sido utilizados em protocolos de imunização, sendo muitos deles redesenhados com o fim de melhorar a imunogenicidade assim como a seguridade que oferecem (6).

Tipo de vacina	Linfócitos T CD4$^+$	Linfócitos T CD8$^+$	Anticorpos
Vetores virais vivos	+++	+++	+++
Vetores bacterianos vivos	+++	+	+++
Pseudoviriones	++	-	+++
Replicones	++	++	++
Plasmídeos de DNA	++	+	+
Proteinas viaris	++	-	+++
Peptídeos	++	++	-

Tabela 1 - Tipos de vacinas utilizadas para ativação da resposta dos linfócitos T CD8$^+$, e a imunidade que produzem
Mostra-se um esquema comparativo dos tipos de vacinas utilizadas para estimular a resposta mediada por linfócitos T CD8$^+$. A pesar de que algumas conseguiram ativar fortemente a resposta de linfócitos T CD4$^+$, não conseguiram induzir a ativação de linfócitos T CD8$^+$. (Adaptado de Koup & Bouek, 2011)

Na ultima década os vetores adenovirais tem sido utilizados em diversos protocolos de imunização, chegando a ser inclusos como instrumentos vacinais em estudos clínicos para o tratamento de doenças como HIV, câncer e tuberculose (**Tabela 2**). A crescente aplicabilidade deste tipo de vacinas em doenças infecciosas e câncer se deve a suas dois principais caraterísticas: a seguranza e a forte ativação dos linfócitos T $CD8^+$ contra o inserto de interesse que induzem; além de outras qualidades, como: a capacidade para carregar sequencias de elevado peso molecular, a elevada indução de expressão do trangene, a abilidade para se multiplicar e produzir elevados títulos *in vitro*, a não-intergração no genoma do hospedeiro, e a estabilidade física e genética (6).

Doença	Vacina adenoviral	Fase do estudo clínico	Referência
Câncer de próstata	Ad5-SGE-REIC/Dkk3	1/2	(7)
Tuberculose	Ad5Ag85A	1	(8)
AIDS	Ad5-gag	1	(9)
Derrame pleural maligno	rAdp53	2	(10)

Tabela 2 - Vacinas de adenovírus recombinante atualmente testadas em estudos clínicos. Lista de algumas vacinas adenovirais utilizadas em diversos estudos clínicos, em processos atualmente abertos, para o tratamento de doenças infeciosas, alguns tipos de câncer, entre outras. Mostra-se o nome da vacina adenoviral e a fase de estudo clínico.

Os vetores adenovirais utilizados no desenvolvimento de vacinas são ferramentas seguras, uma vez que possuem uma incapacidade intrínseca para autorreplicar-se. Essa incapacidade para multiplicar-se se deve à eliminação das seqüências E1 do genoma adenoviral. As sequencias E1 correspondem aos genes de transição precoce, os quais codificam proteínas necessárias para iniciar a replicação viral (11). Desta forma, na ausência das seqüências E1, o vírus não possui a informação genética requerida para produzir novas partículas virais nas células infetadas, evitando assim a possibilidade de propagação da infeção.

Apesar da falta de replicação destes vetores, foi observado que seu genoma permanece transcripcionalmente ativo no local de imunização (12). Desta forma, a presença constante dos produtos do transgêne consegue manter uma alta freqüência de linfócitos T $CD8^+$ efetores (12,13), e ao mesmo tempo, permite a produção de linfócitos T $CD8^+$ de memoria (12,14). Entretanto, essa deficiência na replicação também esta relacionada com a alta especificidade da respota imune gerada contra o inserto durante a vacinação com partículas adenovirais, uma vez que a falta de replicação impede a produção de proteínas virais, evitando assim a competição por epitopos imunogênicos presentes no vetor viral (15).

A capacidade dos adenovírus para gerar uma forte ativação dos linfócitos T $CD8^+$ tem sido amplamente descrita (5,16). Um dos motivos que conduz a esta forte resposta celular é a própria estrutura da partícula adenoviral. Assim, foi descrito que as proteínas *hexon*, constituintes da cápside dos vetores adenovirais, podem servir como potentes adjuvantes que contribuem no recrutamento de células do sistema imune ao local de inoculação (17). Nesse sentido, foi observado que este tipo de vacina induz a migração de um grande número de células apresentadoras de antígeno profissionais (*Antigen Presenting Cells*– APC) para o sitio de infeção (18); as quais, uma vez no linfonodo, ativam os linfócitos T CD8+ através da apresentação do antígeno associado ao complexo MHC-I e a interação com moléculas co-estimuladoras, como CD80 / CD86 (19). Em relação a isso, estudos anteriores demonstraram que após a vacinação com adenovírus recombinante é induzida a expressão do antígeno de interesse tanto no local de inoculação, quanto nos linfonodos drenantes (18). Sendo que esse último evento não foi observado depis da vacinação realizada com outros vetores virais (18). Dessa forma, os vetores adenovirais se mostraram como grandes imunógenos, que geram inicialmente uma potente ativação das células do sistema imune inato, o qual se reflete na robusta resposta imune adatativa observada após a vacinação com estas particulas.

Enfim, todas estas caraterísticas contribuem a induzir a forte resposta de infócitos T $CD8^+$ observada após a vacinação com adenovírus recombinante; a qual privilegia o reconhecimento do antígeno recombinante, e não dos antígenos virais. Os motivos expostos previamente justificam a produção da vacina adenoviral Ad.cOVA, e sua aplicação como ferramenta para induzir a ativação dos linfócitos T $CD8^+$ específicos neste estudo.

1.1 Ativação dos linfócitos T CD8$^+$

Assim, após a vacinação ou durante a ocorrência de alguma infecção viral, as APCs, como podem ser macrófagos, linfócitos B ou células dendriticas (*dendritic cells* – DC) (20), reconhecem e fagocitam os agentes estranhos. Posteriormente, estas células migram para os órgãos linfóides periféricos (linfonodos ou baço) onde estimulam a ativação linfocitária através da apresentação de antígenos estranhos na superfície celular (21). Esta apresentação do peptídeo antigênico é realizada através das moléculas do MHC-I presentes na superfície das APC. Esta estreita interação produzida entre o linfócito T e a APC permite a transmissão de sinais entre essas duas células do sistema imune e, portanto,recebe o nome de sinapse imunológica (22).

Apesar das células do sistema imune formar interações mais transitórias quando comparadas com as sinapses neurais, estas são igualmente estruturadas e essenciais para a ativação celular (23). Nesse sentido, as proteínas que participam da sinapse imunológica encontram-se organizadas em três grupos conhecidos como complexos supramoleculares de ativação (*supramolecular activation clusters* - SMAC) (24). Estes SMAC estão situados de forma concêntrica na membrana da célula, e dependendo de sua localização podem ser denominados como SMAC central (cSMAC), SMAC periférico (pSMAC) ou SMAC distal (dSMAC).

No linfócito T citotóxico, o cSMAC é conformado pelos receptores de células T (TCR). Assim, o cSMAC é responsável pela especificidade da resposta citotóxica desencadeada, uma vez que a união do TCR às moléculas do MHC-I depende da afinidade deste com peptídeo antigênico apresentado (4,25). Seguidamente, o anel que forma o pSMAC esta constituído por moléculas de adesão celular, como LFA-1 ou CD2, as quais reconhecem seu par localizado na APC, a molécula ICAM-1 ou CD58, respectivamente. Dessa forma,o pSMAC é responsável da ligação inicial entre o linfócitos T CD8$^+$ e a APC, acrescentando assim a probabilidade de reconhecimento entre o TCR e MHC. Finalmente, o dSMAC apresenta moléculas co-estimuladoras, como CD28. As quais, uma vez que reconhecem seus ligantes na APC, como CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2), são as responsáveis de aumentar os sinais induzidos pelo TCR ativado (26).

Os linfócitos T naïve que recirculam pelo sangue e linfa na procura de moléculas de MHC ligadas a um peptídeo específico (pMHC-I) são estimulados de forma inicial pelas quimiosinas do microambiente tecidual. Estas citocinas induzem a expressão de LFA-1 na membrana dos linfócitos T $CD8^+$ naïves, estabelecendo um baixo nível de adesão transitória. Dessa forma, as moléculas de adesão acrescentam as chances do TCR detetar o pMHC. Uma vez ativado o TCR, a expressão de LFA-1 na superfície celular pode aumentar, promovendo a formação da sinapse imunológica. Posterior à ativação do TCR, é induzido um incremento da expressão das moléculas co-estimuladoras na membrana celular dos linfócitos T $CD8^+$. Assim, moléculas como CD28 interagem com seus ligandos de uma forma dependente do TCR permitindo a conversão do linfócito naïve para um linfócito efetor (27). Porém tem sido descrito que a completa ativação dos linfócitos T $CD8^+$ requer a indução de outros sinais. Estes sinais são fornecidos através da interação dos linfócitos T citotóxicos com as citocinas produzidas por outras células do sistema imune, como IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, e TNF-α (28).

Uma vez recebidas estas sinais os linfócitos T $CD8^+$ passam por etapas de proliferação, ativação e diferenciação. Durante as quais estas células adquirem suas funções efetoras. Posteriormente, os linfócitos efetores migram dos órgãos linfóides para a periferia (29), onde podem participar diretamente da resposta imunológica contra o antígeno. Uma vez no tecido, as células apresentam na sua superfície as moléculas de MHC-I ligadas a peptídeos derivados da degradação das proteínas intracelulares. Desta forma, as células infectadas ou transformadas disponibilizam uma amostra das proteínas procedentes dos organismos intracelulares ou das estruturas internas mutadas. Conseqüentemente, os linfócitos T $CD8^+$ específicos para os antígenos apresentados conseguem reconhecê-los e induzir a eliminação da célula-alvo.

1.2 Resposta efetora dos linfócitos T $CD8^+$

Os linfócitos T $CD8^+$ ativados têm a capacidade de eliminar, de forma seletiva, as células infectadas ou malignizadas, sem danificar o tecido saudável. Para

conseguir isto, estes linfócitos possuem mecanismos efetores potentes e bem direcionados, através dos quais conseguem induzir apoptose nas células-alvo (30).

Para a indução de apoptose na célula-alvo, os linfócitos T $CD8^+$ ativados dispõem de dois mecanismos de ação (31). O principal deles opera através da liberação de grânulos líticos, os quais são secretados após o reconhecimento de um antígeno específico na superfície da célula-alvo. Estruturalmente, esses grânulos são lisossomos modificados que contêm proteínas citotóxicas, como perforinas e diversos tipos de granzimas (30). Essas moléculas são rapidamente sintetizadas nas primeiras etapas da ativação linfocitária, durante a maturação celular induzida pela apresentação antigênica nos órgãos linfóides, e encontram-se armazenadas na forma ativa nos grânulos líticos no citoplasma das células T $CD8^+$ efetoras (32). Durante a interação com a célula-alvo, a célula efetora citotóxica libera o conteúdo dos grânulos citoplasmáticos de forma dirigida ao espaço intercelular. Uma vez liberada, a perforina sofre uma modificação conformacional induzida pelos íons de Ca^{+2} (32,33), que permite sua polimerização e integração com a membrana da célula-alvo (32,34). Essa integração com a membrana celular é realizada através de uns domínios homólogos ao complexo de ataque a membrana da proteína C9 (MAC) do complemento, sendo que para perforina este domínio recebe o nome de MACPF (*Membrane-Attack-Complex-Perforin Domain*). Assim, os domínios MACPF permitem a formação de poros na membrana de células infectadas. A presença de estes poros na célula-alvo permite a desregulação osmótica desta, e ao mesmo tempo facilita a passagem das granzimas ao interior da célula (35). As granzimas A e B são serina proteases linfocítica, as quais tem a capacidade de induzir morte na celular alvo pela ativação de proteínas relacionadas à degradação do DNA e apoptose, ou outra via de morte (36,37).

O segundo mecanismo de indução de morte de células infectadas ou transformadas usado pelos linfócitos T $CD8^+$ é realizado via interação dos receptores de morte Fas (CD95) e FasL (CD95L). Fas/FasL são moléculas pertencentes à família do TNF e do seu receptor, e apresentam na sua composição domínios transmembrana que permitem a transdução de sinais do meio exterior ao interior da célula (38). FasL é sintetizado nos linfócitos T $CD8^+$ algumas horas depois da ativação realizada pela sinapses imunológica com a APC. Uma vez presente na superfície das células T, FasL é capaz de interagir com seu receptor (Fas), expresso

nas células-alvo constitutivamente. A união dessas duas moléculas leva à citólise por meio da ativação da via extrínseca da apoptose (39).

Adicionalmente, os linfócitos T $CD8^+$ possuem mecanismos não citolíticos que contribuem no controle de infecções por parasitas intracelulares além de controlar o estabelecimento das células mutadas. Estes mecanismos são desenvolvidos através da síntese e secreção de citocinas como IFN-γ, TNF-α e TNF-β, e tem a capacidade de atuar tanto de forma local como sistêmica. Estudos da ação destas três citocinas mostram sua participação durante a resposta antiviral, regulando a inibição da replicação viral (40), e contribuindo na destruição do microambiente tumoral (41). Também tem sido descrito que o IFN-γ atua favorecendo a via de apresentação de antígenos pelos MHC de classe I, acrescentando assim a probabilidade de reconhecimento de antígenos estranhos (42). Além disso, IFN-γ contribui no recrutamento de macrófagos ao local de infecção, e em conjunto com TNF-α e TNF-β podem induzir a ativação destes. Estas duas últimas citocinas também têm a capacidade de induzir a morte de células-alvo através da ligação ao receptor TNFR-I.

1.3 Regulação da resposta imune gerada pelos linfócitos T $CD8^+$

Durante a ativação dos linfócitos T $CD8^+$ ocorre a maturação e proliferação daqueles clones que apresentam especificidade para o antígeno apresentado. Uma vez que o antígeno é eliminado, o sistema imune volta às condições iniciais através de um processo denominado contração linfocitária. Assim, tem sido observado que após o pico de expansão linocitaria, ao redor de 95% dos linfócitos ativados morrem por apoptose, restando apenas os linfócitos T $CD8^+$ de memória que persistem de forma estável ao longo do tempo (43). Essa eliminação linfocitária permite manter a homeostase do organismo, uma vez que permite reduzir a taxa metabólica dele, além de prevenir a autoimunidade.

Desta forma, dependendo do tipo de estimulo antigênico, existem duas vias de morte dos linfócitos ativados. A primeira delas é induzida pela ativação de receptores de morte como Fas/FasL, e é conhecida como AICD (*Activated-Induced Cell Death*). Esta via de indução de morte estimula a ativação da via extrínseca da

apoptose, e se vê favorecida quando se dispõe de altas doses de antígeno, ou por estimulações repetitivas. Desta forma, AICD é a via de regulação linfocitária esperada durante eventos de doenças crônicas (44).

A segunda via de morte utilizada para a regulação linfocitária é induzida pela privação de fatores de crescimento no meio, e é conhecida como ACAD (*Activated T Cell Autonomous Death*). Esta via de indução de morte leva a ativação da via intrínseca da apoptose, através da ativação de BIM, um membro pertencente à família Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). Desta forma, ACAD se vê favorecida por uma única exposição ao antígeno estranho. Deste modo, ACAD age comumente ao final da reposta imune desenvolvida contra infecções agudas (44–46).

1.4 A via intrínseca da apoptose

A apoptose é um processo de morte celular programada. No qual, depois das células receberem alguns estímulos do meio, são ativadas vias de sinalização que induzem a eliminação da própria célula. Por esse motivo, diversos autores tem se referido a esse tipo de morte como um suicídio celular (47).Este mecanismo de morte é acionado durante o desenvolvimento embrionário (48), a renovação celular (49), e o funcionamento do sistema imune (50), entre outros processos; visando a eliminação seletiva das células que não são mais necessárias, ou que sofreram algum dano e se tornaram perigosas (51). Deste modo, tem sido demonstrado que o mau funcionamento dessa via de morte (por deficiência ou exacerbação) é um dos fatores responsáveis de diversas doenças, como dano neurodegenerativo (52), dano isquêmico, doenças autoimunes e vários tipos de câncer (53). Nesse sentido, a apoptose é um processo fisiológico utilizado para manter a homeostase do organismo, e devido a essa importância no controle homeostático tem sido conservado amplamente durante a evolução (54).

A morte celular programada por apoptose pode ser iniciada através de duas vias de sinalização, a “via extrínseca” e a “via intrínseca”. Embora ativadas por diferentes estímulos, estas vias podem se encontrar parcialmente relacionadas (55). Essas duas vias finalmente convergem na ativação de certas proteases denominadas caspases (56), as quais têm como objetivo a clivagem de diferentes

componentes celulares, produzindo as mudanças morfológicas e bioquímicas características da apoptose como, por exemplo, a fragmentação do DNA, formação de corpos apoptóticos, degradação de proteínas do citoesqueleto e nucleares, e externalização de fosfatidilserina (56–58).

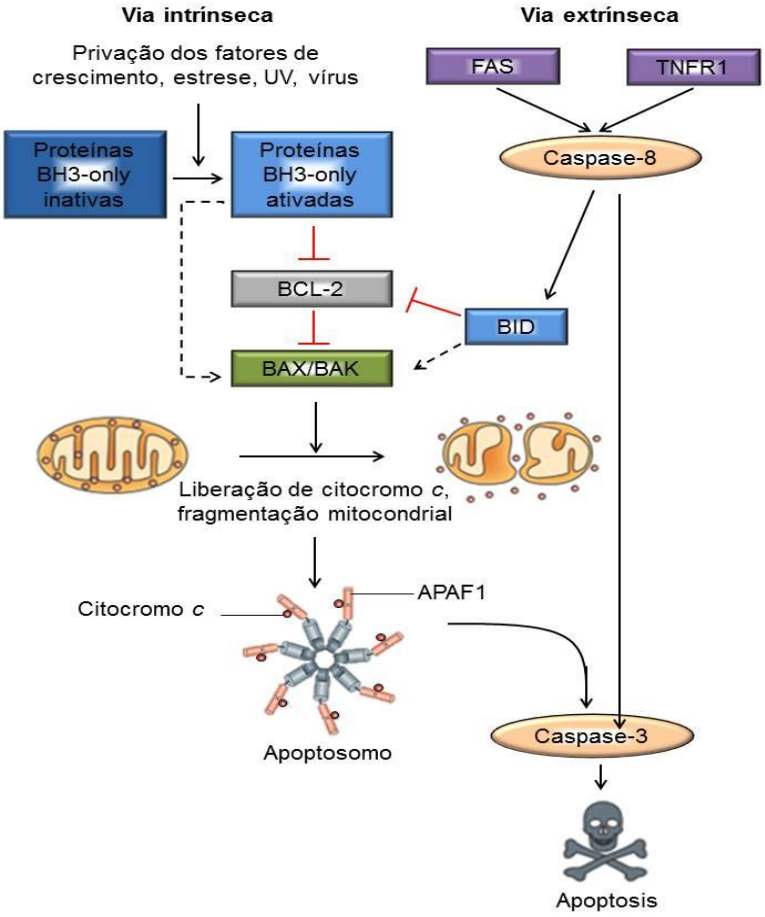

Figura 1 - Vias de morte celular por apoptose.
Representação das vias intrínseca e extrínseca da apoptose, as quais convergem na ativação de caspases efetoras que induzem a morte da célula. As proteínas da família Bcl-2 medeiam o processo de apoptose pela via mitocondrial (Adaptado de Youle et al., 2008).

A via extrínseca da apoptose (**Figura 1**) é induzida por interações mediadas por receptores transmembranais da superfície celular, conhecidos como receptores de morte, os quais são membros da superfamília dos Receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNF-R) (59). Uma vez ativados, estes receptores visam à ativação da caspase iniciadora 8 (caspase-8), a qual desencadeia a ativação das

capases efetoras da apoptose. Em contraste, a morte celular pela via intrínseca (**Figura 1**) é iniciada por estímulos não relacionados a receptores transmembranais. Esses estímulos conseguem modular as proteínas intracelulares pertencentes à família Bcl-2, as quais apresentam um papel regulador desta via de morte (60). As interações das proteínas da família Bcl-2 com a mitocôndria tem a capacidade de controlar de forma positiva ou negativa a permeabilização da membrana mitocondrial externa (*mitochondrial outer membrane permeabilization*- MOMP) (61,62). A instabilidade gerada pela MOMP permite a liberação de citocromo *c* e Smac/DIABLO no citosol. A disponibilização de citocromo c permite sua ligação ao fator de ativação da protease apoptótica 1 (APAF-1), formando uma plataforma de ativação de caspases iniciadoras conhecida como apoptosomo. O apoptosomo cliva e ativa a caspase iniciadora 9 (caspase-9), a qual por sua vez induz a ativação das caspases efetoras (caspase-3, -6 e -7) para a indução de apoptose (63,64).

1.5 Família de proteínas Bcl-2

As proteínas da família Bcl-2 são importantes reguladoras da apoptose, devido a sua capacidade de controlar o ponto de comprometimento (*commitment point*) que determina o final da sobrevivência celular (64). Estruturalmente os membros desta família se caracterizam pela presença de domínios de homologia à Bcl-2 ou também denominados “domínios BH” (**Figura 2**). Dentro dos quase 20 membros que compõem a família Bcl-2, encontram-se proteínas com atividade pró- ou anti-apoptóticas. Dessa forma, a interação entre elas determina o comprometimento com a apoptose ou sobrevivência da célula (65).

As proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 apresentam os quatro domínios BH (BH1-4) existentes na estrutura da proteína Bcl-2 e, portanto, possuem uma conformação tridimensional homologa a Bcl-2. Essas proteínas têm como função preservar a integridade de membrana mitocondrial externa através do bloqueio direto das proteínas pro-apoptóticas da mesma família. Entre as proteínas representantes deste grupo encontra-se A1, Bcl-XL, Bcl-W, MCL-1.

Por outro lado, as proteínas da família Bcl-2 com atividade pro-apoptótica são um pouco mais heterogêneas, uma vez que seus membros diferem na quantidade

de domínios BH. Dessa forma, dependendo do número de domínios BH que apresentem, essas proteínas podem ser subdivididas em proteínas com “multidominios BH”, as quais compartilham os quatro domínios BH (BH1-4) com Bcl-2, e proteínas “BH3-only”, as quais compartilham um único domínio de homologia com as proteínas da família Bcl-2, sendo este o domínio BH3 (64) (**Figura 2**).

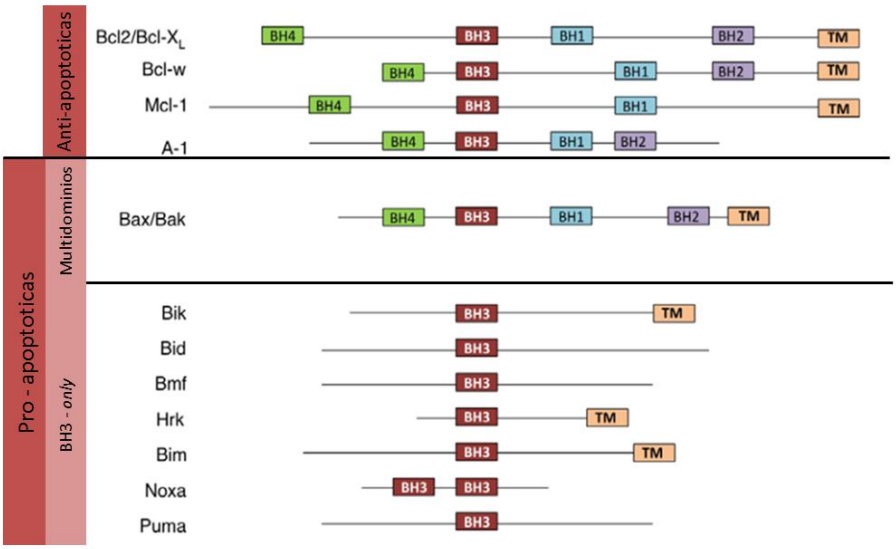

Figura 2 - Organização dos domínios de vários membros da família Bcl-2.
Os domínios de homologia a Bcl-2 (domínios BH) foram indicados: BH1 (azul claro), BH2 (roxo), BH3 (vermelho) e BH4 (verde); assim como os domínios transmembrana (TIM) (laranja) (Adaptado de Doerflinger et al, 2015).

As proteínas pro-apoptóticas com multidominios BH são também conhecidas como os membros efetores deste grupo, uma vez que são as responsáveis diretas da permeabilização da membrana mitocondrial externa. As duas proteínas representativas deste grupo são BAX (*Bcl-2-associated x protein*) e BAK (*Bcl-2 antagonist killer 1*). As quais, uma vez ativadas, formam homo ou hetero oligômeros que unidos à membrana mitocondrial geram poros que induzem a MOMP.

Por outro lado, as proteínas pro-apoptóticasBH3-only são reconhecidas por serem essenciais ao iniciar o processo de apoptose pela via intrínseca (66). As proteínas deste subgrupo utilizam seu domínio BH3 para interagir com as outras proteínas da família Bcl-2 e estimular sinais pro-apoptóticos. Dependendo de suas interações com outras proteínas, as proteínas BH3-only podem ser classificadas

como “sensibilizadoras” ou “ativadoras diretas”. As proteínas sensibilizadoras BH3-only tem a capacidade de interagir só com as proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, neutralizando-as. Alguns exemplos destas proteínas são BAD e Noxa. Entretanto, as proteínas ativadoras diretas BH3-only são capazes de interagir tanto com as proteínas anti-apoptóticas como com as proteínas multidominios BH desta família (BAK e BAX) e dessa forma induzem a oligomerização destes e, conseqüentemente, a MOMP. Entre as proteínas ativadoras diretas se encontram BID e BIM, sendo este último o principal sensor de estresse celular (65).

1.6 A proteína BIM

A proteína BIM (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*) foi descrita duas décadas atrás como um novo membro da família Bcl2 com atividade pro-apoptótica (67,68). Assim, estruturalmente, tem sido observado que BIM é uma proteína intrinsecamente não estruturada, a qual forma uma região anfipática no domínio BH3. Esta região permite a interação de BIM com a região hidrofóbica da superfície das outras proteínas da família Bcl-2 (69). Dessa forma, através do contato com as outras proteínas, BIM pode induzir direta ou indiretamente a ativação de apoptose. A ativação indireta decorre pela ligação de BIM com os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2,neutralizando sua ação e, ao mesmo tempo, deixando livres as proteínas BAX e BAK para a indução de MOMP e desencadeamento de apoptose (64,68,70). Porém, durante a ativação direta, BIM pode interagir com BAX e BAK induzindo a oligomerização destas proteínas e a MOMP (69,71).

A expressão da proteína BIM é regulada através dos níveis pre-transcripcional, transcripcional e post-traducional. O gene *bim* em camundongos possui seu homologo em humanos, o qual esta localizado no cromossomo 2q13 e recebe o nome de Bcl2L11. No nível pre-transcripcional, diversos estudos têm identificado fatores de transcrição que regulam de forma positiva (por exemplo, FKHR-L1 (72), FOXO3a (73) e E2F1 (74)) ou negativa (por exemplo, YY1- RelA (75), PINCH-1 (76), Pokemon (77)) a produção do mRNA desta proteína. Adicionalmente, *bim* é regulado epigeneticamente através da metilação dos dinucleótidos CpG na extremidade 5' da seqüência promotora (78,79).

No nível transcripcional, o mRNA de *bim,* que apresenta 7 exons,pode sofrer splicing alternativo que conduz a formação das onze isoformas identificadas dessa proteína (80,81). Sendo as principais isoformas descritas em camundongos: BIM *small* (BIM_S) com 108 aminoácidos, BIM *large* (BIM_L) com 138 aminoácidos, e BIM *extra-large* (BIM_{EL}) com 198 aminoácidos (68) (**Figura 3**). A diferença de tamanho entre essas isoformas é produzida por splicing dos exons E2B e E2C, os quais contem o domínio de ligação à molécula de dineína (DBD) que permite o transito de vesículas no citoesqueleto. Devido a isso, tem sido observado que BIM_L e BIM_{EL} encontram-se ligados à cadeia leve LC8 do complexo motor de dineína no tecido saudável. Esta interação com a dineína permite sua associação aos microtúbulos, o qual age como um mecanismo de regulação postraducional da atividade desta proteína. Porém, alguns estímulos apoptóticos tem a capacidade de quebrar a interação entre o complexo motor de dineína e LC8, desta forma BIM é liberado e translocado junto com LC8 ao citoplasma, onde interage com as proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, desencadeando a morte da célula (82,83). Por outro lado, BIM_S não possui a região de ligação a LC8, o que indica que não pode ser seqüestrado pelo complexo motor de dineína. Adicionalmente, a isoforma curta de BIM não foi encontrada nos tecidos sadios analisados, o que sugere que a expressão de BIM_S pode ser transiente na célula, e talvez seja estimulada quando for necessária a indução de uma morte celular rápida (82). Consistente com essa hipótese, tem sido observado que BIM_S é o indutor mais forte de apoptose, quando comparado com BIM_L e BIM_{EL} (68).

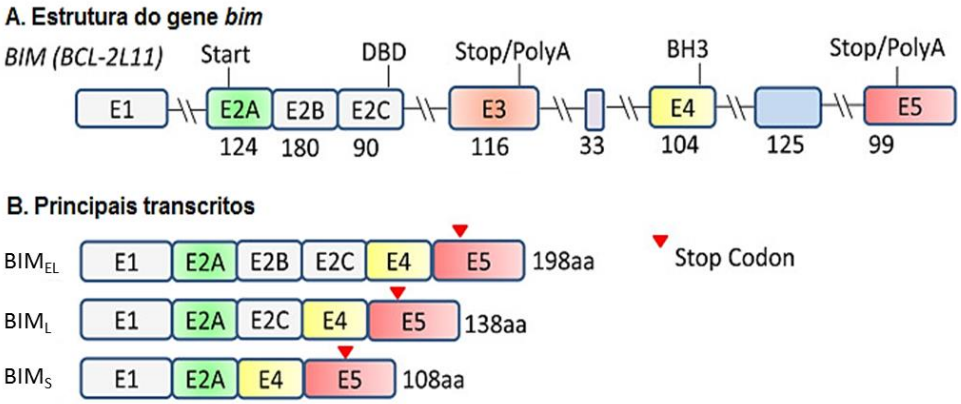

Figura 3 - A estrutura genética de *bim* e as principais isoformas transcritas
A. Representação da estrutura do gene *bim* (Bcl-2L11). A região E2B e/ou E2C contem o domínio de ligação a dineína (DBD). O domínio BH3 está localizado no exon E4. B. Representação dos principais transcritos de isoformas BIM formados por splicing alternativo. BIM_{EL}, BIM_L e BIM_S. (Adaptado de Sionov et al., 2015).

1.7 Camundongos *bim*$^{-/-}$

Camundongos *bim*$^{-/-}$ foram gerados por Bouillet e colaboradores em 1999 através de protocolos de recombinação homóloga que permitiram a introdução de um códon de parada (*stop códon*) na metade da seqüência do domínio BH3 deste gene (**Figura 3**). O polipeptídeo truncado, produto dessa alteração, deixa de ser funcional uma vez que perde a capacidade de se ligar a Bcl-2, não tendo efeito na via de indução de apoptose (85).

Trabalhos *in vivo* demostraram que um número significativo de camundongos *bim*$^{-/-}$, e até mesmo alguns dos animais *bim*$^{+/-}$, morrem no útero antes do décimo dia do desenvolvimento embrionário (E9.5), sugerindo que a proteína BIM desempenha um papel crítico no desenvolvimento embrionário (85,86). Porém, os camundongos *bim*$^{-/-}$ que concluem o desenvolvimento embrionário não apresentam alterações físicas aparentes, mas apresentam números elevados de linfócitos T, linfócitos B, macrófagos e granulócitos, além de número reduzido de plaquetas, quando comparados com animais selvagens. Nesse sentido, tem sido observado que os camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentam de 3 a 5 vezes mais linfócitos T e B no baço (47). Ao chegarem à fase adulta tardia (12 meses de idade), 55% dos camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentam doenças letais, sendo a mais comum a glomerulonefrite autoimune, ocasionada pelos títulos elevados de IgG, entre outras doenças como infarto cardíaco e vasculite (85). Os camundongos *bim*$^{+/-}$ apresentam um comportamento intermediário de todas essas características, mostrando que existe um efeito da dose gênica de *bim* (83). Este acúmulo de células do sistema imune é resultado de uma alta taxa de sobrevivência celular, e não produto de proliferação excessiva, uma vez que a freqüência dos progenitores hematopoiéticos na medula óssea mostra-se normal (85).

1.8 Relação entre BIM e linfócitos T

A proteína BIM é expressa em uma grande variedade de tecidos incluindo cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, ovário, testículo, baço, timo e traquéia, mas é expressa de forma proeminente por células de origem hematopoiética. Assim, estudos realizados com camundongos *bim*$^{-/-}$ demonstraram que a presença BIM

desenvolve um papel determinante na apoptose de células hematopoiéticas. Uma vez que camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentam um acumulo linfocitário nos órgãos linfóides (47).

Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que BIM desempenha um papel fundamental na eliminação de linfócitos autoreativos. Durante o processo de maturação linfocitária no timo, os timócitos são expostos a diferentes processos seletivos para evitar a autoreatividade. Assim, durante a seleção negativa, os timócitos imaturos autorreativos podem ser eliminados pela via intrínseca da apoptose. Resultados obtidos por diferentes trabalhos indicam que BIM é essencial para a indução de apoptose nesses timócitos autorreativos, servindo como uma barreira contra as doenças autoimunes (87). Adicionalmente, BIM apresenta um papel crucial na restauração da homeostase no final da resposta imune, onde tem lugar a eliminação de linfócitos T maduros que não são mais necessários. Este fenômeno de morte no fim da resposta imune é produzido por ausência de sinais de sobrevivência, e é conhecido como ACAD (45).

Nesse sentido, foi observado que a expressão deficiente da proteína BIM durante a deleção clonal de linfócitos T CD4^{+} permite a sobrevivência de células Th1 fracamente funcionais, que normalmente são eliminados durante a fase de contração. Dessa forma, células T CD4^{+} *bim*$^{-/-}$ de memória mostraram funções efetoras deficientes, baixa sensibilidade ao antígeno e incapacidade de responder ao desafio secundário (88). De forma similar, foi observado que a ausência de BIM durante a fase de contração linfocitária aumenta a população de células T CD8^{+} efetoras com potencial de memória (89). Deste modo, BIM desempenha um papel fundamental na formação do repertório de células T CD4^{+} e CD8^{+} de memória, assegurando o aparecimento de células T de memória altamente funcionais e a eliminação de células efetoras com funções subótimas.

Estudos *in vivo* utilizando camundongos deficientes de *bim* demonstraram que durante uma infecção crônica induzida por vírus existe uma maior freqüência dos linfócitos antígeno-específicos quando comparado com camundongos selvagens, o que vem acompanhado de uma melhor eliminação do antígeno (90). De forma similar em humanos, um estudo de análise com microarranjos comparando pacientes com infecção crônica e pacientes que tiveram uma resolução da doença

mostrou que os linfócitos antígeno-específicos de pacientes com infecção crônica apresentam uma superexpressão dos genes pro-apoptóticos, entre os quais se destaca a expressão de *bim*. Entretanto, os pacientes que resolveram a infecção apresentam linfócitos com expressão de proteínas com perfil anti-apoptótico (91). Estes dados em conjunto sugerem que a expressão de *bim* impede as populações de linfócitos T $CD8^+$ efetores sobreviver e controlar a infecção em doenças crônicas.

Desta forma, estes trabalhos mostram a importância de BIM na regulação linfocitária. Mas ainda não foram realizados estudos que avaliem a função dessa proteína durante as primeiras etapas de desenvolvimento da resposta imune. Nesse sentido, deve-se considerar que o entendimento das etapas iniciais de ativação dos linfocitos poderia contribuir na identificação de pontos de controle e oferecer oportunidades para o desenvolvimento de novas terapias com enfoque na manipulação da resposta imune. Por esse motivo, e devido à importância dos linfócitos T $CD8^+$ no controle de doenças frequentes como a hepatite, HIV e câncer; nós decidimos estudar a importância da proteina BIM na fase inicial da resposta imune desenvolvida pelos linfócitos T $CD8^+$.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar o papel da proteína BIM na qualidade e freqüência de linfócitos T $CD8^+$ estimulados com vetor vacinal Adenovírus 5 humano (hAd5) deficiente de replicação.

2.2 Metas específicas

- Produzir o plasmídeo adenoviral recombinante que expressa ovalbumina (pAd.cOVA).
- Produzir e titular as partículas adenovirais recombinantes (Ad.cOVA).
- Padronizar a dose adenoviral e concentração do peptídeo da OVA para o ensaio de citotoxicidade *in vivo* utilizando camundongos C57Bl/6 selvagens.
- Avaliar a resposta citotóxica executada pelos linfócitos T $CD8^+$ de camundongos C57Bl/6 selvagens, $bim^{+/-}$ e $bim^{-/-}$ imunizados com Ad.cOVA através do ensaio de citotoxicidade *in vivo*.
- Avaliar a produção de IFNγ dos linfócitos T $CD8^+$ de camundongos C57Bl/6 selvagens, $bim^{+/-}$ e $bim^{-/-}$ imunizados com Ad.cOVA através do ensaio de ELISPOT.
- Verificar o efeito da imunização com Ad.cOVA em camundongos C57Bl/6 selvagens, $bim^{+/-}$ e $bim^{-/-}$ sobre o crescimento de linhagem de melanoma Tm1, modificada para expressar ovalbumina (Tm1.Luc.cOVA).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento da seqüência da ovalbumina

A seqüência codificadora da ovalbumina citoplasmática (cOVA) foi obtida utilizando o plasmídeo pCI-neo-cOVA (25097, Addgene) (**Figura 4**).

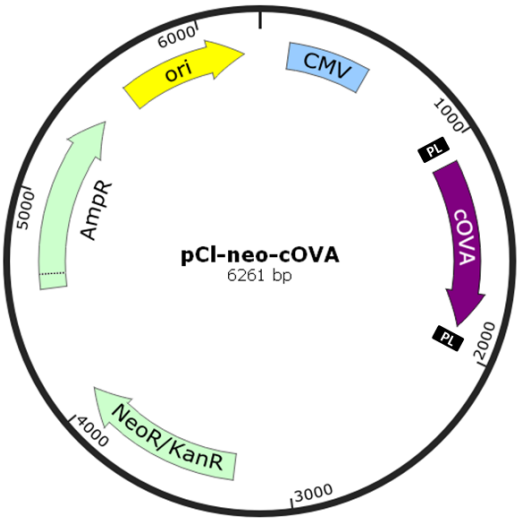

Figura 4 - Mapa do vetor base pCI-neo-cOVA.
Esquema da disposição das sequencias mais relevantes presentes no plasmídeo pCI-neo-cOVA de 6261 bp. Observa-se o gene de resistência a ampicilina (AmpR), a seqüência do gene de ovalbumina citoplasmática (cOVA) de 789 pb, e uma região de clonagem (PL), ou *polilinker*, contendo seqüências de corte para varias enzimas de restrição, incluindo *Eco*RI. Ori: Origem de replicação. CMV: sequencia potenciadora de transcrição. NeoR/KanR: Genes de resistência a neomicina e kanamicina

3.1.1 Transformação por choque elétrico e extração de DNA plasmidial

Para conseguir um grande número de copias do gene da cOVA, bactérias Stbl3 foram transformadas com o plasmídeo base pCI-neo-cOVA por eletroporação utilizando 1700 V/ms. Seguidamente, para permitir a recuperação das bactérias transformadas, estas foram mantidas em 500 µl de meio SOC (2% triptona, 0.5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl2, 10 mM MgSO4 e 20 mM glucose; pH 7.0) durante 1 h a 37 °C e 350 rpm (rotações por minuto) no termomixer. Após este período, foram cultivadas em placas com meio Luria Bertani (LB) ágar (pH 7.0): 0.1 g bacto-peptone, 0.05 g extrato de levedura, 0.1 g NaCl, 0.15 g Bacto-agar, 1mg de ampicilina, 10 ml de água; e cultivadas *overnight* na estufa a 37 °C durante 16h. Seguidamente, três colônias isoladas do cultivo em placa foram selecionadas e transferidas a tubos com 5 ml de meio LB + 0.1 mg/ml de ampicilina, e cultivadas por 16 h no equipamento Unimax 1010 Shaker com incubadora (Heidolph, catálogo: 36130520) a 37 °C e 300 rpm. Finalmente, a partir destas

bactérias transformadas foi extraído o DNA plasmidial com QIAprep Spin Miniprep Kit (27106, QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) conforme as instruções do fabricante.

3.1.2 Digestão do DNA plasmidial

Com o objetivo de isolar a seqüência de interesse (o gene que codifica a cOVA presente no vetor), os plasmídeos purificados foram submetidos à clivagem com a enzima de restrição *Eco*RI. Desta forma, a digestão foi realizada a 37 °C em uma solução contendo 1 X BSA (B9001S), 1 X Buffer 3 (B7003S, New England Biolabs), 4 U *Eco*RI (R0101S, New England Biolabs), 20 µg de DNA em um volume de 120 µl; 2 U de enzima foram colocados para reagir durante a primeira hora de incubação e, posteriormente, foram adicionados mais 2 µl para o segundo período de reação. Seguidamente foi realizada uma incubação de 30 min a 65 °C para inativar a enzima.

3.1.3 Eletroforese e purificação da seqüência da cOVA

Após a digestão enzimática, foi realizada a eletroforese das amostras em gel de agarose 1.5%, com buffer TAE 1 X e voltagem constante de 80V durante 1 h, a banda pertencente à seqüência gênica da cOVA (789 bp) foi extraída e purificada a partir do gel com QIAquick Gel Extraction Kit (28706 QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) conforme as instruções do fabricante.

3.2 Clonagem da cOVA no vetor de entrada pENTR2BΔ

3.2.1 Digestão do vetor pENTR2BΔ

O plasmídeo pENTR2BΔ foi utilizado como vetor de entrada (**Figura 5**). Para isso, 10 µg de plasmídeo foi digerido com a enzima EcoRI sob as mesmas condições usadas na obtenção da seqüência de cOVA (ver seção 3.1.2). Posteriormente, para prevenir a religação do DNA digerido, o material foi tratado com a enzima CIP (*Calf Intestinal alkaline Phosphatase*). Foram adicionados 2% Buffer 3, 2% BSA, 2% CIP, e incubados 1 h a 37 °C.

Previamente à fosforilação com CIP, foi realizada uma eletroforese como controle de digestão, usando 10 µl da amostra em gel de agarose (1%) e buffer TAE 1 X a voltagem constante de 80 V durante 1 h.

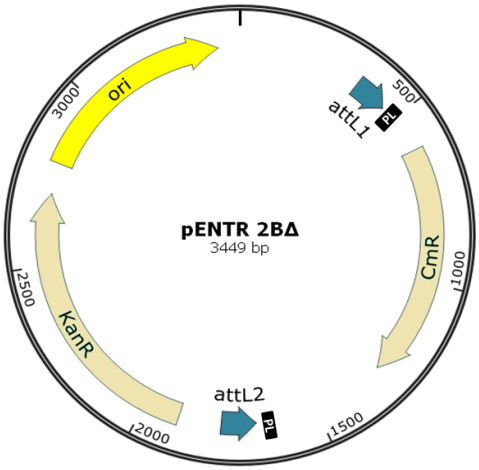

Figura 5 - Mapa do vetor de entrada pENTR2BΔ.
Representação da disposição das sequencias mais relevantes presentes no plasmídeo pENTR 2BΔ de 3449 bp. Encontra-se o gene de resistência a kanamicina (KanR), uma seqüência origem para replicação (*ori*), uma região de enzimas de restrição conhecida como *polilinker* (PL), a qual apresenta a seqüência palindrômica da enzima *Eco*RI, além de seqüência de recombinação específicas (*attL1*, *attL2*), e um gene de resistência ao cloranfenicol (CmR).

3.2.2 Purificação do vetor pENTR2BΔ

O DNA foi purificado utilizando fenol-clorofórmio e resuspendido em buffer TE. Brevemente, 60 µl de fenol-clorofórmio foram adicionados à reação e centrifugados a 12 000 rcf (força centrífuga ou *g*) durante 15 s. Posteriormente, a fase aquosa foi transferidaa um tubo novo com 60 µl de clorofórmio e foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores. A fase aquosa foi transferida a um tubo novo, a partir dela foi realizada a precipitação do DNA através da incubação por 30 min com 120 µl de etanol 100% em gelo. Em seguida centrifugamos a 12 000 rcf por 10 min. Finalmente, foi descartada a fase liquida e o pellet foi lavado com 180 µl de etanol 70%, sendo retirado o álcool e a amostra foi mantida a temperatura ambiente por 1 h para o secado.

3.2.3 Ligação do vetor pENTR 2BΔ e cOVA

A reação de ligação entre o vetor pENTR 2BΔ e a seqüência do gene cOVA foi realizada na proporção molar de 1:3 (vetor : inserto). Desta forma, a amostra foi

incubada a 65 °C por 10 min. e resfriada em gelo durante 5 min. Após esse período de incubação, se adicionou tampão liga se 1 X (46300018, Invitrogen) e T4 DNA ligase 1 X (M1801, Promega), sendo o volume final incubado *overnight* a 16 °C.

3.2.4 Transformação e purificação do plasmídeos pENTR2BΔ-cOVA

Os produtos da ligação (pENTR2BΔ-cOVA) foram transformados em bactérias DH5α eletrocompetentes (1700 V/ms), mantidas 1 h em meio SOC a 37 °C e 400 rcf para sua recuperação e, finalmente, cultivadas em placas com meio sólido LB + kanamicina por 16 h. Depois, dez colônias isoladas foram cultivadas em 5 ml de meio liquido LB + kanamicina por 16 h no shaker. O DNA plasmidial foi extraído com QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) segundo as instruções do fabricante.

3.2.5 Confirmação dos produtos da ligação

Para avaliar a presença do inserto cOVA no vetor resultante (pENTR2BΔ-cOVA), 1 µg de DNA de cada um dos dez clones foi digeridoa com a enzima *Eco*RI (ver seção 3.1.2). De forma similar, a orientação do inserto no vetor pENTR2BΔ-cOVA foi avaliada pela dupla digestão com as enzimas *Xho*I e *Sac*I. Para isso, utilizou-se 1 U de cada enzima de restrição, 1 X Buffer 2 (New England Biolabs) e 0.2 µg BSA, e incubou-se durante 3 h a 37 °C. O produto da digestão foi analisado utilizando eletroforese em gel de agarose 1.5%.

3.3 Recombinação do vetor pENTR2BΔ-cOVA com o vetor adenoviral pAd/CMV/V5-DEST

3.3.1 Recombinação do vetor pENTR2BΔ-cOVA com o vetor pAd/CMV/V5-DEST

Uma vez gerado o vetor de entrada pENTR2BΔ-cOVA, foi feita a reação de recombinação com o vetor plasmidial pAd/CMV/V5-DEST (genoma adenoviral) (V49320, Invitrogen). Para isso, 20 fmol do vetor de destino pAd/CMV/V5-DEST e 10 fmol do vetor de entrada pENTR2BΔ-cOVA foram incubados com 2 µl de Gatway LR clonase II Enzime Mix (11791100, Invitrogen) e TE 1 X para 10 µl finais de reação,a 25 °C *overnight*. No dia seguinte, a reação foi inativada através da incubação com 2 µl de proteinase K por 30 min a 37 °C.

3.3.2 Transformação por choque térmico

Bactérias Stbl3 termocompetentes foram transformadas com o produto da recombinação. Dessa forma, 1 µl de DNA plasmidial pAd/CMV/V5-cOVA (pAd.cOVA), produto da reação de recombinação,foi adicionado às células e incubado por 30 min em gelo. Decorrido esse tempo, as células foram submetidas ao choque térmico a 42 ºC durante 45 s seguidos por 5 min de incubação em gelo.

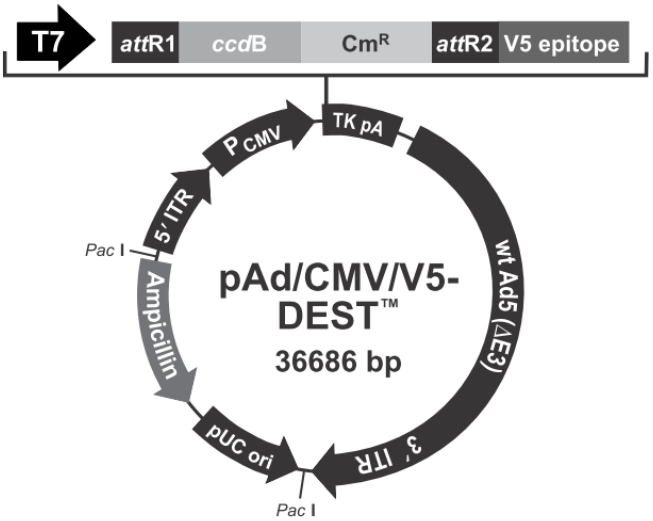

Figura 6 - Mapa do vetor destino pAd/CMV/V5-DEST.
Esquema das seqüências gênicas presentes no plasmídeo pAd/CMV/V5-DEST de 36 kb. No plasmídeo adenoviral encontra-se um gene de resistência a ampicilina, uma origem pUC de replicação (pUC ori), um promotor de citomegalovírus (P_{CMV}) para uma alta expressão do gene de interesse, seqüências repetitivas do adenovírus (ITRs), e uma seqüência de poliadenilação (TKpA) para dar eficiência na terminação da transcrição. Uma visão mais ampla do sítios de clonagem mostra a presença de dois sítios de recombinação (*attR1* y *attR2*), a região do epitope V5, um gene de resistência a cloranfenicol (CmR), o gene ccdB (para seleção ou morte de células bacterianas).

Para recuperação celular, 1 mL de meio LB foi adicionado e seguiu-se uma incubação a 37 °C, 300 rpm por 1 h no equipamento Unimax 1010 Shaker. Por fim, 100 µl da reação foram cultivados em placas de LB-agar suplementado com ampicilina (0.1 mg/ml) permitindo a seleção positiva dos clones transformados. O volume restante da reação foi centrifugado a 2350 rcf por 2 min., o sedimento celular bacteriano foi cultivado em placa segundo as condições descritas previamente. Ambas as placas foram mantidas a 37 °C por 16 h.

3.4 Confirmação da clonagem no vetor pAd.cOVA

No dia seguinte, 6 colônias isoladas foram selecionadas e cultivadas em 5 ml de meio liquido LB com ampicilina (0.1 mg/ml) a 37 °C no equipamento Unimax 1010 Shaker a 300 rpm por 16 h. Após esse período, o DNA plasmidial foi extraído usando o QIAprep Spin Miniprep Kit (27106, Qiagen). Posteriormente, 1 µg de DNA de cada clone foi analisado segundo o padrão de bandas após digestão com *Xho*I (1 h, 37 °C). Adicionalmente, as amostras foram sequenciadas. O clone que apresentou o maior índice de similaridade com a seqüência *in silico* da OVA foi selecionada e cultivada em 20 ml de meio LB com ampicilina (0.1 mg/ml) a 37 °C, 300 rpm por 16 h no equipamento Unimax 1010 Shaker. O DNA plasmidial foi extraído com QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante.

3.4.1 Sequenciamento de DNA plasmidial clonado

As amostras de cada clone foram enviadas para sequenciar no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O sequenciamento foi realizado no equipamento ABI PRISM® 3130XL, e foi utilizada a reação de seqüenciamento Big Dye terminator v.3.1 (4337455, Applied Biosystems). Inicialmente, a seqüência da OVA foi amplificada com os primers T7 e V5 (**Tabela 3**), separadamente, segundo as seguintes condições: 150 ng DNA plasmidial, 9.6 pmoles primer, 1 X sequencing buffer e 13% Big Dye v3.1 em 15 µl de volume de reação. A amplificação do fragmento a ser sequenciado foi realizada seguindo a ciclagem de 96 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos das seguintes etapas: 96 °C por 45 s, 50 °C por 30 s e 60 °C por 4 min. O DNA amplificado foi precipitado com 0.9% de etanol 100% gelado, 0.1 M de NaOAc (pH 5.2) e 0.92 µg de glicogênio em 25 µl para cada amostra. Após a incubação em gelo por 15 min, a solução foi centrifugada a 1500 rcf por 20 min. O excesso foi descartado e etanol gelado 70% foi adicionado ao pellet, seguido por centrifugação a 1500 rcf por 10 min. Posteriormente foi descartado o sobrenadante e a amostra foi incubada por 1 min a 95 °C para permitir a evaporação do álcool.

Primer	Seqüência
T7 (*forward*)	5´-TAATACGACTCACTATAGGG-3´
V5 (*reverse*)	5´-ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3´

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento do gene de ovalbumina presente no vetor pAd.cOVA.
Os oligonucleotidos utilizados na reação de sequenciamento foram desenhados para anelar nas regiões colindantes do gene da cOVA: a região promotora T7, e o epitopo V5.

3.5 Produção da partícula viral

3.5.1 Transfecção de pAd.cOVA em células 293A

Inicialmente, o plasmídeo adenoviral foi digerido com *Pac*I (New England Biolabs) para permitir a exposição das seqüências ITR (*Inverted Terminal Repeat*), segundo as indicações do fabricante.

A transfecção de células eucariotas 293A com o vetor recombinado foi feita utilizando dois tipos de lipofectamina: Lipofectamina 2000 (Invitrogen) e Lipofectamina LTX + *plus reagent* (Invitrogen).

O dia anterior à transfecção, foram preparadas duas placas com poços de 35 mm com 5 x 10^5 células / poço e 2 ml de DMEM 10%, seguindo as instruções do fabricante. Assim, as células atingem 90% de confluência no momento do experimento. Foram realizados três grupos experimentais, em duplicata, um controle negativo (sem lipofectamina), e um grupo controle positivo utilizando o plasmídeo pMAXGFP (3.5 kb) que expressa a proteína fluorescente verde (GFP). Nos dois primeiros grupos experimentais mencionados foi testada a lipofectamina LTX com concentrações diferentes de DNA, e no último grupo foi testada a Lipofectamina 2000 seguindo as instruções do fabricante.

Para o grupo experimental com Lipofectamina 2000, foi diluído 1 µg de pAd.cOVA em 250 µl de meio Opti-MEM Reduced Serum Médium (31985-070, GIBCO) não suplementado com soro fetal bovino (SFB), em paralelo foram diluídos 3 µl de lipofectamina 2000 em 250 µl de Opti-MEM sem soro e incubados por 5 min. Seguidamente, as duas soluções foram misturadas e incubadas por 20 min a

temperatura ambiente para permitir a formação de complexos lipofectamina-DNA. Posteriormente, foi retirado o meio das células e substituído por 1.5 ml de Opti-MEM com 10% de SFB, sendo posteriormente adicionada a solução de transfecção. O meio das células foi trocado após 24 h por meio DMEM 10%, segundo as instruções do fabricante. Para o grupo controle positivo deste reagente foi utilizado o mesmo protocolo utilizando o plasmídeo pMAXGFP.

Para os grupos experimentais com lipofectamina LTX, foram diluídos 1,5 µg e 3 µg de pAd.OVA em 500 µl de meio Opti-MEM sem SFB, e incubados por 5 min. com 2,5 µl de *plus reagent*. Depois, foram adicionados 6,5 µl de lipofectamina LTX e a reação incubou-se por 30 min. para formação da lipovesícula. Para o grupo controle positivo, foi seguido o mesmo protocolo, usando uma única concentração plasmidial de 1,5 µg de pMAXGFP. Finalmente, as células foram incubadas por 4 h com o mix de reação e, em seguida, o meio foi trocado por 2 ml DMEM 10%, segundo as instruções do fabricante.

Após 48 h,as células de todos os grupos experimentais foram tripsinizadas e transferidas a placas petri (100 x 20 mm) com 7 ml de DMEM 10%. Posteriormente, quando as células atingiram 70-80% de confluência na ausência de efeito citopático, foi induzida a transdução viral.

3.5.2 Transdução viral

Continuando com o protocolo descrito na seção anterior, foram coletados em tubos falcon 6 ml do sobrenadante do cultivo de células transfectadas sem efeito citopático (cada amostra por separado), sendo utilizado o 1 ml restante para descolar as células aderidas e colocá-las no tubo falcon para serem centrifugadas a 280 rcf por 5 min. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e resuspendeu-se o pellet em 100 µl de PBS 1 X. Depois, cada amostra foi induzida à lise celular através de 3 repetições de congelamento edescongelamento mediante a imersão intercalada em nitrogênio liquido e banho-maria a 37 °C. Finalmente, os tubos foram centrifugados a 400 rcf por 5 min. para a eliminação dos resíduos celulares, e o sobrenadante contendo partículas virais foi coletado para seu uso na próxima etapa.

Previamente, um total de 2 x 10^5 células 293A (não transfectadas) foram plaqueadas em placa de 6 poços, e colocadas em cultura durante 24 h em 2 ml de

DMEM 10% a 37 °C, até atingirem uma confluência de 80%. Uma vez alcançadas estas características, retiramos o meio das células em cultivo e o sobrenadante viral de cada amostra coletado na etapa anterior foi gotejado sobre elas. Colocou-se 1 ml de DMEM 2% na placa e foram deixadas para incubação durante 4h. Após esse período, foram adicionados mais 2 ml de DMEM 2% e realizo-se uma nova incubação até observar efeito citopático.

Seguidamente, este protocolo foi repetido em uma escala maior para acrescentar o número de partículas virais produzidas. Dessa forma, asprimeiras partículas virais recolhidas no paragrafo anterior foram usadas para infectar novas células 293A cultivadas em placas maiores de 100 x 20 mm. O sobrenadante viral obtido foi aliquotado e mantido no freezer a -80 ºC.

3.5.3 Produção do estoque viral

Foram preparadas 12 garrafas T-150 contendo células 293A com uma confluência maior ou igual a 90%. O meio das garrafas foi substituído por 5 ml de DMEM 2%, e as células foram infectadas com 700 µl de sobrenadante viral não titulado, de forma a produzir efeito citopático em 48 h. Incubou-se as garrafas a 37ºC, por uma hora e, posteriormente, completamos o volume do meio para 25 ml com DMEM 2%.

Após 48 h, o conteúdo das garrafas foi coletado em tubos falcon de 50 ml e centrifugado a 280 rcf a 4 ºC, durante 10 min. Os sobrenadantes foram descartados, e com 5 ml de tampão Tris 0.1 M pH 8.0 + 10% glicerol os pellets foram ressuspendidos e reunidos em um único tubo, o qual foi congelado a -80 °C.

3.5.4 Purificação de adenovírus em gradiente de cloreto de césio

A suspensão de células foi descongelada em gelo, e transferida para um homogeneizador de vidro onde foi macerada durante 5 min, mantendo sempre a amostra em contato com o gelo. Posteriormente, a solução viral foi misturada com deoxicolato sódico 5% na relação de 1:10 do volume de amostra, induzindo assim a mudança da consistência da amostra para uma textura gelatinosa. O processo de homogeneização foi realizado até a amostra adquirir uma consistência líquida novamente, evitando a formação de bolhas de ar. Em seguida, a amostra foi

dissolvida em uma solução contendo 63% de Tris 0.1 M (pH 8.0) e 37% de solução saturada de cloreto de césio. Para a amostra adquirir uma consistência mais aquosa, foi realizada repetidas vezes a passagem dela através de uma agulha de 0.80 x 25 mm. Para isso, a amostra foi coletada em volumes pequenos em uma seringa e seguidamente liberada através da agulha em um novo recipiente.

Seguidamente, a solução obtida foi transferida para tubos de ultracentrífuga (Polyallomer, Beckman, 16 x 76 mm) e centrifugada a 35 000 rpm a 4 °C durante 16 h (Rotor VTI65.1, Beckman). A banda correspondente à fração adenoviralfoi coletada e dialisada, com auxilio de uma membrana CEL MD8 100 CLR, contra Tris 0,01 M (pH 8.0) em câmara fria (4 °C) por 4 h. A solução de Tris 0,01 M foi trocada a cada 2 h para evitar a saturação. Seguidamente, a solução viral foi recuperada da membrana de diálise e adicionado 10% de glicerol ao volume obtido. Finalmente, a solução viral dialisada foi dividida em alíquotas menores para seu almacenamento a –80 °C.

3.5.5 Titulação de estoques de adenovírus recombinantes

Células 293A foram cultivadas por 24 h na densidade de 3 x 10^5 células por poço, em meio DMEM 10% em duas placas de 24 poços, até atingir 90% de confluência. Após esse período, uma alíquota do vírus purificado foi descongelada e misturada utilizando o aparelho vortex. Seguidamente, foi realizada uma diluição inicial de 1:100 (10^{-2}) do estoque de vírus, utilizando como diluente DMEM 10%. A partir dessa diluição foramrealizadas diluições seriadas em quadruplicata, com fator 10. Para isso, foi utilizada uma placa de 96 poços e realizaram-se diluições de 10^{-3} até 10^{-18}, segundo o gráfico da **Figura 7**. Posteriormente, 200 µl de cada réplica das diluições 10^{-6} até 10^{-17} foram utilizadas para infectar um poço das placascom células 293A previamente preparadas. Após a infecção viral, as placas foram incubadas durante 1 hora nas condições previamente descritas. Posteriormente, se adicionou 1500 µl de DMEM 5% a cada poço da placa de titulação e, finalmente, foram incubadaspor sete dias, sendo o titulo calculado a partir da maior diluição de vírus que levou a formação de placas de lise.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-13}	10^{-14}
B	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-13}	10^{-14}
C	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-13}	10^{-14}
D	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	10^{-13}	10^{-14}
E				10^{-23}	10^{-22}	10^{-21}	10^{-20}	10^{-19}	10^{-18}	10^{-17}	10^{-16}	10^{-15}
F				10^{-23}	10^{-22}	10^{-21}	10^{-20}	10^{-19}	10^{-18}	10^{-17}	10^{-16}	10^{-15}
G				10^{-23}	10^{-22}	10^{-21}	10^{-20}	10^{-19}	10^{-18}	10^{-17}	10^{-16}	10^{-15}
H				10^{-23}	10^{-22}	10^{-21}	10^{-20}	10^{-19}	10^{-18}	10^{-17}	10^{-16}	10^{-15}

Figura 7 - Esquema da diluição viral com fator 10.
Distribuição, em quadruplicata, das diluições da partícula viral feitas em uma placa de 96 poços.

Para o calculo do titulo viral, selecionou-se a maior diluição do vírus capaz de induzir a formação de placas de lise nas células (representado pela letra A na formula embaixo). Seguidamente, foi contabilizado o número de placas de lise geradas nos 4 poços pertencentes a essa diluição, e foi calculada a média do número de placas de lise, a qual foi nomeada pela letra “X”. Desta forma, “X” representa o número de Unidades Formadoras de Placa (PFU) para a diluição A. Seguidamente “X” foi multiplicada pelo número de vezes que foi diluída na placa, seguindo a seguinte formula:

$$X\ (10^{-3}\ /\ 10^{A})\ =\ Y$$

Assim, na formula anterior “Y” representa o número de PFU na primeira diluição da placa, 1 x 10^{-3}. Já que nessa diluição foram colocados 25 µl da solução viral 10^{-2}, “Y” equivale à quantidade de PFU presentes nesse volume. E portanto, o numero de PFU presentes no volume total da solução 10^{-2} (representado pela letra “Z” na formula embaixo) foi calculado por relação direta destes dados, segundo se mostra a continuação:

Y ⟶ 25 µl

Z ⟶ 1000 µl

Portanto, “Z” representa a quantidade de PFU na diluição 10^{-2}. De forma similar aos cálculos anteriores, considerando que essa diluição continha 10 µl da solução stock foi realizado o seguinte calculo:

$$Z \longrightarrow 10\ \mu l$$
$$V \longrightarrow 1000\ \mu l$$

De forma tal que “V” representa o número de PFU / ml presentes na solução stock do vírus, em outras palavras, o titulo viral.

3.6 Cultivo de células 293A

As células 293A são uma linhagem imortalizada estabelecida a partir de células embrionárias primárias de rim humano (HEK-293) (92). Como caraterística especial, as células 293A apresentam genes da região E1 do genoma do adenovírus tipo 5 humano. Desta forma, os genes presentes no genoma das células 293A complementam a deleção presente nos vetores adenovirais utilizados na pesquisa epermitem a replicação das partículas virais dentro delas.

3.6.1 Descongelamento de células 293A

Células 293A (Invitrogen) foram descongeladas em banho-maria a 37 °C, Uma vez descongeladas, foram adicionadas a 4 ml de meio DMEM 10% (10% SFB, 1% L-glutamina, 1% pen-strep) e centrifugadas a 450 rcf por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 2 ml de meio de cultura, sendo o volume total transferido a uma garrafa de T-75 (75 cm^2) com 8 ml de DMEM 10%.

3.6.2 Repique de células 293A

As células 293A foram cultivadas em frascos T-75 com 10 ml de meio DMEM 10% em estufa à 37 °C e 5% de CO_2. Foram colocadas 1 x 10^5 células por frasco, e após 3 dias atingiram uma confluência de 85%. Para a transferência e subcultivo celular foi preciso descolar as células da placa através da incubação com 2 ml de tripsina por 5 min, e a inibição da reação com 4 ml de meio DMEM 10%. O pellet celular foi recuperado por centrifugação a 450 rcf e resuspendido em 5 ml.

Finalmente,1 x 10^5 células foram transferidas para um frasco T-75 contendo 10 ml de meio DMEM 10%.

3.6.3 Congelamento de células 293A

As células em cultura foram tripsinizadas e coletadas segundo o protocolo previamente descrito, após centrifugação o pellet foi ressuspendido em 3 ml de DMEM 10%. Para a contagem celular, misturou-se 10 µl do volume celular com 90 µl de azul de tripan; e 10 µl da solução resultante foi colocada em câmara de Neubauer. O número total de células foi calculado pela seguinte formula:

$$\#\ \text{total de células} = \frac{\sum \text{células}}{\text{número de quadrantes}} \text{ x } 10 \text{ x } 10^4 \text{ x volumen de meio}$$

Após a contagem de células, o tubo falcon foi centrifugado e as células foram ressuspendidas em um volume de meio criogênico (10% de DMSO e 90% de SFB) apropriado para que fiquem 1 x 10^6 células / ml. Rapidamente, cada mililitro de células foi colocado em um criovial, transportado em gelo e guardado a -20 °C por 1 h. Após este período, os vials foram transferidos a -80 °C, e no dia seguinte armazenados no nitrogênio líquido.

3.7 Padronização da dose viral

A dose viral para a ativação da resposta imune celular foi avaliadaem camundongos selvagens através do ensaio de citotoxicidade *in vivo* (ver seção 3.9.1), Grupos de camundongos receptores foram imunizados com três doses virais diferentes: 2 x 10^5, 2 x 10^6 ou 2 x 10^7 PFU / 100 µl. Sete dias depois da imunização foi avaliada a capacidade de eliminação das populações pulsadas com o peptídeo da OVA. A menor dose capaz de ativar a resposta citotóxica foi selecionada para os próximos passos.

3.8 Animais de experimentação

Foram usados camundongos C57BL/6 selvagens, *bim*$^{-/-}$ e *bim*$^{+/-}$, machos, de 8-12 semanas de idade. Camundongos C57Bl/6 selvagens foram utilizados como controle da resposta imune. Adicionalmente, camundongos *bim*$^{+/-}$ foram utilizados como controle da linhagem *bim*$^{-/-}$ uma vez que são camundongos irmãos e foram mantidos exatamente nas mesmas condições durante seu desenvolvimento. Estes animais foram adquiridos e manipulados no Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB - USP). Os procedimentos experimentais foram avaliados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) do ICB-USP, sendo que a aprovação se encontra registrada sob nº de protocolo 110 nas folhas 23 do livro 03.

Além disso, foi criada a linhagem de camundongos OTI *bim*$^{-/-}$, que foi utilizada para avaliar a proliferação de linfócitos T CD8^{+} *in vivo*, assim como a expressão de marcadores de ativação através de protocolos de transferência adoptiva com camundongos C57BL/6 selvagens.

3.8.1 Geração de camundongos bim$^{-/-}$

Os camundongos fêmeas deficientes do gene *bim*, apresentam problemas reprodutivos relacionados a malformações na morfologia da vagina (93). Já que o mesmo fenótipo não é observado nas fêmeas heterozigotas para *bim*, padronizarmos o cruzamento entre fêmeas *bim*$^{+/-}$ e machos *bim*$^{-/-}$. Os animais obtidos deste cruzamento foram marcados e genotipados segundo protocolo descrito a seguir.

3.8.2 Genotipagem de camundongos bim$^{+/-}$ *e bim*$^{-/-}$

Cinco milímetros da ponta da cauda de cada camundongo foi cortada com tesoura cirúrgica estéril e colocada em 400 µL de tampão de lise contendo 200 mM NaCl, 100 mM Tris-HCL (pH 8.0), 5 mM EDTA, 0.2% SDS e 100 µg/mL de proteinase K. As amostras foram deixadas em incubação de 56 ºC, 53 rcf, *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 21130 g, 4 ºC por 5 min., e o sobrenadante de cada tubo foi transferido para outro eppendorf contendo 400µL de

isopropanol, sendo posteriormente misturados por inversão 15 vezes até atingir a formação de uma nuvem de DNA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13520 g, 4 ºC por 10 min.O sobrenadante foi descartado e se adicionaram 500 µL de etanol 70% gelado seguido de uma nova centrifugação a 280 g, 4 ºC por 5 min. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados durante 1 h no fluxo laminar para permitir a evaporação dos restos de etanol. Finalmente, o pellet de DNA foi ressuspendido em 100 µL de TE, e incubado a 64 ºC por 30 min. para completar a diluição do DNA. A quantificação da concentração de DNA foi realizada no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), e cada amostra foi diluída até atingir à concentração de 50 µg/ml.

Seguidamente, a região gênica codificante para a proteína BIM foi amplificada por PCR convencional a partir do DNA total extraído de cada uma das amostras. O mix de reação utilizado continha 1 X de PCR Buffer, 0,16 µM de $MgCl_2$, 22 pM primer oIMR1851, 22 pM do primer oIMR1852, 22 pM do primer oIMR1853 (**Tabela 4**), 0.11 mM de dNTPs, 2.15 U da enzima Taq DNA polimerase, e 0.1 µg de DNA. O ciclo de reação começou com a desnaturação do DNA genômico a 94 °C por 4 min. seguido de 35 ciclos de amplificação: 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C e 1 min. em 72 °C, e um ciclo de alongamento final a 72 °C por 5 min.

Primer	Seqüência (5’ → 3’)	Tipo de primer
oIMR1851	CATTCTCGTAAGTCCGAGTCT	Comum
oIMR1852	GTG CTA ACT GAA ACC AGA TTA G	Selvagem
oIMR1853	CTC AGT CCA TTC ATC AAC AG	Mutante

Tabela 4 - Seqüência dos oligonucleotidos para genotipagem de camundongos *bim*$^{-/-}$.
Camundongos resultantes do cruzamento entre fêmeas *bim*$^{+/-}$ e machos *bim*$^{-/-}$ são genotipados utilizando 3 seqüências de primers. Oprimer oIMR1851é de uso comum para a os dois genótipos. O primer oIMR1852 reconhece por complementaridade o exon que codifica para o domínio BH3 em camundongos selvagens. Entretanto, o primer oIMR1853 é complementar à seqüência loxP inserida no lugar do exon que codifica para o domínio BH3 em camundongos *bim*$^{-/-}$.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1.5% contendo 600 X de gel red (Uniscience). As bandas foram fotografadas com o equipamento LAS500 (Healthcare Life), verificando-se a presença de uma banda de 400 pb para os animais WT, uma banda de 540 pb para os *bim*$^{-/-}$ e as duas bandas para os camundongos *bim*$^{+/-}$ (**Figura 8**).

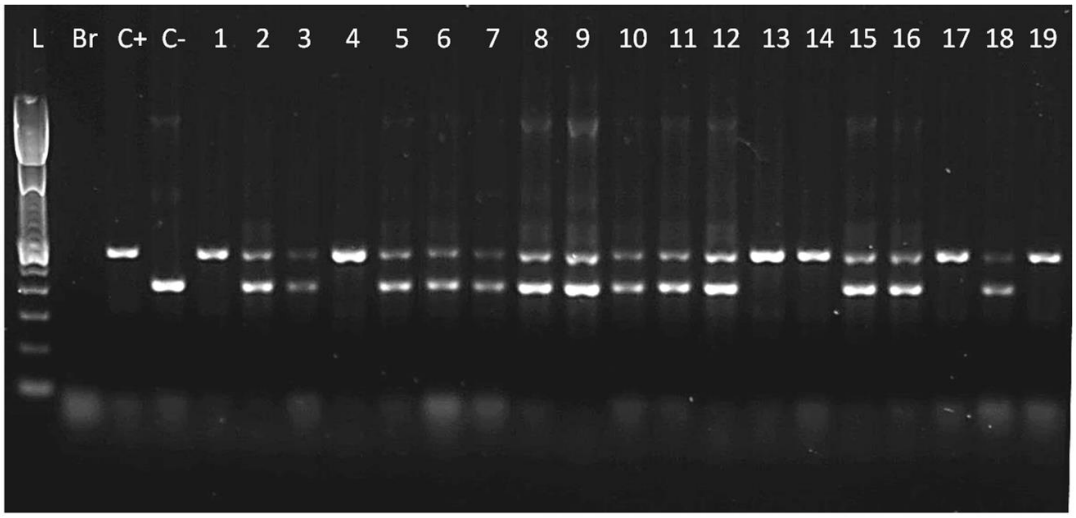

Figura 8 - Genotipagem de camundongos BIM.
Observa-se as bandas obtidas da eletroforese dos produtos da PCR dos animais genotipados. As amostras 1, 4, 13, 14 17 e 19 representam camundongos *bim*$^{-/-}$, e as amostras restantes representam camundongos heterozigotos (*bim*$^{+/-}$). L: Ladder 100 pb (Invitrogen). Br: Branco. C+: Controle dos primers oIMR1851 e oIMR1853 (camundongo *bim*$^{-/-}$) banda de 540 pb. C-: Controle dos primers oIMR1851 e oIMR1852 (camundongo selvagem) banda de 400 pb. .

3.8.3 Geração da linhagem C57Bl/6 OTI bim$^{-/-}$

Devido ao problema reprodutivo que apresentam as fêmeas *bim*$^{-/-}$, o cruze para a geração desta nova linhagem foi realizado através do acasalamento de camundongos macho C57Bl/6 *bim*$^{-/-}$ com fêmeas C57Bl/6 OTI. Seguidamente, camundongos fêmeas da progênie, que possuíam fenótipo OTI e genótipo heterozigoto para o gene *bim*, foram cruzadas com camundongos macho bim$^{-/-}$. Dessa forma foi obtida finalmente a primeira geração de camundongos bim$^{-/-}$ com fenótipo OTI. Finalmente, estes animais foram acasalados com fêmeas OTI *bim*$^{+/-}$, acrescentando as probabilidades de a descendência apresentar fenótipo OTI e genótipo *bim*$^{-/-}$ (**Figura 9**).

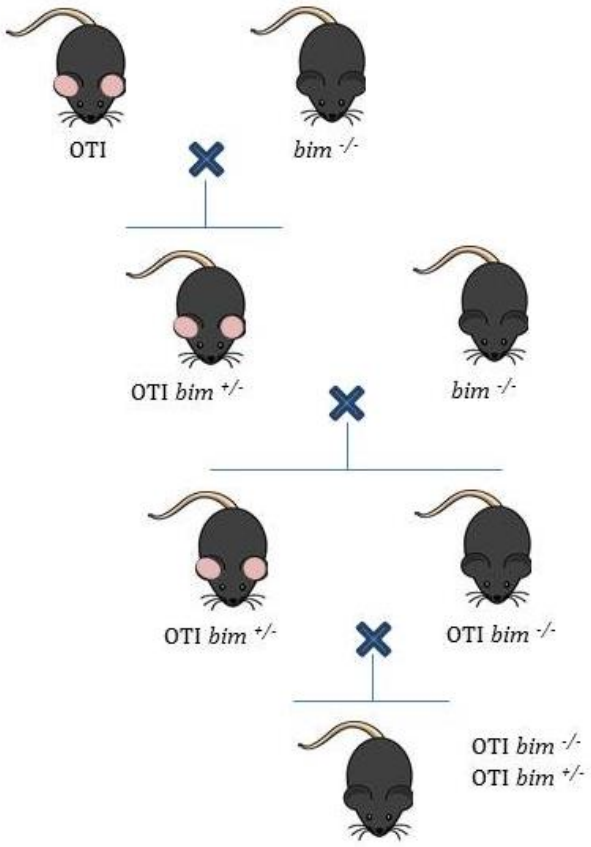

Figura 9 - Geração da linhagem de camundongos C57Bl/6 OTI *bim*$^{-/-}$.
O acasalamento entre as linhagens de camundongos OTI e *bim*$^{-/-}$, foi realizada ao longo de três gerações para a obtenção de camundongos OTI *bim*$^{-/-}$. Devido ao problema de fertilidade das fêmeas da linhagem *bim*$^{-/-}$ foram utilizados camundongos machos como doadores do gene mutante durante o cruzamento destas linhagens.

3.8.4 Fenotipagem de camundongos OTI bim$^{-/-}$

Para avaliar a expressão do TCR transgênico (TCRαV2 / TCRβV5) específico para o reconhecimento de resíduos de OVA nos linfócitos T CD8^{+} dos camundongos da linhagem OTI *bim*$^{-/-}$, foram coletados 15 – 25 µl de sangue através de um corte na ponta da cauda. Durante a coleta, cada amostra de sangue foi misturada com 100 µl de citrato de sódio para impedir a formação de coágulos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 400 rcf por 5 min, e o sedimento celular foi hemolizado através da incubação a temperatura ambiente durante 3 min com 500 µl de tampão de lise (0,15 M NH_4Cl, 1 mM $KHC0_3$, 0,1 mM Na EDTA, pH 7.2). Após a incubação, a reação foi neutralizada com 1 ml demeio RPMI suplementado com 10% de SFB (RPMI 10%), e as amostras foram centrifugadas novamente a 400 rcf por 5 min. Finalmente as células foram ressuspendidas na solução de anticorpos: anti-

TCR Vβ5.1, 5.2–PE clone MR9-4 (Biolegend) e anti-CD8a-APC.Cy^{TM}7 clone 53-6.7 (BD Biosciences) na concentração de 1.33 µg/ml, e incubadas por 30 min a 4 °C. Terminado o tempo de incubação foram adicionados 500 µl de MACS buffer, seguidos de 1 ciclo de centrifugação. Finalmente, as amostras foram fixadas com paraformaldeido (PFA) 1% e analisadas por citometria de fluxo, no equipamento FACS Canto II (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) e posteriormente no software FlowJoX.

A estratégia de gate utilizada foi a seguinte: FSC-A x FSC-H para excluir doublets, FSC-A x SSC-A para selecionar a população linfocitária, e APC.Cy7-CD8 x PE-TCRβV5 para determinar as populações de linfócitos T CD8^{+} que expressam ou não o TCR específico para OVA. Para a analise, vinte mil eventos foram adquiridos na janela da população linfocitária, eforam considerados com fenótipo OTI aqueles camundongos que possuem uma quantidade maior a 90% de linfócitos T CD8^{+} com TCRs específicos para OVA, em relação aos linfócitos T CD8^{+} não transgênicos.

3.9 Avaliação da resposta citotóxica

Camundongos selvagens, *bim*$^{+/-}$ e *bim*$^{-/-}$ foram imunizados com o adenovírus 5 humano deficiente de replicação que expressam o gene da ovalbumina citoplasmática (Ad.cOVA). Cada animal recebeu uma dose viral de 2 x 10^{6} PFU / 100 µl por via intramuscular no músculo *Tibialis anterioris*, sendo inoculada a metade da dose em cada um dos flancos com ajuda de seringas de insulina U - 100 e uma agulha de calibre 27 G. Após sete dias da imunização,foi avaliada a resposta citotóxica anti-OVA através de ensaios de citotoxicidade *in vivo*, produção de IFNγ, progressão do crescimento tumoral e proliferação linfocitária.

3.9.1 Ensaio de citotoxicidade in vivo

Com o objetivo de determinar os linfócitos T CD8^{+} específicos para o epítopo imunodominante SIINFEKL (H-2Kb) da ovalbumina, foram realizados ensaios de citotoxicidade *in vivo*. O protocolo foi adaptado do protocolo desenhado por Clemente e colaboradores (2013) (94).

Camundongos C57BL/6 foram anestesiados por via *i.p.*com 2 mg ketamina + 0.2 mg xilazina, e seguidamente sacrificados por deslocação cervical, e os baços foram recuperados e mantidos em meio RPMI 10%. Desta forma, foram utilizadosem proporção 1 animal doador (obtendo aproximadamente 7 x 10^7 esplenócitos por baço) para cada 2 animais receptores. Posteriormente, os baços foram macerados e a solução de esplenócitos foi colocada em falcon e incubada durante 10 min a 4 °C com a finalidade de decantar os restos do tecido. Após o período de incubação, o sobrenadante foi recuperado e centrifugado a 500 rcf por 5 min. Seguidamente, a suspensão celular foi hemolisada através da incubação por 2 min em 2 mL de tampão de lise por baço (0,15 M NH_4Cl, 1 mM $KHC0_3$, 0,1 mM Na EDTA, pH 7.2). Após o tempo de incubação a reação foi neutralizada com RPMI 10%, adicionando duas vezes o volume da solução de lise utilizada. A continuação centrifugou-se novamente a amostra a 500 rcf por 5 min, e o pellet celular foi ressuspendido em RPMI 10%.

Os esplenócitos anteriormente obtidos foram divididos em duas ou quatro populações e marcados com os corantes vitais Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) e CellTrace^{TM} Violet Cell Proliferation Kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Estes corantes foram diluídos em PBS 1 X aquecido a 37 °C até obter a concentração de uso de 10 µM ($CFSE_{High}$), 1 µM ($CFSE_{Low}$), 5 µM (CTV_{High}) ou 0.5 µM (CTV_{Low}). As células foram incubadas na presença destes marcadores durante 17 min para as marcações com CFSE e 20 min para as marcações com CTV. Após centrifugação a 500 rcf por 5 min, as populações CTV_{High}, $CFSE_{High}$ e CTV_{Low} foram ressuspendidas em RPMI 10% pré-aquecido e pulsadas por 1 hora a 37 °C com 10 nM, 100 pM e 1 pM do peptídeo OVA, respectivamente. Entretanto, as células $CFSE_{Low}$ foram resuspendidas em RPMI 10% e permaneceram não pulsadas. Em seguida, as células pulsadas foram lavadas e misturadas na mesma proporção com as células $CFSE_{Low}$ antes de serem injetadas por via *i.v.* através do plexo retro-orbital de camundongos receptores. Dessa forma, foram transferidas 4 x 10^7 células em 200 µL de RPMI não suplementado por camundongo. Após 16 - 20 h da transferência, os baços dos camundongos receptores foram coletados, processados, e fixados com PFA 1% diluído em PBS 1 X.

As amostras foram analisadas por citometria de fluxo, no FACS Canto II (Becton Dickinson) e posteriormente no software FlowjoX. A estratégia de gate utilizada foi a seguinte: FSC-A x FSC-H para excluir doublets, FSC-A x SSC-A para excluir debris celular e finalmente CFSE x CTV para determinar as populações de esplenócitos marcadas com os corantes vitais. Para a aquisição de eventos a população $CFSE_{Low}$ correspondente às células não pulsadas foi utilizada como grupo controle, a partir do qual foram adquiridos dez mil eventos. A porcentagem de lise específica foi determinada usando a fórmula:

$$1 - \frac{\%\, CFSE_{high}\ imunizado\ /\ \%\, CFSE_{low}\ imunizado}{\%\, CFSE_{high}\ naive\ /\ \%\, CFSE_{low}\ naive}\ x\ 100\%$$

3.9.2 Ensaio de ELISPOT para IFNγ

O ensaio de ELISPOT (*Enzyme-Linked ImmunoSpot*) foi realizado para determinar a freqüência de células antígeno-específicas para o peptídeo SIINFEKL de OVA produtoras de IFNγ. Este protocolo foi adaptado a partir do protocolo descrito por Boscardin et al., 2003 (95).

Inicialmente, foram adicionados 60 µL por poço de PBS 1 X estéril contendo 10 ng/mL do anticorpo de captura monoclonal anti-IFNγ de camundongo (551216, BD Bioscience) em uma placa de nitrocelulose de 96 poços (Multiscreen HA Millipore). A placa foi incubada *overnight* a temperatura ambiente e, no dia seguinte, foi lavada três vezes com 100 µL de RPMI em condições estéreis. Seguidamente, foi realizado o bloqueio da placa através da incubação por 2 h a 37 °C com 100 µL de meio RPMI 10%. Seguidamente, células respondedoras e apresentadoras foram colocadas na placa pre-tratada em uma proporção de 1:3, respectivamente. Estas células foram incubadas na presença ou ausência do peptídeo de OVA em uma concentração final de 10 µM durante 24 h a 37 °C e 5% CO_2 em condições estáticas.

As células respondedoras foram obtidas do baço de animais C57Bl/6 selvagens, *bim*$^{+/-}$ *e bim*$^{-/-}$ previamente imunizados ou não (seguindo o protocolo descrito na seção 3.9.1). Essas células foram ressuspendidas em uma concentração

de 1 x 10^6 células / ml em meio RPMI completo (suplementado com 1 X MEM NEA (*Non Essencial Aminoacids*) (Gibco), 1% L-glutamina (Gibco), 1 X β-Mercaptoetanol (Gibco), 1 X piruvato de sódio (Gibco), 1% penicilina e estreptomicina (Gibco), 10% SFB (Gibco) e 5 ng/mL de IL- 12 recombinante humana). Por outro lado, esplenócitos procedentes de animais C57BL/6 selvagens não tratados foram utilizados como células apresentadoras de antígeno, e resuspendidas em uma concentração de 3 x 10^6 células / ml. Cem microlitros de cada suspensão (células respondedoras e apresentadoras) foram colocados em cada poço da placa de nitrocelulosa, como indicado no paragrafo anterior.

Passadas as 24 h, os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1 X e 5 vezes com PBS Tween 20 (0.05%) (Fisher BioReagents). Em seguida, a placa foi incubada *overnight* a 4 °C com 75 µL por poço do anticorpo biotinilado anti-IFNγ de camundongo (554410, BD Bioscience) diluído em PBS Tween 20 (0.05%) na concentração final de 2 µg/mL. No dia seguinte, a placa foi lavada 5 vezes com PBS Tween 20 (0.05%) e 3 vezes com PBS 1 X. Posteriormente, foram adicionados 100 µL por poço de PBS Tween 20 (0.05%) contendo o complexo estreptavidina-HRP (554066, BD Bioscience) em uma diluição 1:800, com esta solução foi realizada uma incubaçãode 2 h a temperatura ambiente. Uma vez mais foram realizados 3lavados com PBS Tween 20 (0.05%) e 5 lavados com PBS 1 X. A continuação, a placa de nitrocelulosa foi revelada através da exposição durante 15 min com 100 µL por poço da solução de revelado (Tris-HCL 50 µM pH 7.5, 1 mg/ml de DAB, 1 µl/ml de H_20_2). A reação foi interrompida por meio do lavado com água corrente. Finalmente, a placa foi secada a temperatura ambiente e os “spots” foram quantificados no leitor automático para ELISPOT (AID ELR06).

3.9.3 Marcação intracelular para IFNγ

Outra ferramenta para determinar a freqüência de células produtoras de IFNγ é através do uso de anticorpos fluorescente específicos para o reconhecimento desta citocina. A detecção deles é realizada por citometria de fluxo, tendo a vantagem de ser uma técnica altamente sensível, específica e que pode ser utilizada para o reconhecimento de mais de uma molécula simultaneamente.

Desta forma, esplenócitos de camundongos C57Bl/6 selvagens, *bim*$^{+/-}$ *e bim*$^{-/-}$ previamente imunizados ou não foram recuperados e processados seguindo o protocolo descrito na seção 3.9.1. Posteriormente, 2 x 10^6 células de cada amostra foram transferidas para uma placa de 96 poços com fundo U e cultivadas em 200 µl de meio completo (RPMI suplementado com 10% SFB, 1 X 2-mercaptoetanol, 1 X MEM NEA, 1 X vitamina, 1 X piruvato de sódio, 1% L-glutamina, 2 µg/ml anti-CD28, 1 µg/ml golg plug, 5 µg/ml monensina). A incubação destas células foi realizada na presença ou ausência do peptídeo de OVA (10 µg/ml) por um período de 11 h a 37 °C e 5% de CO_2.

Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com MACS buffer e incubadas por 30 min com o anticorpo de superfície anti-CD8. Posteriormente as células foram lavadas, e incubadas por 20 min a 4 °C com o kit Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience) para permitir a fixação e permeabilização da membrana celular. Passado esse período os poços foram lavados duas vezes com 100 µl da solução Perm/Wash 1 X. A continuação as células foram marcadas intracelularmente através da incubação por 15 min com anti-IFNγ. Finalmente, foram realizadas duas etapas de lavado, e as células foram resuspendidas em MACS buffer para posterior analise no citometro de fluxo.

As amostras foram analisadas por citometria de fluxo FACS Canto II (Becton Dickinson), e posteriormente no software FlowjoX. A estratégia de gate utilizada foi a seguinte: FSC-A x FSC-H para excluir doublets, FSC-A x SSC-A para a seleção da população linfocitária, SSC-A x CD8, e finalmente SSC-A x IFNγ para a determinação da freqüência de linfócitos T CD8$^+$ produtores de IFNγ. Para uma analise robusto, setecentos mil eventos foram adquiridos na janela da população linfocitária.

3.9.4 Avaliação da progressão tumoral

O ensaio de progressão tumoral foi realizado com o objetivo de avaliar a resposta dos linfócitos T CD8$^+$ desde outro enfoque experimental, uma vez que a eliminação das células tumorais esta relacionado a atividade citotóxica desenvolvida pelos linfócitos T CD8$^+$.Camundongos C57Bl/6 selvagens*, bim*$^{+/-}$ *e bim*$^{-/-}$ previamente imunizados, ou não, foram desafiados com células tumorais de melanoma da

linhagem Tm1 que expressam a proteína da OVA na forma citoplasmática (Tm1.luc.cOVA). A linhagem Tm1 deficiente de OVA (Tm1.luc) foi utilizada como controle do experimento. O crescimento tumoral foi monitorado através da medição, com paquímetro,do diâmetro menor e maior da tumoração, estas medições são representadas na formula embaixo com as letras “a” e “b”, respetivamente. Com esses dados, o volume tumoral foi calculado a partir da seguinte formula:

$$Volume\ tumoral = 0.5\ x\ a^2 x\ b$$

O crescimento tumoral foi avaliado até os tumores atingirem um volume maior o igual a 1.5 cm^3, depois do qual os camundongos foram sacrificados.

3.9.5 Ensaio de proliferação in vivo

Para avaliar as diferenças no padrão de proliferação dos linfócitos $CD8^+$ deficientes da proteína BIM em resposta a um antígeno-específico, foram utilizados esplenócitos da nova linhagem OTI *bim*$^{-/-}$. Os camundongos OTI *bim*$^{-/-}$ apresentam linfócitos T $CD8^+$ transgênicos, com TCR específico para o reconhecimento de resíduos de OVA. Desta forma, esplenócitos de camundongos OTI e OTI *bim*$^{-/-}$ foram isolados como indicado na seção 3.9.1 e marcados com os corantes CFSE e CTV, respectivamente. As populações foram misturadas na proporção 1:1 de linfócitos T $CD8^+$, determinada a partir da fenotipagem dessas células seguindo o protocolo descrito na seção 3.7.4. A continuação, as células foram resuspendidas em meio RPMI não suplementado em uma concentração de 1 x 10^7 células / 100 µl, e 200 µl foram inoculados em camundongos C57Bl/6 selvagens, através da inoculação por via *i.v.* no plexo retro-orbital.

Depois de 2-3 h da transferência adotiva dos esplenócitos procedentes de camundongos OTI e OTI *bim*$^{-/-}$, os camundongos receptores foram vacinados com 2 x 10^7 PFU / 100 µl de Ad.cOVA para estimular a proliferação dos linfócitos com TCR específico para OVA. Quatro dias depois, o baço dos camundongos receptores foram coletados e processados para obtenção dos esplenócitos. A continuação foi realizada a marcação com anti-CD3 e anti-CD8, através da incubação por 30 min destes anticorpo em MACS buffer. Finalmente, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo no equipamento FACS Canto II (Becton Dickinson).

3.10 Análises estatísticas

As analises estatísticas foram realizadas com o auxilio do software STATISTICA (data analysis software system) versão 7 (2004), da empresa StatSoft, Inc. (*www.statsoft.com*).

Em um primeiro momento foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para provar a hipótese de distribuição normal dos dados. Seguidamente, debido à falta de distribuição normal, os dados foram analisados através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para identificar a presença de variações entre grupos, seguido do teste pos-hoc LSD (*least significant difference*) de Fisher para analisar as interações entre os grupos. Assim, valores de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) e $p < 0.001$ (***) foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Produção do vetor adenoviral

Com o objetivo de induzir a ativação dos linfócitos T $CD8^+$ em camundongos deficientes da proteína BIM, foi produzida uma vacina adenoviral capaz de estimular a resposta imune citotóxica de uma forma antígeno-específica. Assim, através de múltiplos passos, foi clonado o gene da ovalbumina (OVA) dentro de um vetor adenoviral.

A OVA tem sido estudada por muitos anos em inúmeros protocolos de imunização, sendo descrita como um potente imunógeno. Algumas décadas atrás, a procura de novas metodologias terapêuticas e o entendimento da importância da localização e expressão do antígeno inoculado (96) permitiu a construção de novas formas de OVA. A clivagem ou introdução de sequencias específicas na porção terminal codificadora para OVA originou diversas conformações dessa proteína, atualmente são utilizadas na pesquisa: mOVA, OVA ancorada à membrana plasmática (96); cOVA, OVA citoplasmática (97); e sOVA, OVA secretada. Assim, neste estudo foi escolhida a conformação citoplasmática desta proteína (cOVA) com o intuito de ativar a resposta imune celular contra este antígeno. Dessa forma, a expressão intracelular de cOVA nas células infectadas pelo adenovírus permitiu a apresentação do antígeno através do MHC de classe I, e desencadeamento de uma resposta imune citotóxica antígeno-específica.

A OVA é uma proteína utilizada tradicionalmente como antígeno-padrão em pesquisas desenvolvidas na área de imunologia, devido a sua ação como um potente imunógeno. Portanto, atualmente existe uma ampla gama de ferramentas que visam avaliar a resposta imune antígeno-específica contra OVA. Entre elas destaca-se os anticorpos monoclonais anti-OVA, pentâmeros de OVA, linhagens celulares geneticamente modificadas para expressão de OVA, camundongos transgênicos com TCR específico para OVA, peptídeos de OVA restritos para o MHC-I (OVA 257-264, SIINFEKL) ou MHC–II (OVA 323-339, ISQAVHAA-HAEINEAGR), entre outros. Desta forma, o uso de OVA como antígeno representa uma grande vantagem, já que permite uma maior versatilidade no monitoramento da resposta imune induzida depois da vacinação.

4.1.1 Isolamento do gene de cOVA

Inicialmente, a porção gênica de 789 pb que codifica para cOVA foi recuperada a partir do plasmídeo pCI-neo-cOVA (Addgene) que apresenta um total de 6261 pb. Assim, o plasmídeo doador (pCI-neo-cOVA) foi digerido com a enzima *Eco*RI permitindo a liberação da sequencia de interesse. A correta liberação do gene de cOVA através da digestão enzimática foi avaliada por eletroforese da amostra após digestão. Desta forma, na **Figura 10B** é possível observar que a banda liberada apresenta o tamanho referido para a seqüência gênica de interesse.

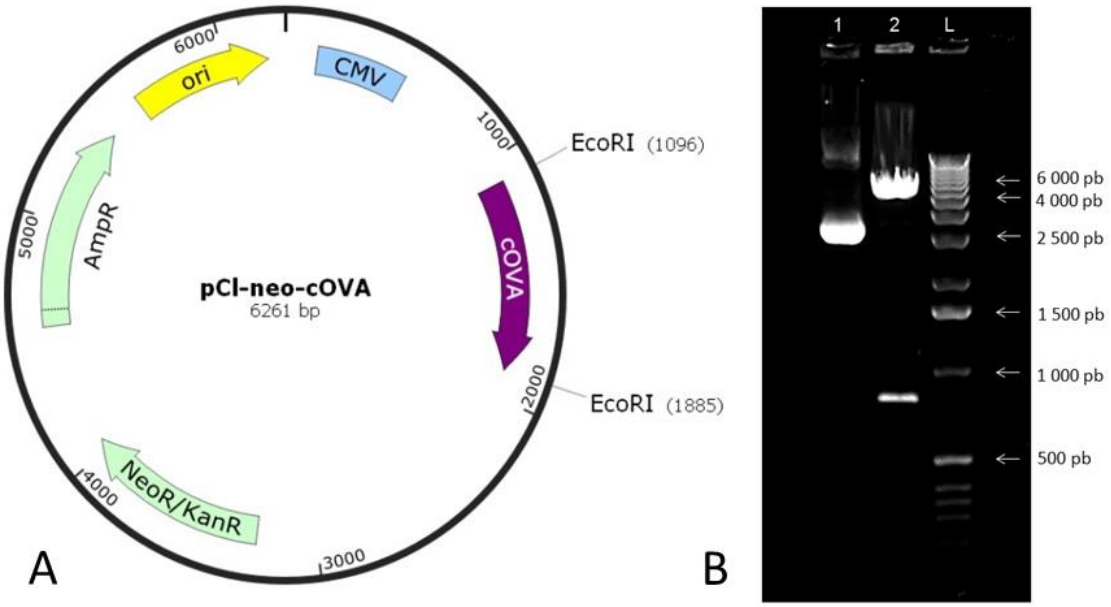

Figura 10 - Isolamento do gene de cOVA.
A. Esquema da disposição das sequencias mais relevantes presentes no plasmídeo pCI-neo-cOVA. Observa-se o gene de resistência a ampicilina (AmpR), a seqüência do gene de ovalbumina citoplasmática (cOVA) de 789 pb, e os sítios de restrição para enzima *Eco*RI. **B.** Eletroforese em gel de agarose 1% que mostra a liberação da sequencia de cOVA (789 pb) a partir do vetor base pCI-neo-cOVA. Lane 1: Plasmídeo não digerido. Lane 2: Plasmídeo digerido com enzima *Eco*RI. L: Ladder de 1kb (Invitrogen).

4.1.2 Clonagem da seqüência cOVA no vetor de entrada pEntr2B∆

A clonagem de genes em vetores de pequeno tamanho vale-se da especificidade das enzimas de restrição, assim como de seu potencial de criar cortes com extremidades coesivas, para a inserção correta de seqüências gênicas, respeitando o marco de leitura do gene de interesse. Porém, existem algumas limitações para trabalhar com vetores adenovirais devido à maior dimensão deles. O

grande tamanho destes vetores impossibilita o uso de enzimas de restrição, devido à inexistência de sítios de restrição de corte único ou duplo na imensidade de seqüências que estes vetores carregam. Desta forma, a tecnologia desenvolvida pela empresa Thermo, com a plataforma Gateway, utiliza os mecanismos de recombinação desenvolvidos evolutivamente pelos bacteriófagos λ para superar aquelas limitações e permitir a clonagem específica de genes, cujo mecanismo de ação será referido posteriormente.

Os vetores de entrada, conhecidos como pENTR, são moléculas chave para o processo de recombinação, uma vez que possuem as seqüências de reconhecimento que medeiam o evento de recombinação. Estes vetores são utilizados como plasmídeos intermediários de pequeno tamanho. Porque, através do uso de enzimas de restrição, é possível inserir a seqüência de interesse nestes vetores, para posteriormente, por recombinação homologa, passar a seqüência de interesse ao plasmídeo destino. Além disso, o plasmídeo pENTR2B possui uma seqüência de grande importância para iniciar o processo de tradução de proteínas, conhecida como a seqüência Kosak. A qual se encontra presente em células eucarióticas e está localizada do lado do códon de inicio AUG na seqüência dos mRNA de diferentes genes (98). Desta forma, a seqüência Kosak serve como alvo para a ligação da subunidade menor do ribossomo, onde age reforçando a eficiência de iniciação da tradução (99), apresentando um papel importante durante a regulação da expressão gênica.

Desta forma, para a inserção da seqüência de cOVA no vetor de entrada foi utilizada a enzima *Eco*RI, devido a que o sitio de restrição que ela reconhece encontrava-se na região polilinker de ambos os vetores, o vetor doador (pCl-neo-cOVA) (**Figura 10A**) e o vetor de entrada (pENTR 2BΔ) (**Figura 11A**). A simulação *in silico* da clonagem do gene de cOVA (**Figura 11**) permitiu observar a perda do gene de resistência a cloranfenicol, e com ele, a eliminação de um ponto de reconhecimento para a enzima *Eco*RI. Estes dados foram utilizados para a seleção e reconhecimento dos clones de células que incorporaram corretamente a sequencia de interesse.

Assim, depois de realizada a clonagem, os plasmídeos resultantes foram transformados em bactérias DH5α e os clones que incorporaram o vetor foram

selecionados negativamente através do cultivo em placa de ágar suplementado com cloranfenicol. Portanto, os clones que não foram capazes de crescer no meio seletivo foram considerados para analises posteriores, uma vez que a morte destes clones indica a perda da seqüência de cloranfenicol no plasmídeo transformado. Porém, para eliminar a possibilidade de o vetor ter fechado sem a incorporação da sequencia de cOVA, foi avaliada a presença do inserto cOVA em dez colônias sensíveis ao cloranfenicol através do ensaio de restrição com a enzima *Eco*RI. A **Tabela 5** mostra os tamanhos dos segmentos esperados para ambos os vetores: o vetor vazio pEntry2BΔ e o vetor com inserto pEntry2BΔ-cOVA.

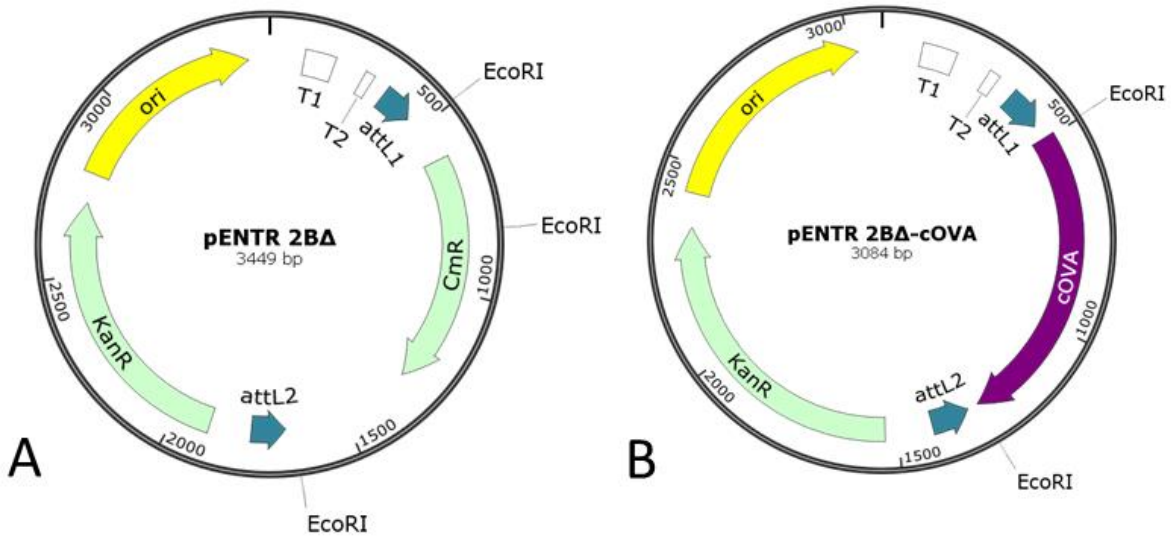

Figura 11 - Simulação *in silico* da clonagem do gene cOVA no vetor pENTR 2BΔ .
A. Digestão do vetor pENTR2BΔ com *Eco*RI e **B.** introdução do inserto de cOVA previamente recuperado do vetor base através do uso desta mesma enzima de restrição. Observa-se a eliminação do gene de resistência a cloranfenicol (CmR) do plasmídeo pENTR 2BΔ.

pEntry2BΔ	pEntry2BΔ-cOVA
2 295 pb	2 295 pb
827 pb	789 pb
327 pb	

Tabela 5 - Bandas esperadas da digestão de pEntry2BΔ e pEntr2BΔ-cOVA com *Eco*RI.
A clivagem enzimática dos plasmídeos pEntry2BΔ e pEntr2BΔ-cOVA mostra diferenças no número de segmentos de DNA gerados. O vetor vazio (pEntry2BΔ) apresenta 3 sítios de corte, em tanto que a presença do gene da OVA no plasmídeo pEntr2BΔ-cOVA reduziu os pontos de ação desta enzima, permitindo o reconhecimento de ambos os vetores.

A digestão enzimática do plasmídeo recuperado a partir dos clones selecionadas demostrou que o 50% dos clones não tinha incorporado a sequencia de cOVA durante o protocolo de ligação (**Figura 12**). Nos clones restantes foi possível observar a liberação do gene de cOVA, uma vez que se observou a banda correspondente ao tamanho dessa sequencia assim como a banda correspondente à armação plasmidial intata, segundo o descrito na **Tabela 5**. Desta forma, os clones 1, 2, 5, 7 e 10 foram selecionados por presentarem a banda de 789 pb correspondente a cOVA, e utilizados nas próximas etapas.

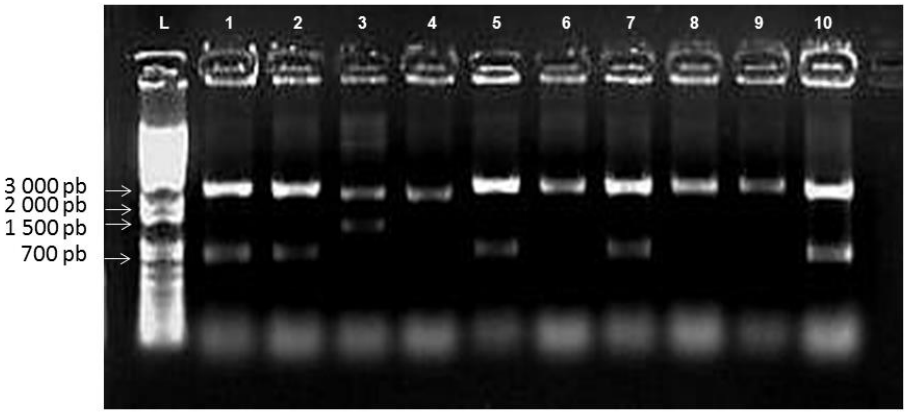

Figura 12 - Avaliação da clonagem de cOVA no vetor pENTR 2BΔ.
O DNA de dez colônias isoladas foi digerido com *Eco*RI para corroborar a presença do inserto da cOVA segundo o padrão de bandas. Bandas esperadas: 2295 pb e 789 pb. L: Ladder 1 kb *plus* (Invitrogen). Lane 1-10: Clones isolados após clonagem de cOVA no vetor de entrada.

Devido a que a clivagem foi realizada com a mesma enzima para os dois extremos, a seqüência de cOVA não possui direcionalidade de inserção como representado na **Figura 13**. Portanto, existia a possibilidade que o inserto se ligasse na orientação inversa. Para determinar a orientação dos insertos em cada um dos clones foram escolhidas *in silico* as enzimas de restrição *Xho*I e *Sac*I, as quais mudam o padrão de bandas gerado para as duas condições de inserção (**Tabela 6, Figura 13**). Desta forma, foi possível avaliar a correta inserção de cOVA nos clones previamente selecionados. Como observado na **Figura 14**, o clone 1 apresentou uma correta incorporação do inserto cOVA, e portanto foi utilizado para os passos posteriores.

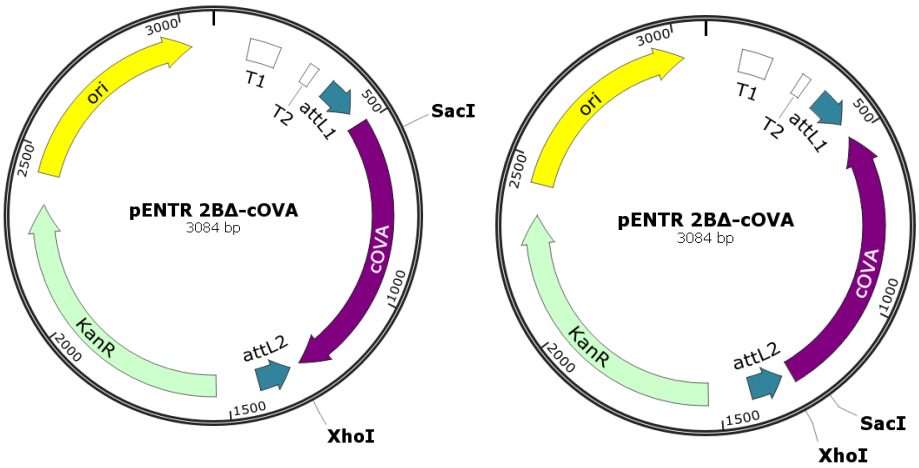

Figura 13 - Simulação *in silico* das possíveis orientações do inserto de cOVA no vetor pENTR2BΔ-cOVA e os pontos de digestão com as enzimas *Xho*I e *Sac*I.
O sentido de inserção da sequencia de cOVA no plasmídeo pENTR2BΔ gera mudanças nos locais de corte das enzimas *Xho*I e *Sac*I, produzindo diferenças nos tamanhos dos fragmentos gerados após a digestão com estas enzimas de restrição.

Orientação certa	2 340 pb 743 pb
Orientação errada	3 007 pb 76 pb

Tabela 6 - Bandas esperadas da digestão de pEntry2BΔ-cOVA com *Xho*I e *Sac*I.
O tamanho dos fragmentos produzidos depois da digestão enzimática com *Xho*I e *Sac*I foi determinado através da simulação *in silico* da ação destas enzimas para o vetor pEntry2BΔ-cOVA com as duas orientações possíveis da sequencia de cOVA.

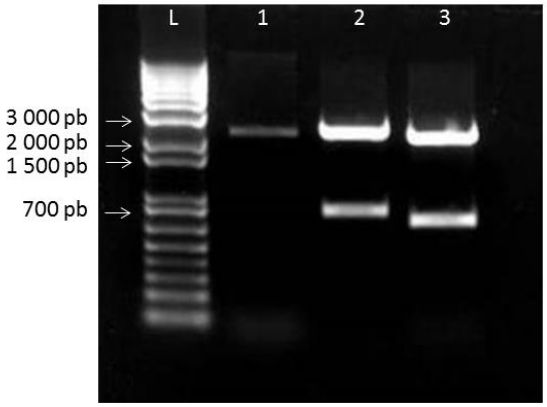

Figura 14 - Orientação correta do inserto cOVA no vetor pEntry2BΔ-cOVA.
Padrão de restrição do clone 1 resultante da ligação de cOVA no vetor de entrada (pEntry2BΔ.cOVA) mostra a orientação certa do inserto. Lane 1: pEntry2BΔ vazio. Lane 2: pEntry2BΔ-cOVA digerido com a enzima *Eco*RI. Lane 3: pEntry2BΔ-cOVA digerido com enzimas *Xho*I e *Sac*I. L: Ladder 1 kb *plus* (Invitrogen)

4.1.3 Clonagem de cOVA no genoma adenoviral pAd/CMV/V5-DEST

A inserção da seqüência de cOVA no vetor adenoviral foi realizada por recombinação homologa com o vetor de entrada, através do protocolo estabelecido pela plataforma Gateway. Esta metodologia é baseada nos processos biológicos que acontecem durante a infecção e inserção do genoma do bacteriófago *λ* em *E. coli*. Sendo assim, a plataforma Gateway apresenta dois componentes para realizar a recombinação *in vitro*: 1) as seqüências de recombinação, conhecidas como *att*, e 2) o mix de proteínas que medeiam o processo de recombinação, denominadas clonase. Biologicamente, as seqüências *att* são pequenas regiões de acoplamento para proteínas que regulam o processo de recombinação, pudendo se encontrar tanto no genoma do fago *λ* quanto no genoma de *E. coli*, a célula hospedeira. Assim, para os processos de recombinação *in vitro*, estes sítios de ligação foram adicionados a diferentes vetores. Adicionalmente, as seqüências *att* foram modificadas para possuir uma maior especificidade, e garantir a conservação da orientação e do marco de leitura da seqüência recombinada. Desta forma, cada vetor plasmidial carregou seqüências *att*1 e *att*2 diferentes entre si, capazes de reagir só com seus pares da mesma numeração presentes no vetor a recombinar, garantindo a correta orientação do inserto durante o processo de recombinação.

Adicionalmente, existe outro controle para o sistema Gateway. O vetor adenoviral possui a seqüência do gene que codifica para a toxina *ccdB* localizada na região de recombinação (**Figura 15**). A expressão dessa toxina induz a morte bacteriana uma vez que inibe a ação da topoisomerase II (girase) (100) essencial para se produzirem os eventos de transcrição e replicação de genes bacterianos. A seqüência *ccdB* é eliminada durante a recombinação homologa com o vetor de entrada, e no lugar dela é colocado o inserto de interesse. Tendo isto em consideração, o gene *ccdB* no plasmídeo adenoviral funciona como um gene de seleção positiva, uma vez que só as bactérias transformadas com o vetor recombinado (também denominado vetor de expressão) conseguem crescer no meio de cultura. Apesar daquele controle da clonagem, as bactérias transformadas com o vetor de expressão foram submetidas à avalição do padrão de restrição, assim como sequenciamento da região de clonagem para garantir a presença do inserto.

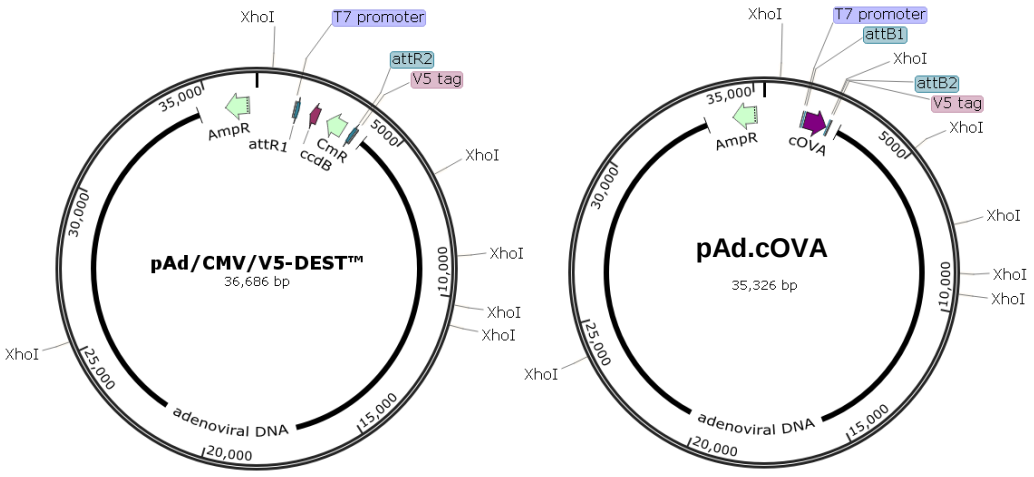

Figura 15 - Mapa de restrição para *Xho*I do vetor destino (pAd/CMV/V5-DEST) e do vetor de expressão (pAd.cOVA).
Durante a recombinação com o vetor de entrada o vetor destino obtém a seqüência de cOVA, a qual contém um sitio de restrição para *Xho*I. Dessa forma, no vetor resultante denominado vetor de expressão, muda o tamanho do plasmídeo e também o padrão de corte para essa enzima.

Para a avaliação do padrão de restrição, foi utilizada a enzima *Xho*I, já que simulações da clonagem feitas *in silico* com o programa SnapGene® 3.0.3 mostraram uma variação do número de sítios de restrição para esta enzima, como mostrado na **Figura 15**. Assim, o mapa de restrição *in silico* para a enzima *Xho*I mostra que uma vez realizado o processo de recombinação, a região de clonagem adquire um sitio de corte adicional para esta enzima, presente na sequencia de cOVA. Desta forma, no padrão de bandas esperado pode-se observar a manutenção do tamanho de todas as bandas entre ambos os vetores, com exceção da banda que envolve o sitio de clonagem, o qual fica dividido em dois fragmentos menores para o plasmídeo de expressão (**Tabela 7**). Este mesmo padrão de bandas foi observado após a digestão enzimática de seis diferentes clones do vetor de expressão (**Figura 16**). Demonstrando a presença da sequencia codificadora para cOVA no vetor adenoviral.

Igualmente, a analise por sequenciamento dos seis clones selecionados mostrou a conservação da sequencia de cOVA durante as etapas de clonagem, uma vez que o alinhamento múltiplo das seqüências do gene obtidas durante o sequenciamento deram *match* com a seqüência da cOVA procedente da base de dados.

pAd/CMV/V5-DEST	pAd.cOVA
14 502	14 502
11 832	11 832
5 846	2 698
2 466	2 466
1 445	1 788
595	1 445
	595

Tabela 7 - Padrão de bandas esperadas da digestão de pAd/CMV/V5-DEST e pAd.cOVA com *Xho*I.
A clivagem *in silico* com enzimas de restrição mostra um padrão diferente de bandas entre o vetor vazio (pAd/CMV/V5-DEST) e o vetor recombinado (pAd.cOVA) após a digestão com a enzima *Xho*I. Neste ultimo é possível observar a formação de dos fragmentos menores de aproximadamente 1.8 e 2.7 kb, em lugar de um maior (5.8 kb) presente no vetor vazio.

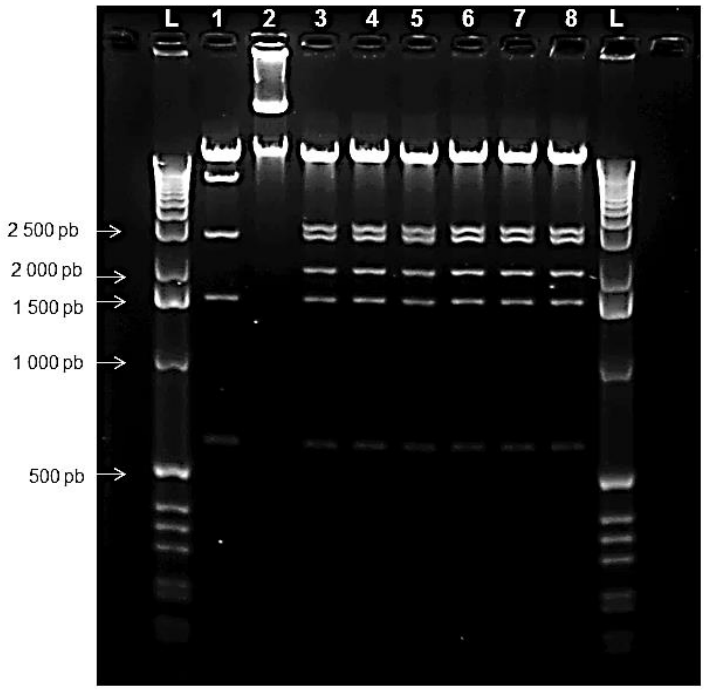

Figura 16 - Avaliação da clonagem de cOVA no vetor destino pAd/CMV/V5-DEST.
Eletroforese em gel de agarose 0.8% que mostra o padrão de bandas do vetor adenoviral após o evento de recombinação. Os diferentes clones foram digeridos com a enzima *Xho*I. Lane 1: pAd/CMV/V5-DEST digerido com *Xho*I. Lane 2: Vetor de expressão pAd.cOVA não digerido. Lane 3-8: clones do vetor pAd.cOVA digeridos com *Xho*I. L: Ladder 1k (Invitrogen).

4.1.4 Transfecção do plasmídeo de expressão pAd.cOVA em células 293A

Previamente a transfecção foi realizada a digestão do vetor de expressão pAd.cOVA com a enzima *Pac*I. Este passo procura atingir dois objetivos: 1) eliminar

as seqüências pertencentes ao genoma bacteriano e 2) expor as seqüências ITR em 5’ e 3’ (**Figura 17A**). As seqüências terminais do genoma adenoviral linearizado, chamadas ITR (repetições terminais invertidas) contém elementos que contribuem na replicação viral, como podem ser seqüências alvo para a ancoragem de fatores de transcrição celulares, assim como regiões que estimulam a transcrição dos genes de expressão inicial da região E1 (101). Durante a conformação circular do plasmídeo adenoviral estas regiões são de difícil acesso para os fatores de transcrição mas, uma vez linearizado, as regiões ITR são liberadas para agir como um genoma viral nativo, uma dupla cadeia de DNA linear, e permitir a transcrição de genes e produção de proteínas que darão origem à partícula viral. Assim, na **Figura 17B** é possível observar o desprendimento de um fragmento de 2074 pb, correspondente as sequencias bacterianas, quando o vetor de expressão é clivado com a enzima *Pac*I. Devido a que esta sequencia, própria do plasmídeo destino, não foi alterada durante o processo de recombinação, também se observou o desprendimento dela depois da digestão do plasmídeo pAd/CMV/V5-DEST com *Pac*I, uso como controle.

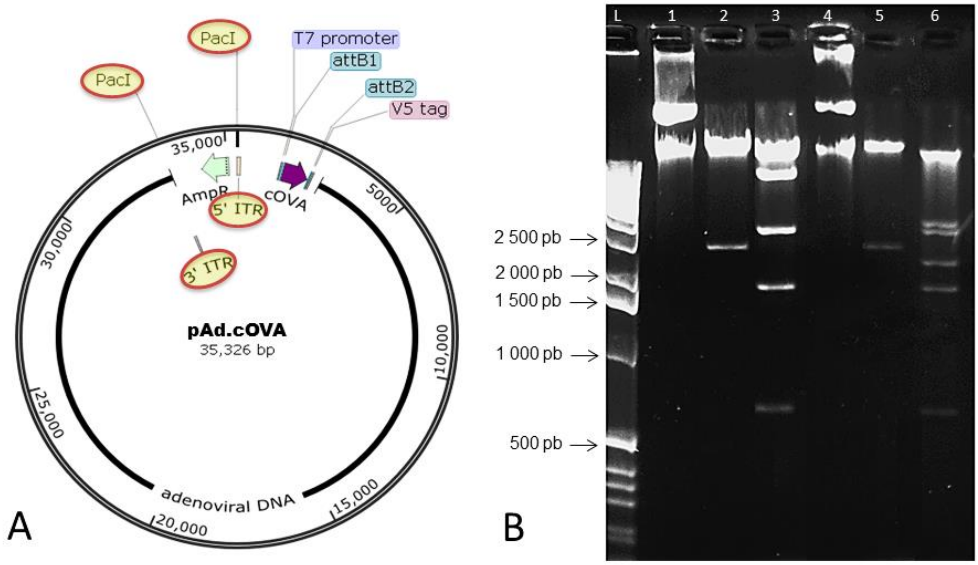

Figura 17 - Digestão com *Pac*I do vetor adenoviral pAd.cOVA.
A. Mapa dos sítios de restrição para *Pac*I no vetor adenoviral pAd.cOVA. O corte com a enzima *Pac*I permite a eliminação dos genes bacterianos (AmpR), ao mesmo tempo em que lineariza o genoma viral e permite a exposição das regiões ITR para a replicação do material genético e a transcrição das proteínas virais, permitindo, em paralelo, a eliminação dos genes bacterianos. **B.** Eletroforese da digestão do plasmídeo pAd.cOVA com a enzima *Pac*I (lane 5), que permite a libração de um fragmento de 2074 pb correspondente as seqüências de genes bacterianos. Como controle, Lane 1: plasmídeo pAd/CMV/V5-DEST não digerido, Lane 2: plasmídeo pAd/CMV/V5-DEST digerido com *Pac*I, ou Lane 3: plasmídeo pAd/CMV/V5-DEST digerido com *Xho*I. Entretanto, Lane 4: plasmídeo pAd.cOVA não digerido, Lane 5: plasmídeo pAd.cOVA digerido com *Pac*I, e Lane 6: plasmídeo pAd.cOVA digerido com *Xho*I.

Uma vez linearizado o plasmídeo, foi realizado o protocolo de transfecção em células 293A para introduzir a cadeia de DNA viral de forma episomal. A linhagem de células 293A apresenta no seu genoma a região codificadora dos genes E1 (E1a, E1b), a qual é importante para a produção das partículas adenovirais. Devido a que as seqüências E1 são eliminadas nos vetores utilizados em pesquisa (adenovírus deficiente de replicação), existe uma complementaridade entre os genomas adenoviral e celular que permite a replicação e produção de proteínas virais de forma exclusiva nesta linhagem celular. Entretanto, outras linhagens celulares que não possuem a região E1 não são capazes de produzir a partícula viral.

Devido ao grande tamanho do genoma adenoviral (33 252 pb) foi necessário utilizar reagentes de grande poder de transfecção. A lipofectamina é um reagente formulado a base de lipossomas catiônicos, o qual consegue introduzir o DNA plasmidial na célula através da interação com a membrana celular, permitindo a absorção por endocitose e liberação no citoplasma. Assim, este complexo liposomal consegue proporcionar uma elevada eficiência de transfecção *in vitro* e permite elevados níveis de expressão do transgêne em diferentes tipos de células de mamíferos (102,103). Tendo isso em consideração, a lipofectamina foi utilizada para a transfecção. Assim, foram testados dois tipos de lipofectamina, a Lipofectamina 2000 e a Lipofectamina LTX + *plus reagent*.

Os poços correspondentes aos grupos controle positivo, que foram transfectados com o plasmídeo que expressa a proteína fluorescente verde (pMAXGFP), mostraram uma eficiência de transfecção de 50 - 70% para as duas lipofectaminas quando foram analisados 24 após transecção (**Figura 18**). Porém, sendo que o plasmídeo adenoviral apresenta um tamanho dez vezes maior que o plasmídeo controle, não é possível afirmar a correta transfecção dele.

Entretanto, os efeitos de uma transfecção positiva de pAd.cOVA deve-se refletir na aparição do efeito citopático nas células que conseguiram adquirir o vetor adenoviral. O efeito citopático se produz pela morte das células hospedeiras, uma vez que as partículas virais produzidas no seu interior conseguem induzir a lise celular, levando a liberação das partículas virais produzidas e conseguinte infecção de células vizinhas. Desta forma, o efeito citopático se reconhece pela presença de células descoladas da placa, em uma freqüência maior da esperada para um cultivo

celular normal. Segundo o fabricante, este efeito deveria ser observado de forma fraca no quarto ou quinto dia após transfecção. Porém, até o sexto dia após transfecção não houve sinal de efeito citopático.

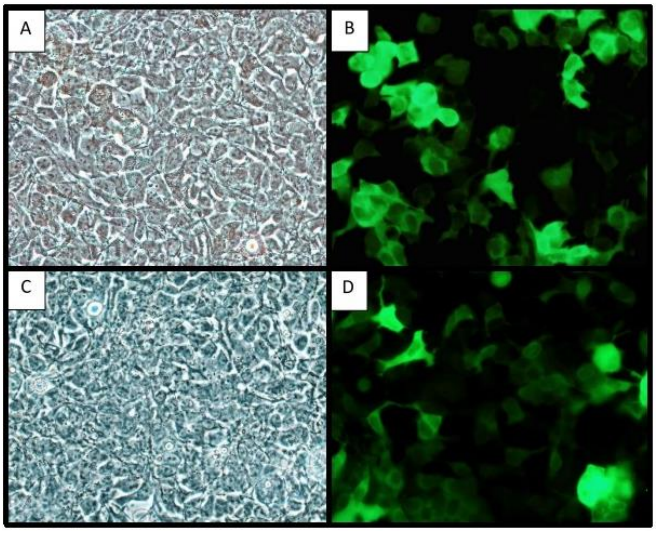

Figura 18 - Resultados da transfecção do plasmídeo controle pMAXGFP em células 293A. Mostra-se resultados positivos da transfecção do plasmídeo controle pMAXGFP em células 293A, e uma eficiência de transfecção de 70 – 80% utilizando (**A** e **B)** lipofectamina 2000 ou (**C e D)** lipofectamina LTX + *plus reagent*. As imagens mostram o cultivo de células em **(A, C)** microscópio de luz invertido e em **(B, D)** microscópio de fluorescência, em um aumento total de 200 X.

Tendo em consideração a baixa taxa de transfecção observada no plasmídeo controle, é de esperar uma eficiência menor para o nosso plasmídeo de expressão. Tem sido relatado na literatura que em ocasiones o efeito citopático após transfecção pode ser observado duas semanas após o inicio do protocolo (104). Este tempo longo deve-se a baixa taxa de transfecção do próprio vetor, por causa do seu grande tamanho, assim como ao reduzido número de copias do genoma viral introduzidos por célula. Desta forma, devido ao baixo número de copias do plasmídeo adenoviral, as células transfectadas não conseguem produzir um número de partículas virais adequados para desencadear a lise da membrana celular. Com o fim de acelerar o processo de produção viral, foi induzido um evento de transdução.

4.1.5 Transdução de células 293A

A transdução é o processo mediante o qual segmentos de DNA são introduzidos em uma célula mediante o uso de um vetor viral. No nosso caso, foi desenvolvido este principio partindo da ideia que os cultivos transfectados poderiam ter produzindo um baixo número de partículas virais, sendo este insuficiente para

induzir a lise celular. Dessa forma, para obter esse pequeno número de partículas virais, as células transfectadas foram lisadas por métodos físicos (choque térmico). Em seguida, o produto de cada lisado celular foi co-cultivado com células 293A, e monitorado até observar o efeito citopático.

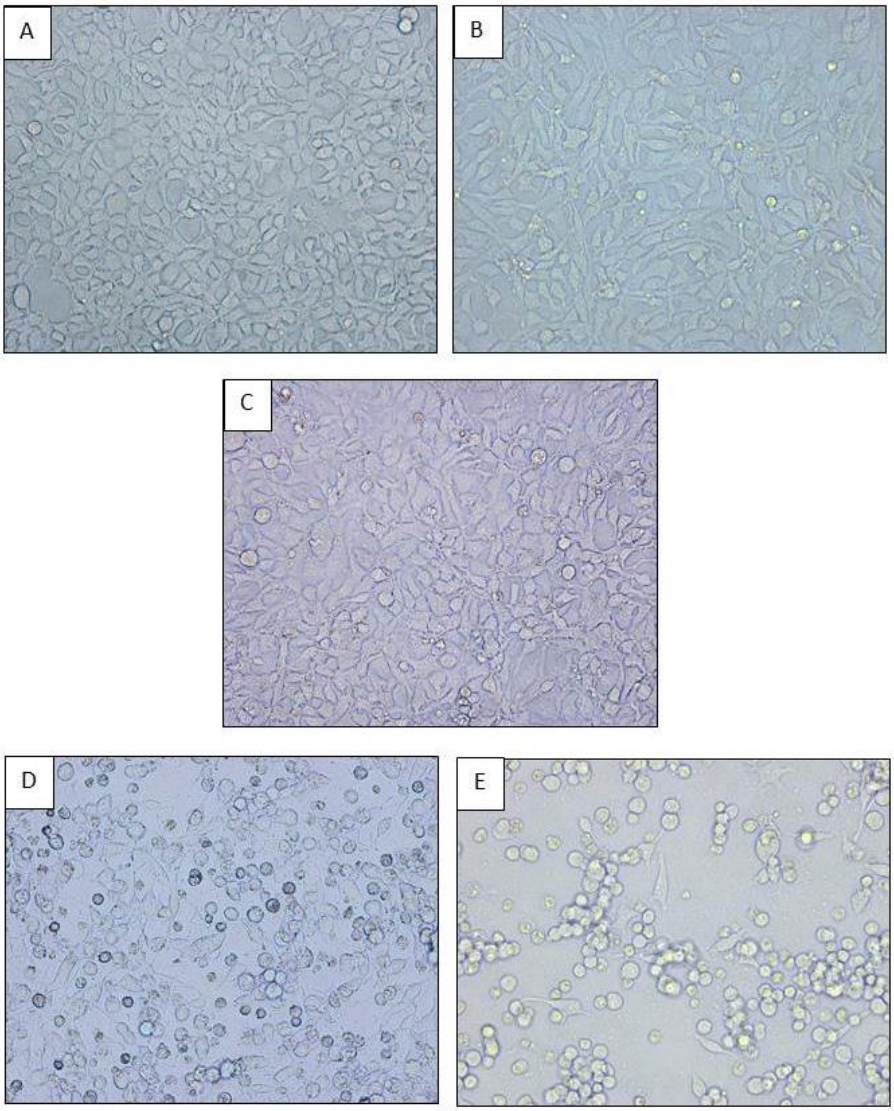

Figura 19 - Células 293A transduzidas com partículas adenovirais obtidas do lisado de células transfectadas.
Os resultados mostram que só as células transfectadas com Lipofectamina LTX + *plus reagent* possuíam partículas virais que permitiram a transdução e aparição do efeito citopático em células 293A. Pode-se observar, no microscópio de luz invertido, o cultivo de células 293A **A.** em condições normais, **B.** co-cultivadas com lisado de células não transfectadas, **C.** co-cultivadas com lisado de células transfectadas com Lipofectamina 2000, e **D.** co-cultivadas com lisado de células transfectadas com Lipofectamina LTX + *plus reagent* e 1.5 µg de DNA plasmidial ou **E.** 3µg de DNA plasmidial.

Após 48 h da transdução viral, foi possível observar efeito citopático nas células que foram transduzidas com o lisado procedente de células transfectadas com Lipofectamina LTX + *plus reagent* (**Figura 19D** e **E)**. Entretanto, as células

transduzidas com o lisado de células transfectadas com Lipofectamina 2000 não manifestaram efeito citopático (**Figura 19C**). Estes resultados mostram que a transfecção do plasmídeo adenoviral pAd.cOVA só funcionou quando realizado com a Lipofectamina LTX + *plus reagent*, já que foram as únicas células que produziram a partícula adenoviral. Desta forma, a Lipofectamina LTX + *plus reagent* mostra uma eficiência de transfecção maior que a Lipofectamina 2000 em relação aos plasmídeos de grande tamanho, uma vez que os plasmídeos controle pMAXGFP foram transfectados com igual eficiência para os dois reagentes.

4.1.6 Titulação da partícula adenoviral

Com o objetivo de quantificar o número de partículas com capacidade infetiva presentes na solução foi realizado o protocolo de titulação por formação de placas de lise. Durante este processo foi possível observar a presença de placas de lise até a diluição 1 x 10^{-8} (**Figura 20**). Seguidamente, foram contabilizadas o número de placas de lise presentes nos cultivos celulares infectados com a diluição 1 x 10^{-8} da partícula viral. Após os cálculos correspondentes foi determinado um título do stock viral de 8 x 10^{8} PFU/ml. Este dado corresponde à quantidade de partículas virais com capacidade infectiva presentes em 1 ml de solução.

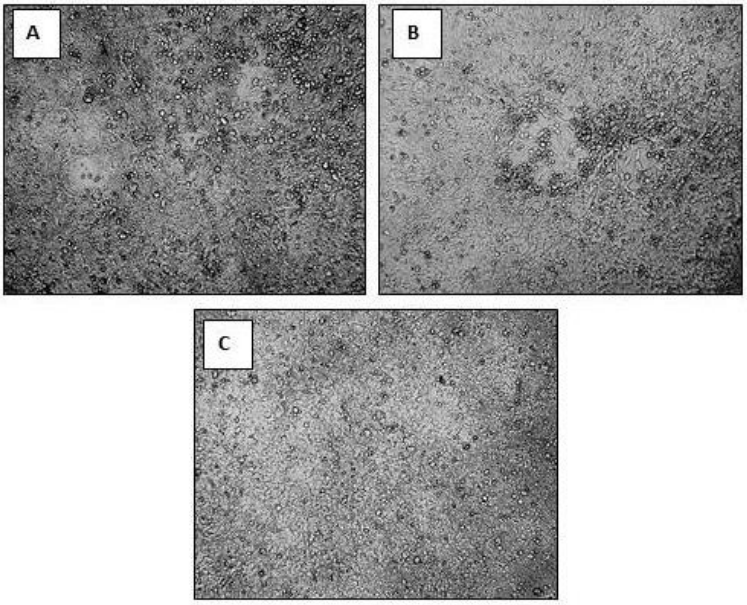

Figura 20 - Formação de placas de lise em células 293A após o cultivo com diferentes diluições de Ad.cOVA.
Os resultados da titulação mostram a formação das últimas placas de lise na diluição **B:** 1 x 10^{-8}, entretanto, diluições menores (**A:** 1 x 10^{-6}) mostram uma maior freqüência no número de placas de lise por campo, e em diluições maiores (**C:** 1 x 10^{-12}) não foi possível encontrar a formação de placas de lise.

4.2 Padronização da dose viral para estimulação da resposta imune *in vivo*

4.2.1 Efetividade e especificidade da vacina adenoviral

Após produção da vacina adenoviral, sua eficácia foi avaliada analisando-se a capacidade de indução de resposta citotóxica desenvolvida pelos linfócitos T $CD8^+$ em modelos murinos *in vivo*. Dessa forma, camundongos C57Bl/6 foram imunizados ou não com 2 x 10^8 PFU / 100 µl de Ad.cOVA. Como controle, utilizamos a mesma concentração do adenovírus vetor (Ad.β-gal).

Sendo que o pico da resposta de linfócitos T $CD8^+$ induzida a partir da vacinação por vetores virais acontece no sétimo dia após a imunização, o ensaio de citotoxicidade *in vivo* foi realizado neste ponto de tempo. Para isso, esplenócitos provenientes de camundongos naïves C57Bl/6 foram marcados com CFSE e pulsados ou não com peptídeo. Com o intuito de avaliar a especificidade da resposta, além do peptídeo de OVA foi utilizado o peptídeo imunodominante da proteína β-galactosidase, conhecido como ICP, o qual também é restrito ao MHC de classe I. Finalmente, estas células foram transferidas por via *i.v.* a animais receptores previamente vacinados, e recuperadas a partir do baço após 18 h para avaliar a freqüência das populações pulsadas ou não com peptídeo.

Assim, na **Figura 10****Figura 21** observa-se que o grupo de camundongos não imunizados não apresentou atividade citotóxica nas populações inoculadas, sendo possível observar ambas as populações de células pulsadas e não pulsadas em freqüência semelhante. Entretanto, camundongos previamente imunizados com Ad.cOVA apresentam lise total das células pulsadas com o peptídeo da OVA, sendo que não há presença de lise na população pulsada com ICP. Paralelamente, os camundongos imunizados com Ad.β-gal, apesar de serem imunizados com uma partícula adenoviral que preserva a homologia das sequencias viral, não apresentaram lise das células pulsadas com o peptídeo da OVA, e sim quando essa população foi pulsada com ICP. Desta forma foi comprovada a ausência de reações cruzadas, que poderiam ter sido geradas pela própria estrutura do vetor adenoviral, para o reconhecimento de OVA.

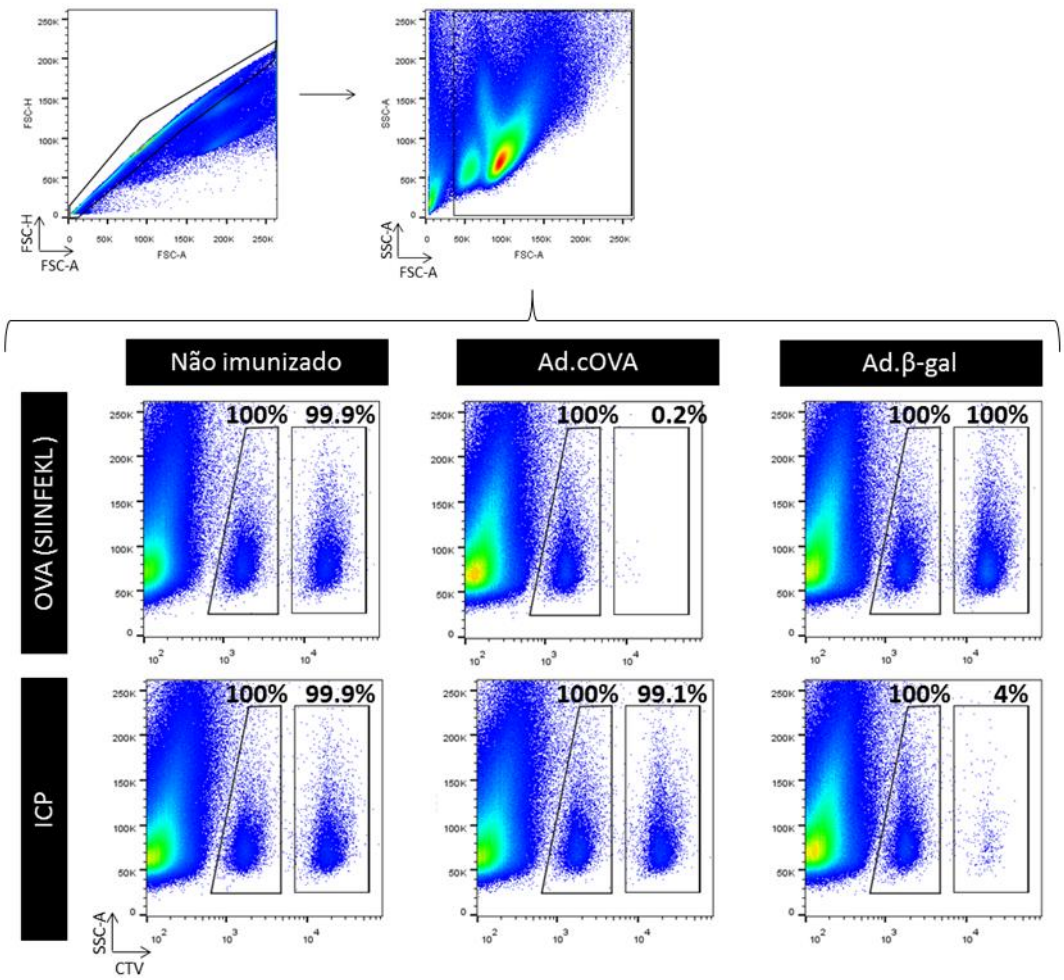

Figura 21 - A resposta citotóxica induzida pela imunização com Ad.cOVA é antígeno-específica.
Camundongos C57Bl/6 foram imunizados ou não com Ad.cOVA ou Ad.β-gal via *i.m.* Sete dias depois, a resposta citotóxica foi estimada pelo desafio com esplenócitos marcados com CTV e pulsados ou não com 1uM do peptídeo da OVA ou ICP. Os resultados são representativos de 1 experimento realizado com 3 animais por grupo.

Além disto, observou-se uma relativa maior imunogenicidade gerada pela vacinação com Ad.cOVA, uma vez que esta induziu a lise total das células pulsadas com OVA. Um efeito menor foi observado após a vacinação com Ad.β-gal apesar de terem sido utilizadas as mesmas doses virais para ambos os vetores.

Contudo, foi possível afirmar que a vacinação com Ad.cOVA induziu uma forte resposta citotóxica, a qual se mostrou específica para o reconhecimento de resíduos de OVA.

4.2.2 A resposta imune citotóxica induzida por Ad.cOVA é dependente da dose de vacinação e da concentração de peptídeo pulsada nas células-alvo durante o ensaio de citotoxicidade in vivo.

Com a finalidade de determinar a melhor relação dose-resposta entre a concentração da partícula adenoviral utilizada para imunização e a resposta efetora induzida em linfócitos T $CD8^+$ foi utilizado o ensaio de citotoxicidade *in vivo*. Desta forma, camundongos C57Bl/6 foram imunizados ou não com três concentrações de Ad.cOVA (2×10^5, 2×10^6 e 2×10^7 PFU / 100 µl). Sete dias depois foi avaliada a resposta imune celular através do desafio com células pulsadas com três diferentes concentrações de peptídeo OVA (10 nM, 100 pM e 1 pM) e um grupo controle de células não pulsadas. Para o estabelecimento dos parâmetros utilizados neste experimento, teve-se em consideração a forte resposta induzida nas condições experimentais previas. Dessa forma, as concentrações virais e de peptídeo foram diminuídas gradualmente até observar o decaimento do efeito citotóxico.

Para isso, as células transferidas foram uma mistura de quatro populações coradas, cada duas, com um marcador diferente: CFSE e CTV, em duas concentrações: *High* e *Low*. Dessa forma, a população CTV_{Low} foi pulsada com a menor concentração do peptídeo 1 pM, CTV_{High} com a concentração intermediaria 100 pM, e $CFSE_{High}$ com a maior concentração do peptídeo 10 nM. A população de células marcadas com $CFSE_{Low}$ não foi pulsada com peptídeo. Durante a aquisição de eventos, esse grupo de células não pulsadas serviu como controle, já que não são eliminadas pelos linfócitos T $CD8^+$ antígeno-específicos.

Assim, a concentração do peptídeo determinou a avidez com a qual os linfócitos, reconheceram o antígeno. Sendo que a avidez é um dos fatores determinantes no desenvolvimento da resposta efetora (105,106), foram observadas variações na lise das populações inoculadas. Na **Figura 22** observa-se que a população de células pulsadas com 1 pM do peptídeo SIINFEKL apresentou um comportamento similar as células sem peptídeo, exibindo ausência de lise. Esse dado indica que esta concentração de peptídio não é suficiente para fazer com que as células-alvo sejam reconhecidas e eliminadas pelos linfócitos T $CD8^+$, para nenhuma das doses virais testadas. Por outro lado, observou-se que a população de esplenócitos pulsados com 100 pM apresentou uma lise proporcional à dose viral

utilizada durante a imunização. Entretanto, advertiu-se que as populações de células pulsadas com 10 nM foram eliminadas quase totalmente durante o ensaio, e não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos imunizados.

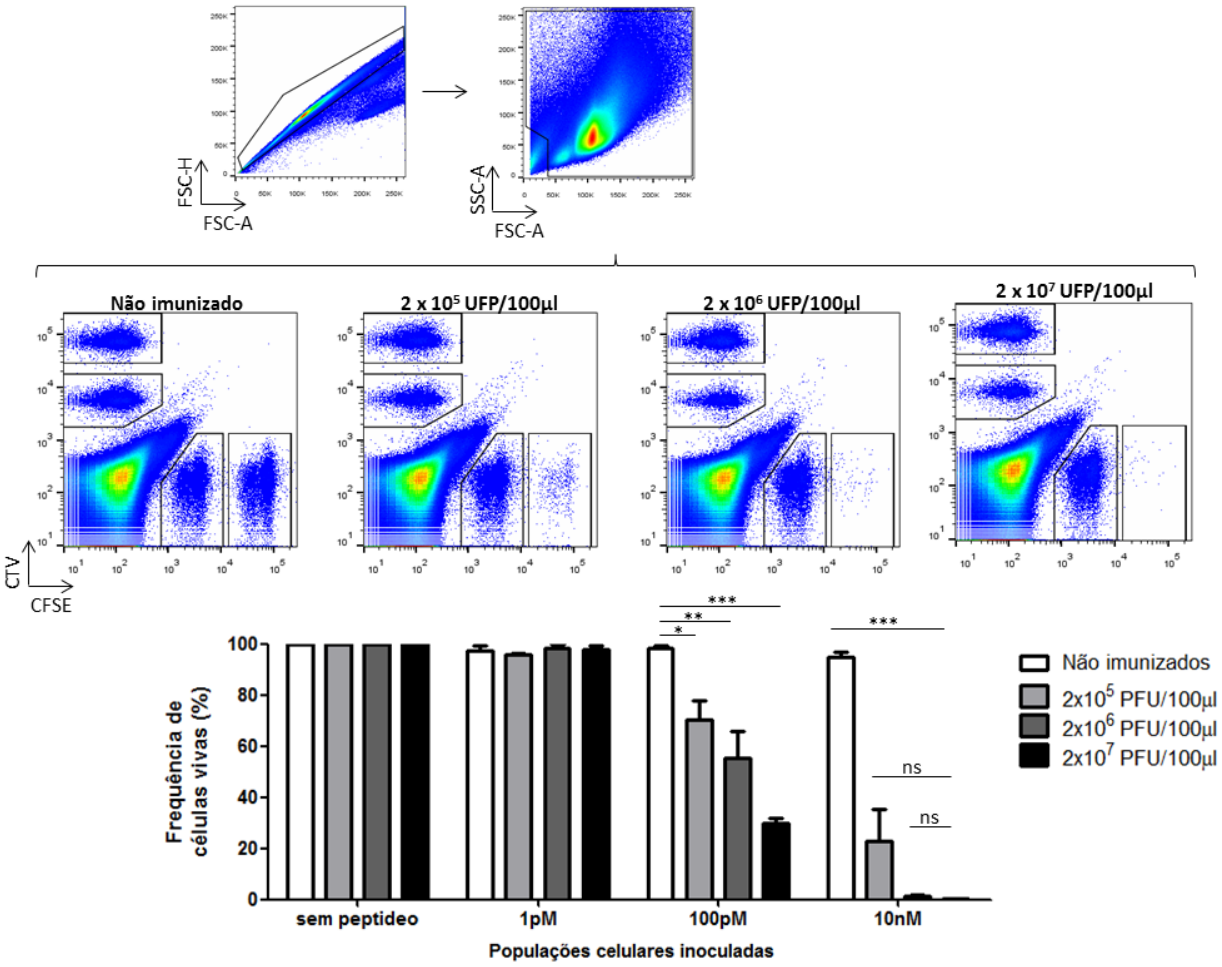

Figura 22 - Curva dose-respota para estimulação da resposta imune citotóxica com Ad.cOVA. Camundongos C57Bl/6 foram imunizados ou não com três concentrações diferentes de Ad.cOVA (2 x 10^5, 2 x 10^6 e 2 x 10^7 PFU / 100 µl) por via *i.m.* uma semana antes do ensaio de citotoxicidade *in vivo*. A resposta citotóxica foi avaliada pela analise da freqüência de células vivas em cada população previamente pulsada ou não com o peptídeo da OVA em diferentes concentrações (CTV_{High} = 1 pM, CTV_{Low} = 100 pM, $CFSE_{High}$ = 10 nM, $CFSE_{Low}$= sem peptídeo). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com uma media de tres animais por grupo. Para a análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste pos-hoc LSD Fisher. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

A concentração de 100 pM de peptídeo, por ter sido eliminada parcialmente, permitiu diferenciar as intensidades de resposta originadas pelas diversas doses de adenovírus. Assim, inferiu-se que as melhoras ou decaimentos da resposta

citotóxica seriam exibidos através da redução ou incremento da freqüência de células nesta população, respetivamente. Portanto, considerou-se avaliar a concentração de 100 pM durante os posteriores ensaios de citotoxicidade *in vivo*.

Em relação à dose vacinal, observou-se que as três doses de adenovírus utilizadas foram capazes de induzir a ativação da resposta imune celular. Sendo que mostraram diferenças significativas na resposta efetora quando compradas com camundongos não imunizados. Porém, a dose de 2 x 10^5 PFU / 100 µl induziu uma resposta citotóxica muito variável entre os indivíduos do mesmo grupo, como se observa na freqüência de células pulsadas com 10 nM na **Figura 22**. Entretanto, entre os camundongos vacinados com 2 x 10^7 PFU / 100 µl e aqueles inoculados com 2 x 10^6 PFU / 100 µl apresentou-se uma atividade citotóxica semelhante nas células pulsadas com 10 nM. Com esses dados, nós resolvimos escolher a concentração de 2 x 10^6 PFU / 100 µl para continuação do nosso trabalho.

4.3 Camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentam lise deficiente das células pulsadas com peptídeo de OVA durante o ensaio de citotoxicidade *in vivo*.

Uma vez padronizado o protocolo de inoculação da vacina adenoviral Ad.cOVA, prosseguimos a avaliar a qualidade da resposta efetora dos linfócitos T CD8$^+$ de camundongos deficientes da proteína BIM através do ensaio de citotoxicidade *in vivo*.

Assim, camundongos C57Bl/6 selvagens, *bim*$^{+/-}$ e *bim*$^{-/-}$ foram imunizados ou não com Ad.cOVA. Sete dias depois da imunização, os animais foram desafiados com células pulsadas com o peptídeo SIINFEKL da OVA, nas condições estabelecidas para este protocolo. Dessa forma, as células transferidas foram uma mistura de duas populações de células coradas com duas concentrações de CTV. A população CTV_{High} (10 µM) foi pulsada com 100 pM de OVA; entretanto, a população CTV_{Low} (1 µM) não foi pulsada com o peptídeo.

A analise da freqüência das populações transferidas (**Figura 23**) indicou que camundongos selvagens e *bim*$^{+/-}$ apresentaram níveis semelhantes de lise específica das células pulsadas com o peptídeo da OVA. Entretanto, camundongos *bim*$^{-/-}$

exibiram uma eliminação deficiente dessas células, uma vez que apresentaram um incremento de 50% na freqüência de células CTV_{High} vivas quando comparados com camundongos das linhagens controle.

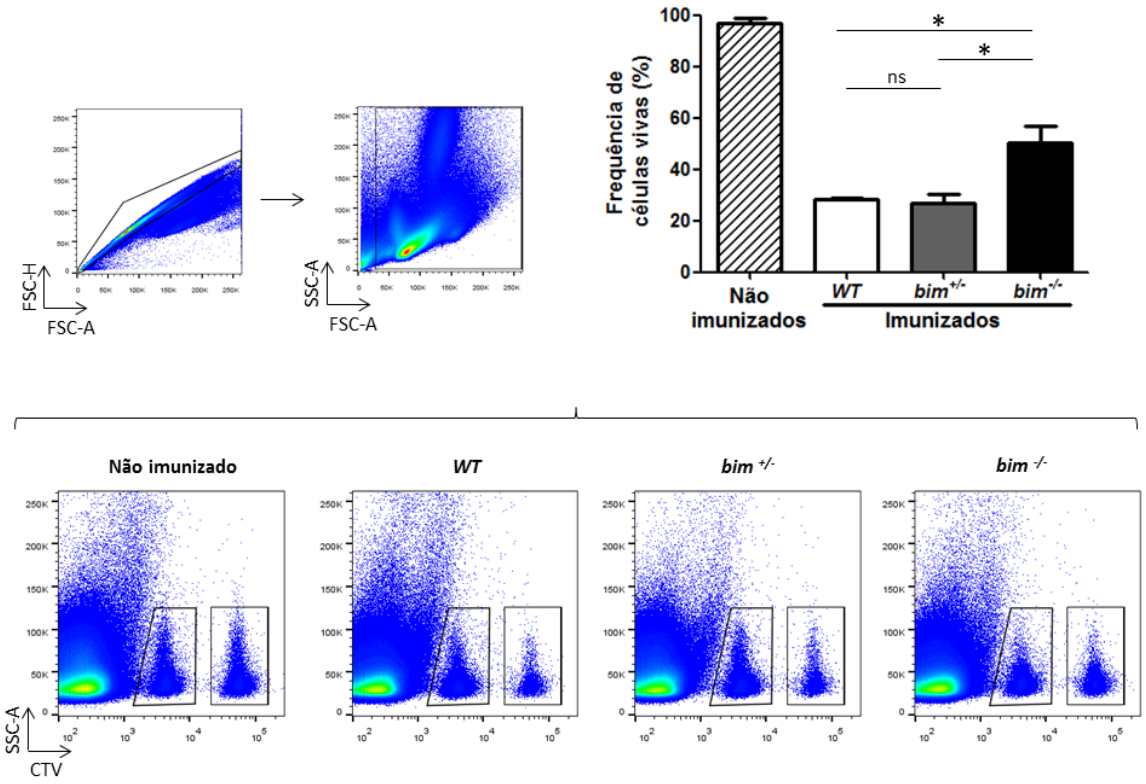

Figura 23 - Camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentam eliminação deficiente das células pulsadas. Camundongos C57Bl/6 selvagens, *bim*$^{+/-}$ e *bim*$^{-/-}$ foram imunizados ou não com 2 x 10^6 PFU / 100 µl de Ad.cOVA por via *i.m.* uma semana antes do ensaio de citotoxicidade *in vivo*. A resposta citotóxica foi avaliada pela analise da freqüência de células vivas na população previamente pulsada com o peptídeo da OVA (CTV_{High} = 100 pM), em relação à freqüência de células na população não pulsada (CTV_{Low}). Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes com uma media de 3 animais por grupo. Para a análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste pos-hoc LSD Fisher. * ($p < 0.05$), ns ($p > 0.05$).

Desta forma, os dados obtidos indicaram que a proteína BIM esta relacionada com um adequado desenvolvimento dos linfócitos T $CD8^+$ efetores, e a capacidade destes para induzir a lise celular. Adicionalmente, este efeito não parece ser dose-dependente, já que camundongos *bim*$^{+/-}$ não mostram diferenças significativas em relação aos camundongos selvagens.

4.4 Camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentam uma baixa freqüência de linfócitos T CD8^{+} produtores de IFNγ .

Uma vez observado que os linfócitos T CD8^{+} de camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentam deficiências na lise específica das células-alvo, decidimos avaliar outra caraterística efetora destas células, como é a produção de citocinas. Em conseqüência, foi avaliada a freqüência de células produtoras de IFNγ através do ensaio de ELISPOT e por citometría de fluxo. Assim, camundongos C57Bl/6 selvagens, *bim*$^{+/-}$ e *bim*$^{-/-}$ foram imunizados ou não com 2 x 10^{6} PFU / 100 µl de Ad.cOVA. Sete dias depois o baço foi coletado e processado para a recuperação dos esplenócitos. Em seguida, esses esplenócitos foram cultivados na presença ou ausência do peptídeo SIINFEKL de OVA.

Para o ensaio de ELISPOT a incubação das células com o estimulo foi realizada por um período de 18 h utilizando uma placa de nitrocelulose previamente tratada com anti-IFNγ. Despois desse período, a placa foi retirada da cultura e processada para permitir o reconhecimento do número de células produtoras de IFNγ. Desta forma, cada célula produtora desta citocina foi representada por um ponto, ou *spot*, sobre a superfície da membrana de nitrocelulosa locada no fundo da placa.

Na **Figura 24** é possível observar que o ensaio de ELISPOT foi específico para o estimulo da OVA, uma vez que não foram encontradas células produtoras de IFNγ nos cultivos realizados em ausência do peptídeo. De igual forma, não foi possível observar células produtoras desta citocina nas amostras procedentes de camundongos não imunizados, seja na presença ou ausência do estimulo. Em contraposição, amostras procedentes de camundongos imunizados com Ad.cOVA apresentaram células produtoras de IFNγ quando foram cultivados na presença do estimulo de OVA.

Durante a análise do número de *spots* gerados através do cultivo de esplenócitos, foi observado que camundongos *bim*$^{+/-}$ apresentaram uma leve redução, não significativa, na freqüência de células produtoras de IFNγ em relação com camundongos selvagens. Entretanto, camundongos *bim*$^{-/-}$ exibiram uma baixa freqüência de células produtoras de IFNγ em resposta ao estimulo com o peptídeo

SIINFEKL de OVA quando comparados com camundongos selvagens e *bim*$^{+/-}$. Assim, estes resultados reforçam a ideia de que a proteína BIM esta relacionada à obtenção de linfócitos T CD8^{+} efetores de boa qualidade.

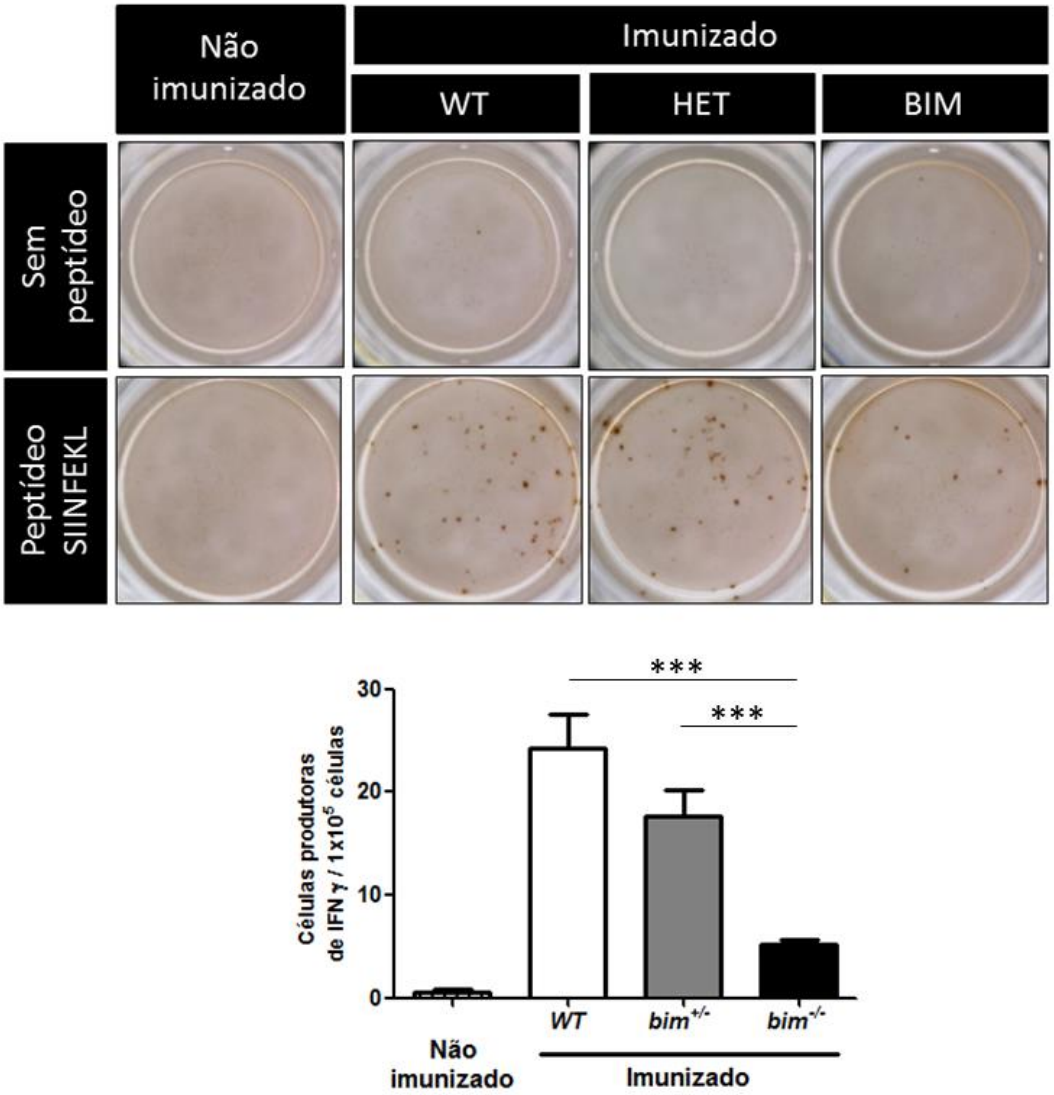

Figura 24 - Freqüência de células produtoras de IFNγ em camundongos *bim*$^{-/-}$ observadas pelo ensaio de ELISPOT.
Esplenócitos de camundongos C57Bl/6 selvagens, *bim*$^{+/-}$ e *bim*$^{-/-}$ imunizados e não imunizados foram coletados e cultivados em placa de ELISPOT na presença ou ausência do peptídeo SIINFEKL da OVA. (A) Microfotografias dos poços da placa de nitrocelulosa que mostram os *spots* representativos das células produtoras de IFNγ. (B) Gráfico de barras que ilustra a freqüência de células produtoras de IFNγ para camundongos selvagens, *bim*$^{+/-}$ e *bim*$^{-/-}$. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes com uma media de 3 animais por grupo. Para a análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste pos-hoc LSD Fisher. *** ($p < 0.001$).

Entretanto, para avaliar a produção de IFNγ por citometría de fluxo, os esplenócitos coletados foram cultivados em uma placa regular de 96 poços por um período de 11 h. Durante este tempo de incubação, as células foram submetidas aos efeitos de brefeldina e monensina, drogas responsáveis da parada do trafego de vesículas intracelulares. De tal modo, a brefeldina impediu o trafego de proteínas entre o retículo endoplasmático (ER) e o complexo de Golgi, induzindo um incremento no tamanho do ER ocasionado pelo acumulo de proteínas (107). Entretanto, a monensina foi responsável da incapacidade de liberação de proteínas no complexo de Golgi, induzindo um incremento do tamanho dessa organela (108). Desta forma, foi bloqueada a liberação de citocinas ao meio extracelular, permitindo seu reconhecimento mediante marcação intracelular das amostras tratadas.

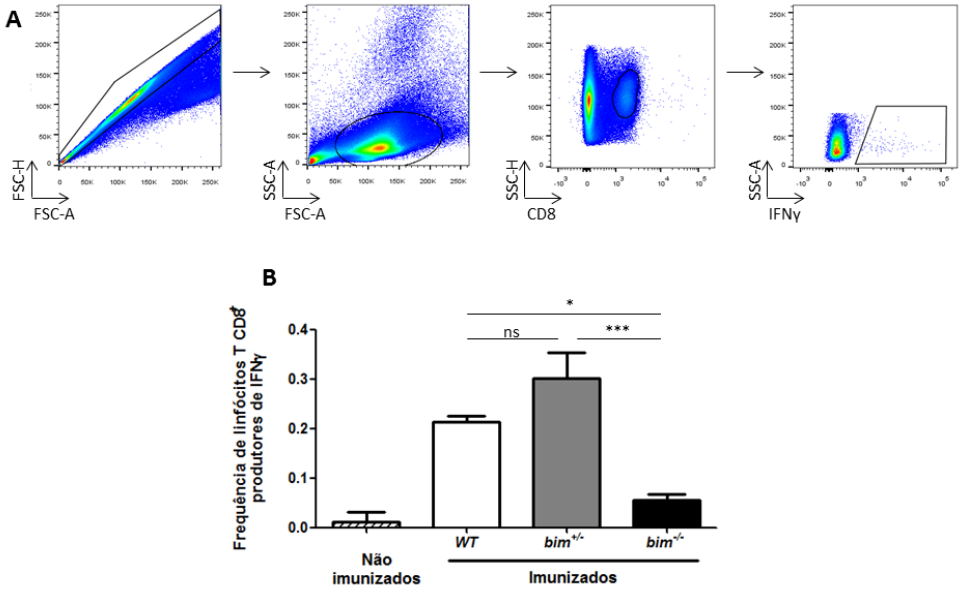

Figura 25 - Freqüência de linfócitos T CD8^{+} produtores de IFNγ em camundongos *bim*$^{-/-}$. Esplenócitos de camundongos C57Bl/6 selvagens, *bim*$^{+/-}$ e *bim*$^{-/-}$imunizados e não imunizados foram coletados e cultivados em placa na presença ou ausência do peptídeo SIINFEKL da OVA. As amostras foram tratadas para impedir o trafego de vesículas intracelulares e a liberação de citocinas. Após a incubação nestas condições, as células foram marcadas com anti-CD8 e anti-IFNγ. **A.** Estratégia de gates utilizada para determinar a freqüência de linfócitos T CD8^{+} produtores de IFNγ. **B.** Gráfico de barras que monstra a freqüência de linfócitos T CD8^{+} produtores de IFNγ em camundongos selvagens, *bim*$^{+/-}$ e *bim*$^{-/-}$. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes com uma media de 3 animais por grupo. Para a análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste pos-hoc LSD Fisher. * ($p < 0.05$), *** ($p < 0.001$), ns ($p > 0.05$).

A analise das populações marcadas, por citometría de fluxo, permitiu comparar a freqüência de linfócitos T CD8^{+} produtores de IFNγ presentes em camundongos C57Bl/6, *bim*$^{+/-}$ e *bim*$^{-/-}$. Observou-se que, os camundongos *bim*$^{+/-}$

apresentaram diferenças não significativas na freqüência de linfócitos T $CD8^+$ produtores de IFNγ em relação aos camundongos selvagens. Adicionalmente, os camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentaram um reduzido número de células produtoras de IFNγ após a estimulação *in vitro* com resíduos de OVA (**Figura 25**). Em geral, estes dados mostram um perfil semelhante aos resultados obtidos através do ensaio de ELISPOT. Assim, sendo o ensaio de marcação intracelular mais sensível e específico, permitiu corroborar os dados anteriormente apresentados.

Em conjunto, estes resultados evidenciaram a importância da proteína BIM durante o desenvolvimento de linfócitos T $CD8^+$ efetores. Demostrando que na ausência desta proteína existe uma redução da resposta citotóxica e da freqüência de células capazes de produzir de IFNγ em resposta ao estímulo.

4.5 Avaliação da resposta antitumoral desenvolvida pelos camundongos *bim*$^{-/-}$

Como uma metodologia alternativa para analisar a resposta efetora de linfócitos T $CD8^+$, foi avaliada a capacidade de controle da progressão tumoral nestes camundongos. Desta forma, células da linhagem de melanoma murino que expressam cOVA (Tm1.Luc.cOVA) foram inoculadas em camundongos C57Bl/6 selvagens e *bim*$^{-/-}$. O crescimento tumoral foi monitorado pela medição com paquímetro.

As linhagens de melanoma murino Tm1.Luc e Tm1.Luc.cOVA foram produzidas no nosso laboratório como parte de um projeto anterior, cujo objetivo era recriar, de forma mais próxima, as caraterísticas dos antígenos expressos em células tumorais (109). Desta forma, uma das principais caraterísticas que diferencia a linhagem Tm1.Luc.cOVA das amplamente utilizadas células tumorais B16.OVA esta relacionada à conformação e localização da proteína OVA produzida. Assim, as células Tm1.Luc.cOVA expressam a proteína OVA na conformação citoplasmática (cOVA), entanto as células B16.OVA produzem ovalbumina secretória (sOVA). Assim, o modelo de tumor Tm1.Luc.cOVA foi escolhido para este desenho experimental já que a presença da OVA no citoplasma permite sua degradação pelo proteossomo, permitindo a associação dos peptídeos gerados ao MHC-I (110).

Dessa forma, os residuos de OVA podem ser reconhecidos pelos TCR dos linfócitos T $CD8^+$ antígeno-específicos estimulados após a vacinação com Ad.cOVA.

Como uma primeira abordagem desta metodologia, camundongos C57Bl/6 selvagens foram imunizados ou não com Ad.cOVA, e sete dias depois a resposta imune foi desafiada com células da linhagem Tm1.Luc, as quais não expressam cOVA (**Figura 26**). Observou-se que o desenvolvimento da linhagem tumoral em ambos os grupos analisados não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Sendo que os tumores atingiram sua maior dimensão (1.5 cm^3) após 25-27 dias da inoculação para ambos os grupos de camundongos, imunizados e não imunizados.

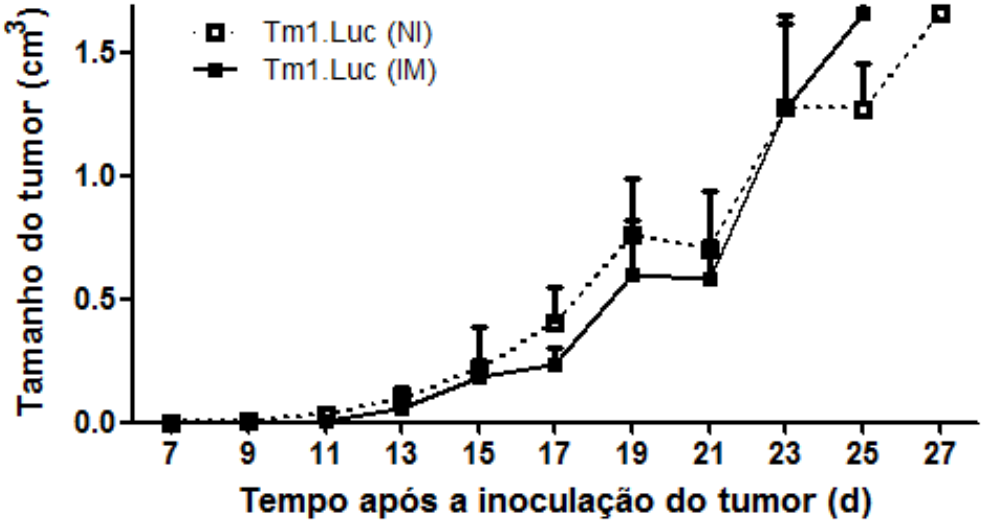

Figura 26 - Células tumorais de melanoma que não expressam OVA (Tm1.Luc) não apresentam diferenças no padrão de crescimento tumoral produto da imunização com Ad.cOVA.
Células tumorais de melanoma da linhagem Tm1 que não expressam OVA (Tm1.Luc) foram inoculadas em camundongos C57Bl/6 selvagens previamente imunizados (IM) ou não (NI) com 2 x 10^6 PFU / 100 µl de Ad.cOVA. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes com uma media de 5 animais por grupo. Para a análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, sendo que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0.05$).

Paralelamente, células da linhagem Tm1.Luc.cOVA foram inoculadas, no sétimo dia, em camundongos selvagens imunizados ou não com a vacina adenoviral Ad.cOVA (**Figura 27**). Dessa forma, observou-se que os camundongos imunizados com Ad.cOVA mostraram uma redução do crescimento tumoral quando comparados

com seus pares não imunizados. Sendo que, os tumores desenvolvidos nos animais não imunizados atingiram sua maior dimensão no dia 20 após inoculação. No entanto, os camundongos imunizados não conseguiram atingir o volume máximo permitido (1.5 cm^3) após 27 dias de acompanhamento da progressão tumoral. Dessa forma, foi possível afirmar que a vacina adenoviral induziu a ativação da resposta imune antitumoral específica contra OVA. O qual se viu refletido em um melhor controle do crescimento tumoral.

Adicionalmente, se observa que a linhagem de melanoma murino Tm1.Luc.cOVA apresenta algumas diferenças durante seu desenvolvimento *in vivo*, quando comparado com a linhagem Tm1.Luc. Sendo que a linhagem Tm1.Luc apresentou uma taxa de crescimento mais lento, o qual permitiu acompanhar o crescimento tumoral até o dia 25 - 27 após inoculação de células tumorais. No entanto, os tumores da linhagem Tm1.Luc.cOVA foram acompanhados até o dia 20 do ensaio.

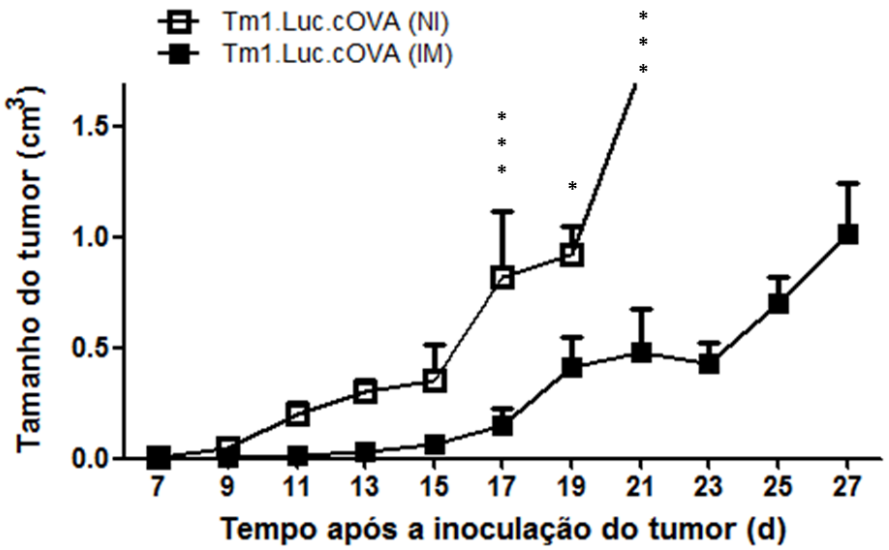

Figura 27 - Células tumorais de melanoma que expressam OVA (Tm1.Luc.cOVA) mostram diferenças no padrão de crescimento tumoral produto da imunização com Ad.cOVA.
Células tumorais de melanoma da linhagem Tm1 que expressam a proteína OVA (Tm1.Luc.cOVA) ou não (Tm1.Luc) foram inoculadas em grupos de camundongos C57Bl/6 selvagens previamente imunizados (IM) e não imunizados (NI) com 2 x 10^6 PFU / 100 µl de Ad.cOVA. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes com uma media de 5 animais por grupo. Para a análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste pos-hoc LSD Fisher. * ($p < 0.05$). *** ($p < 0.001$).

Uma vez comprovado o controle específico do crescimento tumoral em resposta à vacinação com Ad.cOVA, camundongos da linhagem C57Bl/6 selvagens e *bim*$^{-/-}$, foram submetidos aos protocolos previamente descritos, que incluem vacinação com Ad.cOVA e posterior desafio da resposta imune com células tumorais Tm1.Luc.cOVA (**Figura 28**). Assim, uma vez mais, observou-se que camundongos imunizados apresentaram uma menor taxa de crescimento tumoral, em relação aos camundongos não imunizados. Porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na progressão tumoral das linhagens de camundongos selvagens e *bim*$^{-/-}$. Sendo que um único ponto (**Figura 28**, dia 21) da curva de crescimento tumoral exibiu diferenças estatisticamente significativas entre camundongos não imunizados das duas linhagens avaliadas.

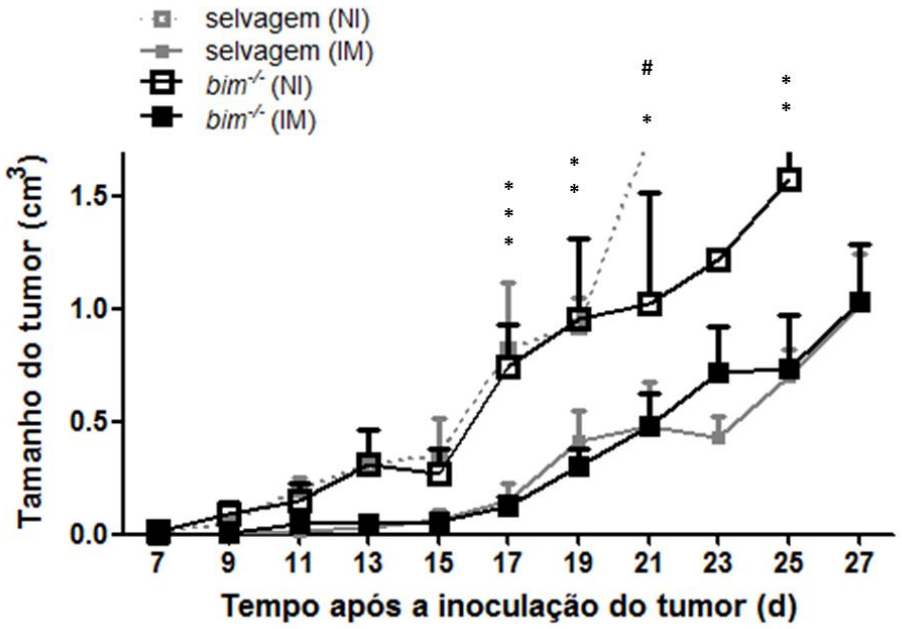

Figura 28 - Camundongos C57Bl/6 selvagens e *bim*$^{-/-}$ não apresentam diferenças no controle da progressão tumoral após imunização com Ad.cOVA.
Células tumorais de melanoma da linhagem Tm1 que expressam a proteína OVA no citoplasma (Tm1.Luc.cOVA) foram inoculadas em camundongos C57Bl/6 selvagens e *bim*$^{-/-}$ previamente imunizados (IM) e não imunizados (NI) com 2 x 10^6 PFU / 100 µl de Ad.cOVA. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes com uma media de 5 animais por grupo. Os asteriscos (*) representam diferenças estatisticamente significativas entre os camundongos IM e NI da linhagem *bim*$^{-/-}$; e o numeral (#) indica diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens de camundongos selvagens e *bim*$^{-/-}$ no grupo de camundongos NI. Para a análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste pos-hoc LSD Fisher. * ($p < 0.05$). ** ($p < 0.01$). *** ($p < 0.001$). # ($p < 0.05$).

Assim, apesar das deficiências apresentadas na função efetora dos linfócitos T $CD8^+$ de camundongos *bim*$^{-/-}$, estes animais foram capazes de controlar o crescimento tumoral de forma similar à desenvolvida por camundongos selvagens depois da vacinação com Ad.cOVA.

4.6 Cinética da resposta citotóxica desencadeada pelos linfócitos T $CD8^+$ em camundongos *bim*$^{-/-}$.

Devido à inesperada boa resposta dos camundongos *bim*$^{-/-}$ frente à progressão tumoral, quando este é inoculado 7 dias após a vacinação, decidimos avaliar o desenvolvimento da resposta imune induzida pela vacina adenoviral durante o mesmo período de tempo. Dessa forma, camundongos C57Bl/6 selvagens, *bim*$^{+/-}$ e *bim*$^{-/-}$ foram imunizados, e a resposta imune foi avaliada através do ensaio de citotoxicidade *in vivo* após 7, 14, 21 e 28 dias a partir da data de vacinação.

Assim, observou-se que camundongos selvagens apresentaram um decaimento constante da atividade citotóxica desenvolvida pelos linfócitos T $CD8^+$ frente às células pulsadas com 100 pM do peptídeo de OVA (**Figura 29A**). Desta forma, advertiu-se nestes camundongos uma diferença maior a 60% na atividade citotóxica produzida entre o dia 7 e o dia 28 após imunização. Entretanto, os camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentaram inicialmente (dia 7 após imunização) uma atividade citotóxica deficiente frente a aquela mesma população de células (100 pM), como já tinha sido observado nos ensaios anteriores (ver seção 4.3). Porém, com o passar do tempo, a resposta citotóxica destes camundongos transgênicos decaiu em uma taxa menor à apresentada em camundongos selvagens. Assim, a diferença da resposta citotóxica desenvolvida pelos camundongos *bim*$^{-/-}$ entre os dias 7 e 28 após imunização foi de 20%. Por outro lado, camundongos *bim*$^{+/-}$ mostraram inicialmente uma atividade citotóxica similar à observada em camundongos selvagens. Mas, com o passar do tempo, a resposta citotóxica destes camundongos decaiu em uma taxa menor à observada nos animais selvagens, mostrando uma diferença de 40% entre o começo e o final da resposta imune celular.

Por outro lado, a população de células pulsadas com 1 pM de OVA (**Figura 29B**) não foi capaz de induzir a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8$^+$, observando-se uma baixa eliminação destas células em todas as linhagens de camundongos avaliadas. Em contraposição, as células pulsadas com 10 nM do peptídeo de OVA (**Figura 29C**) foram eficazes indutoras da atividade citolítica dos linfócitos T CD8$^+$, em conseqüência essa população foi eliminada eficientemente. No entanto, foram observadas algumas diferenças na lise dessas células no dia 28 após imunização. Nesse ponto, foi possível observar um decaimento da atividade citotóxica nas linhagens analisadas, destacando-se uma perda maior da atividade citolítica em camundongos selvagens quando comparados com as linhagens de camundongos transgênicos *bim*$^{+/-}$ e *bim*$^{-/-}$.

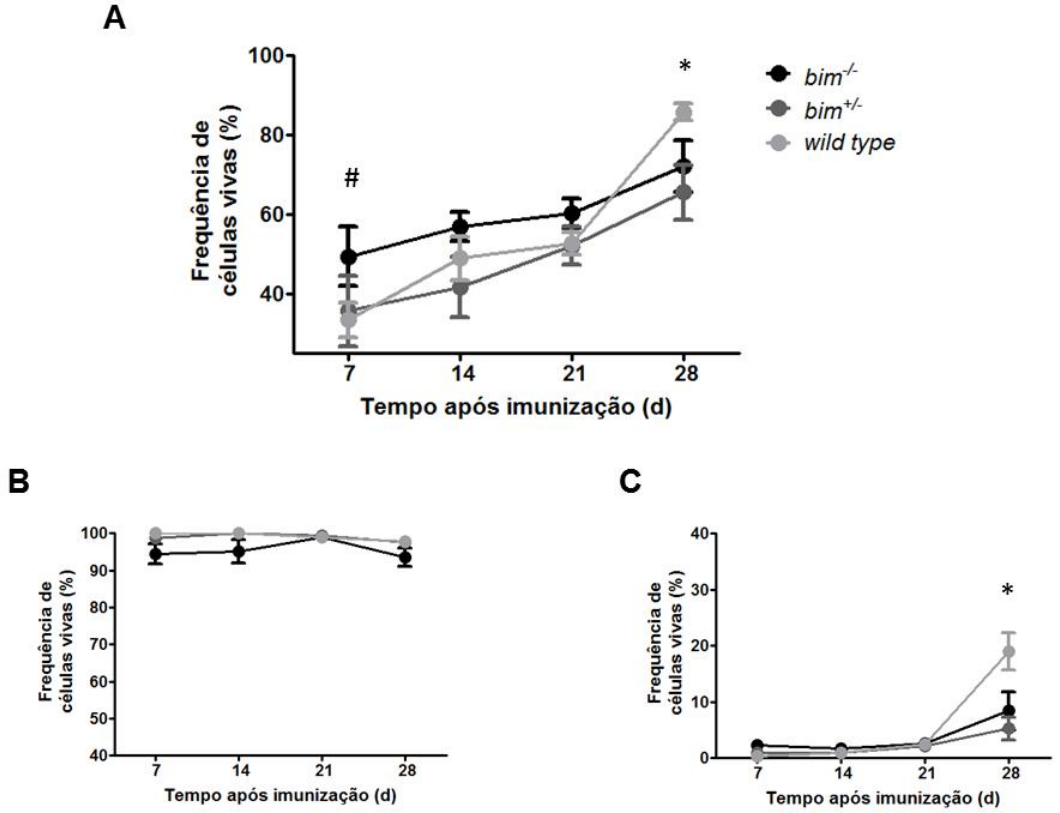

Figura 29 - Cinética da resposta imune citotóxica mediada por linfócitos T CD8$^+$ depois da vacinação de camundongos *bim*$^{-/-}$ com Ad.cOVA.
Camundongos C57Bl/6 selvagem, *bim*$^{+/-}$ e *bim*$^{-/-}$ foram imunizados ou não com 2 x 10^6 PFU / 100 µl de Ad.cOVA por via *i.m.* A resposta citotóxica foi avaliada através do ensaio de citotoxicidade *in vivo*. A freqüência das populações pulsadas com **A.** 100 pM, **B.** 1 pM e **C.** 10 nM do peptídeo de OVA foi avaliada 7, 14, 21 e 28 dias após da inoculação viral. Os resultados são representativos de 1 experimento com 4 animais por grupo. O asterisco (*) representa diferenças estatisticamente significativas dos camundongos selvagens em relação às linhagens *bim*$^{+/-}$ e *bim*$^{-/-}$; e o numeral (#) indica diferenças estatisticamente significativas entre a linhagem *bim*$^{-/-}$ em contraste com os camundongos selvagens e *bim*$^{+/-}$. Para a análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste pos-hoc LSD Fisher. ($p < 0.05$).

Em resumo, estes dados indicam que a resposta imune celular desenvolvida por camundongos *bim*$^{+/-}$ e *bim*$^{-/-}$ apresenta uma taxa de redução menor à observada em camundongos selvagens com o passar do tempo. Dessa forma, apesar da deficiente capacidade citotóxica desenvolvida por camundongos *bim*$^{-/-}$ no inicio da resposta imune, com o decorrer do tempo estes linfócitos que não sucumbem aos estímulos de morte pela via intrínseca da apoptose conseguem manter sua funcionalidade. Assim, estes dados podem explicar a inesperada melhora na resposta antitumoral observada em camundongos *bim*$^{-/-}$.

4.7 Transferência adoptiva de esplenócitos OTI e OTI *bim*$^{-/-}$, para avaliação de proliferação após o estimulo com Ad.cOVA.

Em vista dos resultados anteriores, inferiu-se que a deficiência observada na resposta efetora executada pelos linfócitos T CD8^{+} de camundongos *bim*$^{-/-}$, no sétimo dia após imunização, poderia ser um reflexo de um defeito intrínseco destes linfócitos ou estar relacionada às etapas de estimulação destas células. Portanto, aptou-se por avaliar a ativação destes linfócitos em um sistema neutral, através de sua transferência a camundongos selvagens.

Assim, o protocolo de transferência adoptiva foi desenvolvido com o intuito de avaliar o padrão de proliferação dos linfócitos T CD8^{+} de camundongos *bim*$^{-/-}$. Para isso, esplenócitos de camundongos C57Bl/6 OTI e OTI *bim*$^{-/-}$ foram coletados e marcados com os corantes CFSE e CTV, respetivamente. Em seguida, essas populações de células foram misturadas na mesma proporção (1:1) considerando a freqüência de linfócitos T CD8^{+} com TCR transgênico para OVA. Essa mistura de células foi inoculada por via *i.v.* em camundongos selvagens, e duas horas depois esses camundongos receptores foram imunizados com Ad.cOVA. Finalmente, 96 h depois da imunização, os baços dos camundongos receptores foram coletados e a proliferação de células inoculadas foi analisada por citometría de fluxo (**Figura 30A**).

É importante destacar que estes dados precisam ser analisados criticamente já que, como se mostra na **Figura 30A,** as populações pertencentes às últimas gerações ficaram muito próximas das células não marcadas. Dessa forma, a probabilidade de existirem populações “enterradas” que não foram consideradas

durante a analise é muito alta. Portanto, achamos fundamental a repetição deste experimento para poder chegar a uma conclusão exata referente ao perfil de proliferação destas linhagens. Adicionalmente, consideramos necessárias algumas mudanças, como a redução do tempo de proliferação, e a definição de um ponto de partida para o primeiro pico das marcações com CFSE e CTV.

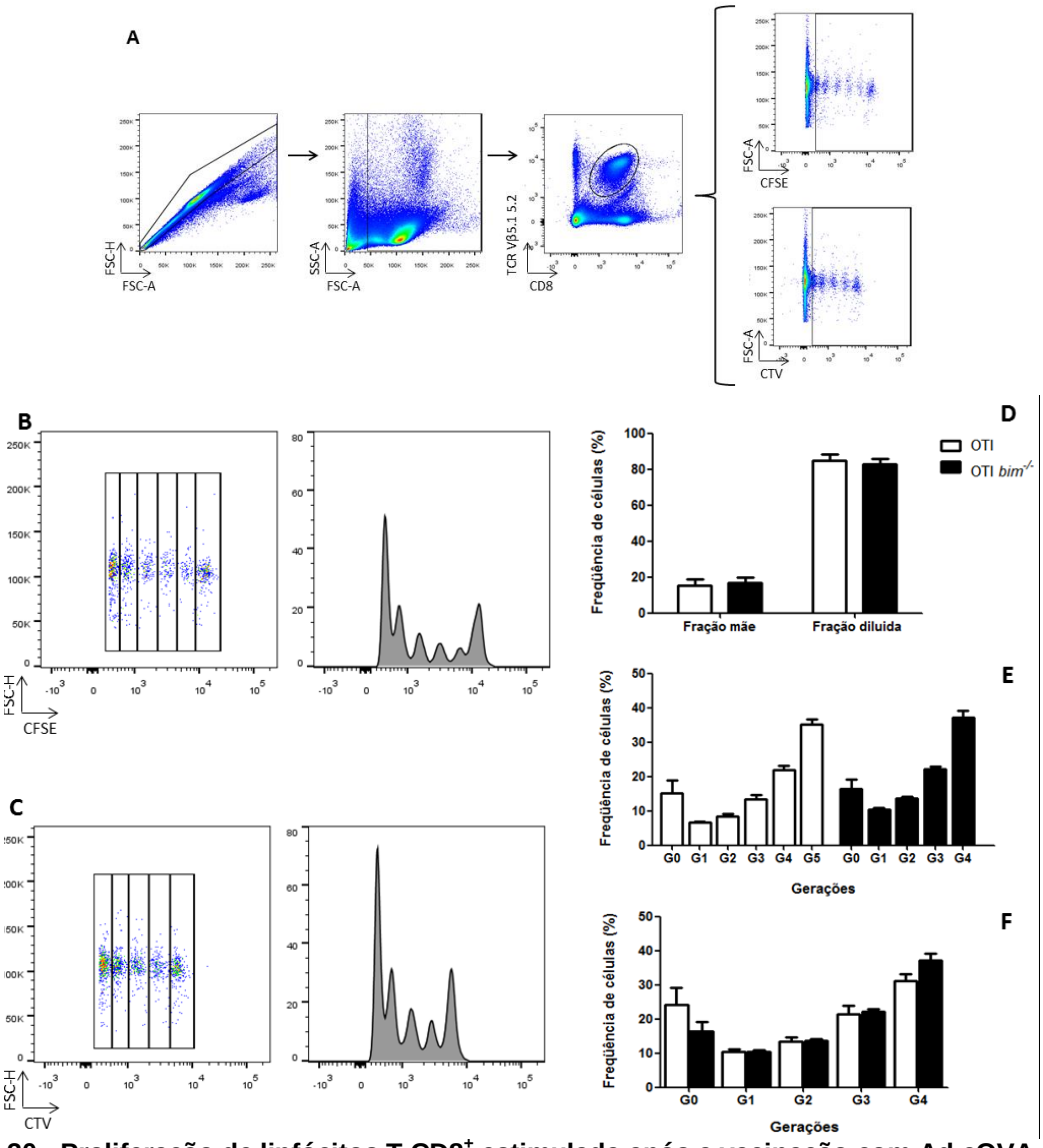

Figura 30 - Proliferação de linfócitos T CD8$^+$ estimulada após a vacinação com Ad.cOVA. Ensaio de transferência adoptiva de esplenócitos de camundongos C57Bl/6 OTI e OTI *bim*$^{-/-}$ para camundongos selvagens. Duas horas depois da transferência de células, os camundongos foram vacinados com Ad.cOVA, e 96 h depois foi avaliada a proliferação das células transferidas por citometría de fluxo. **A.** Estratégia de gates utilizada para determinar a freqüência de linfócitos T CD8$^+$ OTI e OTI *bim*$^{-/-}$. **B.** Proliferação da população de linfócitos T CD8$^+$ OTI em dot-plot e histograma. **C.** Proliferação da população de linfócitos T CD8$^+$ OTI *bim*$^{-/-}$ em dot-plot e histograma. **D.** Freqüência de linfócitos T CD8$^+$ OTI e OTI *bim*$^{-/-}$ que proliferaram (fração diluída) ou não (fração mãe). **E.** Freqüência de linfócitos T CD8$^+$ OTI e OTI *bim*$^{-/-}$ presentes em cada uma das gerações produzidas durante a proliferação linfocitária. **F.** Freqüência de linfócitos T CD8$^+$ OTI e OTI *bim*$^{-/-}$ presentes nas 4 primeiras gerações produzidas por cada linhagem. Os resultados são representativos de 1 único experimento realizado com 3 animais por grupo. Para a análise estatística dos gráficos D e F foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, sendo que não foram observadas diferenças significativas ($p > 0.05$).

Apesar da observação realizada no paragrafo anterior, achamos necessária a leitura desse resultado e sua incorporação a este manuscrito. Dessa forma, é possível observar na **Figura 30D** que ambas as populações de linfócitos T $CD8^+$ OTI e OTI *bim*$^{-/-}$ apresentaram a mesma freqüência de células em proliferação (fração diluída). Entretanto, quando foram analisadas as subpopulações presentes na fração diluída, observou-se um número diferente de gerações produzidas por cada linhagem (**Figura 30B** e **E**). Sendo que a linhagem de linfócitos OTI apresentou 5 gerações (G1-5), em quanto que na linhagem de células OTI *bim*$^{-/-}$ foram achadas 4 gerações (G1-4). Essa variação no número de gerações produzida por cada linhagem poderia indicar uma maior proliferação da linhagem OTI em relação à linhagem OTI *bim*$^{-/-}$. Entretanto, a maior freqüência de células observada nas gerações produzidas pela linhagem OTI *bim*$^{-/-}$ poderiam representar uma retenção das células nas primeiras divisões, relacionado a uma diminuição da capacidade proliferativa delas. Porém estes dados poderiam ser o reflexo de perda das populações posteriores durante a definição dos gates, sendo que as populações ficaram próximas das células não marcadas. Entretanto, na **Figura 30F**, observou-se que quando comparadas cada uma das gerações da linhagem OTI com seus pares da linhagem OTI *bim*$^{-/-}$ não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na freqüência das células.

Contudo, uma melhor analise da capacidade proliferativa precisa ser realizada para avaliar se os efeitos observados são produzidos por uma deficiência na proliferação das células T $CD8^+$ antígeno-específicas deficientes da proteína BIM.

Em conjunto, nossos resultados mostraram que os adenovírus são capazes induzir uma forte ativação antígeno-específica dos linfócitos T $CD8^+$. A qual foi utilizada para avaliar a resposta celular desenvolvida por camundongos *bim*$^{-/-}$. Nesse sentido, foi possível observar que as funções efetoras destes linfócitos se encontram diminuídas, quando comparadas com camundongos selvagens. Isto inclui, a capacidade de lise celular, e a produção de citocinas como IFNγ. O esclarecimento da capacidade proliferativa destes linfócitos é necessário, uma vez que pode estar relacionado às deficiências observadas. Adicionalmente, a capacidade efetora destes linfócitos parece manter se no tempo, constituindo uma vantagem para o controle de doenças crônicas.

5 DISCUSSÃO

O papel da proteína BIM como regulador da resposta imune tem sido descrito através de dois eventos: 1) eliminação dos linfócitos T ativados que não são mais requeridos no final da resposta imune e 2) através da eliminação de células auto-reativas durante as etapas de amadurecimento de linfócitos T (87). Porém, o papel desta proteína nas primeiras fases de desenvolvimento da resposta imune encontra-se pobremente referenciada. Dessa forma, dada a importância dos linfócitos T $CD8^+$ para o controle de infecções e câncer, o entendimento das etapas iniciais de ativação destas células poderia contribuir no desenvolvimento de novas terapias que visem modular a resposta imune. Assim, decidimos investigar a qualidade da resposta desenvolvida pelos linfócitos T $CD8^+$ em camundongos *bim*$^{-/-}$.

Uma vez produzida a vacina adenoviral Ad.cOVA, e comprovada a especificidade da resposta imune desencadeada para o reconhecimento de resíduos da proteína OVA, foi imperativo determinar a dose vacinal necessária para avaliar a resposta imune. A determinação da dose mínima efetiva da vacina adenoviral foi um passo importante para definir a quantidade de vírus necessária para o desenvolvimento do projeto, assim como para garantir a seguridade da dose utilizada no protocolo de vacinação. Já que uma alta dose de vacina viral esta relacionada à indução de uma resposta imune exacerbada, a qual pode ser letal para o animal ou conduzir a aparição de doenças autoimunes. Nesse sentido, estudos realizados em camundongos transgênicos mostraram que a imunização com vetores virais pode induzir autoimunidade através da ativação de células T espectadoras (*bystander T-cell activation*) (111,112). Este mecanismo se desenvolve pela elevada produção de citocinas que acompanha a resposta imune frente à infeção viral. Desta forma, a elevada quantidade de citocinas disponíveis, assim como a presença de moleculas co-estimuladoras nas APCs, permite a ativação indesejada de linfócitos autorreativos previamente formados (113).

Após a definição dos parâmetros experimentais, e como uma primeira abordagem para a avaliação da resposta efetora desenvolvida pelos linfócitos T $CD8^+$ de camundongos *bim*$^{-/-}$, decidimos caracterizar a capacidade de lise de células-alvo. Desta forma, os resultados obtidos do ensaio de citotoxicidade *in vivo* mostraram que camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentam uma ineficiente eliminação de células-alvo no sétimo dia após imunização, quando comparados com camundongos selvagens e *bim*$^{+/-}$. Ensaios anteriores de nosso grupo de pesquisa mostraram que a

lise celular observada durante o protocolo de citotoxicidade *in vivo* é mediada exclusivamente pelos linfócitos T $CD8^+$, sem participação das células Natural Killer (NK), uma vez que é absolutamente antígeno-específica, e que camundongos deficientes de linfócitos T $CD8^+$ (CD8 knockout) não são capazes de eliminar as populações pulsadas com estes antígenos. Além disto, já foi demonstrado que camundongos deficientes em células NK (CD1 knockout) não apresentaram diferenças significativas na lise celular quando comparados com camundongos selvagens (114). Portanto, é possivel afirmar que os linfócitos T $CD8^+$ antígeno-específicos de camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentam um efeito citotóxico menor ao apresentado em camundongos selvagens.

De forma coerente com estes resultados, foi observado que os camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentam um menor número de linfócitos T $CD8^+$ produtores de IFNγ em comparação com camundongos selvagens ou *bim*$^{+/-}$. Este efeito foi avaliado por ELISPOT e comprovado através do ensaio de marcação intracelular. Durante ambos os ensaios foram cultivados esplenócitos totais, portanto, poderiam existir outras populações celulares capazes de produzir IFNγ, como é o caso dos linfócitos T $CD4^+$ (115). Porém, a avaliação específica da resposta desenvolvida pelos linfócitos T $CD8^+$ foi garantida pelo uso do peptídeo SIINFEKL de OVA, o qual é restrito ao complexo de MHC-I. Adicionalmente, o ensaio de marcação intracelular permitiu uma análise mais exata, e a validação dos resultados obtidos por ELISPOT, uma vez que a avaliação da freqüência de células produtoras de IFNγ foi realizada dentro da janela da população positiva para CD8. As técnicas de ELISPOT e marcação intracelular, apesar de serem desenvolvidas *in vitro*, oferecem uma imagem bastante precisa do fenômeno imunológico que acontece *in vivo*, uma vez que é avaliado o efeito direto das células coletadas. Assim, as células coletadas foram ativadas nas mesmas condições do ensaio de citotoxicidade *in vivo*, o que permite comparar ambos os resultados.

Contudo, estes resultados indicam uma deficiente resposta efetora desenvolvida pelos linfócitos T $CD8^+$ de camundongos *bim*$^{-/-}$. Porém, sabe-se que a ativação e diferenciação dos linfócitos T $CD8^+$ requer de sinais além dos convencionais. Uma vez que a ativação do TCR, pelo reconhecimento de um peptídeo específico relacionado ao MHC, e os sinais co-estimuladores não são suficientes para induzir a correta ativação e diferenciação dos linfócitos T $CD8^+$ em

células efetoras. Isto se deve à incapacidade destes linfócitos para produzir a quantidade necessária de IL-2 para sua própria ativação. Este efeito é produzido pela presença do fator de transcrição Ikaros, relacionado à repressão linfocitária e anergia (116). Desta forma, a ativação dos linfócitos T $CD8^+$ depende tanto da interação direta com a APC (117), como da produção de citocinas pro-inflamatorias como IL-2, IFNα/β, IL-12 e IL-21, muitas das quais são fornecidas pelos linfócitos T $CD4^+$ (118). Adicionalmente, tem sido descrito que o IFNγ produzido pelos linfócitos T $CD4^+$ é essencial para induzir uma resposta efetora mais robusta nos linfócitos T $CD8^+$ (115). Sendo que os linfócitos T $CD4^+$ contribuem no desenvolvimento de linfócitos T $CD8^+$, e que esta característica tem sido descrita como um fator indispensavel depois da vacinação com adenovírus recombinantes (119), devem-se considerar que um possivel os efeitos de um má funcionamento destas células nos linfócitos T $CD8^+$ a. Nesse sentido, por ter sido realizado um ensaio *in vivo*, alterações nos sinais de ativação fornecidos por outras células poderiam ser as responsáveis do fenótipo observado nos linfócitos T $CD8^+$ de camundongos *bim*$^{-/-}$.

Um estudo realizado em 2009, com o objetivo de avaliar a resistência à autoimunidade desenvolvida por camundongos *bim*$^{-/-}$ jovens (menos de 14 semanas de idade), mostrou que linfócitos T $CD4^+$ *bim*$^{-/-}$ ativados *in vitro* produzem uma menor quantidade de citocinas pro-inflamatorias em comparação com linfócitos isolados de camundongos selvagens (120). Desta forma, estes dados indicariam a existencia de um defeito na resposta efetora dos linfócitos T $CD4^+$ de camundongos *bim*$^{-/-}$, inferindo-se que a baixa produção de citocinas por estas células possa ser um dos fatores responsáveis da perda de eficiência na resposta efetora desenvolvida pelos linfócitos T $CD8^+$ destes camundongos. Porém, em 2006, um estudo que visava o estudo dos linfócitos T $CD8^+$ durante infecções crônicas em camundongos *bim*$^{-/-}$ indicou que não foram observadas alterações na quantidade ou ativação dos linfócitos T $CD4^+$ (90).

Apesar de que os dados apresentados no paragrafo anterior fornecem uma explicação para os efeitos observados, não descartamos a possibilidade de que mais de um evento esteja produzindo à baixa eficiência da resposta efetora dos linfócitos T $CD8^+$ *bim*$^{-/-}$. Nesse sentido, considerando que a expressão da proteína BIM esta diretamente relacionada com estresse do ER e indução da liberação de Ca^{+2} (121,122), e este evento por sua vez tem sido ampliamente relacionado com o

processo de divisão celular (123), nós deduzimos que a deficiência de BIM nos linfócitos T $CD8^+$ poderia gerar uma baixa taxa de divisão linfocitária. Por esse motivo foi realizada a avaliação da capacidade proliferativa destas células através do ensaio de transferência adoptiva. Os resultados deste ensaio, embora controversos, não mostram diferenças na freqüência total de células que entraram em divisão, mas a análise das gerações produzidas apontam à existência de diferenças no padrão de proliferação dos linfócitos T $CD8^+$. Em relação a isso, um trabalho desenvolvido em 2008 com a finalidade de avaliar a importância de BIM durante a contração linfocitária mostrou, mediante um desenho experimental bastante similar ao nosso, que a acumulação de linfócitos T $CD8^+$ observado em camundongos *bim*$^{-/-}$ não esta relacionada com variações da freqüência de células em proliferação nas primeiras etapas da resposta imune (124). Dessa forma, estes dados da literatura indicam que não existe alteração do perfil de proliferação dos linfócitos T $CD8^+$ de camundongos *bim*$^{-/-}$. Porém, é preciso considerar que para este ensaio foi analisada a incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) nas células em divisão e, portanto, só foi avaliada a freqüência de células totais que entraram em divisão, e não o número de gerações produzidas. Sendo que nossos resultados mostraram diferenças durante a análise das gerações de linfócitos produzidas, ainda achamos interessante avaliar o perfil de proliferação destas células.

Adicionalmente, sabe-se que os linfócitos T $CD8^+$ se encontram catalogados como responsáveis diretos da atividade antitumoral (125), e sua presença no infiltrado tumoral tem sido relacionada com a sobrevida dos pacientes frente à doença (126,127). Portanto, uma metodologia alternativa que utilizamos para avaliar a resposta efetora destes linfócitos foi através do desafio com células tumorais da linhagem Tm1.Luc.cOVA. Estudos prévios utilizando a linhagem de melanoma murino B16 tem demostrado a efetividade preventiva das vacinas adenovirais frente ao crescimento tumoral em camundongos (128). Porém, a imunização com fins terapeuticos utilizando a mesma vacina acarretou a redução de sua imunogenicidade, provocando um detrimento das funções efetoras dos linfócitos infiltrantes (TILs) (129). Esses acontecimentos são explicados pela disvantagem apresentada na resposta imune frente a tumores pre-estabelecidos, os quais podem desenvolver mecanismos de evasão da resposta imune, como a construção de um microambiente tumoral imuno supressor, ou a expressão defeituosa das moléculas

de MHC-I importantes para a apresentação de antígenos tumorais, entre outros (130). Em vista de que estas alterações no microambiente tumoral podem mascarar a real atividade dos linfócitos envolvidos na resposta antitumoral, decidimos utilizar a vacina adenoviral Ad.cOVA de forma profiláctica, sendo aplicada sete dias antes da inoculação tumoral. Dessa forma, nossos resultados mostram que a vacinação com o Ad.cOVA induziu um melhor controle do crescimento tumoral em camundongos selvagens e *bim*$^{-/-}$ imunizados, em contraposição às dimensões da massa tumoral exibidas por camundongos não imunizados das mesmas linhagens.

Durante a avaliação do crescimento tumoral em camundongos trangenicos, e devido à defeituosa resposta efetora observada nos linfócitos T CD8^{+} de camundongos *bim*, era de esperar que a resposta antitumoral destes camundongos também fosse deficiente. Porém, não se observaram diferenças significativas na progressão tumoral entre camundongos selvagens e *bim*$^{-/-}$ após imunização. Dessa forma, estes dados podem indicar tanto um melhor desenvolvimento dos camundongos *bim*$^{-/-}$ frente ao tumor, sendo que os camundongos *bim*$^{-/-}$ conseguem compensar a deficiente resposta imune observada após imunização com Ad.cOVA.

Um estudo prévio realizado com o intuito de melhorar a resposta antitumoral fornecida pela vacinação com adenovirus que expressa OVA frente ao tumor cutâneo EG7-OVA demostrou que há um paradoxo entre a forte resposta imune e o controle tumoral (131). Observou-se neste estudo que o uso de adjuvantes que estimulam TLR9 esta relacionado a um controle mais eficiente da progressão tumoral. Mas, paradoxicamente, a analise do perfil dos linfócitos T CD8^{+} gerados após a vacinação com adenovírus e adjuvante mostrou uma menor taxa de proliferação, assim como menor produção de IFNγ e lise de células-alvo nestes animais, quando comparados com os camundongos que receberam a vacina adenoviral sem adjuvante. Este efeito esta relacionado com alguns estudos de pacientes vacinados contra antígenos tumorais, os quais conseguiram regredir o tumor, mas apresentaram um baixo número de linfócitos antígeno-específicos (132). Consideramos que este efeito pode estar relacionado a diferentes fatores, como mudanças na qualidade da resposta imune inata e do microambiente tumoral desenvolvida por causa do adjuvante, as quais permitem a seleção de um eficiente, embora menor, repertório de linfócitos T CD8^{+}. Adicionalmente, também postulou-se a ideia de que um número desnecessário de linfócitos T CD8^{+} podem danificar o

tecido do hospedeiro, sendo responsáveis de um detrimento na saúde do animal (131). Desta forma, se a deficiente resposta efetora obsevada nos camundongos *bim*$^{-/-}$ fosse reflexo da produção de um menor número de células, a qualidade da resposta exercida por estas poderia ser a responsável da capacidade de controle do crescimento tumoral observada nestes camundongos.

Adicionalmente, sendo que o cancer é reconhecido como uma doença crônica (133), é importante ter em consideração que a resposta imune desencadeada por este tipo de doenças apresenta um perfil diferente ao observado em infecções agudas. Alguns estudos demostraram que embora a apoptosis de linfócitos T durante uma infecção crônica seja mediada pela ativação do receptor TNF-RII, ela vem acompanhada de uma redução na expressão de Bcl-2 (134). Desta forma, na ausência de apoptose, existe uma persistência dos linfócitos T CD8^{+} antígeno-específicos, os quais continuam sendo funcionais e participam da produção de citocinas como IFNγ e TNFα. Em consequencia, tem sido observado que a deficiencia de BIM permitiu uma melhor eliminação do antígeno durante a infeção crônica em camundongos (90). Nesse sentido, um estudo de expressão gênica realizado em pacientes infectados com o virus da hepatite B (HBV) demostrou que a baixa expressão de *bim* nos linfócitos T CD8^{+} HBV-específicos contribuía com o controle da replicação viral e permitia a resolução da infecção nos pacientes (91). Em conjunto, esses dados e nossos resultados sugerem que o acumulo de linfócitos T CD8^{+} com capacidade efetora seriam os responsáveis pelo bom controle da progressão tumoral observado.

Devido ao desconhecimento da evolução da resposta imune desenvolvida por camundongos *bim*$^{-/-}$ após a vacinação com Ad.cOVA, foi resolvido avaliar a cinética da resposta efetetora dos linfócitos T CD8^{+} destes animais. Regularmente, a resposta imune induzida após a vacinação adenoviral apresenta seu valor máximo no dia 7, e decai progressivamente com o passar do tempo (114). Assim, foi observado que para a linhagem de camundongos *bim*$^{-/-}$ também foi observado o mesmo efeito. Porém, a taxa de perda da resposta citotóxica é menor à observada nos camundongos WT. Desta forma, para o final da cinética é possível observar uma reversão da eficiência apresentada. Isto pode ser explicado porque na ausência desta proteína os linfócitos T CD8^{+} efetores não são devidamente eliminados, produzindo um acúmulo destes linfócitos efetores. Entretanto outros são eliminados

por outras vias de apoptose, como FAZ / FASL. Aparentemente estes linfócitos acumulados se mostram eficientes com o passar do tempo.

Os resultados dos experimentos realizados ao longo deste projeto mostram que os linfócitos T $CD8^+$ de camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentam uma deficiente resposta efetora desenvolvida após sete dias da vacinação com Ad.cOVA. Desta forma, o ensaio de citotoxicidade *in vivo* mostrou menor lise das populações de células pulsadas com resíduos de OVA. Adicionalmente, através do ensaio de ELISPOT e por marcação intracelular desta citocina, foi possível observar que os linfócitos T $CD8^+$ de camundongos BIM deficientes apresentam um baixo número de células produtoras de IFNγ quando comparados com camundongos selvagens. Apesar destas carências, a cinética da resposta citotóxica em camundongos *bim*$^{-/-}$ mostrou que os linfócitos remanecentes conseguem desenvolver sua capacidade efetora. Assim, acreditamos que este efeito poderia estar compensando a deficiência inicial dos linfócitos de camundongos bim, produzindo um controle similar do crescimento tumoral.

6 CONCLUSÕES

- Através de técnicas convencionais de clonagem e de clonagem por recombinação da plataforma Invitrogem™ Gateway™ foi possível gerar o vetor adenoviral que carrega a sequencia de OVA (pAd.cOVA)
- A transfecção deste vetor adenoviral nas células da linhagem 293A resultou em uma bem sucedida produção das partículas adenovirais Ad.cOVA.
- A imunização com Ad.cOVA permitiu a ativação da resposta imune celular específica contra o inserto de OVA.
- Camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentam uma menor freqüência de lise específica em comparação com os linfócitos de camundongos selvagens e *bim*$^{+/-}$.
- Camundongos *bim*$^{-/-}$ apresentam uma menor freqüência de linfócitos T CD8^{+} produtores de IFNγ quando comparados com camundongos selvagens e *bim*$^{+/-}$.
- A resposta efetora dos linfócitos T CD8^{+} em camundongos *bim*$^{-/-}$ decai em uma taxa menor à observada em camundongos selvagens.
- Camundongos *bim*$^{-/-}$ mostraram um perfil de resposta antitumoral igual à observada em camundongos selvagens.
- A proteína BIM desenvolve um papel importante na produção de linfócitos T CD8^{+} antígeno-específicos após a imunização com Ad.cOVA, tendo em consideração que não foi determinada sua ação intrínseca ou indireta através de estímulos ineficientes por parte dos linfócitos T CD4^{+} ou APCs.

REFERÊNCIAS *

1. Cox MA, Kahan SM, Zajac AJ. Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. Virology [Internet]. 2013;435(1):157–69. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23217625

2. Nagata T, Koide Y. Induction of Specific CD8, Induction of Specific CD8. Biomed Res Int [Internet]. 2010 May;2010, 2010:e764542. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20

3. Antony PA, Piccirillo CA, Akpinarli A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, et al. CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. J Immunol (Baltimore, Md 1950) [Internet]. 2005 Mar;174(5):2591–601. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728465

4. Dockree T, Holland CJ, Clement M, Ladell K, McLaren JE, van den Berg HA, et al. CD8+ T-cell specificity is compromised at a defined MHCI/CD8 affinity threshold. Immunol Cell Biol [Internet]. 2017;95(1):68–76. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/icb.2016.85

5. Koup RA, Douek DC. Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2011;1(1):a007252. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22229122

6. Robert-Guroff M. Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development. Curr Opin Biotechnol [Internet]. 2007 Dec [cited 2017 Mar 13];18(6):546–56. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18063357

7. Castle JC, Kreiter S, Diekmann J, Löwer M, van de Roemer N, de Graaf J, et al. Exploiting the Mutanome for Tumor Vaccination. Cancer Res. 2012;72(5).

8. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, et al. The Prioritization of Cancer Antigens : A National Cancer Institute Pilot Project for the Acceleration of Translational Research. 2009;15(17):5323–37.

9. Bright RK, Bright JD, Byrne JA. Overexpressed oncogenic tumor-self antigens. Hum Vaccines Immunother. 2014;10(11):3297–305.

10. Gonzalez S, González-rodríguez AP, Suárez-álvarez B, López-soto A, Huergo-zapico L, Lopez-larrea C. Conceptual aspects of self and nonself discrimination. 2011;(March):19–25.

11. Kovesdi I, Hedley SJ. Adenoviral producer cells. Viruses [Internet]. 2010;2(8):1681–703. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994701

12. Tatsis N, Fitzgerald JC, Reyes-Sandoval A, Harris-McCoy KC, Hensley SE, Zhou D, et al. Adenoviral vectors persist in vivo and maintain activated CD8+ T cells: implications for their use as vaccines. Blood. 2007;110(6).

13. Steffensen MA, Holst PJ, Steengaard SS, Jensen BAH, Bartholdy C, Stryhn A, et al. Qualitative and quantitative analysis of adenovirus type 5 vector-induced memory CD8 T cells: not as bad as their reputation. J Virol [Internet]. 2013 Jun [cited 2017 Feb 25];87(11):6283–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23536658

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htlm

14. Bolinger B, Sims S, Swadling L, O'Hara G, de Lara C, Baban D, et al. Adenoviral Vector Vaccination Induces a Conserved Program of CD8+ T Cell Memory Differentiation in Mouse and Man. Cell Rep [Internet]. 2015 Nov;13(8):1578–88. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124715012048

15. Kastenmuller W, Gasteiger G, Gronau JH, Baier R, Ljapoci R, Busch DH, et al. Cross-competition of CD8+ T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination. J Exp Med [Internet]. 2007 Sep 3 [cited 2017 Mar 2];204(9):2187–98. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709425

16. Barefoot B, Thornburg NJ, Barouch DH, Yu J-S, Sample C, Johnston RE, et al. Comparison of multiple vaccine vectors in a single heterologous prime-boost trial. Vaccine [Internet]. 2008 Nov 11;26(48):6108–18. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18809447

17. Molinier-Frenkel V, Lengagne R, Gaden F, Hong S-S, Choppin J, Gahery-Ségard H, et al. Adenovirus hexon protein is a potent adjuvant for activation of a cellular immune response. J Virol [Internet]. 2002 Jan;76(1):127–35. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739678

18. Yang TC, Dayball K, Wan YH, Bramson J. Detailed analysis of the CD8+ T-cell response following adenovirus vaccination. J Virol [Internet]. 2003 Dec;77(24):13407–11. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645597

19. Nielsen KN, Steffensen MA, Christensen JP, Thomsen AR. Priming of CD8 T Cells by Adenoviral Vectors Is Critically Dependent on B7 and Dendritic Cells but Only Partially Dependent on CD28 Ligation on CD8 T Cells. J Immunol. 2014;193(3).

20. Kambayashi T, Laufer TM. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? Nat Rev Immunol [Internet]. 2014;14(11):719–30. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri3754

21. Miller MJ, Hejazi AS, Wei SH, Cahalan MD, Parker I. T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2004;101(4):998–1003. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14722354

22. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, et al. The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. Science (80-). 1999;285(5425).

23. Dustin ML, Chakraborty AK, Shaw AS. Understanding the structure and function of the immunological synapse. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. 2010 Oct;2(10):a002311. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843980

24. Kupfer A, Monks CRF, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. Nature [Internet]. 1998 Sep;395(6697):82–6. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/25764

25. Cole DK, Miles KM, Madura F, Holland CJ, Schauenburg AJA, Godkin AJ, et al. T-cell receptor (TCR)-peptide specificity overrides affinity-enhancing TCR-major histocompatibility complex interactions. J Biol Chem [Internet]. 2014;289(2):628–38. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24196962

26. Bromley SK, Iaboni A, Davis SJ, Whitty A, Green JM, Shaw AS, et al. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. Nat Immunol [Internet]. 2001;2(12):1159–66. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11713465

27. Dustin ML. The immunological synapse. Cancer Immunol Res [Internet]. 2014;2(11):1023–33. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25367977

28. Ito H, Seishima M. Regulation of the induction and function of cytotoxic T lymphocytes by natural killer T cell. J Biomed Biotechnol [Internet]. 2010;2010:641757. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20508728

29. Zinkernagel RM, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. Nature [Internet]. 1974 Oct;251(5475):547–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4547543

30. Kyaw T, Winship A, Tay C, Kanellakis P, Hosseini H, Cao A, et al. Cytotoxic and Proinflammatory CD8+ T Lymphocytes Promote Development of Vulnerable Atherosclerotic Plaques in ApoE-Deficient MiceClinical Perspective. Circulation. 2013;127(9).

31. Rauf A, Khatri M, Murgia M V., Saif YM. Fas/FasL and perforin–granzyme pathways mediated T cell cytotoxic responses in infectious bursal disease virus infected chickens. Results Immunol [Internet]. 2012 [cited 2016 Jan 6];2:112–9. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211283912000147

32. Shen DT, Ma JSY, Mather J, Vukmanovic S, Radoja S. Activation of primary T lymphocytes results in lysosome development and polarized granule exocytosis in CD4+ and CD8+ subsets, whereas expression of lytic molecules confers cytotoxicity to CD8+ T cells. J Leukoc Biol [Internet]. 2006;80(4):827–37. Available from: http://www.jleukbio.org/content/80/4/827

33. Yagi H, Conroy PJ, Leung EWW, Law RHP, Trapani JA, Voskoboinik I, et al. Structural Basis for Ca2+-mediated Interaction of the Perforin C2 Domain with Lipid Membranes. J Biol Chem [Internet]. 2015 Oct [cited 2016 Jan 7];290(42):25213–26. Available from: http://www.jbc.org/content/290/42/25213

34. Traore DAK, Brennan AJ, Law RHP, Dogovski C, Perugini MA, Lukoyanova N, et al. Defining the interaction of perforin with calcium and the phospholipid membrane. Biochem J [Internet]. 2013 Dec;456(3):323–35. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24070258

35. McCormack R, de Armas L, Shiratsuchi M, Podack ER. Killing machines: three pore-forming proteins of the immune system. Immunol Res [Internet]. 2013;57(1–3):268–78. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24293008

36. Pardo J, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Naval J, Müllbacher A, et al. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. J Cell Biol [Internet]. 2004;167(3):457–68. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15534000

37. Cullen SP, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. Cell Death Differ [Internet]. 2008;15(2):251–62. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.cdd.4402244

38. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell [Internet]. 1993 Dec;75(6):1169–78. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7505205

39. Caulfield AJ, Lathem WW. Disruption of Fas-Fas Ligand Signaling, Apoptosis, and Innate Immunity by Bacterial Pathogens. PLoS Pathog [Internet]. 2014 Aug [cited

2016 Jan 6];10(8). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4125287/

40. Sainz Jr. B, Mossel EC, Peters CJ, Garry RF. Interferon-beta and interferon-gamma synergistically inhibit the replication of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV). Virology [Internet]. 2004 Nov [cited 2016 Jan 13];329(1):11–7. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682204005422

41. Zhang B, Karrison T, Rowley DA, Schreiber H. IFN-gamma- and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers. J Clin Invest [Internet]. 2008;118(4):1398–404. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18317595

42. Groettrup M, Khan S, Schwarz K, Schmidtke G. Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? Biochimie [Internet]. 2001 Apr;83(3–4):367–72. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11295499

43. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ., Zajac AJ, Miller JD, et al. Counting Antigen-Specific CD8 T Cells: A Reevaluation of Bystander Activation during Viral Infection. Immunity. 1998;8(2):177–87.

44. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. Vol. 14, Current Opinion in Immunology. 2002. p. 354–9.

45. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. Nat Rev Immunol [Internet]. 2007 Jul;7(7):532–42. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17589543

46. Lohman BL, Razvi ES, Welsh RM. T-lymphocyte downregulation after acute viral infection is not dependent on CD95 (Fas) receptor-ligand interactions. 1996;70(11):8199–203.

47. Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, et al. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. Nature [Internet]. 2002 Oct;419(6907):634–7. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature01101

48. Yeh W-C, Itie A, Elia AJ, Ng M, Shu H-B, Wakeham A, et al. Requirement for Casper (c-FLIP) in Regulation of Death Receptor–Induced Apoptosis and Embryonic Development. Immunity. 2000;12(6):633–42.

49. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. J Cell Sci. 1994;107(12).

50. Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. Nat Immunol [Internet]. 2003;4(5):410–5. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni0503-410

51. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer [Internet]. 1972 Aug;26(4):239–57. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027

52. Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. Prog Neurobiol. 2014;112:24–49.

53. Poon IKH, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. Nat Rev Immunol [Internet]. 2014;14(3):166–80. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri3607

54. Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J, Ameisen JC. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote Leishmania major involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. Cell Death Differ [Internet]. 2002;9(1):65–81. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.cdd.4400951

55. Hu L, Su C, Song X, Shi Q, Fu J, Xia X, et al. Tetrachlorobenzoquinone triggers the cleavage of Bid and promotes the cross-talk of extrinsic and intrinsic apoptotic signalings in pheochromocytoma (PC) 12 cells. Neurotoxicology. 2015;49:149–57.

56. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science [Internet]. 1998;281(5381):1312–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721091

57. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara R, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. BMC Cell Biol [Internet]. 2013;14(1):32. Available from: http://bmccellbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2121-14-32

58. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol [Internet]. 2007;35(4):495–516. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117903/

59. Rath PC, Aggarwal BB. TNF-induced signaling in apoptosis. J Clin Immunol [Internet]. 1999;19(6):350–64. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10634209

60. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. Trends Biochem Sci [Internet]. 2001 Jan;26(1):61–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11165519

61. Landes T, Martinou J-C. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: The role of mitochondrial fission. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res. 2011;1813(4):540–5.

62. James D, Parone PA, Terradillos O, Lucken-Ardjomande S, Montessuit S, Martinou J-C. Mechanisms of mitochondrial outer membrane permeabilization. Novartis Found Symp [Internet]. 2007;287:170-6-82. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18074638

63. Bhola PD, Letai A. Mitochondria—Judges and Executioners of Cell Death Sentences. Mol Cell. 2016;61(5):695–704.

64. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2008;9(1):47–59. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm2308

65. Doerflinger M, Glab JA, Puthalakath H. BH3-only proteins: a 20-year stock-take. FEBS J [Internet]. 2015;282(6):1006–16. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/febs.13190

66. Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. Cell [Internet]. 2000 Dec 8;103(6):839–42. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136969

67. Hsu SY, Lin P, Hsueh AJ. BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. Mol Endocrinol [Internet]. 1998;12(9):1432–40. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9731710

68. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, et al. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. EMBO J [Internet]. 1998;17(2):384–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1170389/

69. Czabotar PE, Colman PM, Huang DCS. Bax activation by Bim? Cell Death Differ [Internet]. 2009;16(9):1187–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19557009

70. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, et al. Apoptosis Initiated When BH3 Ligands Engage Multiple Bcl-2 Homologs, Not Bax or Bak. Science (80-) [Internet]. 2007;315(5813):856–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17289999

71. Gavathiotis E, Reyna DE, Davis ML, Bird GH, Walensky LD. BH3-Triggered Structural Reorganization Drives the Activation of Proapoptotic BAX. Mol Cell. 2010;40(3):481–92.

72. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffer PJ. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. Curr Biol CB [Internet]. 2000 Oct;10(19):1201–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050388

73. Andrew Sunters SF de M. FoxO3a Transcriptional Regulation of Bim Controls Apoptosis in Paclitaxel-treated Breast Cancer Cell Lines. J Biol Chem [Internet]. 2004;278(50):49795–805. Available from: https://www.researchgate.net/publication/9064201_FoxO3a_Transcriptional_Regulation_of_Bim_Controls_Apoptosis_in_Paclitaxel-treated_Breast_Cancer_Cell_Lines

74. Gogada R, Yadav N, Liu J, Tang S, Zhang D, Schneider A, et al. Bim, a Proapoptotic Protein, Up-regulated via Transcription Factor E2F1-dependent Mechanism, Functions as a Prosurvival Molecule in Cancer. J Biol Chem [Internet]. 2013 Apr [cited 2016 Jan 4];288(1):368–81. Available from: http://www.jbc.org/content/288/1/368

75. Potluri V, Noothi SK, Vallabhapurapu SD, Yoon S-O, Driscoll JJ, Lawrie CH, et al. Transcriptional Repression of Bim by a Novel YY1-RelA Complex Is Essential for the Survival and Growth of Multiple Myeloma. PLoS One [Internet]. 2013;8(7):e66121. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0066121

76. Montanez E, Karaköse E, Tischner D, Villunger A, Fässler R. PINCH-1 promotes Bcl-2-dependent survival signalling and inhibits JNK-mediated apoptosis in the primitive endoderm. J Cell Sci. 2012;125(21).

77. Liu K, Liu F, Zhang N, Liu S, Jiang Y. Pokemon Silencing Leads to Bim-Mediated Anoikis of Human Hepatoma Cell QGY7703. Int J Mol Sci [Internet]. 2012;13(12):5818–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22754333

78. Piazza R, Magistroni V, Mogavero A, Andreoni F, Ambrogio C, Chiarle R, et al. Epigenetic silencing of the proapoptotic gene BIM in anaplastic large cell lymphoma through an MeCP2/SIN3a deacetylating complex. Neoplasia [Internet]. 2013;15(5):511–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23633923

79. San José-Eneriz E, Agirre X, Jiménez-Velasco A, Cordeu L, Martín V, Arqueros V, et al. Epigenetic down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. Eur J Cancer [Internet]. 2009;45(10):1877–89. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19403302

80. U M, Miyashita T, Shikama Y, Tadokoro K, Yamada M. Molecular cloning and characterization of six novel isoforms of human Bim, a member of the proapoptotic Bcl-2 family. FEBS Lett [Internet]. 2001 Nov 30;509(1):135–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734221

81. Marani M, Tenev T, Hancock D, Downward J, Lemoine NR. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. Mol Cell Biol [Internet]. 2002;22(11):3577–89. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11997495

82. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. Mol Cell [Internet]. 1999 Mar;3(3):287–96. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10198631

83. Strasser A, Puthalakath H, Bouillet P, Huang DC, O'Connor L, O'Reilly LA, et al. The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 2000;917:541–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11268382

84. Sionov RV, Vlahopoulos SA, Granot Z. Regulation of Bim in Health and Disease. Oncotarget [Internet]. 2015;6(27):23056–134. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget

85. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Köntgen F, et al. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. Science [Internet]. 1999 Nov;286(5445):1735–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10576740

86. O'Reilly LA, Cullen L, Visvader J, Lindeman GJ, Print C, Bath ML, et al. The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. Am J Pathol [Internet]. 2000;157(2):449–61. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10934149

87. Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang L-C, Coultas L, Puthalakath H, et al. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. Nature [Internet]. 2002 Feb;415(6874):922–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11859372

88. Jay DC, Mitchell DM, Williams MA. Bim mediates the elimination of functionally unfit Th1 responders from the memory pool. PLoS One [Internet]. 2013;8(6):e67363. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23840678

89. Kurtulus S, Sholl A, Toe J, Tripathi P, Raynor J, Li K-P, et al. Bim controls IL-15 availability and limits engagement of multiple BH3-only proteins. Cell Death Differ [Internet]. 2015;22(1):174–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25124553

90. Grayson JM, Weant AE, Holbrook BC, Hildeman D. Role of Bim in regulating CD8+ T-cell responses during chronic viral infection. J Virol [Internet]. 2006 Sep;80(17):8627–38. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16912311

91. Lopes AR, Kellam P, Das A, Dunn C, Kwan A, Turner J, et al. Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection. J Clin Invest [Internet]. 2008 May;118(5):1835–45. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18398508

92. Lin Y-C, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. Nat Commun [Internet]. 2014;5(11):4767. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms5767%5Cnhttp://www.nature.com/ncomms/2014/140903/ncomms5767/full/ncomms5767.html#ref7%5Cnhttp://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms5767

93. Hübner A, Cavanagh-Kyros J, Rincon M, Flavell R a, Davis RJ. Functional cooperation of the proapoptotic Bcl2 family proteins Bmf and Bim in vivo. Mol Cell Biol. 2010;30(1):98–105.

94. Clemente T, Dominguez MR, Vieira NJ, Rodrigues MM, Amarante-Mendes GP. In vivo assessment of specific cytotoxic T lymphocyte killing. Methods [Internet]. 2013;61(2):105–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23454288

95. 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 [Internet]. 2003;71(5):2744–57. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704149

96. Boyle JS, Koniaras C, Lew AM. Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. Int Immunol [Internet]. 1997;9(12):1897–906. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466317

97. Tabe L, Krieg P, Strachan R, Jackson D, Wallis E, Colman A. Segregation of mutant ovalbumins and ovalbumin-globin fusion proteins in Xenopus oocytes. Identification of an ovalbumin signal sequence. J Mol Biol [Internet]. 1984;180(3):645–66. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6543229

98. Nakagawa S, Niimura Y, Gojobori T, Tanaka H, Miura K. Diversity of preferred nucleotide sequences around the translation initiation codon in eukaryote genomes. Nucleic Acids Res [Internet]. 2008 Feb [cited 2016 Jan 18];36(3):861–71. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2241899/

99. Grzegorski SJ, Chiari EF, Robbins A, Kish PE, Kahana A. Natural Variability of Kozak Sequences Correlates with Function in a Zebrafish Model. PLoS One [Internet]. 2014 Sep [cited 2016 Jan 18];9(9):e108475. Available from: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0108475

100. Bernard P, Couturier M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. J Mol Biol [Internet]. 1992 Aug;226(3):735–45. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1324324

101. Hatfield L, Hearing P. Redundant elements in the adenovirus type 5 inverted terminal repeat promote bidirectional transcription in vitro and are important for virus growth in vivo. Virology [Internet]. 1991 Sep;184(1):265–76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1871971

102. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput

applications. Methods [Internet]. 2004 Jun;33(2):95–103. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15121163

103. Hunt MA, Currie MJ, Robinson BA, Dachs GU. Optimizing Transfection of Primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells Using Commercially Available Chemical Transfection Reagents. J Biomol Tech [Internet]. 2010 Jul [cited 2016 Jan 17];21(2):66–72. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2884313/

104. Luo J, Deng Z-L, Luo X, Tang N, Song W-X, Chen J, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. Nat Protoc [Internet]. 2007 May [cited 2016 Jan 17];2(5):1236–47. Available from: http://www.nature.com/nprot/journal/v2/n5/full/nprot.2007.135.html

105. Tubo NJ, Jenkins MK. TCR signal quantity and quality in CD4+ T cell differentiation. Trends Immunol [Internet]. 2014 Dec [cited 2017 Mar 3];35(12):591–6. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490614001707

106. Dustin ML. What Counts in the Immunological Synapse? Mol Cell [Internet]. 2014 Apr [cited 2017 Mar 2];54(2):255–62. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276514003104

107. Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. J Biol Chem [Internet]. 1988 Dec 5 [cited 2017 Feb 22];263(34):18545–52. Available from: http://www.jbc.org/cgi/content/short/263/34/18545

108. Reynier MO, Abou Hashieh I, Crotte C, Carbuccia N, Richard B, Gérolami A. Monensin action on the Golgi complex in perfused rat liver: evidence against bile salt vesicular transport. Gastroenterology [Internet]. 1992 Jun [cited 2017 Feb 22];102(6):2024–32. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1587420

109. Cabral PC. Desenvolvimento de modelo experimental murino para o estudo da imunobiologia do melanoma. [Internet]. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; 2016. Available from: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42133/tde-16112016-093857/pt-br.php

110. Rock KL, York IA, Saric T, Goldberg AL. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. Adv Immunol. 2002;80:1–70.

111. Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvetnick N. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. Nat Med [Internet]. 1998 Jul;4(7):781–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9662368

112. Kissler S, Anderton SM, Wraith DC. Antigen-presenting Cell Activation: a Link Between Infection and Autoimmunity? J Autoimmun [Internet]. 2001 May;16(3):303–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334496

113. Di Genova G, Savelyeva N, Suchacki A, Thirdborough SM, Stevenson FK. Bystander stimulation of activated $CD4^{+}$ T cells of unrelated specificity following a booster vaccination with tetanus toxoid. Eur J Immunol [Internet]. 2010 Apr;40(4):976–85. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200940017

114. Tiago Clemente. Novo papel da galectina-1 como molécula efetora de células citotóxicas. [Internet]. [São Paulo]: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; 2014. Available from:

http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42133/tde-11072014-141421/

115. Green AM, DiFazio R, Flynn JL. IFN-γ from CD4 T Cells Is Essential for Host Survival and Enhances CD8 T Cell Function during Mycobacterium tuberculosis Infection. J Immunol [Internet]. 2013 Mar 15;190:270–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164422

116. O'Brien S, Thomas RM, Wertheim GB, Zhang F, Shen H, Wells AD. Ikaros imposes a barrier to CD8+ T cell differentiation by restricting autocrine IL-2 production. J Immunol [Internet]. 2014 Jun 1;192(11):5118–29. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24778448

117. Hor JL, Whitney PG, Zaid A, Brooks AG, Heath WR, Mueller SN. Spatiotemporally Distinct Interactions with Dendritic Cell Subsets Facilitates CD4+ and CD8+ T Cell Activation to Localized Viral Infection. Immunity [Internet]. 2015 Sep [cited 2017 Mar 3];43(3):554–65. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107476131500309X

118. Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. Curr Opin Immunol [Internet]. 2010 Jun;22(3):333–40. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20363604

119. Yang TC, Millar J, Groves T, Zhou W, Grinshtein N, Parsons R, et al. On the Role of CD4+ T Cells in the CD8+ T-Cell Response Elicited by Recombinant Adenovirus Vaccines. Mol Ther [Internet]. 2007 May;15(5):997–1006. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17375073

120. Ludwinski MW, Sun J, Hilliard B, Gong S, Xue F, Carmody RJ, et al. Critical roles of Bim in T cell activation and T cell-mediated autoimmune inflammation in mice. J Clin Invest [Internet]. 2009 Jun;119(6):1706–13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19411758

121. Urra H, Dufey E, Lisbona F, Rojas-Rivera D, Hetz C. When ER stress reaches a dead end. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet]. 2013 Dec;1833(12):3507–17. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016748891300311X

122. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca2+ transfer in the control of apoptosis. Oncogene [Internet]. 2008 Oct 27;27(50):6407–18. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955969

123. Santella L, Ercolano E, Nusco GA. The cell cycle: a new entry in the field of Ca 2+ signaling. Available from: http://download.springer.com/static/pdf/282/art%253A10.1007%252Fs00018-005-5083-6.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2Fs00018-005-5083-6&token2=exp=1488537875~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F282%2Fart%25253A10.1007%25252Fs00018-005-508

124. Prlic M, Bevan MJ. Exploring regulatory mechanisms of CD8+ T cell contraction. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2008 Oct 28;105(43):16689–94. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18946035

125. Knocke S, Fleischmann-Mundt B, Saborowski M, Manns MP, Kühnel F, Wirth TC, et al. Tailored Tumor Immunogenicity Reveals Regulation of CD4 and CD8 T Cell Responses against Cancer. Cell Rep [Internet]. 2016 Nov;17(9):2234–46. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124716315248

126. Ali HR, Provenzano E, Dawson S-J, Blows FM, Liu B, Shah M, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. Ann Oncol [Internet]. 2014 Aug 1;25(8):1536–43. Available from: https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdu191

127. Flecken T, Schmidt N, Hild S, Gostick E, Drognitz O, Zeiser R, et al. Immunodominance and functional alterations of tumor-associated antigen-specific $CD8^{+}$ T-cell responses in hepatocellular carcinoma. Hepatology [Internet]. 2014 Apr;59(4):1415–26. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/hep.26731

128. Mcgray AJR, Bernard D, Hallett R, Kelly R, Jha M, Gregory C, et al. Combined vaccination and immunostimulatory antibodies provides durable cure of murine melanoma and induces transcriptional changes associated with positive outcome in human melanoma patients. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/onci.19534?needAccess=true

129. Grinshtein N, Ventresca M, Margl R, Bernard D, Yang T-C, Millar JB, et al. High-dose chemotherapy augments the efficacy of recombinant adenovirus vaccines and improves the therapeutic outcome. Cancer Gene Ther [Internet]. 2009 Apr 7;16(4):338–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18989352

130. van der Burg SH, Arens R, Ossendorp F, van Hall T, Melief CJM. Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. Nat Rev Cancer [Internet]. 2016 Mar 11;16(4):219–33. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc.2016.16

131. Karan D, Krieg AM, Lubaroff DM. Paradoxical enhancement of CD8 T cell-dependent anti-tumor protection despite reduced CD8 T cell responses with addition of a TLR9 agonist to a tumor vaccine. Int J Cancer [Internet]. 2007 Oct 1;121(7):1520–8. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.22873

132. Coulie PG, Karanikas V, Lurquin C, Colau D, Connerotte T, Hanagiri T, et al. Cytolytic T-cell responses of cancer patients vaccinated with a MAGE antigen. Immunol Rev [Internet]. 2002 Oct;188(1):33–42. Available from: http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-065X.2002.18804.x

133. Stewart B, Wild CP, International Agency for Research on Cancer, WHO. World Cancer Report 2014 [Internet]. 2014. Available from: http://www.thehealthwell.info/search-results/world-cancer-report-2014?source=relatedblock&content=resource&member=572160&catalogue=none&collection=Conditions,Chronic Conditions,Cancer&tokens_complete=true

134. Alexander-Miller MA, Derby MA, Sarin A, Henkart PA, Berzofsky JA. Supraoptimal peptide-major histocompatibility complex causes a decrease in bc1-2 levels and allows tumor necrosis factor alpha receptor II-mediated apoptosis of cytotoxic T lymphocytes. J Exp Med [Internet]. 1998 Oct 19;188(8):1391–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9782116