

Tiago Clemente Machado

**Novo papel da galectina-1 como
molécula efetora de células
citotóxicas**

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

São Paulo
2014

Tiago Clemente Machado

**Novo papel da galectina-1 como
molécula efetora de células
citotóxicas**

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

Área de concentração: Imunologia

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

Versão original

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

© reprodução total

Machado, Tiago Clemente.

Novo papel da galectina-1 como molécula efetora de células citotóxicas / Tiago Clemente Machado. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Controle molecular da morte celular.

Versão do título para o inglês: New role for galectin-1 as effector molecule of cytotoxic cells.

1. Células citotóxicas 2. Galectina-1 3. Citotoxicidade celular
4. Lisossomos secretórios 5. Linfócito TCD8⁺ 6. Célula NK
I. Mendes, Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB013/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Tiago Clemente Machado.

Título da Tese: Novo papel da galectina-1 como molécula efetora de células citotóxicas.

Orientador(a): Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

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

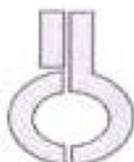
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal



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: ceq@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **077** nas fls. **105** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **João Gustavo Pessini Amarante-Mendes**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Novo papel da galectina-1 como molécula efetora de células citotóxicas*" do qual participam o(s) alunos **Thiago Clemente Machado**, 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 **20.06.2011**, com validade de **3 anos**.

São Paulo, 21 de junho de 2011.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

*Aos meus pais e as minhas irmãs
pelo amor, dedicação, incentivo e
apoio constante, presente e em espírito.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gustavo Amarante-Mendes pela oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa de excelente qualidade nos últimos cinco anos. Por me mostrar com seu exemplo, o real papel de orientar. Me ensinou o pensar, argumentar e criticar científico. Confiou a mim conduzir uma de suas brilhantes idéias que hoje se tornou minha tese de doutorado. Por sua generosidade e disposição diária. Principalmente pela atenção e amizade.

Ao Prof. Dr. Sebastian Diego Amigorena pela oportunidade dada a mim de desenvolver parte da minha tese em seu laboratório no Institut Curie, Paris – França. Agradeço a paciência e atenção com minhas dificuldades e tese. Pelas discussões, disposição diária e disponibilizar toda sua estrutura e pessoal para o desenvolvimento do meu projeto. A todos os seus pós-docs João, Ulf, Patricia, Ella, Andres, Elodie, Omar e em especial a Luigia Pace, quem me supervisionou e colaborou com discussões que conduziram meus experimentos. As técnicas Géraldine, Clarice e Stephanie, por todo auxílio e ajuda no laboratório e com os animais. Aos secretários Olivier e Céline, por todo auxílio na parte burocrática e financeira. A Celine e a todos os funcionários dos biotérios do Institut Curie, pelo auxílio, manutenção e cuidado com os animais de experimentação.

Ao Prof. Maurício Martins Rodrigues pela ajuda durante todo o projeto sempre que solicitado. Por ter sido sempre tão disponível e tão gentil na elaboração e ensinamento dos ensaios de citotoxicidade, produção e titulação do adenovírus recombinante, ensaios do tetrâmero e na realização do paper de metodologia do ensaio de citotoxicidade. Agradecimento especial a sua aluna de doutorado e grande amiga, Mariana Dominguez, pelos ensinamentos e paciência, além de colaborar e desenvolver junto a mim meu primeiro paper. Agradecimento também ao Roni pelos ensinamentos de imunização dos animais e a todo o laboratório.

A Prof. Dra. Jacqueline Jacysin. Por toda a ajuda nos experimentos e pelo ensinamento em manipular os animais os quais devo inteiramente a você. Não esquecerei que mesmo doente viajou a Ribeirão Preto para me auxiliar no momento de ansiedade, quando eu iniciei os trabalhos da galectina 1. Obrigado pela amizade e grande carinho!

A Profa. Dra. Karina Ramalho Bortolucci e todo seu laboratório com quem convivi constantemente desde o início do meu curso. Obrigado pela amizade e pelo carinho durante todo nosso convívio, em especial a Carininha, Silvia, Thaís e Vi.

Ao Prof. Dr. Seamus Martin pela ajuda na construção deste projeto, desde sua fase inicial no pós-doutorado do Prof. Gustavo até as discussões e críticas para a escrita e publicação do paper.

Ao Prof. Dr. Marcelo Dias-Baruffi por toda a ajuda com os ensaios de citotoxicidade ao conceder os animais Gal-1 e seu laboratório para a realização de diversos dos ensaios, além das discussões científicas empolgantes sobre as galectinas. Pela atenção e carinho a mim dedicado desde o primeiro dia do nosso convívio. Agradeço a todos do laboratório e os que ali comigo conviveram e me ajudaram, Karina e Carlos, Lilian, Camilo, Mayb, Maitê, Willian, Francine, Thalita e seus avós,

Bianca, Helen, Amandas, Fabiana, Eleni, Maicon, Rubinho. Obrigado por me receberem tão bem, alguns em suas casas, e por tornarem minhas estadias em Ribeirão Preto produtivas, divertidas e confortáveis.

Aos Professores Anderson, Momtchilo e Maria Regina, pelos ensinamentos da docência no Programa de Aperfeiçoamento Estudantil – PAE –, experiência excepcional de oratória e didática.

Ao HC-USP Ribeirão Preto, ao departamento de patologia da USP Ribeirão Preto e ao laboratório do Professor Júlio Voltarelli pelo apoio no início das padronizações da microscopia confocal.

Aos Professores Niels, Ana Paula Lepique, Éspér Kallas, Roger Chammas, Daniela Santoro e Alexandre Steiner, membros das minhas bancas de qualificação. Agradeço pelas críticas e discussões que enriqueceram minha tese e contribuiu para meu crescimento crítico na pós graduação.

A Prof. Dra. Telma Zorn pela grande ajuda e colaboração com os experimentos de microscopia eletrônica. Obrigado também a Fernanda, que me ajudou com tanta dedicação e atenção não só na construção dos materiais mas também na leitura e fotomicrografias eletônicas.

Ao Prof. Dr. Serjo Shenkman, por ceder seu laboratório para a realização das nossas primeiras fotomicrografias confocais e ao seu aluno Bruno Blota, por toda paciência e pelo ensinamento da técnica e marcação da fluorescência.

Ao Prof. Renato Mortara, por ceder os anticorpos anti-LAMP-1 e anti-LAMP-2 durante nossos experimentos de padronização da microscopia confocal.

Aos técnicos Daniel e Danilo, cujo trabalho foi fundamental para o bom andamento e organização do laboratório.

Aos pré-ICs e ICs Marco Aurélio, Jennifer, Giulia e Bárbara. Por toda amizade, carisma, paciência, aprendizados e ensinamentos divididos.

Aos meus grandes amigos de laboratório de longa data e os mais recentes, Maria Emília, Júlia, Lú Medina, Flávia, Cristiane, Bá, Narciso, Natália, Pri Denapoli, Priscila, Sandy, Marcela, por me ajudarem na elaboração dos experimentos e discussão dos dados. Por sempre lerem meus relatórios, qualificações e tese e me ajudarem na correção. Pela amizade sincera que cultivamos dentro e fora do laboratório. Por dividirem o dia-a-dia e o tornar tão prazeroso. Por me acolherem e apoiarem. Pelas risadas e também tensões. Por transformarem em um ambiente familiar nosso trabalho.

A Lú e sua família, Nair, Hilton e Fernando, um agradecimento especial por todo carinho e pelos estudos para meu ingresso na Pós, cursão e supervisão com os alunos de pré-IC e ICs.

A Jú e sua mãe, Bel, agradeço a amizade e o carinho de ter me recebido e cuidado de forma tão especial após a cirurgia.

Ao Narciso obrigado pela amizade, companheirismo e colaboração, além da honra de agora ser seu padrinho.

Aos que já saíram: Ricardo, Maíra, Nair, Welbert, Rodolfo, Inaê, André, Lú Concep. Pelas discussões, amizade, companheirismo e carinho que tornaram o ambiente de trabalho tão divertido e especial!

A Má e ao Manú um agradecimento especial não só pela grande amizade mas também por me receberem em sua casa no mês mais difícil financeiramente da minha estadia em São Paulo. Por toda compreensão e carinho que me dedicaram. Pra sempre no meu coração. Em especial também a Ré, mãezona da Má e grande amiga.

Ao André agradeço pelo tempo que dividimos o mesmo trabalho, pelas discussões e amizade.

Ao Prof. Niels, por me acompanhar desde antes do meu ingresso no programa. Pelos ensinamentos e conselhos. Agradeço a todo seu laboratório com quem mantive contato próximo. Meire, Mari, Tércio, Matheus, Ênio, Reinaldo, Rosa, Gisele, Carla, Pedro, Maristela, Richardt, Angela, Candinho, Welbert, Cris.

A Profa. Lourdes Isaac, pelos ensinamentos de como utilizar o soro e ativar as proteínas do complemento nos ensaios de geração de Blastos CD8. E a todo seu laboratório pelo qual tenho grande amizade. Tati, Mônica, Adriana, Leandro, Iris.

As secretárias e secretários do departamento, Jotelma, Amanda, Eni, João, pela amizade, paciência e por toda a ajuda. Obrigado pelo convívio amigável e por serem sempre disponíveis e receptivos.

Aos funcionários da portaria e segurança do departamento de Imunologia. Especialmente ao Otacílio e Milton, Márcio e Moisés, independentemente do dia, da hora, sempre cordiais e bem humorados!

Aos funcionários do biotério, em especial Israel, Silvia, Regina, Márcio, Ana, por toda dedicação e cuidado com nossos animais. Pelos ensinamentos, disposição e dedicação a essa tarifa tão especial.

A Andrea, por ser sempre cordial e disposta no dia-a-dia da rotina do FACs.

A todo o departamento de Imunologia, aos docentes e a todos os alunos por sempre se mostrarem disponíveis para discussões, dividirmos reagentes, disponibilizar aparelhos e computadores quando necessário. Por toda troca de informações e conhecimento, além do convívio e amizade.

Aos meus pais, Adelson e Marluce, e a minha irmã Liliane que apesar de longe fisicamente estiveram sempre presentes, apoiando, incentivando e vibrando com todas as minhas conquistas. A minha irmã Tatiane, que está sempre olhando por mim e me protegendo, onde quer que ela esteja.

A toda minha família que me acompanha e dá apoio as minhas decisões. Por estarem sempre presentes e pelo carinho especial que tem comigo.

Aos meus queridos de coração, Mariana, Gladstone, Tércio, Júlia Ines, Jacu, Nina, Matheus, Tati, Monica, Adriana, Valerinha, Renata, Carla, Lilian, Patrícia, Andrea, unidos por uma grande amizade!

A todos os amigos que não foram citados, mas que contribuíram direta ou indiretamente, para a elaboração desta tese.

A Universidade de São Paulo – USP – e ao Institut Curie, por dar estrutura e suporte para que essa tese fosse realizada.

As agências de fomento Fapesp, CNPq, INCT e ao Institut Curie pelo suporte financeiro.

“Uma vez que você tenha experimentado voar, você andará pela terra com seus olhos voltados para o céu, pois lá você esteve e para lá você desejará voltar.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

MACHADO, T. C. **Novo papel da galectina-1 como molécula efetora de células citotóxicas.** 2014. 122 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A exocitose de grânulos secretórios é o principal mecanismo efetor de células T CD8⁺ (também conhecidas como linfócitos T citotóxicos - CTLs) e constitui uma importante arma contra o câncer e as células infectadas por patógenos. Apesar da intensa pesquisa sobre o desenvolvimento, ativação e função efetora destas células, o entendimento sobre mecanismos moleculares envolvidos na degranulação direcionada à célula alvo, morte desta e sobrevivência da célula efetora durante o ataque citotóxico continua limitado. Em particular, pouco se sabe sobre a composição/estrutura dos grânulos líticos das CTLs. A literatura mostra que perforina e certas granzimas são fundamentais para a indução da morte nas células alvo *in vitro* e que *in vivo* ainda há controversa quanto as principais indutoras desse processo. Resultados prévios do nosso grupo identificaram, através de uma análise proteômica, algumas dezenas de novas proteínas desses grânulos, além de alguns constituintes já conhecidos. Dentre elas foi identificada a galectina-1, uma lectina que reconhece beta-galactosídeos e participa de vários processos biológicos, incluindo a resposta imune adaptativa. Galectinas podem interagir com glicanas nas superfícies celulares das células do sistema imune e, dessa forma, promover a modulação da produção de citocinas e mediadores, a adesão celular, apoptose, quimiotaxia e endocitose. A literatura atual relata a ação de Gal-1 por via exógena apenas através de sua secreção por uma via não convencional que depende da manutenção da sua região de ligação a carboidratos. Dados iniciais do nosso grupo apontam um novo cenário para esta proteína, no contexto da resposta efetora das células citotóxicas, no qual Gal-1 está presente em grânulos citotóxicos. Através das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia confocal de varredura a laser e dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, nossos resultados sugerem que a Gal-1 participa do papel citotóxico das CTLs modulando a via dos receptores de morte FAS-FASL. Nós também mostramos que Gal-1 interfere com o tempo de contato entre APCs e linfócitos TCD8⁺, com a ativação dessas células e com o controle da proliferação dos linfócitos. Em conjunto, nossos resultados apontam um novo cenário para esta proteína, no qual Gal-1 está presente nos grânulos citotóxicos das CTLs e está relacionada a resposta efetora de células citotóxicas.

Palavras-chave: Células citotóxicas. Galectina-1. Citotoxicidade Celular. Lisossomos secretórios. Linfócito TCD8⁺. Célula NK. FAS-FASL. Proliferação celular.

ABSTRACT

MACHADO, T. C. **New role for galectin-1 as effector molecule of cytotoxic cells.** 2014. 122 p. Ph. D thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Exocytosis of secretory granules is the main effector mechanism of CD8⁺ T cells (also known as cytotoxic T lymphocytes - CTLs) and is an important weapon against cancer and pathogen-infected cells. Despite intense research on the development, activation and effector function of these cells, the understanding of the molecular mechanisms involved in the cytotoxic cell degranulation, death of target cells and survival of effector cells from the cytotoxic attack, remains limited. In particular, little is known about CTL's lytic granules composition and structure. Literature shows that perforin and certain granzymes are essential to induce death in target cells *in vitro* and *in vivo* but the major inducers of this process are still controversial. Previous results from our group identified, by proteomic analysis, most of the known components as well as a few dozens of new proteins associated with these granules. Among them, we identified galectin-1, a lectin that recognizes beta-galactosides and participates in many biological processes, including the adaptive immune response. Galectins can interact with cell surfaces glucans of the immune system, thereby modulating cytokine production, cell adhesion, apoptosis, chemotaxis and endocytosis. Literature reports the extracellular action of Gal-1 by means of its secretion via an unconventional pathway that depends on their carbohydrate binding region. Initial data from our group suggested a new scenario for this protein in the context of cytotoxic cell response, since Gal-1 was found inside cytotoxic granules. Here, we show by transmission electron and confocal laser scanning microscopy and *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity assays that Gal-1 has a role on CTL killing probably mediating the FAS-FASL pathway. We also show that Gal-1 regulates the time of contact between APCs and TCD8⁺ lymphocytes, the activation of APCs and the proliferation of CD8 T cells. Taken together, our findings suggest a new scenario, in which Gal-1 is present in CTL granules and participates in cytotoxic effector response.

Keywords: Cytotoxic cells. Galectin-1. Cellular cytotoxicity. Secretory lysosomes. CD8⁺ T lymphocytes. NK cell. FAS-FASL. Cell proliferation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Marcação com SDS-PAGE seguido de ‘Coomassie Blue’ de grânulos purificados de células citotóxicas.....33
- Figura 2** – Colocalização de α -tubulina, LAMP-1, granzima B, perforina e Gal-1 em lisossomos de células YT (YT), observada por microscopia de fluorescência confocal.....54
- Figura 3** – Visualização de Galectina-1 dentro de lisossomos por microscopia eletrônica de transmissão.....56
- Figura 4** – Células L1210Fas apresentam maior expressão da proteína Fas e maior sensibilidade à morte por Fas ligante solúvel.....59
- Figura 5** – Células TCD8+ Gal-1KO tem menor potencial efetor e essa alteração de função é independente da via FAS-FASL ex vivo.....60
- Figura 6** – Especificidade da citotoxicidade induzida pela imunização com Ad5 β -gal ou Ad5ASP-2.....62
- Figura 7** – Sensibilidade do ensaio de citotoxicidade *in vivo*.....64
- Figura 8** – Ensaio de citotoxicidade por imunização com Ad5 β -gal entre animais WT e CD8KO mostra que a resposta citotóxica é dependente das CTLs.....65
- Figura 9** – Ensaio de citotoxicidade por imunização com Ad5 β -gal entre animais WT, CD8KO, CD4KO e RAGKO mostra que a resposta citotóxica é parcialmente dependente dos linfócitos TCD4⁺ e independente de células NKT.....67
- Figura 10** – Cinética do ensaio de citotoxicidade *in vivo*.....68

Figura 11 – A média da intensidade de fluorescência de CD44 nas células TCD8+ específicas ativadas é maior no sétimo dia da resposta.....	70
Figura 12 – A administração de PA8 aumenta o número de células produtoras de IFN- γ e/ou TNF- α para o peptídeo no baço dos animais imunizados com o adenovírus recombinante adenoASP2.....	71
Figura 13 – A administração de ICP aumenta o número de células específicas para o peptídeo no LN dos animais imunizados com o adenovírus recombinante adeno β gal.....	71
Figura 14 – Cinética do número de células TCD8+ específica.....	73
Figura 15 – Ensaio de citotoxicidade por imunização com Ad5 β -gal entre animais WT e LPR mostra que a resposta citotóxica é dependente em aproximadamente 15% da via de CD95/CD95L.....	74
Figura 16 – Gráfico de representação das figuras de cinética do número de células TCD8+ específica e da cinética do ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i>	75
Figura 17 – Células TCD8+ tem menor potencial efetor em camundongos Knockout para galectina-1 (Gal-1KO).....	76
Figura 18 – Células T CD8+Gal-1KO entram em maior número de divisões em resposta a estimulação antigênica após 3 dias de estímulo <i>in vitro</i>	78
Figura 19 – Células T CD8+Gal-1KO entram em maior número de divisões em resposta a estimulação antigênica após 6 dias de estímulo <i>in vitro</i>	79
Figura 20 – Células T CD8+Gal-1KO apresentam diferente perfil de ativação em resposta a estimulação antigênica após 3 dias de estímulo <i>in vitro</i>	80

Figura 21 – Células T CD8+Gal-1KO apresentam diferente perfil de ativação em resposta a estimulação antigênica após 6 dias de estímulo <i>in vitro</i>	81
Figura 22 – Caracterização fenotípica dos animais OT-I.....	81
Figura 23 – BMDCs CD11c+Gr1- cultivadas com GM-CSF e estimuladas com LPS acentuam a expressão dos marcadores MHCII, CD86, CD80 e CD40.....	82
Figura 24 – Caracterização fenotípica das células de animais transgênicos para o TCR OT-I pós coluna de seleção negativa de células T CD8a+.....	83
Figura 25 – Células OT-IGal-1-/- possuem número de divisões similar ao de animais OT-IGal-1+/+ após 3 dias de imunização <i>in vivo</i> com DCs pulsadas com o peptídeo da OVA SIINFEKL.....	84
Figura 26 – Cinética de proliferação das células OT-I após 48, 54, 60 e 72 horas de imunização <i>in vivo</i> com DCs pulsadas com o peptídeo da OVA SIINFEKL e injeção das células OT-I.....	85
Figura 27 – Células TCD8 ⁺ de camundongos Gal-1KO apresentam maior degranulação do que a de animais selvagens.....	86
Figura 28 – A administração de ICP mostra números maiores de células específicas para o peptídeo no LN de camundongos Gal-1KO imunizados com o vírus adenoBgal do que em camundongos selvagens.....	88
Figura 29 – Células TCD8 ⁺ tem potencial efetor similar ao de animais selvagens em camundongos Knockout para galectina-1 (Gal-1KO) quando há ausência de Fas nas células alvo.....	90

Figura 30 – Galectina-1 é um dos constituintes dos lisossomos das células citotóxicas e contribui para a total eficácia da função efetora de células TCD8⁺ através da regulação da via de FasL. Além disso, a expressão de galectina-1 nos linfócitos T CD8⁺ é importante para o estabelecimento de contato duradouro entre essas células e células dendríticas durante o processo de apresentação de antígenos.....101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista das proteínas mais abundantes identificadas nos preparados das amostras dos grânulos das CTLs em 1D-SDS-PAGE.....116

Tabela 2 – Lista de proteínas identificadas por eletroforese 2D.....117

LISTA DE FILMES

Filmes 1-4 – Células OT-IGal-1-/- fazem contatos menos duradouros e menos estáveis com DCs durante a apresentação de antígenos pelas APCs no linfonodo.....	92
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AINR** – *activation-induced nonresponsiveness*
- AP** – proteína adaptadora
- APC** – Célula apresentadora de antígeno (*antigen-presenting cell*)
- ASP-2** - proteína de superfície de amastigota 2 de *T. cruzi*
- β-gal** - beta-galactosidase de *E. coli*
- CD** – *cluster differentiation*
- CRD** - *Carbohydrate Recognition Domain*
- CTL** – *Cytotoxic T Lymphocytes*
- dGal-1** – Galectina-1 dimérica
- DNA** – ácido desoxirribonucléico
- EAE** - encefalomielite autoimune
- Eomes** – *Eomesodermin*
- ERK** – *Extracellular signal-regulated kinase*
- FADD** – *Fas-associated protein with death domain*
- FcεRI** – *Receptor para a região Fc da imunoglobulina E*
- FGF-2** - fator de crescimento de fibroblastos-2
- Gal-1** – *Galectina-1*
- GM1** – *monosialotetrahexosylganglioside*
- GTP** – guanina trifosfato
- HAd5** - adenovírus 5 humano deficiente de replicação
- Hsc70** - *heat shock70*
- IFN-γ** - *Interferon gama*
- Igs** – imunoglobulinas
- IL** – interleucina
- iNOS** - NO sintase induzida
- KIRs** - *Killer cell immunoglobulin-like receptors*
- LAMP** – proteína de membrana associada a lisossomo
- Lck** – *Lymphocyte Specific Protein Tyrosine Kinase p56*
- LFA-1** - *lymphocyte function-associated antigen-1*
- Lgp96** – *96-kDa lysosomal glycoprotein protein*
- LPS** – lipopolissacarídeo
- Lyst** – *lysosomal trafficking regulator*

M6P - manose 6- fosfato

MMP - *Mitochondrial Membrane Permeabilization*

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MPR - receptor de manose 6-fosfato

MTOC – centro organizador de microtúbulo (centríolo)

NK – *Natural killer*

NKIS – sinapse imunológica de célula NK

NO – óxido nítrico

NOD – domínio de oligomerização de nucleotídeos

PBMC - células mononucleares do sangue periférico

PKC – *Protein kinase C*

PLC γ 1 – *phospholipase C-gamma1*

pMHC - peptídeo + complexo principal de histocompatibilidade

PRD – *Proline Rich Domain*

rGal-1 – Galectina-1 recombinante

RGGT - *Rab geranylgeranyltransferase*

RILP - *Rab7-Interacting Lysosomal Protein*

RNA m – Ácido ribonucléico mensageiro

SLP-76 – *Src homology 2 (SH2) domain-containing leukocyte protein of 76 kDa*

SMAC - complexo de ativação supramolecular

SMN - *survival of motor neuron*

SNAP-23 - *proteína 23 associada à sinaptossomo*

SNARE - *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*

T-bet – *T-box expressed in T cells*

TCR – receptor de célula T

TGF- β – *transforming growth factor beta*

TGN – *trans-Golgi network*

Th – *T helper*

TLR – Receptores tipo Toll

TNF- α - fator de necrose tumoral α

VAMP - *proteína de membrana associada a vesículas*

WASp – *Wiskott–Aldrich syndrome protein*

ZAP-70 – *Zeta-chain-associated protein kinase 70*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Células citotóxicas	23
1.2 Lisossomos secretórios – degranulação	28
1.3 Constituintes dos grânulos	30
1.4 Galectina-1	33
2 OBJETIVOS	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Camundongos	41
3.2 Células	41
3.3 Cultivo de Células	42
3.4 Imunofluorescência - Microscopia Confocal	42
3.5 Imunocitoquímica para microscopia eletrônica de transmissão (MET)	43
3.6 Obtenção de células TCD8+ efectoras por lavagem peritoneal	44
3.7 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	45
3.8 Ensaio de proliferação e perfil de ativação <i>in vitro</i>	45
3.9 Taxa média de divisão (“Average stage of division”)	45
3.10 Produção e purificação de adenovírus recombinantes humano do tipo 5 deficientes em replicação	46
3.10.1 Produção de estoque viral.....	46
3.10.2 Purificação de adenovírus recombinantes em gradiente de cloreto de céσιο.....	46
3.10.3 Titulação de estoques de adenovírus recombinantes.....	47
3.11 Imunização com adenoβgal	47
3.12 Ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i>	48
3.13 Imunofluorescência por citometria de fluxo	48
3.14 Ensaio pentâmero H-2Kb-VNHRFTLV	49
3.15 ELISPOT	49
3.16 Marcação de CD107a e ICS	50
3.17 Imunização	51
3.18 “Two-photon laser scanning microscopy”	51
3.19 Análises estatísticas	52

4 RESULTADOS	53
4.1 Colocalização Galectina-1, LAMP-1, granzima B e perforina	53
4.2 Gal-1 no compartimento lisossomal	55
4.3 Efeito da ausência de Gal-1 na resposta antitumoral <i>in vitro</i>	57
4.4 Padronização do ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i>	60
4.4.1 Especificidade do ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i>	60
4.4.2 Citotoxicidade <i>in vivo</i> para adenoBgal é dependente da dose da vacinação e da concentração de peptídeo pulsada nas células alvo.....	63
4.4.3 Citotoxicidade <i>in vivo</i> para Ad5 β -gal é dependente dos linfócitos T CD8+.....	64
4.4.4 A resposta máxima da citotoxicidade <i>in vivo</i> acontece no sétimo dia pós-imunização.....	68
4.4.5 O maior número de células T CD8 ⁺ positivas para CD44, produtoras de interferon gama e de TNF alfa na resposta ao adenoBgal transgênico se encontra no sétimo dia da resposta.....	69
4.4.6 O maior número de células T CD8 ⁺ específicas para o adeno β gal transgênico também se encontra no sétimo dia da resposta.....	72
4.5 Efeito da não expressão de Gal-1 <i>in vivo</i> na resposta antiviral por CTLs	75
4.6 Gal-1 controla a ativação dos linfócitos e a proliferação das células	77
4.7 Construção de animais OT-I <i>knockouts</i> para o gene <i>Igals</i> para ensaios <i>in vivo</i>	81
4.8 BMDCs cultivadas com GM-CSF e estimuladas com LPS expressam CD11c e acentuam a expressão dos marcadores MHCII, CD86, CD80 e CD40	82
4.9 Proliferação <i>in vivo</i> das células OT-I Gal-1KO apresenta perfil similar ao de células OT-I	83
4.10 Perfil de degranulação em animais Gal-1KO	85
4.11 Animais Gal-1KO possuem maior número de células produtoras de interferon (ELISPOT)	87
4.12 Papel de FAS-FASL e Gal-1 na função efetora das CTLs	89

4.13 Células OT-IGal-1^{-/-} fazem contatos menos duradouros e menos estáveis com DCs durante a apresentação de antígenos pelas APCs no linfonodo.....	91
5 DISCUSSÃO.....	93
6 CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS.....	102
APÊNDICES.....	116
APÊNDICE A – Lista das proteínas mais abundantes identificadas nos grânulos das CTLs.....	116
APÊNDICE B – Lista das proteínas dos grânulos das CTLs.....	117
APÊNDICE C – <i>In vivo</i> assessment of specific cytotoxic T lymphocyte killing.....	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células citotóxicas

O sistema imunológico é constituído por moléculas, células, tecidos e órgãos que trabalham em conjunto, em uma rede dinâmica de interações, para manter a homeostase do organismo. Linfócitos T citotóxicos (CTLs; linfócitos TCD8⁺) e células natural killer (NK) são células do sistema imune adaptativo e inato, respectivamente, que apresentam papel crucial na resposta imune antitumoral, antiviral e contra outros patógenos intracelulares, em um processo conhecido como vigilância imunológica (1).

Células NK são as primeiras células na defesa do hospedeiro contra infecções virais e outros patógenos. Estas não requerem pré-ativação por células apresentadoras de antígeno (APC) e, dessa forma, são importantes nos estágios iniciais da infecção, antes que a resposta por células T esteja formada. Seus grânulos citotóxicos são formados durante o desenvolvimento, o que torna as células NK equipadas para responder rapidamente a ameaça de tumorigenicidade e infecção (2). Além do ataque citotóxico, células NK podem rapidamente produzir citocinas e quimiocinas, as quais têm efeito imunoestimulatório e quimiotático (3).

Células NK expressam uma série de receptores de ativação e inibição, os quais agem permitindo a elas discriminar entre células alvo e não-alvo (4). O repertório de receptores das células NK é complementado por outros sensores inatos, tais como receptores *scavenger*, receptores do tipo Toll (*TOLL-like receptors*, TLRs) ou receptores do tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-like receptors, NLR) (5). Dessa forma, as estratégias de reconhecimento das células NK ampliam a detecção de situações patológicas nas quais sinais de perigo de micróbios patogênicos estão ausentes *in vivo*, tais como no caso de tumores com baixa imunogenicidade.

Para formar uma interface entre uma célula NK e a célula alvo susceptível, há a interação entre receptores de superfície celular, os quais iniciam a formação de uma estrutura chamada de sinapse imunológica de célula NK (NKIS; *NK immunological synapse*). Um número de moléculas tem sido encontradas acumuladas nas NKIS ativadas (6) e, embora a maioria seja estritamente intracelular, elas incluem CD2 (7) e CD11a (8) na superfície das células (9).

Consistente com seu papel na vigilância imune, células NK são largamente distribuídas no corpo. Não está claro, no entanto, se esta ampla distribuição é devido a sua recirculação, devido a existência de subconjuntos de NK com diferentes capacidades de *homing*, ou devido ao seu desenvolvimento em múltiplos locais (5). Entretanto, células NK são preferencialmente encontradas dentro dos vasos ou sinusóides do sangue ou linfa (5).

Células NK compartilham muitos caminhos de transdução de sinais e mecanismos citolíticos com CTLs. A interação de células NK com células alvo, como também em CTLs, é acompanhada pelo remodelamento do citoesqueleto das células NK, marcadas pela polarização de talina (8), actina (8), balsas lipídicas (*membrane rafts*) (10), do centro organizador de microtúbulo (MTOC) (11) e de lisossomos para o ponto de contato intercelular. Além disto, a distribuição espacial de moléculas dentro da sinapse de células NK ativadas, comparada à sinapse de CTL (com LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) e talina localizados no anel periférico), é ao redor de um núcleo central de moléculas de sinalização tais como PKC- θ , PLC γ 1, Ick e SLP-76 (8). Uma diferença importante entre CTLs e células NK é que a função efetora das NKs é negativamente regulada pela presença de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I nas células alvo. Receptores KIRs (*Killer cell immunoglobulin-like receptors*) nas células NK se ligam a estas moléculas e transduzem um sinal negativo que desativa a maquinaria lítica destas células (12).

Em células NK, a polimerização de actina e microtúbulos são exigidas para função citotóxica (13) e filamentos de actina (F-actina) (14), assim como MTOC (15), acumulam-se nas NKIS ativadas. Importantes moléculas associadas a actina são também encontradas no centro de ativação supramolecular (SMAC), incluindo a proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich (WASp) e talina (8, 16). A função de WASp em células NK, em particular, é um importante fator contribuidor para polarização de F-actina, e ambas as funções de polimerização de actina e função de WASp são solicitadas para efetiva localização dos grânulos citotóxicos em NKIS ativada (16).

Há uma variedade de receptores de adesão com potencial participação na adesão célula alvo/célula NK, incluindo as β 2-integrinas, CD11a e CD11b, assim como os membros da superfamília das Igs e CD2, todos acumulados na pSMAC das NKIS ativadas. Este agrupamento exige ambos polimerização de actina e função de WASp. Dessa forma, o papel destes receptores na sinalização celular e formação de

NKIS deve ser precedida por eventos de sinalização promovendo a ativação de WASp e rearranjo de citoesqueleto (9).

Diferente das células NKs que fomentam seu papel como constituintes das respostas imunes inata, os linfócitos TCD8⁺ são constituinte da resposta mais específica no sistema imunológico, que não se encontra montada no primeiro contato com o agente patogênico estranho ao organismo, e participam também em infecções por patógenos intracelulares e tumores. No entanto, essas células necessitam ser inicialmente ativadas nos órgãos linfóides periféricos pelo reconhecimento dos peptídeos de antígenos estranhos, presentes na superfície de uma APC, usualmente uma célula dendrítica. Este reconhecimento depende da presença, em uma APC, de MHC classe I, nos quais se ligam peptídeos antigênicos intracelulares que são então carregados para a superfície celular e apresentados junto a moléculas estimulatórias, para o CTL.

A população de células T naíve (células T ainda ativadas) expressa uma vasta gama de TCR com especificidade única e afinidade por um complexo formado entre o antígeno (peptídeo – p) e o complexo principal de histocompatibilidade (pMHC). Essas células constantemente recirculam entre sangue, linfa e baço e examinam APCs nos tecidos linfóides secundários a procura do raro complexo pMHC para o qual tem afinidade (17). Devido à diversidade de repertório de TCR, uma em um milhão de células expressam um TCR com uma afinidade para dado antígeno capaz de transmitir um estímulo de ativação (18, 19).

Estudos recentes têm mostrado que a ativação das células T ocorre em três fases distintas. A fase inicial dura cerca de 8 horas e é caracterizada por curtas interações entre as DCs pulsadas com antígeno e as células T. A dose total de antígeno determina a duração desta fase, o que sugere a existência de mecanismos integrados que estabelecem um limite para a ativação com base na dose de antígeno encontrado por uma célula T. Esta fase é imunologicamente produtiva porque as células T começam a aumentar a expressão de marcadores de ativação. Células T que encontram uma dose de antígeno abaixo do limiar não fazem contatos prolongados e continuam a migrar até saírem do linfonodo sem serem ativadas (20).

No início da segunda fase, o tempo de interação célula T-DC torna-se muito maior, e pode ser de aproximadamente 12 horas, sendo acompanhado por aumento adicional na expressão de marcadores de ativação e início da produção de IL-2 e IFN- γ . Finalmente, a fase três, que começa cerca de 24 horas após a entrada das

células T no linfonodo é caracterizada por curtas interações entre DC e células T e é induzida a proliferação das células (21-23).

Uma vez ativadas, os linfócitos TCD8⁺ podem reconhecer o mesmo complexo peptídeo-MHC classe I na superfície de uma célula infectada por vírus, por exemplo. A literatura relata que não há necessidade de abundância de complexos peptídeo/MHC para que a CTL induza apoptose de seu alvo. Estudos *in vitro* com células T efetoras mostraram que o simples contato TCR-MHC desencadeia o influxo de cálcio, e que cerca de 10 complexos MHC são necessários para a formação da sinapse imunológica (24, 25). Além disso, a presença de três complexo MHC para o qual os linfócitos T citotóxicos são específicos já é suficientes para induzir a lise das células alvo (26). No encontro de antígenos específicos pela primeira vez, células T são induzidas a expansão clonal em comando para combater a infecção, sendo que esta demora de 5 a 7 dias. Este primeiro encontro também leva a produção de células T de memória as quais, quando o antígeno for encontrado pela segunda vez, garantirão uma resposta mais rápida e efetiva.

CTLs podem matar seus alvos por duas vias. A primeira é através da expressão de ligantes da superfamília do Fator de Necrose Tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*), tais como o próprio TNF- α , TRAIL e FASL, desde que células alvos possuam receptores correspondentes em sua superfície. A segunda via de morte celular envolve a transferência de lisossomos secretórios, também chamados grânulos citotóxicos, dentro da sinapse imunológica estabelecida entre a célula efetora e a célula alvo, e prevalece como o maior mecanismo de morte mediada por CTL e por células NK (27). A morte da célula alvo é decorrente da indução de apoptose pela ação de proteínas pertencentes a uma família especial de proteases e da presença de uma proteína formadora de poros.

Os linfócitos TCD8⁺ se tornam competentes matadores (células efetoras) somente após ativação pelas APCs (12), que estimulam o receptor de célula T (TCR) induzindo a expressão gênica (expressam RNAm, por exemplo, para as proteínas perforina e granzima), formação de lisossomos secretórios - o aparecimento de lisossomos secretórios maduros é correlacionado com a habilidade citotóxica de uma CTL (28) - e proliferação celular (CTL antígeno-específico passa por uma série de duplicações celulares) (28). A literatura mostra que CTLs possuem um período de ausência de responsividade induzida por ativação (AINR; *activation-induced non-responsiveness*) nos dias 2-4 após a ligação inicial do TCR em que as

células T CD8⁺ se tornam incapazes de produzir IL-2 – citocina que atua como fator de crescimento autócrino - ou proliferar em resposta a uma ligação secundária do TCR (29, 30).

A interação entre linfócitos T citotóxicos e células alvo começa com a ligação de forma aleatória entre moléculas de adesão localizadas na superfície de ambas as células. O subsequente reconhecimento de antígenos específicos resulta na ativação de sinais bioquímicos que integram vias iniciadas pelos receptores de antígenos das células T e pelas moléculas acessórias (31). É importante destacar que a especificidade do reconhecimento depende justamente da detecção de peptídeos associados ao MHC classe I nas células alvo pelo TCR, sendo que o engajamento do TCR é necessário para que a célula efetora passe a expressar granzimas, perforina e FASL (12).

Quando CTLs encontram um alvo específico, o complexo TCR transfere uma rápida cascata de sinais ativadores através de tirosina-quinases e um rápido influxo de cálcio. Essa cascata causa uma rápida segregação dos receptores de superfície celular dentro de três compartimentos concêntricos, chamados de SMAC central (cSMAC), periférico (pSMAC) e distal (dSMAC) (32). Desta forma, sinalização e adesão celular se redistribuem na área de contato. A cSMAC é rica em proteínas de sinalização associadas ao TCR incluindo o TCR ζ , Lck e ZAP-70, assumindo o local da sinalização do TCR e é cercada pela outra área, composta pelo anel de proteínas de adesão como o LFA-1 (p-SMAC). Grânulos líticos são secretados em uma zona definida dentro da p-SMAC e próxima ao c-SMAC conhecida como domínio secretório (33). Demonstrou-se em células T que a formação da SMAC depende em parte da polimerização do citoesqueleto de actina (34, 35). Esta zona intercelular altamente organizada assemelha-se a uma sinapse neuronal razão pela qual ela tem sido chamada de “sinapse imunológica”.

Em relação à diferenciação de CTLs em células efetoras e de memória, o T-box dos fatores de transcrição Eomesodermina (Eomes) e T-bet parecem ser essenciais (36). T-bet é induzido rapidamente mediante estimulação do complexo TCR e é requerido no programa inicial de produção de citocinas (37), enquanto Eomes é induzido mais tarde durante a diferenciação e manutenção da expressão de IFN- γ . Camundongos deficientes para ambos T-bet e Eomes, em células T, têm expressão debilitada de mediadores citolíticos.

Proteínas Runx, uma família de 3 fatores de transcrição que se ligam ao DNA, controlam a diferenciação de timócitos e a diferenciação de linhagem CD4/CD8 (38, 39). Todas as três proteínas Runx são expressas em células CTL maduras (38), e CTLs deficientes em Runx3 apresentam redução de atividade citolítica (40).

1.2 Lisossomos secretórios – degranulação

CTLs e as células NK apresentam a citotoxicidade como mecanismo principal da sua função efetora no sistema imune. A principal organela dessa função é justamente o lisossomo secretório. Exocitose de lisossomos secretórios, como outros eventos de secreção regulados, envolvem vias distintas. A ligação estável ao receptor de superfície celular de um linfócito citotóxico com uma célula alvo resulta em mobilização de Ca^{2+} dentro da célula, os quais atuam como um sinal para o grânulo se mobilizar para degranulação (41). Esta mobilização ocorre ao longo dos microtúbulos em direção ao centro organizador de microtúbulos (MTOC/centrossomo) e é dirigido por uma proteína motora da família Kinesina (42). Uma vez que a sinalização tenha ocorrido, o citoesqueleto de actina e os microtúbulos polarizam rapidamente para a sinapse, uma via crucial na citotoxicidade (revisado na referência (43)). Microtúbulos que tem uma polaridade definida, se irradiam da MTOC (final negativo) para a periferia da célula (final positivo) e os grânulos migram na direção negativa para a MTOC através da ação das proteínas motoras dineína-dinactina. Os grânulos secretórios são transportados junto aos microtúbulos e agrupados ao redor do MTOC. Uma vez próximo à periferia da célula, o lisossomo utiliza-se de filamentos de actina para viajar a curta distância final para o atracamento local à membrana plasmática (42). Depois dos grânulos citotóxicos terem sido polarizados na membrana plasmática, eles são secretados dentro da sinapse imunológica em uma seqüência de eventos ordenados (44). Isto permite a liberação polarizada de seus conteúdos: perforina, granzimas e outros agentes de rompimento de membrana (45).

A fusão de lisossomos secretórios com a membrana plasmática é mediada por um conjunto de proteínas específicas (42). A fusão ocorre quando uma proteína R-SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) na membrana da célula efetora interage fortemente com duas ou três Q-SNARE

levando à formação de um complexo trans-SNARE que cataliza a fusão das duas membranas (46). Contudo, a identidade das SNAREs associadas com os lisossomos secretórios em células NK e CTLs é desconhecida.

Muitas proteínas SNARE têm sido encontradas associadas com lisossomos secretórios em vários tipos de células, tais como a proteína 23 associada à sinaptossomo (SNAP-23), proteína 2 de membrana associada a vesículas (VAMP2) e VAMP7 em mastócitos (47-49) em neutrófilos (50). Contudo, a significância funcional destas associações não é ainda plenamente entendida.

O processo de fusão entre a vesícula e a membrana é adicionalmente regulado pela GTPases da família *Rab* (51), as quais fornecem um segundo nível de especificidade para o evento de fusão. Cada *Rab* associa-se a uma diferente membrana celular (52). *Rab27a* é necessária para o movimento nos microtúbulos dos grânulos do MTOC para a sinapse através da região rica em actina (12, 42). *Rabs*, tais como, *Rab7* e/ou *Rab34*, podem ter um papel chave na ligação e transporte dos grânulos ao longo dos microtúbulos. *Rab7* atua controlando a proteína efetora RILP (*Rab7-Interacting Lysosomal Protein*), a qual recruta o motor dineína-dinactina para *Rab7* contida nos endossomos finais e lisossomos. Conseqüentemente, o motor transporta endossomos e lisossomos em direção ao final negativo dos microtúbulos (53). *Rab34* parece ter um papel similar a *Rab7* (54). Outra proteína que é requerida para uma adequada morte mediada por CTL é a proteína efetora *Rab geranylgeranyltransferase* (RGGT) – uma enzima que prenha certos *Rabs*, isto é, realiza modificação pós-traducional pela adição enzimática de motivos prenyl, os quais permitem ligação das *Rabs* às membranas e, desse modo, regula a associação entre elas (55). RGGT é exigida, por exemplo, para modificação lipídica de *Rab27a* (12).

O camundongo *gunmetal* – modelo murino da Síndrome de Hermansky-Pudlak (HPS) - tem mutações que inativam RGGT. Neles, há redução da secreção direcionada de vesículas, como das CTLs para células alvo e também secreção de grânulos de plaquetas (56) e a maioria dos lisossomos está espalhada em volta da periferia das células. A HPS é uma doença caracterizada por albinismo parcial, resultantes de defeitos na secreção de melanócitos, e distúrbios hemorrágicos resultantes da disfunção das plaquetas (57). Dessa forma, sabendo que tráfico vesicular é um processo crítico para a fisiologia normal de eucariotos e que as *Rab* GTPases são os maiores reguladores deste processo, defeitos nessas moléculas ou

na sua ativação estão cada vez mais implicados com doenças hereditárias e adquiridas. Já se sabe também que na Síndrome de Griscelli 2, existe um defeito na função de Rab27a que compromete a exocitose de grânulos líticos em linfócitos T citotóxicos. Essa doença apresenta como fenótipo episódios de ativação e infiltração descontrolada de linfócitos T e macrófagos para dentro de vários órgãos, incluindo o cérebro, o que causa convulsões e comprometimento neurológico com sérios riscos para a vida do paciente (58, 59).

Além da Rab27a, outra proteína identificada com papel na secreção de vesículas é a Lyst – também nomeada de proteína da Síndrome de Chediak-Higashi -, que tem papel único na regulação da fusão de membranas. Esta proteína citoplasmática é expressa em baixos níveis em todos os tipos de células e sua ausência leva a grandes anormalidades. Pacientes e camundongos com o gene defeituoso para a proteína Lyst desenvolvem a Síndrome de Chediak-Higashi, a qual apresenta uma marcada hipopigmentação e presença de lisossomos gigantes em todos os tipos de células (60).

Recentemente, uma quinase associada com a exocitose de grânulos líticos que contém granzima B foi identificada, a PKC δ . Ela se torna ativada após ligação ao TCR e está envolvida no seletivo movimento de grânulos citotóxicos para a sinapse imunológica (61, 62).

1.3 Constituintes dos grânulos

Lisossomos secretórios contêm a maquinaria – tal como as formas maduras das hidrolases ácidas lisossomais – que é requerida para sua função degradativa, e receptores – tais como Lgp96, um membro da família de proteína de membrana associada a lisossomo (LAMP) (63) e membros da família ‘heat shock 70’ (Hsc70) (64) – que são usados para reconhecimento e transferência de material (ambos citosólicos e ligados a membrana) para o lisossomo. As funções de outras proteínas residentes de membrana, tal como LAMP-1(CD107a), LAMP-2, LAMP-3 (CD63), são desconhecidas.

As proteínas de membrana são direcionadas por sinais em suas caudas citoplasmáticas que são reconhecidas por componentes específicos. Algumas proteínas de membrana lisossomal tais como LAMP-1, LAMP-2 e LAMP-3 tem um motivo contendo tirosinas, o qual pode ser reconhecido pelo complexo adaptador

AP1, AP2 e AP3, os quais são encontrados no TGN (*trans-Golgi network*), membrana plasmática e o sistema TGN-endossomal, respectivamente (42). Cada molécula AP liga um motivo específico (um sinal de tirosina ou um sinal de dileucina) na cauda citoplasmática e transfere proteínas para o endossomo primário e, então, para o lisossomo no caso de AP-1 e AP-2 ou diretamente para o lisossomo no caso de AP-3. LAMP-3 se liga a AP-3 e é especificado diretamente para lisossomos enquanto LAMP-1 e 2 são os primeiros transferidos para endossomo pela AP-1 e AP-2 (65, 66). Quando a molécula adaptadora AP-3 é defeituosa, os lisossomos secretórios de CTL são incapazes de mover-se junto aos microtúbulos na direção final negativa. A mutação afeta somente lisossomos secretórios, uma vez que os MTOC ou o Golgi são transportados normalmente para a área de contato. Assim, outras proteínas de membrana ainda não identificadas devem ser erroneamente arranjadas afetando o complexo motor dineína-dinactina para um transporte efetivo de grânulos para o MTOC durante a estimulação (28).

As proteínas lisossomais solúveis, tais como as hidrolases lisossomais, não têm sinais específicos em sua seqüência peptídica. Em vez disso, elas são modificadas durante a biossíntese pela adição de uma porção de manose 6- fosfato (M6P), a qual é reconhecida pelo receptor de manose 6-fosfato (MPR) (42). As serino-proteases granzimas A e B também são direcionadas pela manose-6-fosfato (67, 68). Estudos *in vitro* mostraram que a morte da célula alvo é decorrente da indução de apoptose pela ação dessas proteínas pertencentes a uma família especial de proteases (granzimas) e da presença de uma proteína formadora de poros (perforina) (69). Enquanto granzima B cliva caspase 3 e a molécula pró-apoptótica BID e ativa o processo de apoptose, a granzima A induz quebras em fita simples de DNA e impede o reparo celular forçando as células a entrarem neste programa de morte celular (70, 71). Estudos *in vivo* tem colocado em questão o papel das granzimas A e B na eliminação de células alvo e aberto o campo para identificação de novas moléculas que contribuiriam nesse cenário. Trabalho elegante de Regner e colaboradores mostrou que células T de animais deficientes em granzimas A e B são capazes de eliminar células alvo tão rápido e de maneira similar aos indivíduos selvagens, sem o uso de mecanismos compensatórios como aumento da expressão de granzimas órfãs ou interações FasL-Fas (72).

Perforina, uma das proteínas do grânulo conhecida por lisar membranas, é crucial para a função de constituintes do grânulo que estão envolvidos na morte da

célula-alvo (73). Quando perforina é secretada, ela polimeriza formando um poro de 16 nm na membrana através do qual granzimas e outras moléculas dos grânulos entram no citosol (74). Granulisina também requer perforina na sua transferência para dentro da célula-alvo, na qual atua diretamente em patógenos microbianos pela alteração da integridade de membrana (75).

Enquanto granzimas induzem morte celular pela entrada no citosol através de perforinas, a proteína de membrana FAS ligante (CD95L ou FasL) atua se ligando a FAS na superfície da célula alvo (28). FASL é um dos principais mediadores de apoptose que pode ser usado pela célula natural killer e a célula T ativada para matar células alvo e, portanto, são cuidadosamente controlados (76). A expressão de FASL é fortemente regulada pela CTL e estocada em grânulos líticos (77) e embora esteja armazenada em grânulos líticos, ainda está em debate se esta proteína está armazenada ou não junto com perforina e granzima B (78)

Apesar do papel central da exocitose de lisossomos secretórios na resposta imune a vírus, tumores e patógenos intracelulares e de haver intensa pesquisa nos eventos de morte por CTLs e NKs, pouco se sabe sobre a composição/estrutura dos grânulos líticos destas células e há contradição em quais são seus principais agentes citotóxicos. Não está claro a real composição de tais organelas bem como a identidade dos potenciais componentes de sua maquinaria exocítica.

Uma metodologia comumente utilizada na identificação de novas proteínas é o estudo do proteoma (proteômica). Em 2007, Casey e colaboradores publicaram um estudo no qual utilizou proteômica da membrana de lisossomos secretórios de células NK para definir sua composição (79). Foram identificadas proteínas como as GTPases Rab27a, Rab11a e Rab11b; de tráfego e vesiculares, entre elas Sintaxina 7 e VAMP7; estrutura de membrana e *membrane rafts*, tais como, CD63, LAMP1, LAMP2; identificou diversas outras proteínas como a hidrolase granzima B e receptores *scavenger* e também algumas que ainda não foram caracterizadas e que se apresentaram com 12% de abrangência do total de proteínas caracterizadas. Nesse mesmo contexto, a análise das proteínas dos grânulos de CTLs (resultado prévio do nosso grupo - Amarante-Mendes *et al.*, dados não publicados e **Figura 1, Tabela 1, Tabela 2**) identificou dezenas de novas proteínas, além de alguns constituintes já conhecidos. Entre os já conhecidos estavam granzima A e B, LAMP-1 e perforina. No entanto, dentre os novos candidatos, a molécula que se destacou e será alvo deste trabalho foi uma lectina, denominada galectina-1 (Gal-1), que tem

ganhado destaque por seu papel como um dos importantes reguladores das respostas imunes.

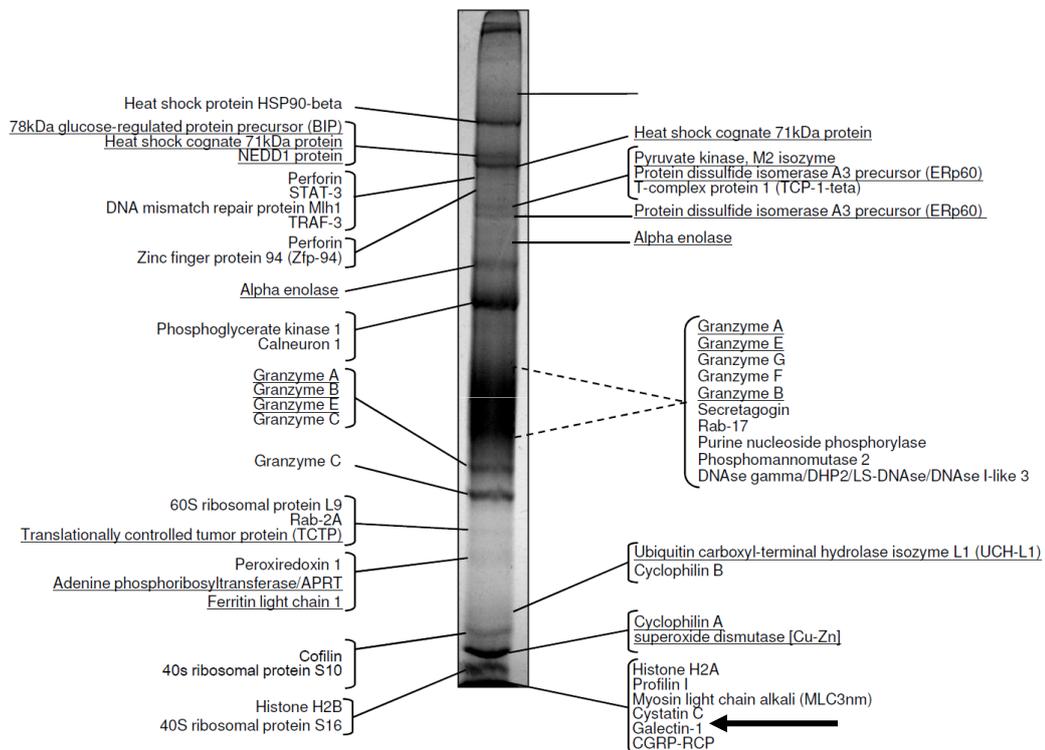


Figura 1. Marcação com SDS-PAGE seguido de 'Coomassie Blue' de grânulos purificados de células citotóxicas. A marcação revelou a banda mais proeminente presente em níveis similares em duas amostras representativas. Essas frações foram enriquecidas por atividade da esterase BLT. Análise por western-blot revelou que as frações dos grânulos purificados estavam fortemente enriquecidas com perforina, granzima A e granzima B.

1.4 Galectina-1

Galectinas são uma família de lectinas animais que reconhecem β -galactosídeos que contêm preferencialmente sequências de N-acetilactosaminas, sendo os resíduos terminais β -galactose e o tamanho da cadeia de polilactosamina requerimentos críticos para a capacidade de reconhecimento de carboidratos dessas lectinas (80).

Essas proteínas são importantes reguladoras da tolerância imune e homeostasia, podem desempenhar um papel relevante no desenvolvimento da resposta inflamatória, doenças autoimunes, aterosclerose, processos infecciosos e câncer (81). Isso faz delas alvos terapêuticos atraentes para limitar tais inflamações e doenças, além de prevenir rejeição de aloenxertos e potencializar a resposta antitumoral.

Até o momento, quinze galectinas foram identificadas em mamíferos, a maioria com grande distribuição tecidual e essa família de proteínas é subdividida em 3 categorias com base na homologia de suas sequências de aminoácidos: I) *prototípicas*, são aquelas que contêm um único CRD (*carbohydrate-recognition-binding domain*) e formam homodímeros não-covalentes (na qual se encontra a galectina-1); II) *quiméricas*, apresentam um CRD e um domínio aminoterminal rico em resíduos de prolina, glicina e tirosina, o qual é sensível a metaloproteinases e contribui para a oligomerização dessas lectinas; III) do tipo repetições em sequência (*tandem-repeat*), polipeptídeos únicos compostos por dois CRDs distintos conectados por um peptídeo ligador de 5 a 50 resíduos de aminoácidos (Cummings & Liu, 2009).

A primeira proteína descoberta na família das galectinas foi Gal-1. A galectina-1 é uma proteína ácida, possui a porção N-terminal acetilada, não possui peptídeo sinal e apresenta resíduos de cisteína livres. Gal-1 ocorre tanto como monômero quanto homodímero (82, 83). Os monômeros de galectina-1 possuem massa molecular aparente de aproximadamente 15 kDa sendo que esta pode também existir em uma forma oxidada, isto é, uma forma que não possui atividade de lectina (84).

A galectina-1 humana é codificada pelo gene LSGALS1, de 4397 pares de bases, localizado no cromossomo 22q12. O transcrito de 0,6 kb resulta do *splicing* de 4 éxons e codifica uma proteína de 135 aminoácidos (85). A galectina-1 de camundongo é codificada pelo gene *lsgals1*, de 3451 pares de base localizados no cromossomo 15 na região 44.9cM na citobanda E, dando origem a um transcrito de 817 pares de base, traduzido a uma proteína de 135 aminoácidos (86).

Essa lectina está presente tanto no meio extracelular como no intracelular. Gal-1 tem característica de proteínas citoplasmáticas típicas com uma região N-terminal acetilada e ausência de glicosilação (87). Ela tem sido descrita no núcleo celular e citosol. Contudo, embora Gal-1 não apresente a sequência sinal de secreção e não passe pela via padrão retículo endoplasmático/complexo de golgi (88), é bem sabido que ela é secretada e pode ser encontrada no lado extracelular de todas as membranas extracelulares tanto quanto em matriz extracelular de vários tecidos normais e neoplásicos (89, 90). Há evidências que esta proteína é secretada de uma maneira similar ao fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2), numa via de transporte de dentro para fora que envolve a translocação direta na membrana de

células de mamíferos e requer proteínas de membrana integras e fatores citosólicos que ainda não foram identificados (91).

Embora galectinas em geral, e em particular Gal-1, foram inicialmente descritas como lectinas que se ligam a β -galactosídeos, está claro na literatura que Gal-1 também é capaz de interagir através de ligações proteína-proteína. Na maioria dos casos a atividade de lectina de Gal-1 é observada quando ela está no meio extracelular, enquanto as interações proteína-proteína afetam suas funções intracelulares.

As proteínas já identificadas que interagem de maneira independente de carboidratos com Gal-1 não estão estruturalmente relacionadas umas com as outras e não parecem compartilhar motivos ou domínios comuns. Além disso, a porção da molécula da Gal-1 que está envolvida nestas interações ainda permanece desconhecida.

A atividade de lectina de Gal-1 está relacionada ao seu CRD. Embora Gal-1 dimérica (dGal-1) se ligue preferencialmente a glicoconjugados que contenham dissacarídeos ubíquos de N-acetilactosamina (Gal- β 1-3/4 GlcNAc também conhecido como LacNAcII ou sacarídeo tipo 2), sua ligação a unidades individuais de lactosamina é caracterizada por níveis de afinidade relativamente baixos (92, 93). É o arranjo dos dissacarídeos de lactosamina em cadeias de repetição multiramificadas (até três ramificações) que aumenta a avidéz de ligação (92, 93). Em contraste, não há aumento na avidéz quando as unidades de reconhecimento estão repetidas em corda (poli-N-lactosamina) (92).

Gal-1 é expressa diferentemente por diversos tecidos, tanto normais quanto patológicos, e participa de vários processos biológicos. Dentre estes processos podemos citar controle de sinalização celular, proliferação e ciclos celulares, apoptose, gênese de tumores, interações patógeno-hospedeiro e homeostase de célula T (81, 94-98).

Rubinstein e colaboradores mostraram que o bloqueio da atividade biológica de Gal-1 em tecido de melanoma resulta em uma massa tumoral reduzida e estimula a geração de resposta de célula T específica para o tumor *in vivo* (99).

Diversos trabalhos também têm mostrado a participação de galectina-1 na resposta imune inata e no processo inflamatório. Nesse contexto, foi visto que essa lectina inibe o edema, o extravasamento de neutrófilos e a degranulação de mastócitos (100). Mostrou-se também que a galectina-1 inibe a liberação de ácido

araquidônico (100), a produção de NO e a expressão de NO sintase induzida (iNOS) em macrófagos estimulados com LPS (101). Gal-1 é também capaz de induzir o *burst* oxidativo em neutrófilos que extravasaram para o tecido, mas não no caso de neutrófilos do sangue periférico (102).

Ainda nessa linha, mostrou-se que galectina-1 reduz a produção de IFN- γ , do TNF- α e aumenta os níveis de IL-10 tanto nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) como em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, ambas estimuladas com anti-CD3 ou na ausência deste estímulo. Portanto, essa lectina tem um papel imunorregulador (103, 104) e isto, provavelmente estaria correlacionado com o efeito benéfico do tratamento com galectina-1 em modelos de doenças autoimunes experimentais (105). Estudos *in vivo* em modelo de autoimunidade experimental têm revelado a habilidade de Gal-1 em polarizar a resposta de citocinas para o tipo T_{helper}2 (Th2), por reduzir os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12 e aumentar os níveis da secreção de IL-5 (106, 107). A administração *in vivo* de Gal-1 previne o desenvolvimento de inflamação crônica e prejudica o andamento da doença em modelos de encefalomielite experimental autoimune (EAE) (108), artrite (98), colite (106), hepatite (107), e pancreatite crônica (109).

Dentro desse contexto de resposta imunológica, já se sabe que galectina-1 modula as etapas iniciais de ativação de célula T por limitar a coalescência de *membrane rafts* e por promover fosforilação incompleta da cadeia ζ do TCR, então permitindo somente a resposta de células T que requerem sinais parciais do TCR (110).

A ligação de galectina-1 a células T inicia uma variedade de eventos de transdução de sinal, tais como ERK-2, fosforilação, influxo de cálcio, ativação de fatores de transcrição como AP-1 e redução da proteína anti-apoptótica BCL-2, importante para a fisiologia e sobrevivência de célula T (111, 112).

Embora Gal-1 tenha uma especificidade mínima para N-acetilactosamina (113), ela se liga preferencialmente a O- e N- glicanos que trazem unidades repetidas de N-acetilactosamina (113, 114). Apesar da abundância de tais estruturas, galectina-1 se liga a uma discreta subclasse de glicoproteínas da superfície das células T, presumivelmente porque elas decoram suas principais proteínas de suporte com unidades repetidas de lactosamina espaçadas, o que favorece o empacotamento e a ligação de alta avidade de Gal-1 multivalente e bivalente.

Como dímero bivalente, Gal-1 se liga a glicoproteínas na superfície das células T de uma maneira dependente de carboidratos (115). Um número de glicoproteínas encontradas nas linhagens de células T humanas Jurkat e MOLT-4 são candidatas a receptores específicos para a ligação de Gal-1 de mamíferos e estão envolvidas na morte de célula T mediada por Gal-1: CD45, CD43, CD7 (115, 116). A expressão regulada de glicosiltransferases, levando à criação de ligantes de N-acetilactosamina, durante diferentes estágios de desenvolvimento e ativação nas células T, pode determinar a susceptibilidade para a morte celular induzida por Gal-1 (117, 118).

As cadeias α e β do TCR e GM1 tem sido propostas como receptores adicionais (119, 120). Gal-1 é um dos maiores receptores para a porção de carboidrato do gangliosídeo GM-1 exposto na superfície de células de neuroblastoma humano (121). A confluência das células aumenta a apresentação de dGal-1 na superfície. Sobre essas condições Gal-1 atua como um regulador negativo de crescimento das células de neuroblastoma, sem ser pró-apoptótico (122).

Trabalhos mostraram que rGal-1 (Gal-1 recombinante) dirige a montagem de glicolattices que segregam seletivamente ligantes de Gal-1 dentro de microdomínios distintos de CD45/CD3 e CD43/CD7 na superfície de algumas células T (115).

Clustering e segregação de CD45 com CD3 e CD43 (também conhecida como leucosialina) com CD7 parecem ser cruciais para a sinalização e subsequente morte celular por galectina-1. Contudo, aquelas glicoproteínas podem regular positivamente ou negativamente a susceptibilidade celular para a apoptose induzida por galectina-1, dependendo do seu estado de glicosilação, o que deixa o possível envolvimento destas na indução de apoptose por galectina-1 ainda controverso. Dados da literatura mostram ainda que galectina-1 pode induzir apoptose em leucócitos (96), dentre os quais estão os timócitos imaturos (123) e células T ativadas *in vitro* (96). Entretanto, existem relatos na literatura contrários ao potencial apoptótico da galectina-1. Nessa linha, foi mostrado que apesar de galectina-1 induzir a exposição de fosfatidilserina na superfície de células MOLT-4, estas não entram em apoptose, pois não foi detectada a fragmentação do DNA e a perda da capacidade proliferativa dessas células após tratamento com galectina-1 (124). Dessa forma, apesar do papel de galectina-1 na indução de apoptose não estar claro, demonstrou-se que essa lectina está envolvida na homeostase leucocitária por induzir a fagocitose dessas células (95, 124). Além disso, a galectina-1 pode

promover a apoptose de células T produtoras de citocina pró-inflamatória IL-17 (Th17) e não de células Th2 produtoras de IL-10 e TGF- β (citocinas de caráter anti-inflamatório), por meio de reconhecimento diferencial de glicanas na superfície dessas células. Ou seja, essa susceptibilidade está associada ao padrão de glicosilação (125). Camundongos deficientes de galectina-1 (Lgals1^{-/-}) têm aumento na frequência de células Th1 e Th17 e aumentam a susceptibilidade a neuroinflamação autoimune.

Sabe-se, também, que Gal-1 é secretada por células TCD8⁺ efetoras ativadas. M. Carrie Miceli e colaboradores sugerem que Gal-1 regula a resposta primária de linfócitos TCD8⁺ *in vivo* por limitar o *burst size* promovendo apoptose. Seu grupo mostrou que na deficiência de Gal-1 as células hiperproliferaram em resposta à ligação do TCR, possivelmente pelo aumento da produção de IL-2 induzida pelo TCR e prevenção da AINR das células TCD8⁺ nos dias 2-4 após a ligação inicial do TCR (29, 30, 126, 127).

M. Carrie Miceli e colaboradores também mostraram, através de ensaios *in vitro* e *in vivo* de citometria de fluxo verificando a intensidade de fluorescência média da marcação com tetrâmero específico, que Gal-1 antagoniza a ligação persistente de agonistas do TCR em células TCD8⁺ periféricas ativadas (127). Além disso, demonstraram que a expressão induzida de Gal-1 por células TCD8⁺ ativadas regula a proliferação via apoptose da célula T por oposição da ligação contínua de agonistas do TCR e transdução do sinal.

Contudo, acreditava-se até o momento que as galectinas tinham ação exógena apenas através de sua secreção por uma via não-convencional que depende da manutenção da sua região de ligação a carboidratos. No entanto, como destacamos acima, resultados prévios do nosso grupo (Amarante-Mendes, dados não publicados) sugerem que a galectina 1 está presente nos lisossomos secretórios de células citotóxicas. Estes achados apontam um novo cenário dessa molécula no contexto de resposta efetora das células T CD8⁺, no qual ela seria secretada junto às outras proteínas dos grânulos citotóxicos.

Baseado neste fato, em dados da literatura que correlacionam Gal-1 e células TCD8⁺ e nas evidências de ação desta lectina sobre receptores de superfície celular regulando a fisiologia das células e homeostasia do sistema imunológico, a hipótese deste trabalho é que Gal-1 está localizada no compartimento lisossomal de células citotóxicas e possa ser secretada junto

às outras proteínas dos grânulos citotóxicos, contribuindo, desta forma, com a resposta efetora de células NK e CTL.

2 OBJETIVOS

- Comprovar a presença de Gal-1 nos lisossomos secretórios das células citotóxicas;
- Investigar sua participação na função efetora dessas células;
- Identificar o possível mecanismo de Gal-1 no controle da função efetora das células citotóxicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Neste trabalho, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, selvagens (Gal-1+/+), ou destituídos do gene para galectina-1 (Gal-1^{-/-}) fêmeas e adultas, pesando de 25-30 g, com idade entre 5-11 semanas provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (FCFRP-USP) gentilmente cedidos pelo Prof. Marcelo Dias-Baruffi da FCFRP-USP.

Também foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 CD8KO destituídos do gene para a cadeia alfa da proteína CD8, CD4KO, RAGKO e CD1KO machos e adultos, pesando de 25-30 g, com idade entre 5-11 semanas provenientes do Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia – USP.

Para os ensaios realizados no Institut Curie, Paris, os animais C57Bl/6 fêmea foram obtidos do laboratório Charles River e utilizados entre 6-10 semanas de idade. Animais C57Bl/6 transgênicos para o TCR (V α 2, V β 5) (OT-I), animais CD45.1/Bl6 e animais *knockouts* para galectina-1 (Gal-1^{-/-}) foram adquiridos da Jackson laboratory. Camundongos OT-I foram cruzados com animais CD45.1/C57Bl/6 para obter os camundongos OT-I CD45.1 e com animais Gal-1^{-/-} para obter os camundongos OT-IGal-1^{-/-}. Todos os animais foram alojados em biotérios SPF do Instituto Curie. As experiências com animais vivos foram realizadas de acordo com as diretrizes do Departamento de Veterinária Européia.

3.2 Células

YT: linhagem NK derivada de leucemia linfoblástica aguda transformada pelo vírus Epstein-Barr. Possui atividade citotóxica. Cresce em suspensão formando grumos. Linhagem gentilmente cedida pelo Dr. Seamus Martin (Trinity College, Dublin, Ireland);

L1210: - células de linfoma murino originalmente concedidas a pesquisa por Mr. I. Wodinsky, Arthur D. Little Corp., Cambridge, Mass. e adaptadas para crescimento em cultura celular por Kessel D. (128, 129). Possuem baixa expressão da proteína FAS e foram gentilmente cedidas pelo Dr. Thomi Brunner (University of Konstanz, Konstanz, Alemanha);

L1210Fas: linhagem de células L1210 de linfoma murino expressando FAS, gentilmente cedida pelo Dr. Thomi Brunner (University of Konstanz, Konstanz, Alemanha);

Células T CD8⁺ OT-I ou OT-IGal-1^{-/-} (específicas para o peptídeo SIINFEKL OVA257-264 em contexto MHC classe I H2-Kb) foram obtidas a partir dos linfonodos de animais OT-I ou animais OT-IGal-1^{-/-}, respectivamente, e enriquecida com o MACS CD8 + kit de isolamento (pureza cerca de 98%). O mesmo procedimento também foi realizado para a obtenção de células T CD8⁺ de animais C57Bl/6 e de animais Gal-1^{-/-}. Células dendríticas (DCs) derivadas de medula óssea foram diferenciadas conforme descrito por Winzler e colaboradores (130). As células foram recolhidas após 7 dias, ativadas com LPS durante toda noite (1µg/ml; SIGMA), e, em seguida, pulsada com o peptídeo SIINFEKL durante 1 hora a 37 °C. As células foram extensivamente lavadas antes da injeção.

3.3 Cultivo de Células

As linhagens de células YT foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 25 mM HEPES, 10% de FCS (*fetal cow serum*), 2 mM de L-glutamina e antibiótico (100 µg/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) a 37 °C em 5% de CO₂.

O uso das células para experimentos foi condicionado ao mínimo de 95% de viabilidade verificada por exclusão com Azul de Tripán 0,2%. A contagem do número de células tanto para repique quanto para a execução dos experimentos foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

3.4 Imunofluorescência - Microscopia Confocal

Primeiro foi preparada lâmina com polilisina onde se colocou cerca de 50 µL dessa em cada poço da lâmina de imunofluorescência e foi deixada em estufa 37 °C por 30 minutos. Ficou secando dentro do fluxo laminar por cerca de 15 min. Em seguida as células foram preparadas e feita a fixação nas lâminas. As células YT foram, centrifugadas a 90 *xg*/5 min. O sobrenadante foi retirado por inversão e o pelete foi ressuspenso em 1 ml de RPMI-1640 – 10% SFB. As células YT foram centrifugadas a 90 *xg*/2 min e ressuspenso na concentração de 1 x 10⁶ células/mL.

Posteriormente foi feita a adesão das células às lâminas com polilisina (50 µL de polilisina/poço). Após 30 min de incubação e a lâmina estar seca, foi adicionado 5×10^4 células/poço (50 µL) nas lâminas, deixando-as aderir por 30 min. Após este período, o sobrenadante foi aspirado e aplicado 50 µL de PFA a 2% em cada poço, deixando-se reagir por 30 min. Foi lavado 3 vezes com PBS, aplicado cerca de 20 µL de TritonX-100 0,1% em cada poço e deixado agir por 5 min. Nova lavagem de 3 vezes com PBS foi realizada. Foi feito o bloqueio por 60 min em PBS 1X 1% de BSA. Aplicou-se Hoechst e deixado reagir por 30 min a 37 °C. Aplicou-se o anticorpo primário α -Gal-1; LAMP-1; α -tubulina, granzima B e perforina e deixado reagir por 30 min a 37 °C. Lavagem de 3x em PBS foi feita e então foi aplicado o anticorpo secundário (Alexa Red 546 ou Alexa 488 - Invitrogen) e deixado reagir por 30 min. Lavagem de 3x em PBS foi feita e montada a lâmina com Vectashield (cerca de 4 µL por poço). Foi vedado com esmalte. As imagens de microscopia confocal a laser foram realizadas no microscópio confocal da Zeiss LSM 510 na Central Analítica do Instituto de Química da USP. Foi utilizada a objetiva C-Apochromat de 40X e 60X (zoom de 120X), no espectro de 488 nm, 590 nm e 364 nm.

3.5 Imunocitoquímica para microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As células YT foram centrifugadas a 90 *xg*/5 min. O sobrenadante foi retirado por inversão e o pelete foi ressuspenso em 1 mL de RPMI-1640 – 10% SFB. As células YT foram centrifugadas a 300 *xg*/2 min. Assim sedimentadas, as células foram ressuspendidas em fixador (4% de paraformaldeído; 0,1% de glutaraldeído em tampão de cacodilato 0,1 M, pH 7,3). O pellet foi deixado nesse fixador por **24 horas**. Após esse período o pelete foi lavado uma vez em PBS e novamente fixado por 24 horas em geladeira. Após o período ele foi lavado quatro vezes em tampão de cacodilato 0,1 M, pH 7,3 num período de 10 minutos cada lavagem. Foi então realizada a desidratação em concentrações cada vez maiores de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 95%) sendo uma vez em cada etapa com duração de 5 minutos cada. Em seguida, foi realizado o processo de infiltração do pelete (todo a 4 °C) em que foi deixado em LR White (LONDON RESIN COMPANY LTD.) + etanol absoluto (proporção 1:1) *overnigth*. Seguida por incubação LR White + etanol absoluto (proporção 3:1) de 3 horas. Após, foi feita incubação com LR White pura

por 2 horas, troca por mais LR White puro *overnight* e realizado mais uma troca por LR White puro por uma hora. Em seguida, o pelete foi incluso em LR White Resin Grade Acrylic Resin (London Resin Company Ltd.) em cápsulas de gelatina, em estufa à 60 °C por 72 horas. Esses peletes sofreram cortes ultrafinos em ultramicrotomo para a construção das telas para a leitura em microscopia eletrônica. As telas foram então lavadas por 5 min em H₂O destilada e 15 min em TBS pH 7,24 mais glicina 0,02 µM em temperatura ambiente. Foram então incubadas em diluição 1:1 de soro normal de cabra e solução de TBS + BSA3% + NaN₃ 0,05% + Tween20 0,1% pH 7,3 para bloqueio. Após essa etapa, as telas foram incubadas em câmara úmida com anticorpo primário anti-Gal1 *overnight* a 4 °C em diluição de 1:5 em solução TBS + BSA 0,1% + NaN₃ 0,05% + Tween20 0,1% pH 7,3 seguida por cinco lavagens em TBS + BSA 0,1% + NaN₃ 0,05% + Tween20 0,1% pH 7,3, e uma lavagem TBS + BSA 0,1% + NaN₃ 0,05% + Tween20 0,1% pH 8,2. Foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com ouro 15 nm (Amersahm GAG15) por duas horas a temperatura ambiente em diluição 1:10 em solução de NaCl 0,5M + BSA 0,1% + SFB 5% + Tween20 0,05% pH 8,0 seguido de uma lavagem de 5 min em TBS + BSA 1% + NaN₃ 0,05% + Tween20 0,1% pH 8,2, 3 lavagens de 5 min em TBS + BSA 0,1% + NaN₃ 0,05% + Tween20 0,1% pH 7,3 e 2 lavagens de 5 min em TBS + Tween20 0,1% pH 7,3 a T. A. Para fixação as telas foram incubadas por 10 min em gluta 2,5% em Tp. Cacodilato 0,1 M pH 7,2 seguido por 3 lavagens de 2 min em água destilada. As amostras foram examinadas usando um microscópio eletrônico JEOL 100 CX II 100 KW (aumentos de 12000x e 20000x) no ICBIV da USP.

3.6 Obtenção de células TCD8+ efectoras por lavagem peritoneal

2×10^7 do clone de células L1210 foram injetadas i.p. em animais da linhagem C57Bl/6 e animais Gal-1^{-/-}. Após 12 dias, os animais foram anestesiados com 200 µL de anestesia (ketamina – 100 mg/mL - e xilazina - 0,023 g/mL) e sacrificados por deslocamento cervical. Após sacrifício, foi realizado o lavado peritoneal dos animais com 5 mL de PBS 1X.

3.7 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Para o ensaio de citotoxicidade *in vitro*, 1×10^5 do clone de células L1210 ou L1210Fas foram marcadas com o corante fluorogênico *Cell Trace Violet dye* (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) na concentração de 5 μM . As células foram plaqueadas em 100 μL de meio RPMI1640 completo (0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 0,1 mM de vitaminas, 2 mM de L-glutamina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina, 100 U/L penicilina + 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ estreptomicina 0,05 mM de 2-mercaptoetanol, 1 mM de piruvato de sódio, 10% de soro fetal bovino) em placa de 96 poços de fundo U. A elas foi realizada co-cultura pela adição de 5×10^5 células do lavado peritoneal de animais C57Bl/6 ou Gal-1KO em 100 μL do mesmo meio RPMI1640 completo. As células foram incubadas a 37 °C, 4% CO_2 por 4 horas. Após esse período, foi realizada marcação para AnexinaV-Fitc – proteína com alta afinidade por fosfatidilserina, fosfolípídeo com alta exposição para o meio extracelular por células em apoptose. As amostras foram adquiridas em um FACSCantoll e analisadas utilizando software FlowJo.

3.8 Ensaio de proliferação e perfil de ativação *in vitro*

Linfócitos de animais C57BL/6 e Gal-1^{-/-} foram obtidos dos linfonodos dos animais e enriquecidos para células CD8a+ utilizando kit II de isolamento de células CD8a+ (Miltenyi Biotec, Alburn, CA, EUA) e separação magnética de células (AutoMACS, Alburn, CA, EUA). A pureza foi >85% de células T CD8 +. As células CD8a foram marcadas com 5 μM de CFSE e estimuladas em placas de 12 poços durante 3 ou 6 dias com ou sem 40 U/mL de IL-2 e 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de “beads” CD3/CD28. Todas as amostras de citometria de fluxo foram adquiridos em um FACSVerse e analisados utilizando software FlowJo.

3.9 Taxa média de divisão (“Average stage of division”)

A taxa média de divisão foi calculada através da análise dos histogramas de CFSE com o “gate” nas células CD8+CD3+. A porcentagem de células em cada divisão do CFSE foi então inserida na equação seguinte (127):

$$\text{Average stage} = \frac{((\% \text{ of undivided}) + (2 \cdot \% \text{ div 1}) + (3 \cdot \% \text{ div 2}) + \dots)}{100} - 1$$

3.10 Produção e purificação de adenovírus recombinantes humano do tipo 5 deficientes em replicação

3.10.1 Produção de estoque viral

Foram preparadas quatorze garrafas de cultivo grandes (150 cm²) com células HEK293A com confluência 90%. Estimamos que cada garrafa com monocamada confluyente de HEK293 tenha em torno de 10⁷ células. As células foram infectadas com amostras purificadas e tituladas de vírus de forma a empregar uma quantidade, multiplicidade de infecção (m.o.i.), em torno de 1 a 10. Dessa forma são necessárias de 10⁷ a 10⁸ P.F.U/garrafa. Amostras de vírus foram adicionadas em DMEM completo. As garrafas foram incubadas fechadas a 37 °C, por uma hora. Após a incubação, o volume das garrafas foi completo para 35 mL com DMEM fresco. As garrafas foram incubadas até o desenvolvimento de efeito citopático e desprendimento total das células. O conteúdo das garrafas foi coletado em tubos de 50 mL e centrifugado a 1200 rpm a 4 °C, durante 10 min. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspensos em 3-5 mL de tampão Tris 0,1 M pH 8,0. Este material foi congelado a -70 °C imediatamente.

3.10.2 Purificação de adenovírus recombinantes em gradiente de cloreto de céσιο

A suspensão de células foi descongelada e misturada a uma solução de deoxicolato sódico 5%. O volume de deoxicolato usado correspondeu a 1/10 do volume de suspensão de células. A suspensão foi homogeneizada e incubada em gelo por 30 min. O material foi macerado com ajuda de um potter de vidro até que a consistência da suspensão ficasse líquida. O volume foi completo para 16,4 mL com Tris 0,1 M pH 8,0 (este volume correspondeu a 63% da solução de cloreto de céσιο). Foi adicionado 9,6 mL de solução saturada de cloreto de céσιο, mantida a temperatura ambiente (a proporção é de 5,8 mL de cloreto de céσιο saturado para cada 10 mL de suspensão de células, ou 37% de solução de cloreto de céσιο e 63% de suspensão de células). Após homogeneização com vórtex, a amostra foi transferida para tubos de ultracentrífuga (PA, Ultracrimp 11,5 mL). Os tubos foram centrifugados a 35.000 rpm a 4 °C durante 16 hs (Rotor VTI65.1). A banda de adenovírus foi coletada e dialisada contra Tris 0,01 M pH 8,0, em câmara fria (4 °C)

durante 4 hs. Foram adicionados 10% glicerol ao volume dialisado (4400 μL + 484 μL de glicerol autoclavado puro), e as suspensões alíquotadas (50- 100 μL) e congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.10.3 Titulação de estoques de adenovírus recombinantes

Foram preparadas previamente placas de titulação que consistem em placa de cultivo de 24 poços, no qual foram semeadas células HEK293 numa densidade de 3×10^5 células por poço, em DMEM completo e cultivadas durante 24 h a 37°C até que os poços atingiram confluência $> 90\%$. Foi descongelada uma alíquota de vírus purificado em banho de gelo, sonicada durante 20 segundos em um sonicador de banho, e foi preparada uma diluição inicial de 1:100 (10-2) do estoque de vírus em DMEM completo (10 μL de vírus purificado + 990 μL de DMEM completo). A partir dessa diluição inicial, foram preparadas diluições em série, com fator 10. As diluições foram preparadas em quadruplicata, da seguinte forma: em uma placa de cultivo de 96 poços, foram adicionados 225 μL de DMEM nas quatro primeiras fileiras completas (linha A até D, colunas 11 até 12, completas), com pipetador multicanal, pipetamos 4 alíquotas de 25 μL da diluição inicial 10-2 e foram acrescentados à primeira coluna da placa de 96 wells. Repetimos a operação até que completamos as doze colunas. Dessa forma, as diluições feitas na placa de 96 poços vão de 10-3 (coluna 1) até 10-14 (coluna 12). Foram usados 200 μL de cada réplica das diluições 10-6 a 10-11 para infectar um poço da placa de titulação previamente preparada. Incubamos por uma hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a incubação, adicionamos 1500 μL de meio DMEM completo a cada poço da placa de titulação. As placas foram incubamos por 7 dias a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. O título foi calculado a partir da maior diluição de vírus que leva a formação das placas de lise.

3.11 Imunização com adeno β gal

Baseado no trabalho de Machado e colaboradores, no dia zero, cada animal (**C57Bl/6; Gal-1KO; CD8KO; CD4KO; RAGKO; CD1KO**) recebeu uma dose de 2×10^8 PFU de adeno β gal (diluídos para 100 μL de PBS) por via intramuscular no músculo *Tibialis anterioris*, sendo metade da dose em cada uma das coxas, as quais

foram realizadas por meio de seringas de insulina U-100 e uma agulha de calibre 27G (131). Os ensaios imunológicos foram realizados 1 semana após a dose.

3.12 Ensaio de citotoxicidade *in vivo*

Para o ensaio de citotoxicidade *in vivo*, nos baseamos no modelo experimental de Machado e colaboradores e Tzelepis e colaboradores em que esplenócitos de C57BL/6 foram divididos dentro de duas populações e marcados com o corante fluorogênico *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl diester* (CFSE Molecules probes, Eugene, Oregon, USA) em uma concentração final de 10 μM (CFSE_{high}) ou 1 μM (CFSE_{low}) (131, 132). As células CFSE_{high} foram pulsadas por 40 min a 37 °C com 1 μM do peptídeo PA8 H-2Kb ASP-2 (VNHRFTLV) ou com peptídeo ICP H-2Kb β -gal (ICPMYARV). As células CFSE_{low} permaneceram não pulsadas. Em seguida, as células CFSE_{high} foram lavadas e misturadas com um número igual de células CFSE_{low} antes de serem injetadas pela via intravenosa (i.v.) num total de 30 a 40x10⁶ células por camundongo. Os animais recipientes (**C57Bl/6; Gal-1KO; CD8KO; CD4KO; CD1KO; RAGKO**) foram camundongos imunizados ou não com o adeno β gal, após 7 dias da imunização. As células do baço dos camundongos recipientes foram coletadas após 18 horas da transferência, lavadas e analisadas por *fluorescence-activated cell sorting* (FACS), usando um citómetro FacsCantoll (BD, Mountain View, CA, EUA). A porcentagem de lise específica foi determinada usando a fórmula:

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

3.13 Imunofluorescência por citometria de fluxo

As células foram recolhidas em diferentes pontos de tempo após a imunização. Foi feita a suspensão de células, os glóbulos vermelhos foram lisados com tampão hipotônico e o número de células foi determinado. As suspensões de células foram preparadas em PBS, BSA a 0,5% e EDTA 2 mM (tampão FACS) e as células foram marcadas de acordo com o ensaio com anti-CD8 (53-6,7), anti-CD4 (RM4-5), anti-CD25 (7D4), anti-CD44 (clone IM-7), anti-CD62L (clone MEL-14), anti-

CD40 (3/23), anti-H-2Kb (AF6-88.5), anti-CD11c (clone HL3), anti-CD80 (clone 16-10A1), anti-CD86 (GL1), anti-IA b (clone AF6-120.1), anti-CD45.1 (A20), Gr-1 (RB6-8C5), CD3 ϵ (145-2C11), CD19 (1D3), anti-TCRV α 2, anti-TCRV β 5, CD49b, CD11b, AnexinaV, CD107a (clone 1D4B), IFN- γ (clone XMG1.2), TNF- α (clone MP6-XT22) e H-2Kb-VNHRFTLV. As células foram então fixadas com 1% de PFA. Receptores Fc foram bloqueados com o anticorpo murino CD16/CD32 (2.4.G2). A caracterização fenotípica dos linfócitos foi realizada utilizando um FACsVerse (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) ou FACSCantoll (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). Os dados foram analisados com o software FlowJo.

3.14 Ensaio pentâmero H-2Kb-VNHRFTLV

2×10^6 células de baço dos animais C57Bl/6 e Gal-1KO foram pipetadas em placa em fundo em U. As células foram lavadas por adição de 180 μ L de tampão MACS e centrifugadas a 2800 rpm por 5 min, a 4°C. Foi retirado o sobrenadante com pipeta ou por inversão e adicionado 50 μ L de tampão MACS e 10 μ L de pentâmero por amostra. As amostras foram então incubadas por 10', temperatura ambiente e a elas foi adicionado 180 μ L de tampão MACS. Foram centrifugadas a 2800 rpm por 5 min, a 4 °C e a lavagem foi repetida. 50 μ L de mix anti-CD8 marcado com fluorocromo (1:100) e streptavidina marcada (1:50) diluído em tampão MACS foi adicionado por amostra. As amostras foram incubadas por 20 min no gelo, no escuro e lavadas com 200 μ L de tampão MACS. A seguir, foi feita centrifugação a 2800 rpm por 5 min a 4 °C, retirado o sobrenadante e repetida a lavagem. Novamente foi retirado o sobrenadante e as amostras foram fixadas com 200 μ L de PBS-paraformaldeído 1% e analisadas por citometria de fluxo, utilizando o aparelho FACSCanto (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA).

3.15 ELISPOT

O ensaio *ex vivo* do ELISPOT (IFN- γ) foi realizado exatamente como descrito anteriormente por Rigato e colaboradores (133).

3.16 Marcação de CD107a e ICS

A mobilização de superfície de CD107a e a expressão intracelular de citocinas (IFN- γ , TNF- α) foram avaliados após a cultura *in vitro* de células esplênicas na presença ou ausência de estímulo antigênico. As células foram lavadas três vezes em meio RPMI simples e ressuspensas em meio de cultura de células que consiste em meio RPMI 1640, pH 7,4, suplementado com HEPES 10 mM, bicarbonato de sódio a 0,2%, 59 mg/L de penicilina, 133 mg/L de estreptomicina, e 10% Hyclone fetal bovino soros (Hyclone, Logan, Utah, EUA). A viabilidade das células foi avaliada utilizando 0,2% de corante de exclusão de azul de Trypan para discriminar entre células vivas e mortas. A concentração celular foi ajustada para 2×10^6 células/mL em meio de cultura celular contendo anti-CD28 (2 μ g/mL, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), Brefeldin A (10 μ g/mL, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), monensina (5 μ g/mL, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e marcado com FITC anti-CD107a (Clone 1D4B, 2 μ g/mL, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). Em metade das culturas, uma concentração final de 10 μ M do peptídeo VNHRFTLV foi adicionado. As células foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo V (Corning Enterprise, Union City, CA, EUA) em um ambiente úmido a 37 °C contendo 5% de CO₂. Depois de 12 hs de incubação as células foram colhidas e marcadas com anticorpos anti-CD8 e anti-CD3 conjugados com Per-CPCy5 ou Fitc em gelo durante 20 min. Para detectar o IFN- γ , TNF- α por marcação intracelular (ICS), as células foram então lavadas duas vezes em tampão contendo PBS, BSA 0,5% e 2 mM de EDTA, fixadas e permeabilizadas durante 20 minutos em gelo com 100 μ L de Cytotfix/Cytoperm (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). Depois de terem sido lavadas duas vezes com 250 μ L de tampão *permwash* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), as células foram coradas com os marcadores intracelulares anti-IFN- γ conjugado com APC (Clone XMG1.2) e anti-TNF- α conjugado com PE (clone MP6-XT22). Finalmente, as células foram lavadas duas vezes e fixadas em PBS a 1% paraformaldeído. Pelo menos 300.000 células foram adquiridos num citômetro de fluxo BD FACS Canto II e, em seguida, analisadas com FlowJo.

3.17 Imunização

No “priming” das células OT-I Gal-1+/+ ou células OT-I Gal-1/- para a microscopia *two photon*, 1×10^6 DCs pulsadas com o peptídeo SIINFEKL (1 μ M) ou DCs controle não pulsadas, marcadas por 10 minutos com CMTMR+ a 37 °C, foram injetadas na pata (subcutânea) de animais C57Bl/6. Após 18 horas, as células OT-I Gal-1+/+ ou células OT-I Gal-1/- marcadas com 10 μ M de CFSE foram injetadas por via retroorbital. Três horas após a injeção, os linfonodos poplíteos drenantes e os linfonodos controles não drenantes foram expostos e analisados por microscopia intravital *two photon*. Para a análise da expansão e perfil de ativação das células OT-IGal-1+/+ e OT-IGal-1/- *in vivo*, 3×10^5 células OT-IGal-1+/+CD45.2+ ou 3×10^5 OT-IGal-1/-CD45.2+ marcadas com 5 μ M de CFSE foram transferidas adotivamente 18 horas após 5×10^5 DCs terem sido pulsadas com o peptídeo SIINFEKL e injetadas subcutâneas na pata de animais CD45.1+ . Os linfonodos poplíteos drenantes e não drenantes dos animais foram extraídos 24, 48, 54, 60 e/ou 72 dias após a injeção das células.

3.18 “Two-photon laser scanning microscopy”

5×10^6 células OT-IGal-1+/+ ou OT-IGal-1/- marcadas com 5 μ M de CFSE foram injetadas no plexo retroorbital de animais C57Bl/6 fêmeas de 6-8-semanas de idade imunizados com 1×10^6 DCs marcadas com 5 μ M de CMTMR+ e pulsadas ou não com 1 μ M do peptídeo SIINFEKL. Após 3 da transferência adotiva, os camundongos foram anestesiados (dose inicial de 80 mg de ketamina / kg, 4 mg de xilazina/ kg, e 0,3 mg de flunitrazepan / kg, seguido por uma injeção de metade da dose a cada 45 min; os animais foram mantidos sob anestesia durante 3 hs), e o linfonodo poplíteo drenante ou não drenante foi cirurgicamente expostos para imagem *two photon*. A temperatura local foi monitorada e mantida a 37 °C. As células T marcadas com CFSE puderam ser detectada até 200 μ m da superfície do linfonodo.

As medições foram realizadas em dois experimentos independentes. Os “set ups” do time-lapse two-photon laser-scanning microscopy (TPLSM) utilizados foram ou um Fluoview200 (Olympus) em uma configuração descanned equipado com uma objetiva de imersão de 20x 0,95 NA (Olympus), utilizando um espelho dicróico de

540 nm para separar os espectros de emissão do GFP e da Rodamina, ou uma Meta LSM510 (Carl Zeiss microfilmagem, Inc.), acoplado a um laser de femtosegundos Maitai (710-920 nm) (Spectra-Physics). Com a última configuração, a fluorescência Rodamina-SHG-GFP foi separada utilizando o detector de Meta e foi de pixel-wise linear não misturados tomando os espectros de fluorescência experimental das amostras monomarcadas como uma referência externa. Três canais de fluorescência foram separados usando 495 e 590 nm espelhos dicróticos, em combinação com 457/50 (SHG) ou 472/30 (PCP), 520/35 (GFP), e 624/40 nm filtros passa-banda. O comprimento de onda de excitação foi de 900 nm. Para a análise de migração celular, foram captadas a cada 30s durante 30-60 min, quatro imagens consecutivas de $560 \mu\text{m}^2$, com $10 \mu\text{m}$ de espaçamento z usando a objetiva de 20x cuja parte de trás da abertura foi artificialmente preenchida para se obter um eixo de resolução perto $5 \mu\text{m}$. As imagens tiveram a média de projeção usando Image J (National Institutes of Health). Os protocolos de aquisição e análise de todas as condições experimentais que foram comparadas foram idênticos.

3.19 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de um software computacional chamado *Graphpad Prism*, da companhia *Graphpad Software Incorporation*, versão 3.02. O teste usado foi o ANOVA, seguido pelo teste *BonFerroni*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Colocalização Galectina-1, LAMP-1, granzima B e perforina

Uma metodologia comumente utilizada na identificação de novas proteínas é o estudo do proteoma (proteômica). A Proteômica estuda o conjunto de proteínas expressas por um genoma em determinadas condições de tempo, espaço, estado patológico e estímulos externos, podendo trazer informações detalhadas sobre a composição das organelas intracelulares. Os recentes estudos têm conciliado a proteômica e metodologias como microscopia confocal a laser e microscopia eletrônica com o objetivo de corroborar os achados e tornar mais robustos os resultados. Algumas proteínas com localização já bem estabelecida na literatura como as de estrutura de membrana e *membrane rafts*, tal como LAMP1, e as de matriz de lisossomo como a hidrolase granzima B (GrzB) e perforina (Prf) (79) são, dessa forma, excelentes parâmetros para co-localizar moléculas com o compartimento lisossomal. Baseado no fato que a co-localização de moléculas é uma das metodologias atuais mais utilizadas para situar a compartimentalização celular, o primeiro passo deste estudo consistiu nesta técnica. Para isso, nós utilizamos LAMP-1 como marcador de membrana dos lisossomos e as proteínas GrzB e Prf para co-localização com a matriz da organela. A análise por imunofluorescência mostrou que Gal-1 co-localiza tanto com a proteína de membrana do lisossomo como com as proteínas da matriz (**Figura 2**) e esta observação reforça a presença de Gal-1 no compartimento lisossomal.

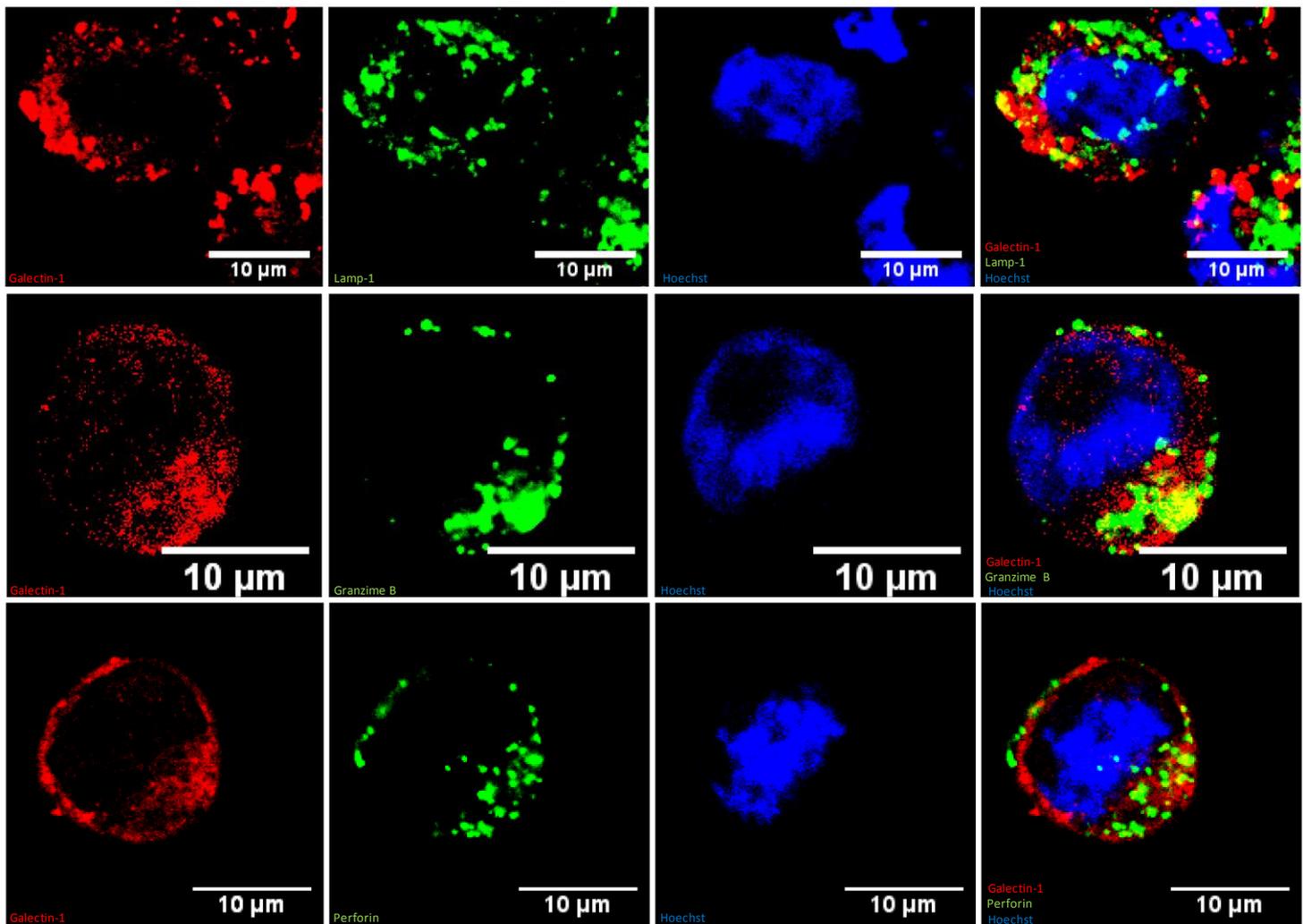


Figura 2 - Colocalização de LAMP-1, granzima B, perforina e Gal-1 em lisossomos de células YT (YT), observada por microscopia de fluorescência confocal. Gal-1 foi identificada utilizando um anticorpo policlonal de coelho, combinado com uma Ig anti-coelho secundário conjugado com ALEXA546 (vermelho). Lamp-1, granzime B e perforina foram detectados por um anticorpo monoclonal de camundongo e um anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com Alexa488 (verde). Núcleos foram revelados usando Hoechst (azul) – aumento de 120x.

Fica claro em nossas imagens, que Gal-1 está presente nos lisossomos. Além disso, a literatura relata que no compartimento de linfócitos citotóxicos (CTLs e células NKs), a parcela quase total dos lisossomos é secretória, o que sugere que Gal-1 está presente neste compartimento celular.

4.2 Gal-1 no compartimento lisossomal

Para consolidar o resultado acima, nós também utilizamos outra abordagem (microscopia eletrônica de transmissão) para avaliar se Gal-1 realmente está presente no compartimento lisossomal. Nós realizamos fotomicrografias eletrônicas em que fica mais uma vez evidente a localização de Gal-1 em diversos compartimentos intracelulares, como nucléolo e mesmo no citosol, e essa evidência está de acordo com a literatura, que mostra a localização nuclear e citoplasmática de Gal-1 em diversos tipos celulares (87, 88, 134). Além disso, nossos dados também apresentam pela primeira vez um novo compartimento de localização de Gal-1 nas células citotóxicas, o lisossomo. **(Figura 3)**.

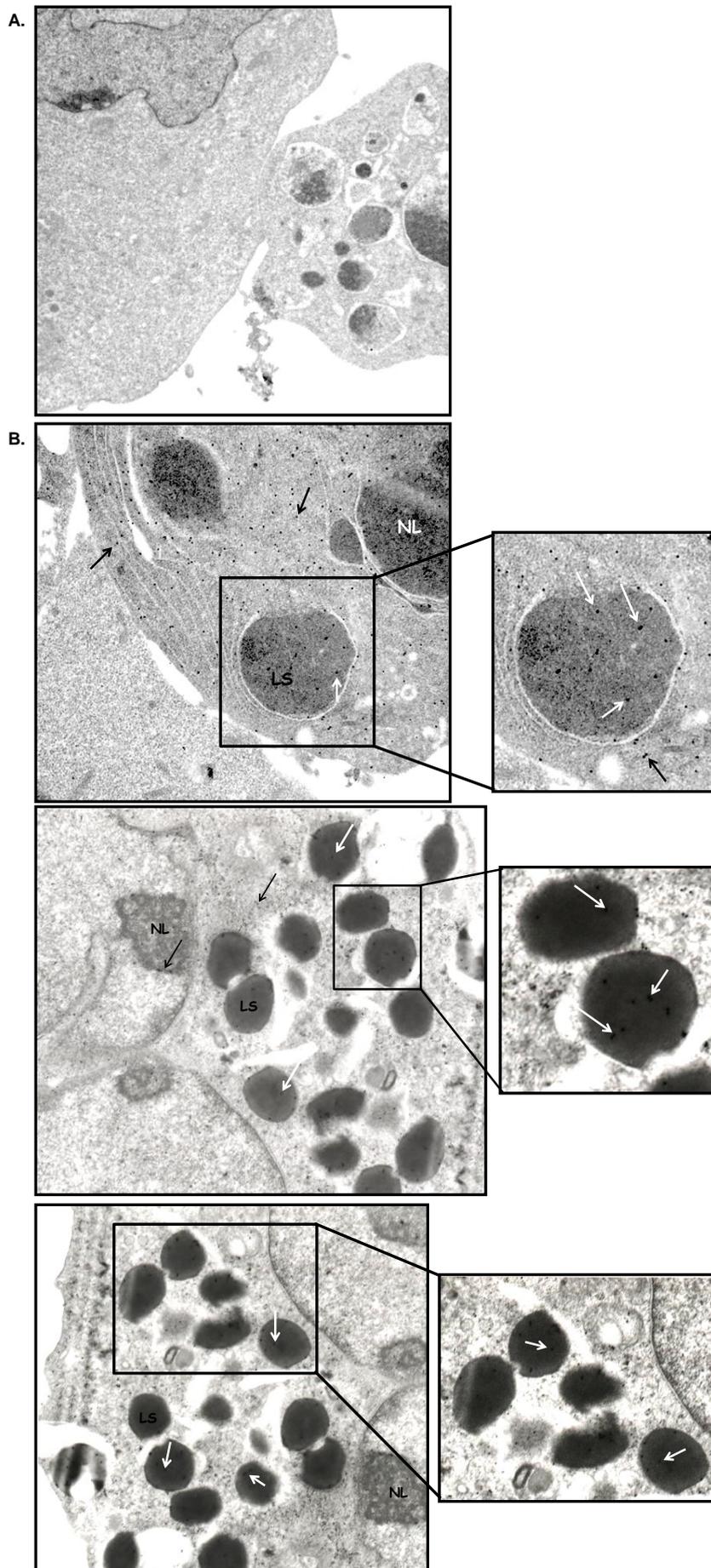


Figura 3 - **Visualização de Galectina-1 dentro de lisossomos por microscopia eletrônica de transmissão.** Micrografia eletrônica de seções ultrafinas marcadas com *immunogold* (partículas de ouro de 12 nm) (aumento 12000x). Controle com apenas o anticorpo secundário anti-rabbit (**A**); testes com marcação para Galectina-1 (**B**). LS: lisossomos; NL: nucléolos.

Schafer e colaboradores mostraram que Gal-1 parece utilizar a mesma via do fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2) para ser secretada das células e que este mecanismo está presente em membranas plasmáticas (91). Baseado nesta evidência pode ser também esse o mecanismo utilizado pela Gal-1 para entrar nos lisossomos. No entanto, estudos mais aprofundados em maquinaria de lisossomos são necessários para esclarecer tal evento. O fato de termos observado na fotomicrografia eletrônica Gal-1 presente nos lisossomos sugere que essa lectina deve possuir alguma função específica nessa organela, como participar dos eventos efetores das células citotóxicas na região de liberação dos grânulos citotóxicos ou mesmo ter papel na matriz dessas organelas por interagir com moléculas ali presentes, provavelmente interação proteína-proteína, já que esta parece ser a interação que prevalece no ambiente intracelular (134).

Uma vez mostrada a localização de Gal-1 na principal organela efetora das células citotóxicas, o próximo passo consistiu em verificar sua contribuição para a função citotóxica dessas células. Nesse sentido, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* baseado na resposta de células TCD8⁺ foi realizado.

4.3 Efeito da ausência de Gal-1 na resposta antitumoral *in vitro*

As células TCD8⁺ antígeno específicas constituem uma população heterogênea responsável pelo desenvolvimento de uma série de funções efetoras. Dentre estas funções está a produção de citocinas, quimiocinas e moléculas efetoras citotóxicas, além da lise de células alvo identificadas pelo reconhecimento do peptídeo específico no MHC de classe I das células apresentadoras de antígeno. A fim de determinar essas funções, há um debate atual sobre qual seria a metodologia mais apropriada para mensurar as respostas e sua correlação *in vivo*.

Durante uma infecção viral, as células T *naïve* circulantes específicas para o vírus encontram com células dendríticas apresentadoras de antígenos e interagem com elas através da formação da sinapse imunológica. Após este contato inicial que pode durar até 24 horas, as células T ativadas começam a proliferar rapidamente, aumentando o seu número até 10.000 vezes, tendo de 4 a 6 horas por ciclo celular e podendo chegar a 20 divisões celulares por semana. É quando essas células se diferenciam, adquirem funções efetoras e desenvolvem a capacidade de migrar para os locais da infecção (135).

He e Ostergaard (78), descreveram um protocolo em que após células L1210 serem injetadas i.p. em animais BALB/c, linfócitos TCD8+ efetores puderam ser recuperadas após 10-12 dias da injeção das células tumorais por lavagem peritoneal e utilizadas em ensaios de citotoxicidade *in vitro*. Baseados nesse modelo experimental, nós realizamos a injeção do clone de células L1210 em camundongos C57Bl/6 selvagens e Gal-1KO. Após 12 dias, as células peritoneais dos animais foram recuperadas (células efetoras – E) e colocadas em co-cultura com células da linhagem L1210 (células alvo – A) marcadas com *Cell Trace Violet dye* (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) na proporção 5E:1A. Após 4 horas, nós avaliamos a citotoxicidade *in vitro* através da marcação com AnexinaV.

Dentro desse contexto, nós também avaliamos a participação de Gal-1 na via do FASL. Para isso, foi utilizado como célula alvo não apenas a linhagem L1210, mas também células L1210Fas, resultado da transfecção estável com o gene FAS humano (**Figura 4A**) e, portanto, com maior susceptibilidade a morte induzida por FASL (**Figura 4B**).

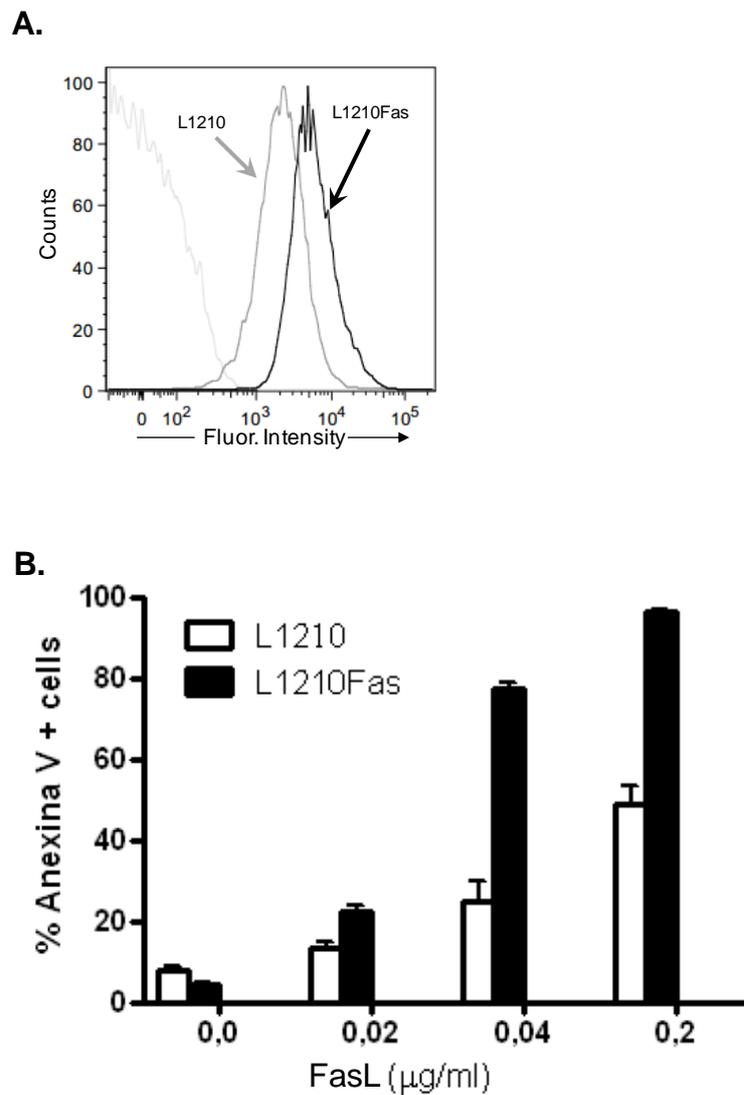


Figura 4 – Células L1210Fas apresentam maior expressão da proteína FAS e maior sensibilidade à morte por FAS ligante solúvel. Células L1210 e L1210Fas foram marcadas para FAS (Pe - BD Bioscience) e a média de intensidade de fluorescência foi determinada por análises de FACs (A). Células L1210 e L1210Fas foram incubadas por 18 horas a 37°C com 0; 0,02; 0,04 e 0,2 µg/ml de FasL solúvel. O gráfico de barras é representativo das células positivas para anexina V (B).

Em nossos dados do ensaio de citotoxicidade *in vitro*, Gal-1 aparece como um potencial componente da resposta efetora de linfócitos TCD8⁺. A citotoxicidade celular contra células L1210 e L1210Fas é significativamente menor em células efetoras deficientes de Gal-1 (**Figura 5**). Esses resultados sugerem que Gal-1 é um componente importante da ação efetora das células citotóxicas. Para consolidar nossos dados, o passo seguinte foi avaliar se Gal-1 também é importante para a citotoxicidade celular *in vivo*.

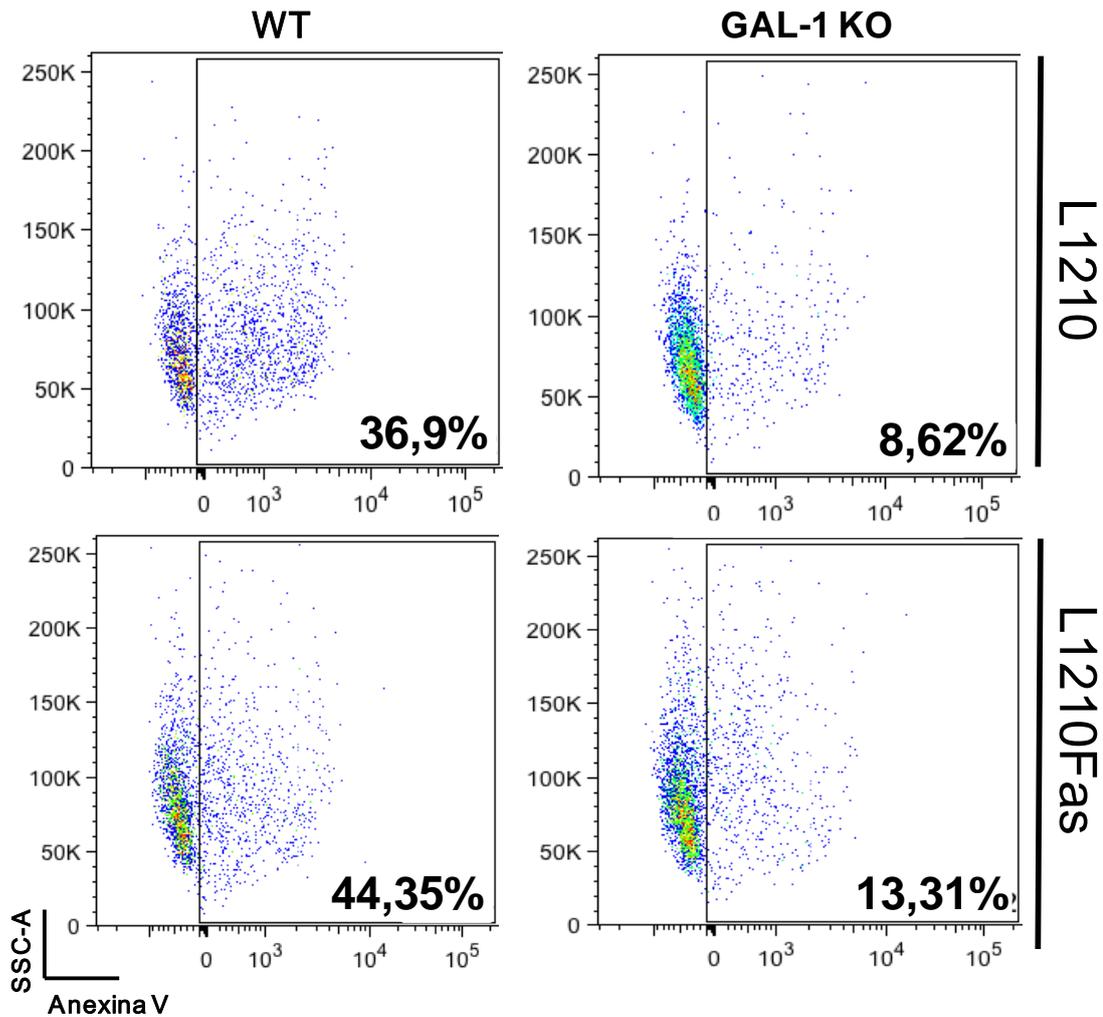


Figura 5 - **Células TCD8⁺ Gal-1KO tem menor potencial efector e essa alteração de função é independente da via FAS-FASL *ex vivo*.** Camundongos Gal-1KO e C57Bl/6 foram injetados i.p com 2x10⁷ células L1210 e após 12 dias os linfócitos do exsudato peritoneal foram recuperados por lavagem da cavidade peritoneal. Foi realizado co-cultura de células L1210 ou L1210 Fas (células alvo) marcadas com *cell trace violet* e células peritoneais (células efectoras) 1:5 por 4 horas a 37°C. Os *dot plots* são representativos do gate de células L1210 ou L1210Fas positivas para *cell trace violet* e representam marcação para Anexina V.

4.4 Padronização do ensaio de citotoxicidade *in vivo*

4.4.1 Especificidade do ensaio de citotoxicidade *in vivo*

O ensaio de citotoxicidade *in vivo* utilizado neste trabalho foi proposto pela primeira vez por Oehen e colaboradores (136). O método utiliza o modelo de vacinação com adenovírus 5 humano deficiente de replicação (HA5) e baseia-se na inoculação dos animais imunizados ou infectados com uma proporção de 1:1 de células singênicas do baço, em que uma população é pulsada com um peptídeo para o qual a resposta CTL específica irá ser analisada. A presença de células

marcadas no baço dos animais receptores é avaliada após diferentes períodos de tempo por citometria de fluxo.

Uma vez que nosso objetivo foi analisar a resposta específica das células TCD8⁺ citotóxicas *in vivo*, camundongos C57BL/6 foram imunizados ou não i.m. com 2×10^8 PFU (*plaque forming unit*) de HAd5. A fim de comparar a resposta de células TCD8⁺ para peptídeos específicos e não específicos, nós examinamos a resposta para dois diferentes epítomos de CD8 de vacinas distintas. Dessa forma, os animais foram imunizados ou não com vacinas utilizando o mesmo vetor HAd5 contendo diferentes transgenes: um codificando a proteína de superfície de amastigota 2 de *T. cruzi* (AdASP-2) (132, 137, 138) e a outra, a beta-galactosidase de *E. coli* (Ad β -gal) (139).

Como o pico de resposta das células TCD8⁺ induzida por este protocolo de imunização ocorre no sétimo dia após a imunização, o ensaio de citotoxicidade *in vivo* foi realizado neste ponto de tempo. Assim, nós seguimos os procedimentos tal como descrito por Barber D. L. (140). Em resumo, os esplenócitos singênicos de camundongos naïves foram marcados com o succinimidil carboxifluoresceína éster (Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), e então estas células foram pulsadas ou não com o peptídeo, e, finalmente, foram transferidas i.v. para os animais receptores.

Para análises adicionais do efeito citotóxico, as células transferidas foram uma mistura de duas populações de células coradas com uma concentração final de CFSE diferente, 10 μ M (CFSE_{high}) ou 1 μ M (CFSE_{low}). Células CFSE_{high} foram pulsadas com peptídeo PA8 H-2Kb ASP-2 (VNHRFTLV) ou com peptídeo ICP H-2Kb β -gal (ICPMYARV). Visando com as duas populações CFSE_{high} e CFSE_{low} ter controle da migração e assumindo que as células pulsadas e não pulsadas migram igualmente, as células CFSE_{low} por não estarem pulsadas poderão ser encontradas no baço dos animais receptores tanto dos animais vacinados quanto daqueles que não receberam o vírus. Como visto na **Figura 6** as células transferidas migraram para o baço dos animais receptores e puderam ser monitoradas até o momento de sua remoção, 16-20 h após a transferência. O grupo de animais não imunizados não apresentou atividade citotóxica para nenhuma das células pulsadas sendo, dessa forma, um controle para o cálculo da razão entre células CFSE_{high} e CFSE_{low} injetadas.

Como mostrado na **Figura 6**, os animais imunizados uma semana antes da transferência de células apresentaram lise de aproximadamente 100% das células alvo. Além disso, as únicas células lisadas foram aquelas pulsadas com o peptídeo específico para as CTLs. Isso foi observado em ambos os grupos imunizados, AdASP-2 ou Ad β -gal; esses grupos tinham apenas atividade citotóxica para PA8 ou ICP, respectivamente. Além disso, como nenhuma resposta citotóxica foi observada para as células não pulsadas com o peptídeo específico e quase todas as células pulsadas com o peptídeo específico foram mortas, podemos concluir que este método de citotoxicidade *in vivo* é altamente específico.

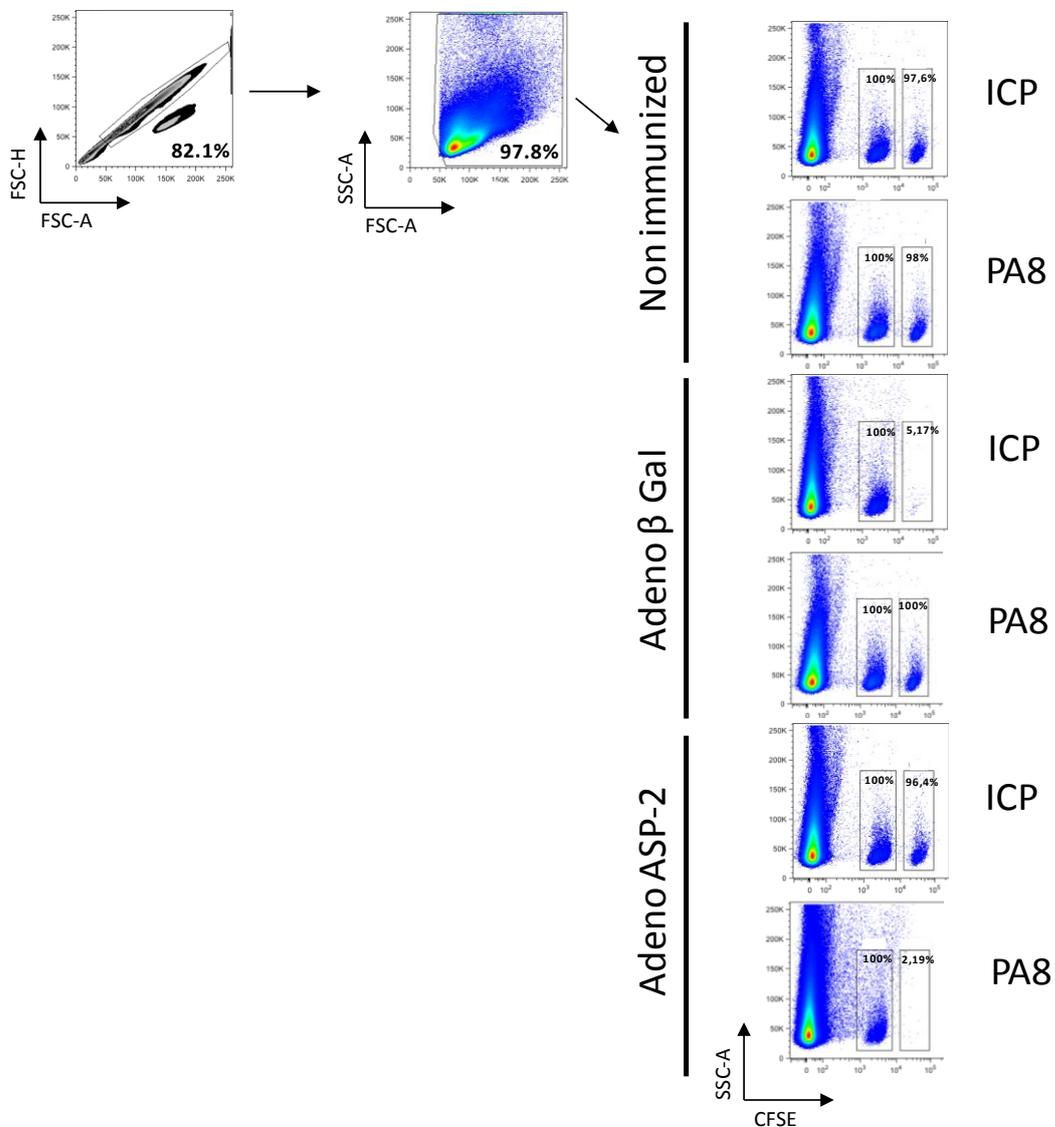


Figura 6 – Especificidade da citotoxicidade induzida pela imunização com Ad5 β -gal ou Ad5ASP-2. Animais C57Bl/6 foram imunizados ou não com Ad5 β -gal ou Ad5ASP-2 i.m. Sete dias depois, a atividade citotóxica *in vivo* foi estimada pela injeção de em cada animal com células esplênicas singênicas marcadas com CFSE pulsadas ou não com 1 μ g/ml do peptídeo ICP ou PA8. Os resultados são expressos como as médias de 2 animais por grupo e são representativos de experimentos realizados pelo menos duas vezes com resultados semelhantes.

4.4.2 Citotoxicidade *in vivo* para adenoβgal é dependente da dose da vacinação e da concentração de peptídeo pulsada nas células alvo

O passo seguinte foi determinar o quão sensível é este método, através da transferência de células esplênicas marcadas com CFSE e pulsadas com diferentes concentrações do peptídeo específico (**Figura 7a**). Pode-se observar a mesma atividade citotóxica com uma concentração até 100 vezes menor do peptídeo pulsado. Partimos de uma concentração de 1 μM (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do peptídeo pulsado nas células alvo em que houve 90% de lise, mesmo resultado observado com até 100 vezes menos da concentração do peptídeo (0,01 μM ou 10 ng/ml). Nenhuma citotoxicidade foi detectada nas células alvo pulsadas com 0,1 nM, utilizando o mesmo protocolo.

Além disso, também foi medida a sensibilidade da ação citotóxica *in vivo* após a imunização com diferentes concentrações de PFU do AdASP-2 (**Figura 7b**). Por meio do ensaio de citotoxicidade *in vivo* observou-se que houve uma diferença significativa entre a imunização com 2×10^8 e 2×10^7 PFU i.m., em que o primeiro grupo apresentou cerca de 95% das células alvo lisadas, enquanto no segundo grupo houve apenas 30% da atividade citotóxica. Além disso, não foi possível observar qualquer atividade citotóxica para os grupos imunizados com 2×10^6 PFU e 2×10^5 PFU.

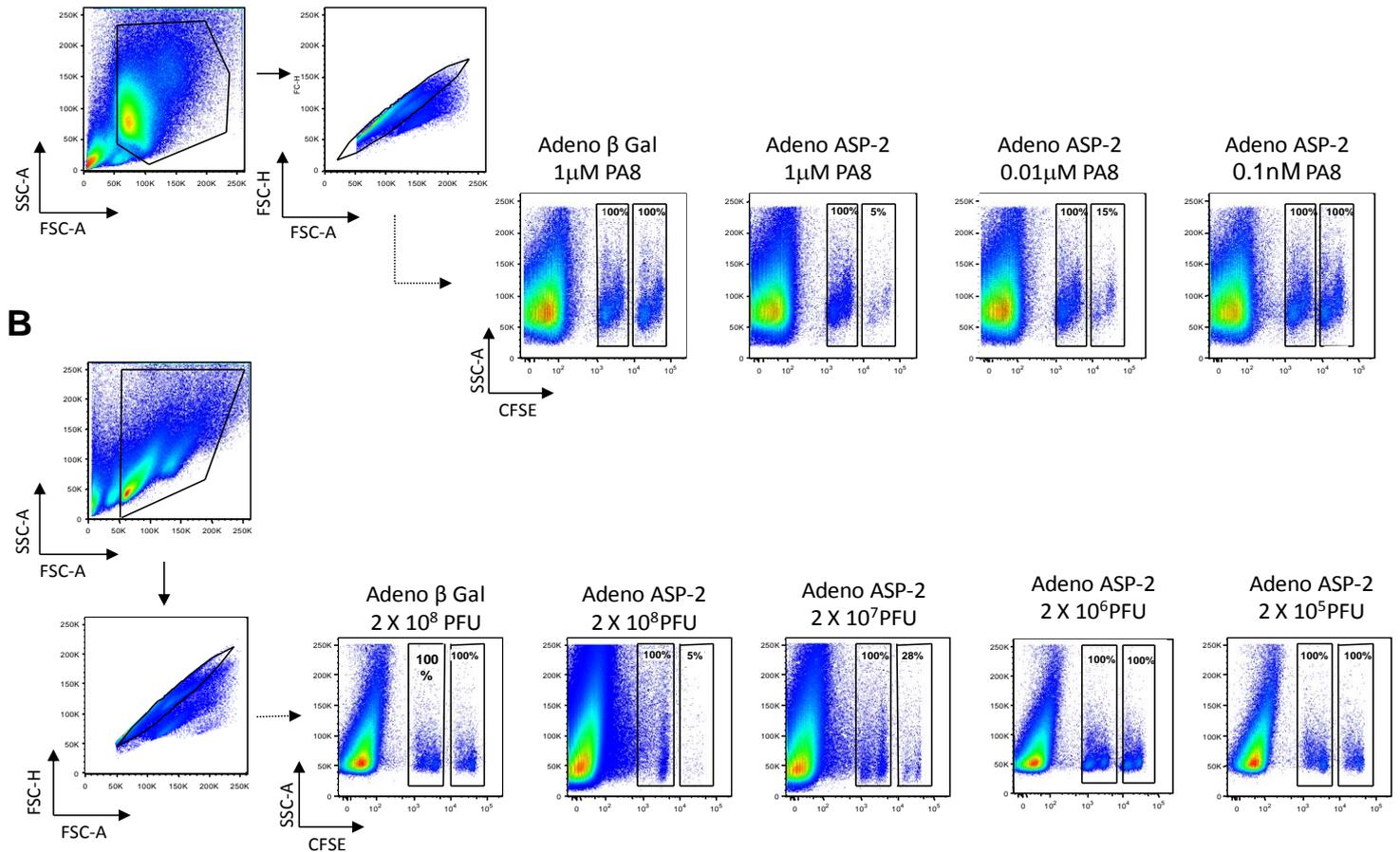


Figura 7 – **Sensibilidade do ensaio de citotoxicidade *in vivo***. Camundongos C57BL/6 foram imunizados ou não com Ad5 β -gal i.m. uma semana antes do ensaio de atividade citotóxica *in vivo*. A resposta citotóxica foi estimada **(A)** por injeção em cada animal com células esplênicas singênicas marcadas com CFSE pulsadas ou não com o peptídeo PA8 em diferentes concentrações 0.04 μ g/ml, 0.1 μ g/ml ou 1.0 μ g/ml; **(B)** por imunização em cada animal com diferentes concentrações de Ad5ASP-2, 2x10⁸, 2x10⁷, 2x10⁶ e 2x10⁵ PFU. 2x10⁸ PFU de Ad5 β -gal foi utilizado como controle. Os resultados são expressos como a média de 3 animais por grupo e são representativos de experimentos realizadas pelo menos duas vezes com resultados semelhantes.

4.4.3 Citotoxicidade *in vivo* para Ad5 β -gal é dependente dos linfócitos T CD8+

Os ensaios de citotoxicidade *in vivo* utilizados neste trabalho se baseiam em resposta adaptativa por linfócitos TCD8⁺. Dessa forma, um dos controles essenciais é a observação do mesmo evento em animais deficientes nessas células. O modelo animal B6.129S2-Cd8 α ^{tm1Mak}/J, são camundongos homozigotos com a mutação alvo Cd8 α ^{tm1Mak} deficientes em linfócitos T citotóxicos funcionais (<http://jaxmice.jax.org/strain/002665.html>). Nós podemos observar que na ausência dos linfócitos TCD8⁺ o padrão da resposta citotóxica se tornou similar ao dos animais não imunizados, em que não há a morte das células alvo (**Figura 8**). Dessa maneira, pode-se concluir que este modelo é claramente baseado em resposta por linfócitos TCD8⁺ e evidencia ser este um ótimo modelo *in vivo* a ser utilizado.

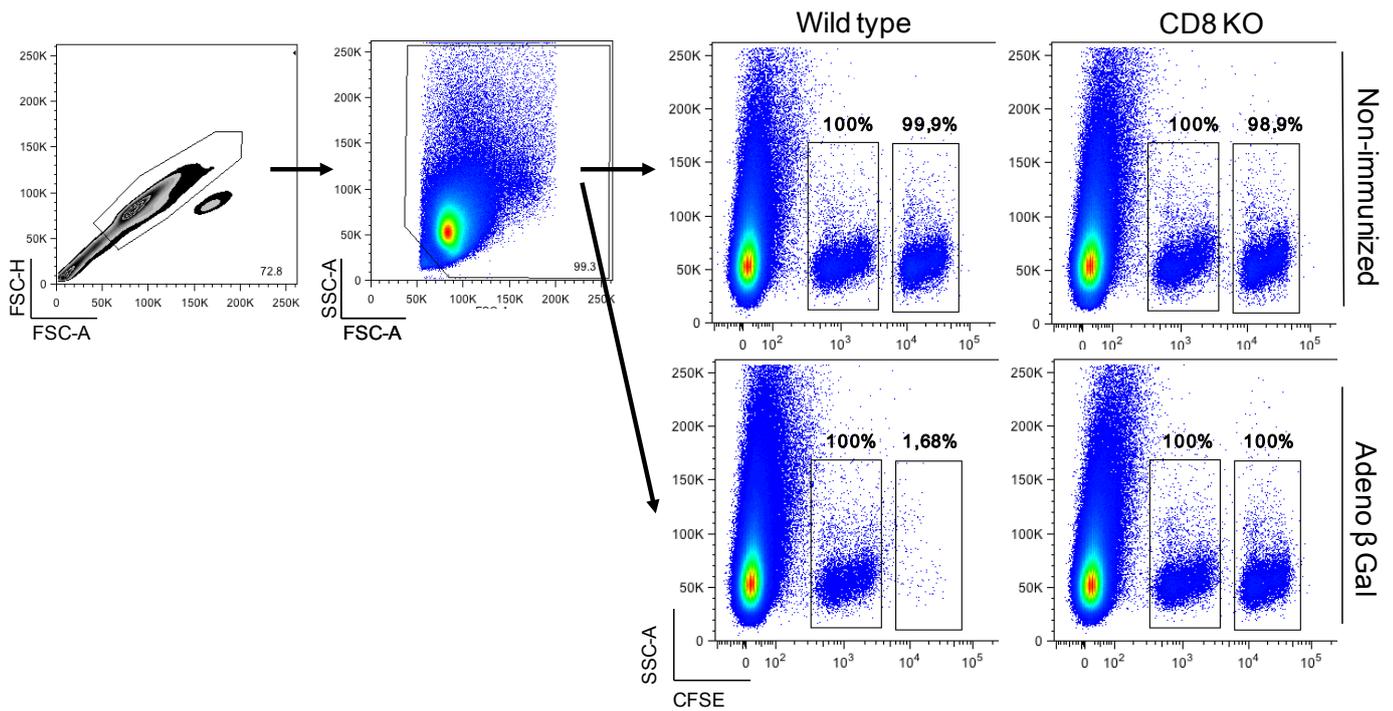


Figure 8 – Ensaio de citotoxicidade por imunização com Ad5 β -gal entre animais WT e CD8KO mostra que a resposta citotóxica é dependente das CTLs. Camundongos C57Bl/6 e CD8 knockouts foram imunizados ou não i.m. com Ad5 β -gal. Sete dias depois, a atividade citotóxica *in vivo* foi estimada pela injeção em cada animal com células esplênicas singênicas marcadas com CFSE pulsadas ou não com 1 μ g/ml do ICP. Os resultados são expressos como as médias de 3 animais por grupo e são representativos de experimentos realizados pelo menos duas vezes com resultados semelhantes.

A mudança do corrente paradigma na ativação/tolerância de células T destaca a integração das interações entre essas células e o ambiente, e entre diferentes moléculas estimuladoras ou inibitórias da superfície celular que influenciarão o destino das células.

O estado de maturação de DCs, sinais adicionais de outras células e a produção de IL-2 exógena a partir de células TCD4⁺ - necessárias para inverter o estado tolerante temporário (AINR) de CTLs - estão entre os fatores deste processo. Células TCD4⁺ também parecem atuar através de outras citocinas neste processo. Por exemplo, as células estimuladas com peptídeo na presença de IL-12 tem um maior índice de proliferação celular e apresentam aumento significativo de atividade citotóxica quando comparada com células estimuladas na ausência de IL-12. IL-7 e IL-15, citocinas homeostáticas com implicações no salvamento das subclasses de CTLs primárias antígeno-específicas que sobreviveram à fase de contração, ajudam na diferenciação destas em células de memória. Parecem também participar do resgate dessas células do estado AINR (141-143).

No entanto, uma forte resposta primária por CTLs para muitos agentes infecciosos pode ser visto em animais CD4⁺KOs, e nós também observamos este evento em nosso modelo de imunização (**Figura 9**). Uma porcentagem estatisticamente significativa de lise é observada nos animais CD4KO quando comparados aos animais WT, CD8KO e RAGKO. Este fato pode ser explicado porque APCs podem ser ativadas diretamente pelo agente infeccioso, que ao se ligarem a receptores como os do tipo Toll (TLRs) induzem a produção de outros sinais inflamatórios, tais como IFNs e TNF. Apesar disso, a presença de linfócitos TCD4⁺ mostrou ser essencial para o completo potencial citotóxico das CTLs. Além disso, nossos dados mostram que esse modelo não depende da ação de células NKT, visto que em animais CD1KO houve lise das células alvo semelhante a de animais selvagens.

Há um debate atual na literatura para o papel das células TCD4⁺ na geração de células de longa duração que respondem rapidamente a um novo desafio patogênico neste tipo de inflamação (144, 145). É importante lembrar que os linfócitos B também atuam no ambiente infeccioso de agentes virais através da produção de níveis elevados de anticorpos neutralizantes, dependentes ou não das células TCD4⁺ *helper*. Apesar disso, não observamos alteração no perfil de citotoxicidade quando os linfócitos B estão presentes e há ausência de CD8, isso porque os anticorpos atuam na neutralização dos vírus e, em nosso modelo, utilizamos infecção aguda a um primeiro desafio. Talvez em um segundo desafio poderíamos observar tal efeito, já que haveria tempo para a produção destes.

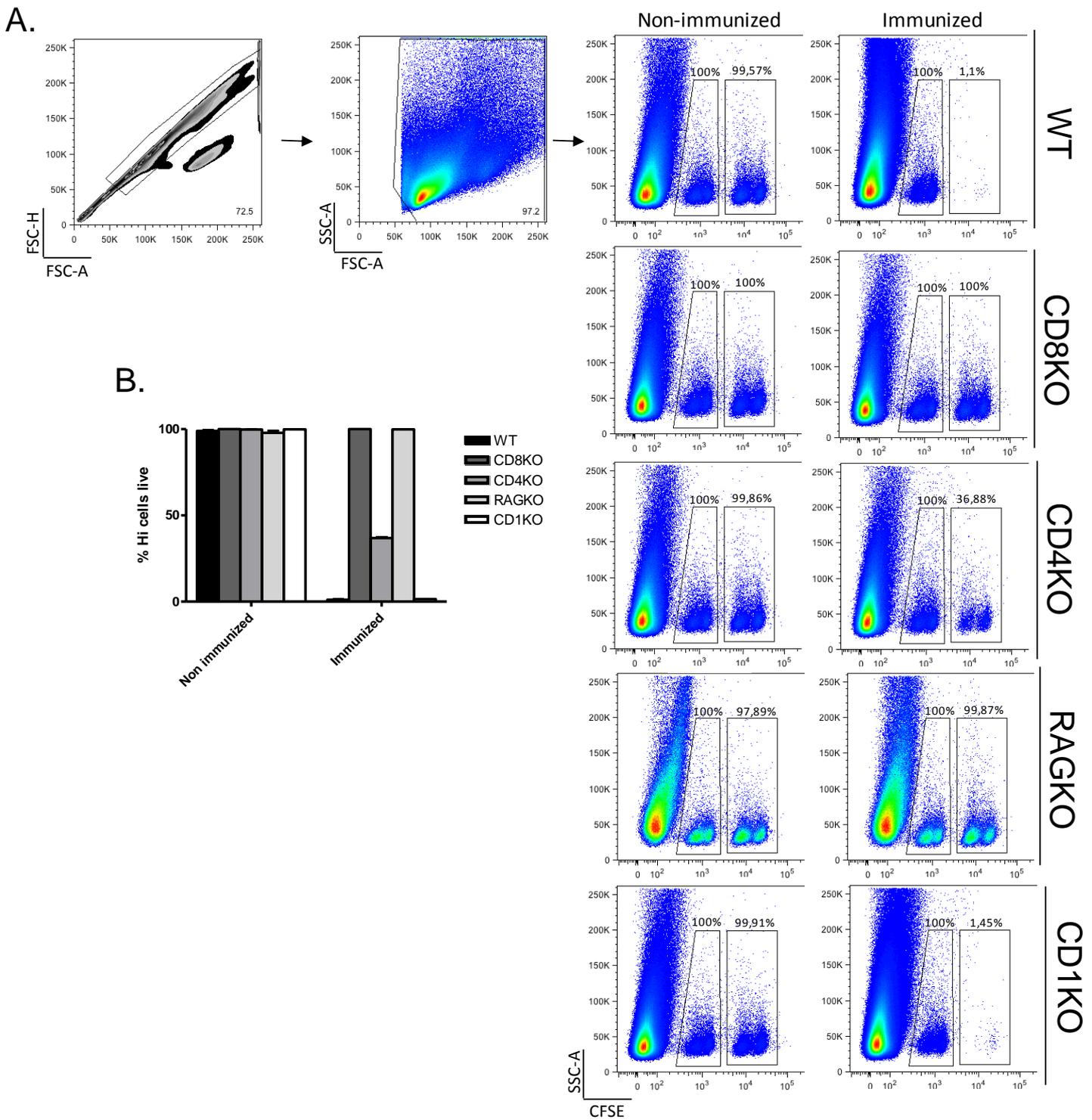


Figure 9 – Ensaio de citotoxicidade por imunização com Ad5 β -gal entre animais WT, CD8KO, CD4KO e RAGKO mostra que a resposta citotóxica é parcialmente dependente dos linfócitos TCD4⁺ e independente de células NKT. Camundongos C57Bl/6, CD8, CD4, RAG e CD1 knockouts foram imunizados ou não i.m. com Ad5 β -gal. Sete dias depois, a atividade citotóxica *in vivo* foi estimada pela injeção em cada animal com células esplênicas singênicas marcadas com CFSE pulsadas ou não com 1 μ g/ml do ICP. Os resultados são expressos como as médias de 3 animais por grupo e são representativos de experimentos realizados pelo menos duas vezes com resultados semelhantes.

4.4.4 A resposta máxima da citotoxicidade *in vivo* acontece no sétimo dia pós-imunização

A típica resposta das células T a uma infecção viral tem três fases distintas características: expansão e diferenciação em células T efetoras, cujas características mais importantes são a acentuada expansão clonal e desenvolvimento da função citotóxica; contração, na qual muitas das células T efetoras morrem por apoptose; memória, após as fases de expansão e contração, em que uma fração de 5-20% das células T específicas para o vírus sobrevive e dá origem a população de células de vida longa que formam o pool de células T de memória (146).

A fim de obter a eficácia deste ensaio na determinação da atividade citotóxica das células T CD8 *in vivo*, foi realizada uma cinética da resposta de CTL induzida pelo mesmo protocolo de imunização aqui utilizado **Figura 10**. Nós determinamos atividade citotóxica em diferentes pontos de tempo após a imunização: dias 4, 7, 16 e 32.

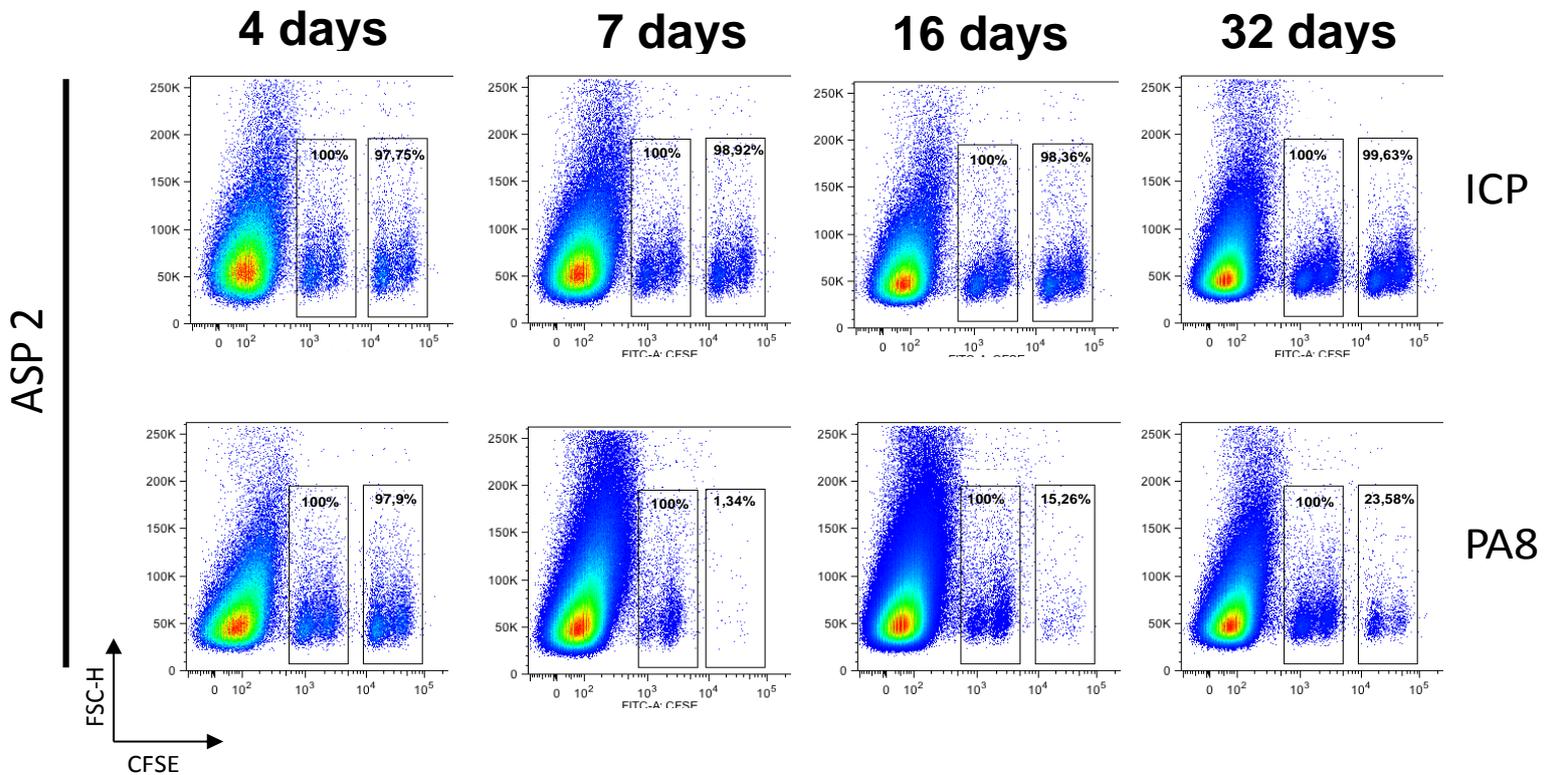


Figura 10 – Cinética do ensaio de citotoxicidade *in vivo*. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com Ad5 ASP-2 i.m. 4, 7, 16 e 32 dias antes do ensaio de citotoxicidade *in vivo* ser realizado. A resposta citotóxica foi estimada por injeção em cada camundongo com células esplênicas singênicas marcadas com CFSE pulsadas ou não com 1.0µg/ml do peptídeo PA8. Os resultados são expressos como a média de 3 animais por grupo e são representativos de experimentos realizados pelo menos duas vezes com resultados semelhantes.

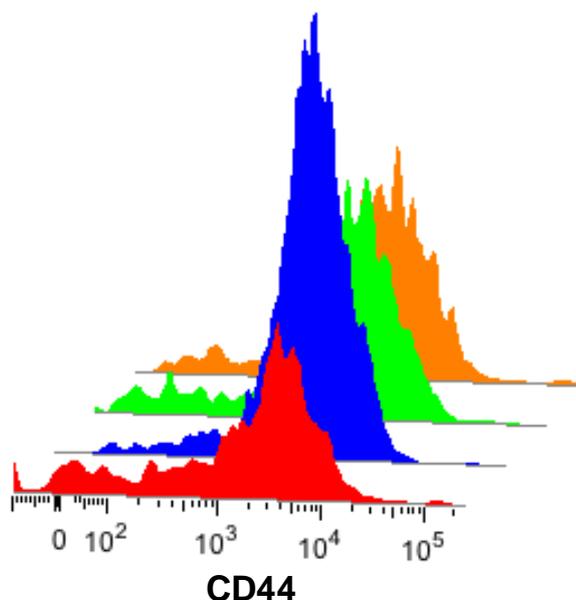
Células TCD8⁺ *naïves* não são capazes de matar seus alvos imediatamente e levam de 5-7 dias após o *priming* para as células *naïve* se diferenciarem em células efetoras e concluírem a expansão clonal (126, 147-149). Portanto, como esperado, no dia 4 após a imunização não foi possível detectar lise das células pulsadas com o peptídeo. Além disso, o pico da resposta das CTLs foi visto no dia 7 pós-imunização e após este pico há diminuição na função efetora acompanhada até 32 dias pós-imunização. Foi observado aproximadamente 100% de citotoxicidade nos dias 7 e 16, mesma cinética de função de CTL e correlação com a fase de resposta observadas por Stambas e colaboradores (150) utilizando modelo de infecção por influenza.

4.4.5 O maior número de células T CD8⁺ positivas para CD44, produtoras de interferon gama e de TNF alfa na resposta ao adenoβgal transgênico se encontra no sétimo dia da resposta

Células efetoras expressam diferentes marcadores de superfície e são funcionalmente distintas das células *naïve*. Em animais C57BL/6, o receptor de ácido hialurônico - CD44 - pode ser usado para distinguir células *naïve* das células efetoras/memória, uma vez que células *naïve* apresentam padrão de expressão CD44^{low} e nas células efetoras/memória este receptor é regulado positivamente. Células esplênicas CD44^{high}/CD62^{low} são células capazes de exercer funções efetoras rapidamente e formarem o pool de células de memória efetoras. Outra população encontrada no baço e linfonodos são as células CD44^{high}/CD62L^{high} que formam o pool de células de memória central e não exercem funções efetoras imediatas (151). Diversos fatores contribuem para que uma célula tenha tal destino. Entre eles está a força e duração da estimulação do TCR, citocinas inflamatórias, mecanismos de regulação da transcrição, alterações metabólicas, entre outros (135).

De forma interessante, a pequena semelhança na frequência de células específicas nos dias 4 e 32 e a função citotóxica completamente diferente (0% e 80% de lise) nestes dois momentos levou-nos à hipótese de que isso deve acontecer devido aos estados de ativação das células TCD8⁺ específicas nestes dois pontos de tempo. Esta hipótese é apoiada pelo fato de que, depois do *priming*,

as células TCD8⁺ *naïve* levam algum tempo para se diferenciar completamente em CTLs efetoras. É possível que no dia 4 estas células não estejam completamente ativadas e não sejam plenamente funcionais. Para testar essa pergunta, repetimos o protocolo da cinética de imunização e marcamos as células CD3⁺CD8⁺ e as CD3⁺CD8⁺pent+ com CD44⁺. Comparando a média de intensidade de fluorescência do CD44 destas duas populações foi observado que no dia 4 as células CD3⁺CD8⁺pent+ apresentaram menor MFI de CD44⁺, ou seja, menor expressão de CD44, do que a população total CD3⁺CD8⁺. No entanto, para os outros pontos de tempo a expressão de CD44⁺ foi sempre superior na população CD3⁺CD8⁺pent+ do que na população não específica CD3⁺CD8⁺ (**Figura 11**). O aumento da expressão de CD44 confirma a diferenciação das CTLs em células efetoras ou de memória. A ausência de outros marcadores, como CD62L, deixa em aberto se o destino final é o perfil de memória.



Sample	Freq. pent+	%CD44	MFI
Day 4	1.64	79.9	4666
Day 7	6.26	91.0	4282
Day 16	2.54	77.0	4455
Day 32	2.51	83.6	4641

Figura 11 – **A média da intensidade de fluorescência de CD44 nas células TCD8⁺ específicas ativadas é maior no sétimo dia da resposta.** Animais C57BL/6 foram imunizados i.m. com Ad5 ASP-2 ou Ad5 β -gal nos dias 4, 7, 16 e 32 antes da retirada do baço. Células esplênicas foram marcadas e a média de intensidade de fluorescência de CD44⁺ das células CD8⁺ ou CD8⁺CD44⁺H-2Kb-VNHRFTLV⁺ foi determinada por análises de FACS. Os resultados são expressos como a média de 3 animais por grupo e são representativos de experimentos realizados pelo menos duas vezes com resultados semelhantes.

Além do estado de ativação, avaliamos outro parâmetro funcional destas células. Foi analisada a produção de TNF- α e/ou a de IFN- γ por meio de marcação intracelular após cultura destas células com estímulo do peptídeo PA8. Embora essas células tenham permanecido ativadas e funcionais até o dia 32, conclusão baseada no ensaio de citotoxicidade *in vivo*, foi possível detectar a liberação de citocinas por marcação intracelular praticamente apenas no dia 7 (**Figura 12**). O mesmo padrão de liberação de IFN- γ foi observada por ELISPOT (**Figura 13**). Estes resultados mostram que o pico da resposta citotóxica no dia 7 após a imunização coincide com a maior produção de TNF- α e com o maior número de células produtoras de IFN- γ .

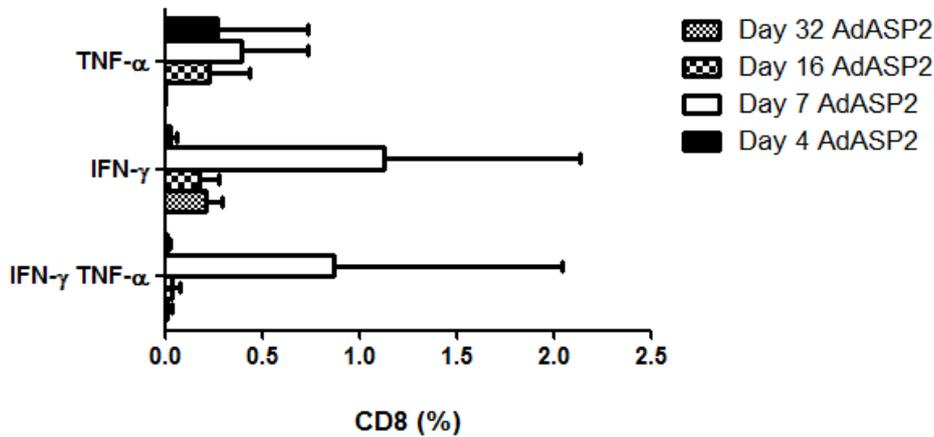


Figura 12 - A administração de PA8 aumenta o número de células produtoras de IFN- γ e/ou TNF- α para o peptídeo no baço dos animais imunizados com o adenovírus recombinante adenoASP2. Camundongos C57BL/6 foram imunizados i.m. com 2×10^8 adenovírus adenoASP2. Após sete dias, a frequência de células produtoras de IFN- γ , TNF- α ou duplo positivas foi estimada *ex vivo* através do protocolo de marcação intracelular (ICS) na presença do peptídeo PA8. Os resultados são representados como médias e desvio padrão de 3 animais por grupo.

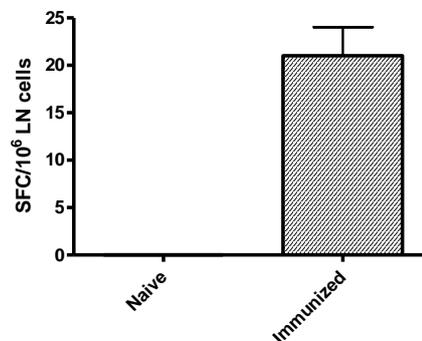


Figura 13: A administração de ICP aumenta o número de células específicas para o peptídeo no LN dos animais imunizados com o adenovírus recombinante adeno β gal. Camundongos C57BL/6 foram imunizados i.m. com 2×10^8 adenovírus adeno β gal. Após sete dias, a frequência de células produtoras de IFN- γ foi estimada *ex vivo* através do ensaio de ELISPOT na presença do peptídeo ICP. Os resultados são representados como médias e desvio padrão de 3 animais por grupo.

4.4.6 O maior número de células T CD8⁺ específicas para o adenoβgal transgênico também se encontra no sétimo dia da resposta

Para correlacionar o número de células TCD8⁺ específicas em cada tempo com a atividade citotóxica observada na cinética, **Figura 10**, nós avaliamos, através de marcação com pentâmero, o número dessas células em cada ponto de tempo (**Figura 14**).

Como esperado, a maior número de células TCD8⁺ específicas foi observado no dia 7 após a imunização e os menores números foram vistos nos dias 4 e 32. Estes dados mostram que os dias 7 e 4 estão correlacionados com o ponto de maior e de menor citotoxicidade, respectivamente. Nós também podemos observar que, embora tenha havido uma diminuição expressiva do número de células específicas no dia 16 e, principalmente, no dia 32, a função citotóxica apenas apresentou ligeira diminuição. Provavelmente este é um evento relacionado à homeostase das CTLs. Com este fim, entram em jogo alguns mecanismos no curso da resposta, tal como morte celular induzida por ativação (AICD), a qual regula a sobrevivência/morte das células T para impedir respostas imunes descontroladas. A expressão em células efectoras do ligante de FAS (FASL) permite a essas matarem outras células que expressam FAS.

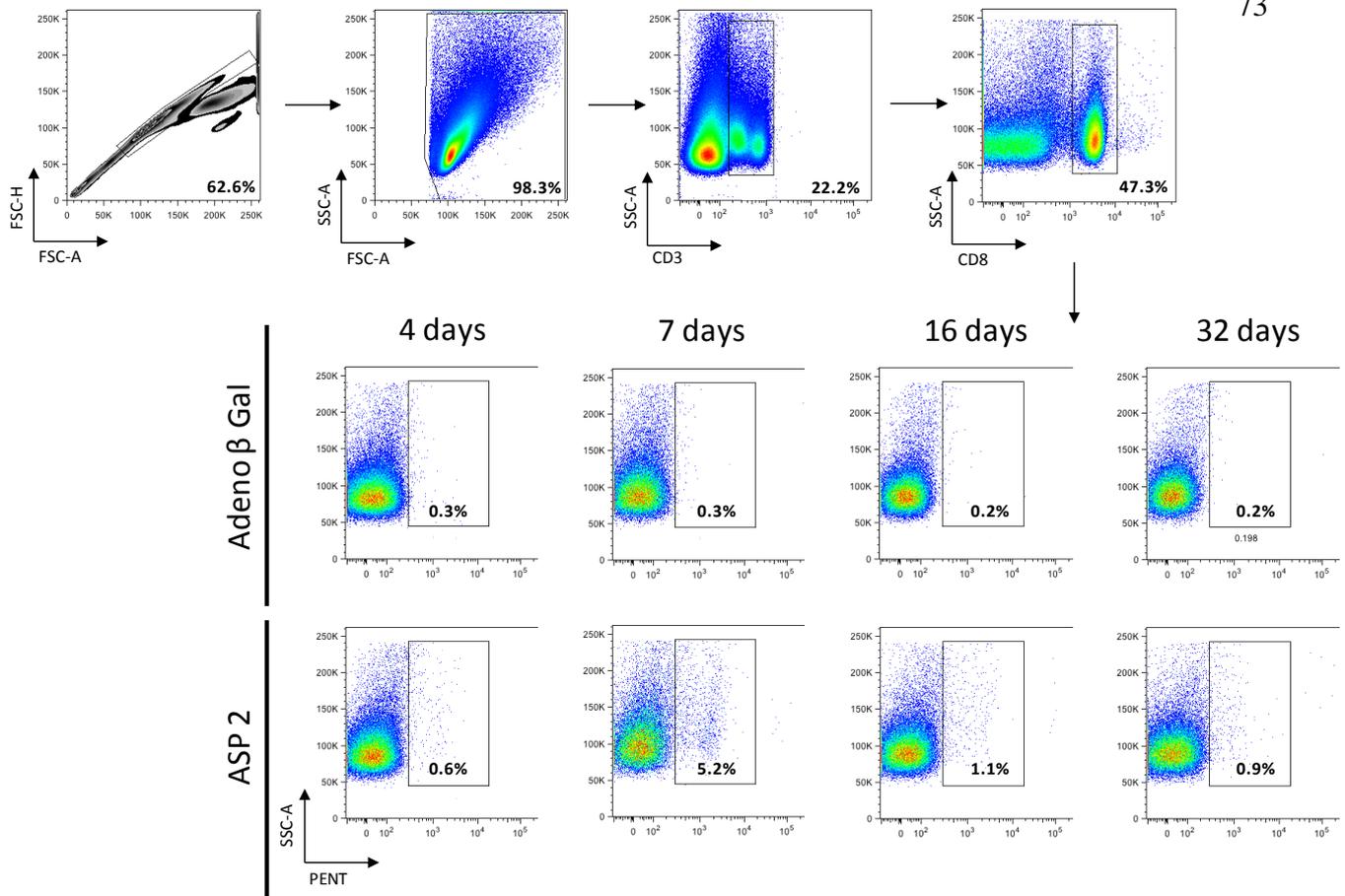


Figura 14 – **Cinética do número de células TCD8+ específica.** Animais C57Bl/6 foram imunizados i.m. com Ad5ASP-2 ou Ad5β-gal nos dias 4, 7, 16 e 32 antes de terem seus baços retirados. Células esplênicas foram marcadas com pentâmero e a frequência de células TCD8+ H-2Kb-VNHRFTLV+ foi determinada por análise de FACS. Os resultados são expressos como a média de 3 animais por grupo e são representativos de experimentos realizados pelo menos duas vezes com resultados semelhantes.

Enquanto perforina, granzima e granzulina induzem morte celular pela entrada no citosol, a proteína de membrana FAS ligante (FASL) atua a nível de membrana plasmática se ligando a FAS na célula alvo (28).

Agregação de receptores de morte FAS na superfície de células induz, através da alteração morfológica do domínio de morte, o recrutamento de outra molécula, FADD (que se associa a FAS via domínio de morte) e pró-caspases apicais. Uma vez ativadas, estas caspases apicais desencadeiam uma cascata de ativação de caspases, que culmina na morte celular (45).

A literatura mostra que os defeitos genéticos na via de FASL/FAS desencadeia a síndrome linfoproliferativa autoimune tanto em seres humanos quanto em camundongos e está relacionada a autoimunidade. Para avaliar qual a contribuição desses receptores de morte na ação citotóxica das CTLs em nosso modelo, nós utilizamos como células alvo, células singênicas do baço de animais LPR, camundongos mutantes para FAS (MRL/lpr) que desenvolvem uma

linfoacumulação natural com esplenomegalia e linfadenopatia (152, 153) (**Figura 15**).

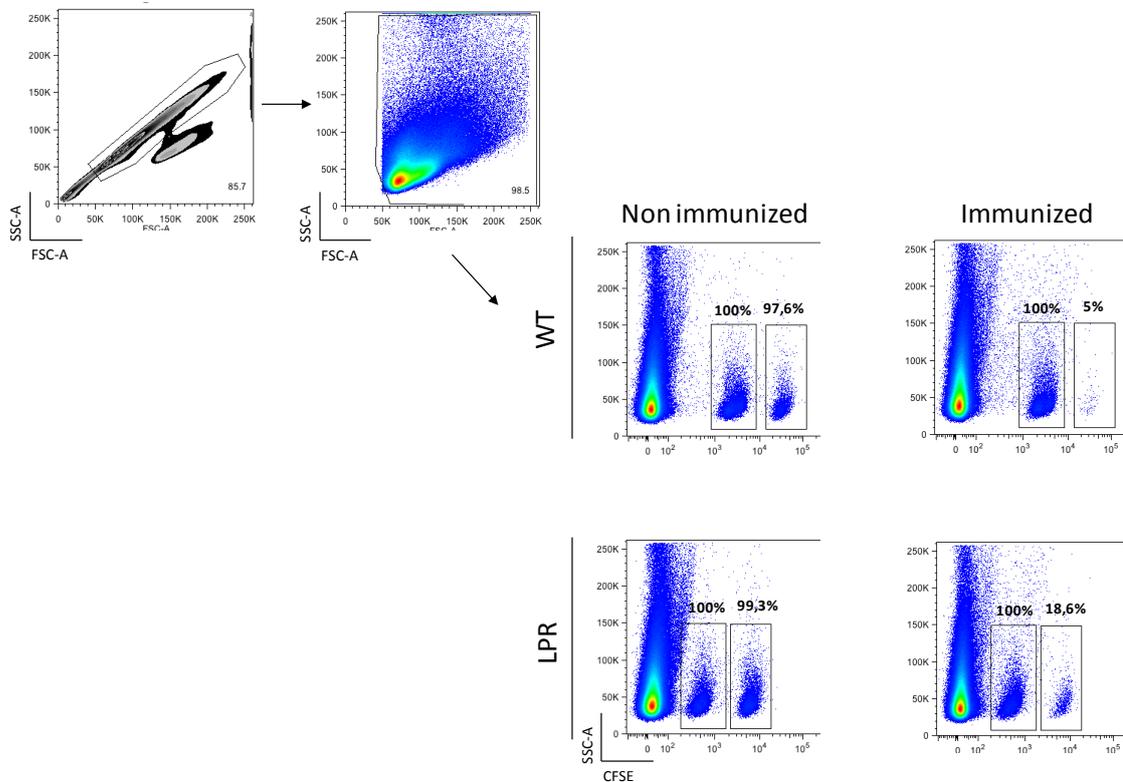


Figura 15: Ensaio de citotoxicidade por imunização com Ad5 β -gal entre animais WT e LPR mostra que a resposta citotóxica é dependente em aproximadamente 15% da via de FAS/FASL. Camundongos C57Bl/6 e LPR foram imunizados ou não i.m. com Ad5 β -gal. Sete dias depois, a atividade citotóxica *in vivo* foi estimada pela injeção em cada animal com células esplênicas singênicas marcadas com CFSE pulsadas ou não com 1 μ g/ml do ICP. Os resultados são expressos como as médias de 3 animais por grupo e são representativos de experimentos realizados pelo menos duas vezes com resultados semelhantes.

Nós observamos que a citotoxicidade *in vivo* para o adeno β gal é dependente em aproximadamente 13% da ligação de receptores de morte FAS-FASL, sendo dessa forma, que estes receptores tem uma contribuição importante para a morte de células alvo. TNF- α , que assim como FASL, faz parte da subfamília dos ligantes de morte, também pode exercer funções citotóxicas (154, 155).

Linfócitos T citotóxicos também utilizam de mecanismos fratricidas. Esta hipótese é apoiada por observações *in vitro* em que CTLs são alvos de suas irmãs, depois de terem capturado fragmentos de membrana da célula alvo morta anteriormente (33, 156, 157). A relevância *in vivo* deste mecanismo é difícil de ser avaliada, mas se ele ocorre *in vivo*, é assumido que deve participar na homeostase de células TCD8⁺ que estavam ativas durante a resposta imune.

Conseqüentemente, esse resultado reforça nossa conclusão de que este

ensaio de citotoxicidade *in vivo* é muito sensível para determinar a função citotóxica das CTLs. Trabalho elegante de Stambas J. e colaboradores (150) mostraram que há um limiar neste método acima do qual as respostas serão detectadas com cerca de 100% de lise das células alvo. Este grupo sugere que a taxa mínima de célula efetora /célula alvo deve ser de 7:1, mas mesmo com uma razão de 0,7:1 é possível ver 40% de citotoxicidade (150).

Os resultados indicam claramente que o ensaio de citotoxicidade *in vivo* é o método mais preciso para a análise da resposta efetora das CTLs, não avaliando apenas a função efetora no pico da fase de proliferação, como no ICS ou no ensaio de ELISPOT, mas ainda sendo capaz de detectar a atividade citotóxica após a fase de contração. Como mostrado na **Figura 16**, a capacidade de resposta da CTL não diminui após a fase de contração, e isso pode ser devido as CTLs que permanecem no local da resposta serem melhores efetoras do que aquelas em fase de proliferação, talvez células com perfil de memória. Apesar disso, a função das CTLs após 32 dias da imunização com adenovírus recombinante só pode ser detectada corretamente pelo ensaio de citotoxicidade *in vivo*.

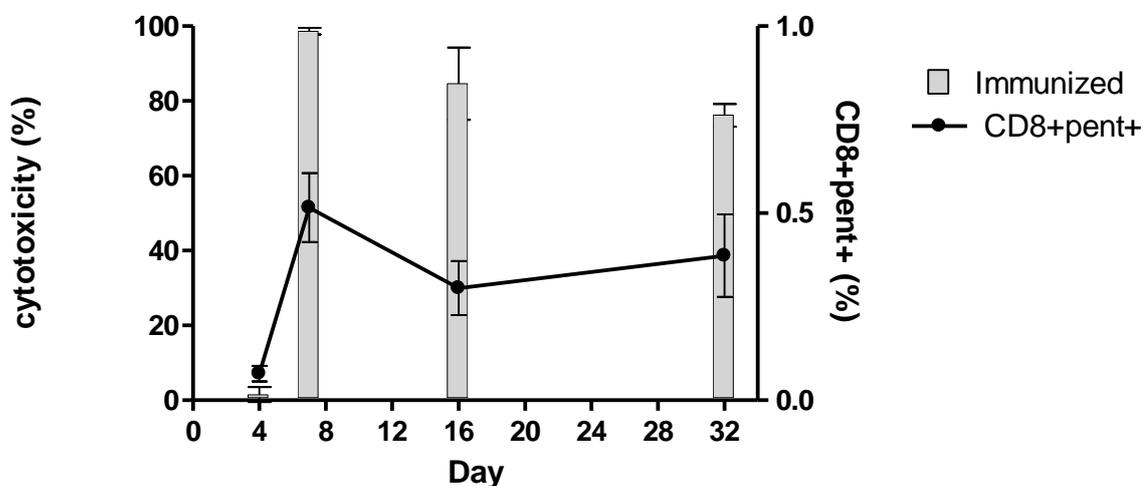


Figura 16: Gráfico de representação das figuras de cinética do número de células TCD8+ específica e da cinética do ensaio de citotoxicidade *in vivo*.

4.5 Efeito da não expressão de Gal-1 *in vivo* na resposta antiviral por CTLs

Uma vez mostrada a localização de Gal-1 na principal organela efetora das células citotóxicas e de ter padronizado o ensaio de citotoxicidade *in vivo*, o próximo passo consistiu em verificar a contribuição de Gal-1 para a função citotóxica dessas células.

Foi observado que nos animais Gal-1KO houve um número significativamente maior de células alvo vivas (CFSE_{high}) quando comparado ao grupo de animais selvagens após 7 dias de imunização e 18 horas da inoculação (**Figura 17A**).

A análise estatística revelou que essa diferença é estatisticamente significativa e sugere que os animais deficientes em Gal-1 apresentam alterações na função efetora de células citotóxicas (**Figura 17B**). Esse ensaio coloca em evidência que Gal-1 pode ser uma das moléculas que participam na função efetora de células citotóxicas, mas, que podem existir outros mecanismos atuantes simultaneamente.

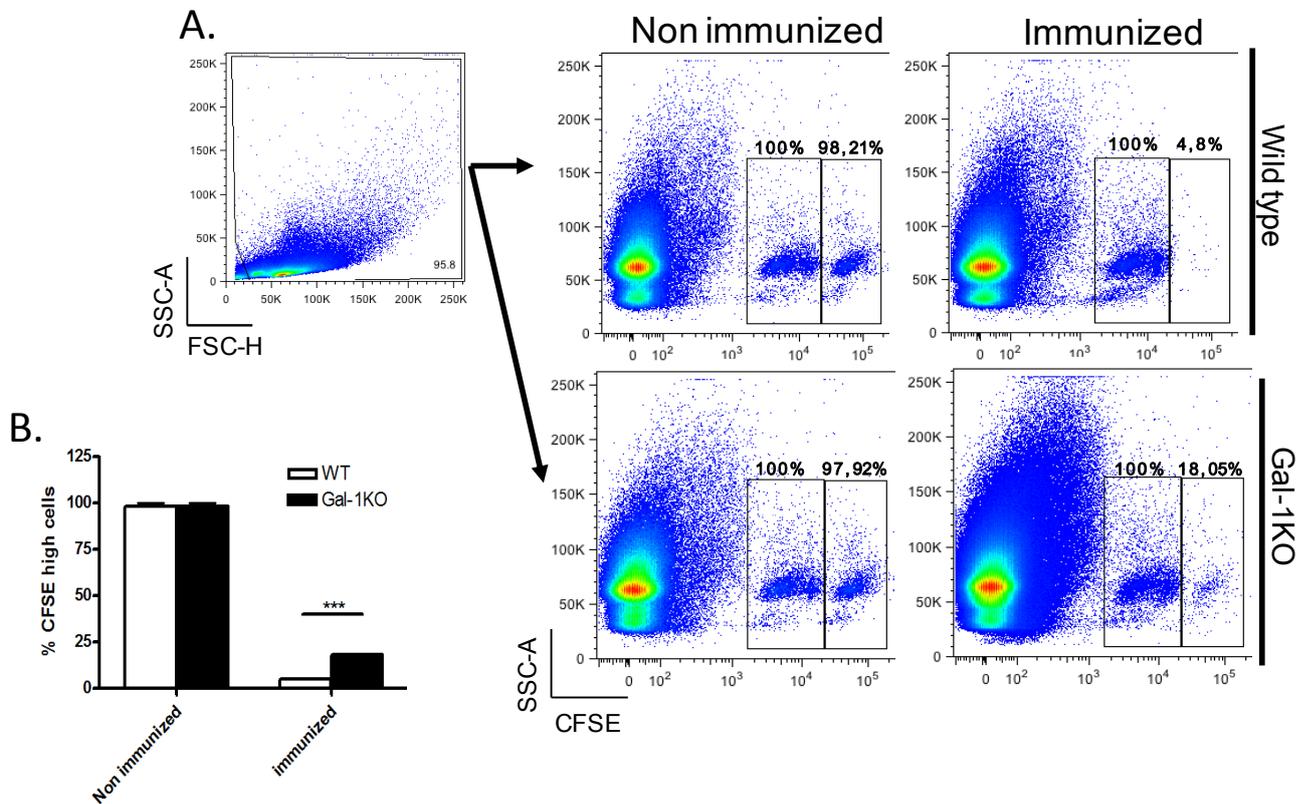


Figura 17. Células TCD8+ tem menor potencial efetor em camundongos *Knockout* para galectina-1 (Gal-1KO). Camundongos Gal-1KO e C57Bl/6 foram imunizados ou não (controle) com 2×10^8 PFU de Ad5 β -gal e após 8 dias foram inoculados com 20×10^6 esplenócitos marcados com 1 μ g de CFSE e 20×10^6 esplenócitos marcados com 10 μ g de CFSE pulsados com 0,1 μ g/mL do peptídeo ICP. FSC por SSC; Dotplot FSC por CFSE das populações de células Low(Lo) (não pulsada com ICP - não alvo) e Hi (pulsada com ICP - alvo para CD8) para CFSE. As porcentagens foram calculadas baseadas na média de 3 animais por grupo apenas nas células positivas para CFSE (**A**). Gráfico representativo das células alvo (CFSE Hi) vivas dos grupos de animais WT e Gal-1KO ($P < 0,001$) (**B**).

4.6 Gal-1 controla a ativação dos linfócitos e a proliferação das células

Em 2009, trabalho elegante de M. Carrie Miceli e colaboradores mostrou que na deficiência de Gal-1 as células hiperproliferaram em resposta a ligação do TCR possivelmente pelo aumento da produção de IL-2 induzida pelo TCR e prevenção da não responsividade induzida por ativação (AINR) das células TCD8+ nos dias 2-4 após a ligação inicial do TCR (29, 126, 149).

Com o objetivo de avaliar os resultados apresentados pela literatura, nós realizamos ensaios de proliferação *in vitro* no dia 3 (**Figura 18**) e dia 6 (**Figura 19**) após estímulo, em que as células de animais C57Bl/6 e animais Gal-1KO foram estimuladas com “beads” recobertas por anti-CD3/CD28 na presença (3 e 6 dias de cultura) e ausência de IL-2 (3 dias de cultura) e, após este mesmo período, também avaliamos o perfil das moléculas relacionadas a ativação das células T, CD25, CD44 e CD62L (**Figura 3**).

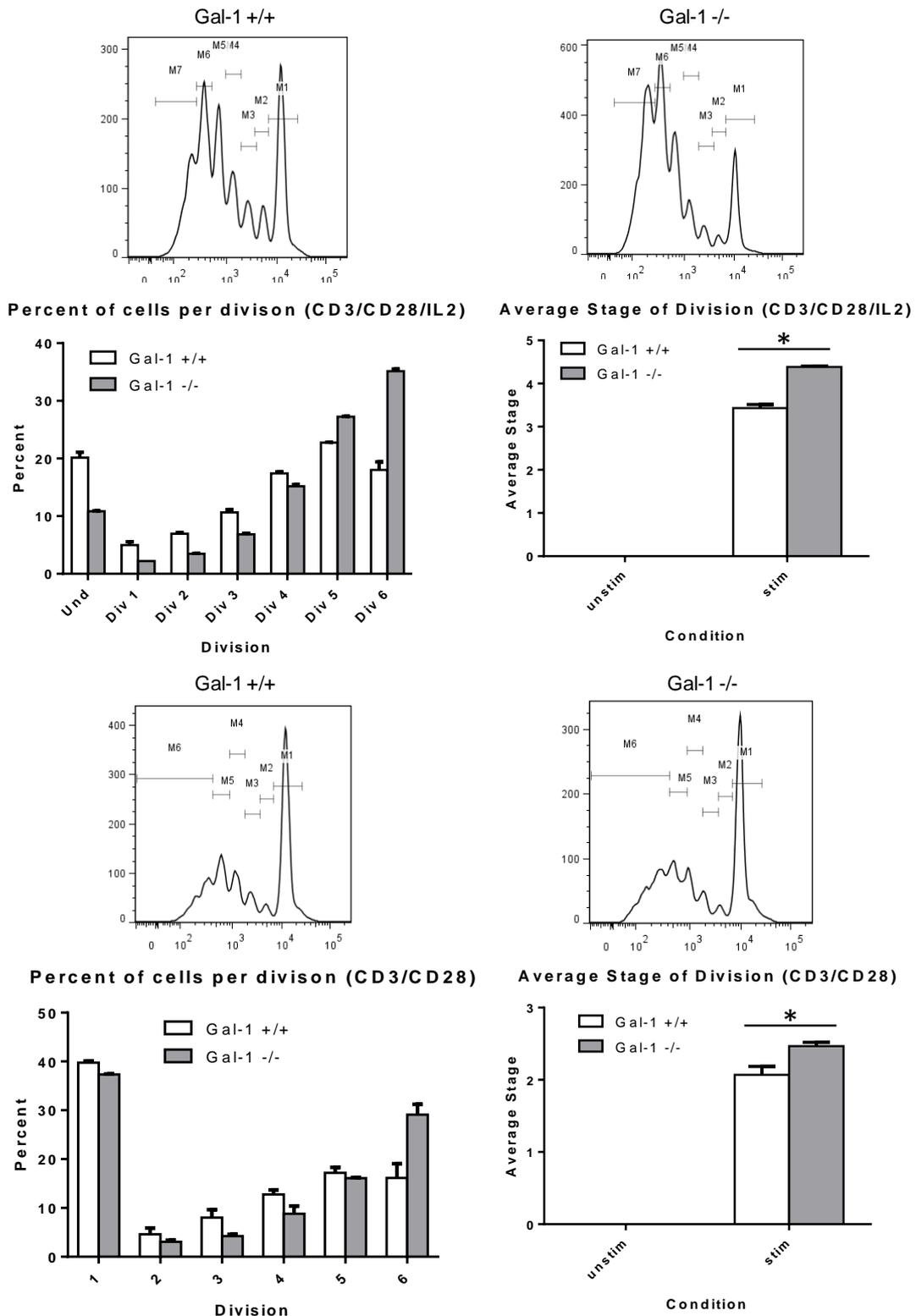


Figura 18. Células T CD8+Gal-1KO entram em maior número de divisões em resposta a estimulação antigênica após 3 dias de estímulo *in vitro*. (A) perfil de diluição de CFSE das células T CD8+ Gal-1+/+ e Gal-1-/- estimuladas durante 72 horas com 40U/mL de IL-2 e 10 μ L/mL de beads CD3/CD28. O histograma na parte superior representa os picos de diluição do CFSE das células em divisão. Abaixo gráficos das porcentagens e da taxa média de divisão de células T CD8+ WT Gal-1+/+ ou Gal-1-/- que sofreram os números indicados de divisões em resposta a ao estímulo por IL-2 e CD3/CD28 conforme determinado a partir dos perfis de diluição de CFSE; (B) perfil de diluição de CFSE das células T CD8+ Gal-1+/+ e Gal-1-/- estimuladas durante 72 horas apenas por estímulo com 10 μ L/mL de beads CD3/CD28. O histograma na parte superior representa os picos de diluição do CFSE das células em divisão. Abaixo gráficos das porcentagens e da taxa média de divisão de células T CD8+ WT Gal-1+/+ ou Gal-1-/- que sofreram os números indicados de divisões em resposta a ao estímulo por CD3/CD28 conforme determinado a partir dos perfis de diluição de CFSE ($p < 0,05$).

Nós observamos por meio dos ensaios *in vitro* que as células Gal-1^{-/-} entram em maior número de divisões quando comparadas ao de células WT visto que tanto no período de 3 dias quanto 6 dias após estimulação CD3/CD28 há maior número de células Gal-1^{-/-} em estágio mais avançados de proliferação. Tal fato é observado de forma mais acentuada quando as células são cultivadas na presença de IL-2 mas o mesmo evento é observado na ausência dessa interleucina. Nossos resultados estão de acordo com a literatura e corroboram os dados que apontam a importância de Gal-1 no controle da expansão celular durante a fase de proliferação de linfócitos.

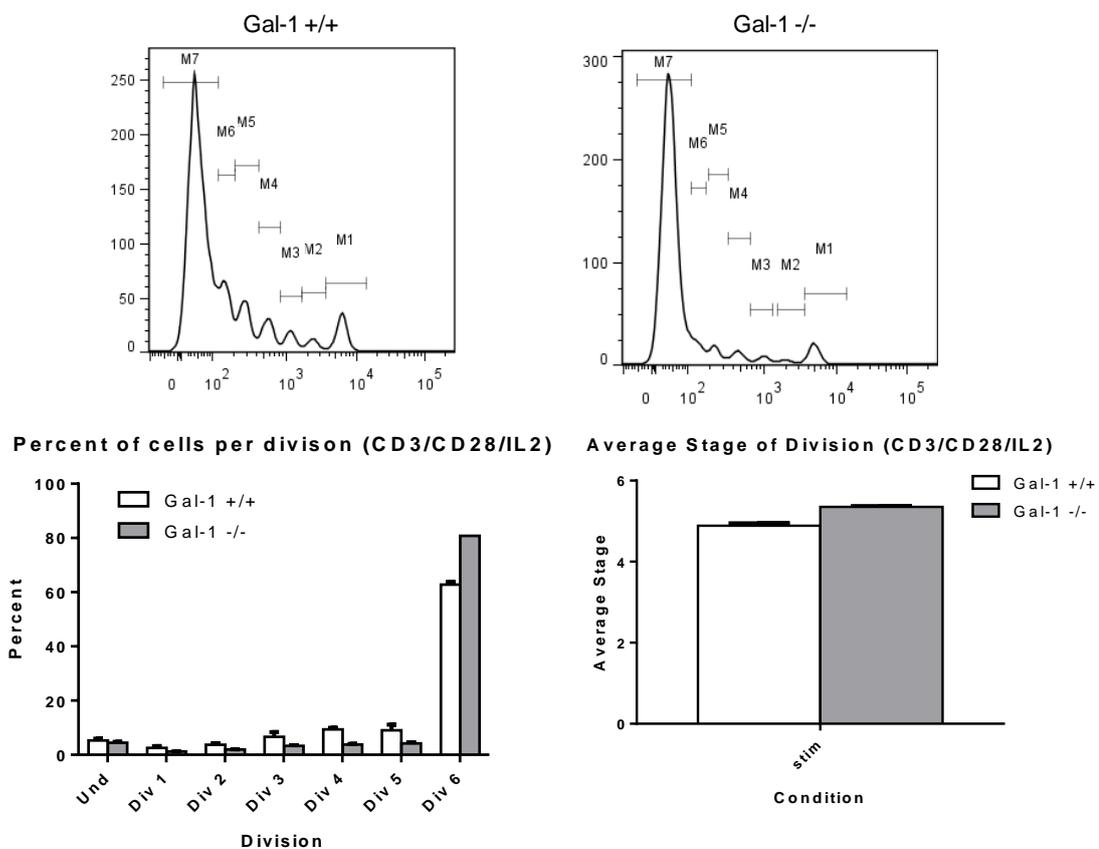


Figura 19. Células T CD8+Gal-1KO entram em maior número de divisões em resposta a estimulação antigênica após 6 dias de estímulo *in vitro*. Perfil de diluição de CFSE das células T CD8+ Gal-1+/+ e Gal-1^{-/-} estimuladas durante 6 dias com 40U/mL de IL-2 e 10µL/mL de beads CD3/CD28. O histograma na parte superior representa os picos de diluição do CFSE das células em divisão. Abaixo gráficos das porcentagens e da taxa média de divisão de células T CD8+ WT Gal-1+/+ ou Gal-1^{-/-} que sofreram os números indicados de divisões em resposta ao estímulo por IL-2 e CD3/CD28 conforme determinado a partir dos perfis de diluição de CFSE.

Nós observamos, nesse mesmo período de 3 dias de estimulação *in vitro*, na presença de IL-2, que Gal-1 mostrou ser importante no controle da ativação dos linfócitos, uma vez que na ausência dessa proteína, as células apresentaram perfil diferente de expressão da cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25), CD44 e CD62L. Neste período, houve não apenas o aumento de CD25, evento intimamente

relacionado a ativação de linfócitos, como também aumento do receptor de ácido hialurônico - CD44 – que pode ser usado para distinguir células *naïve* das células efetoras/memória, uma vez que células *naïve* apresentam padrão de expressão CD44^{low} e nas células efetoras/memória a expressão deste receptor é aumentada.

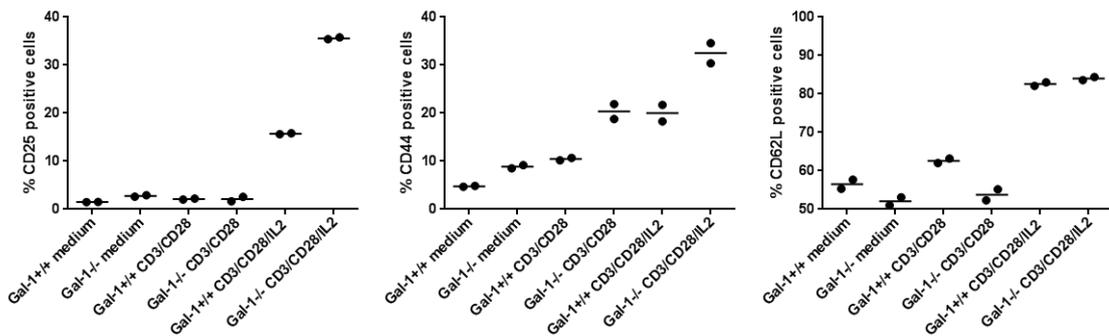


Figura 20. Células T CD8+Gal-1KO apresentam diferente perfil de ativação em resposta a estimulação antigênica após 3 dias de estímulo *in vitro*. Perfil de marcação de CD25, CD44 e CD62L das células T CD8+ Gal-1+/+ e Gal-1-/-, estimuladas ou não (“medium”) durante 3 dias em cultura com (CD3/CD28/IL-2) ou sem (CD3/CD28) 40U/mL de IL-2 e 10 μ L/mL de beads CD3/CD28.

De maneira interessante, nós observamos que no sexto dia de cultura houve menor expressão de CD62L nas células T CD8+ Gal-1KO quando comparadas as selvagens (**Figura 20**). A baixa expressão dessa molécula é relacionada a diferenciação dessas células em linfócitos T efetores os quais possuem baixa expressão de L-selectina, uma vez que essas células saem dos órgão linfóides secundários e circulam para a periferia com o objetivo de exercerem suas funções efetoras imediatamente após reencontrarem o antígeno. Esses resultados são inéditos na literatura e indicam que na ausência de Gal-1 os linfócitos TCD8+ não só possuem maior ativação como também maior capacidade de deixarem os órgãos linfóides secundários mais cedo que células selvagens. No sexto dia ainda há maior número de células em estágios mais avançados de proliferação (**Figura 21**).

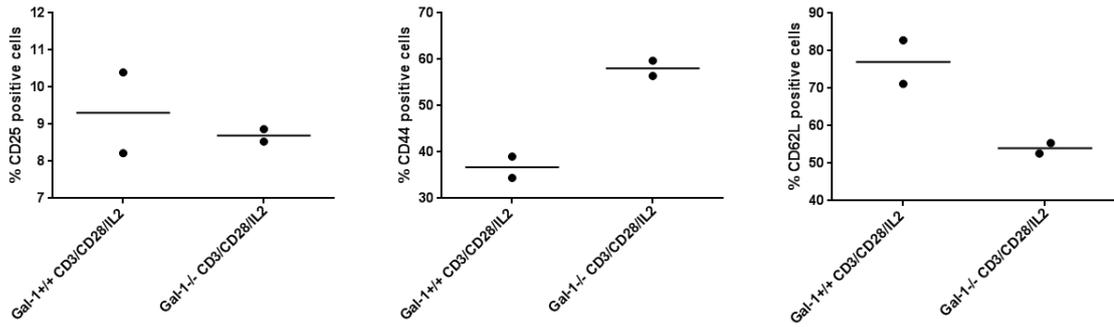


Figura 21. Células T CD8+Gal-1KO apresentam diferente perfil de ativação em resposta a estimulação antigênica após 6 dias de estímulo *in vitro*. Perfil de marcação de CD25, CD44 e CD62L das células T CD8+ Gal-1+/+ e Gal-1^{-/-}, estimuladas durante 6 dias em cultura com 40U/mL de IL-2 e 10 μ L/mL de beads CD3/CD28.

4.7 Construção de animais OT-I *knockouts* para o gene *Igals* para ensaios *in vivo*

Levando-se em conta que as análises *in vitro* são menos informativas do que os ensaios *in vivo*, uma vez que não levam em conta a complexidade do microambiente em que a resposta imune ocorre e, por isso, nem sempre reproduzem o que ocorre *in vivo*, o passo seguinte dos nossos estudos foi avaliar a participação de Gal-1 na proliferação celular e no perfil de ativação dos linfócitos T CD8+ *in vivo*. Para isso, nós construímos o modelo de animais OT-I *knockouts* para gene *Igals* (OT-I Gal-1^{-/-}) através do cruzamento entre animais OT-I e animais Gal-1KO. A avaliação do fenótipo OT-I foi feita através da marcação das células de sangue periférico para CD8 e cadeia V α 2 constituinte do TCR de células T OT-I (Figura 22), em que a dupla marcação para essas moléculas caracteriza animais OT-I.

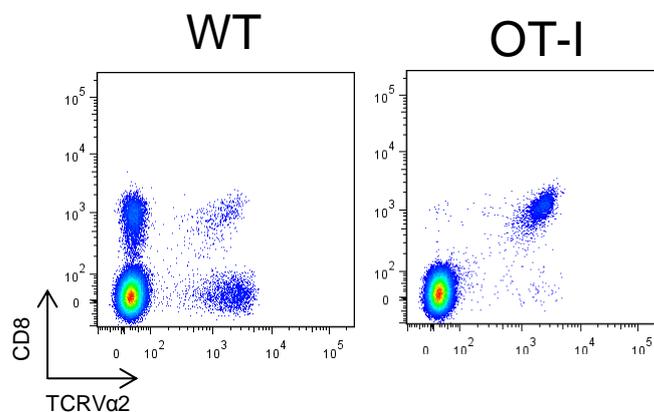


Figura 22: **Caracterização fenotípica dos animais OT-I.** Células do sangue periférico dos animais C57Bl/6 e OT-I foram tratadas com tampão de lise de hemácias para lise de eritrócitos. As células restantes foram marcadas com anticorpos CD8.APC e TCRV α 2.V450 e analisadas por citometria de fluxo.

4.8 BMDCs cultivadas com GM-CSF e estimuladas com LPS expressam CD11c e acentuam a expressão dos marcadores MHCII, CD86, CD80 e CD40.

Levando-se em conta o modelo de OT-I para avaliar a resposta específica de células T CD8+, nós padronizamos o modelo de imunização utilizando células dendríticas pulsadas com o peptídeo específico da OVA, SIINFEKL (InvivoGen). Nesse modelo, nós cultivamos células obtidas da medula óssea de animais C57Bl/6 em meio completo na presença de GM-CSF por 7 dias. Após o 7º dia, as células foram ativadas através da adição de LPS ao meio e então avaliadas através de citometria de fluxo para os marcadores CD11c, CD80, CD86, MHCI, MHCII, Gr1 e CD40. A ativação das células é observada pelo aumento da expressão das moléculas de MHCII assim como das moléculas CD80, CD86 e CD40. A marcação positiva para CD11c, proteína transmembrânica encontrada em níveis elevados nas células dendríticas, e negativa para Gr1, antígeno marcador de diferenciação mielóide, cuja expressão celular é restrita a monócitos da medula óssea e neutrófilos em órgãos periféricos, indica que as células se diferenciaram em células dendríticas e não em macrófagos (**Figura 23**).

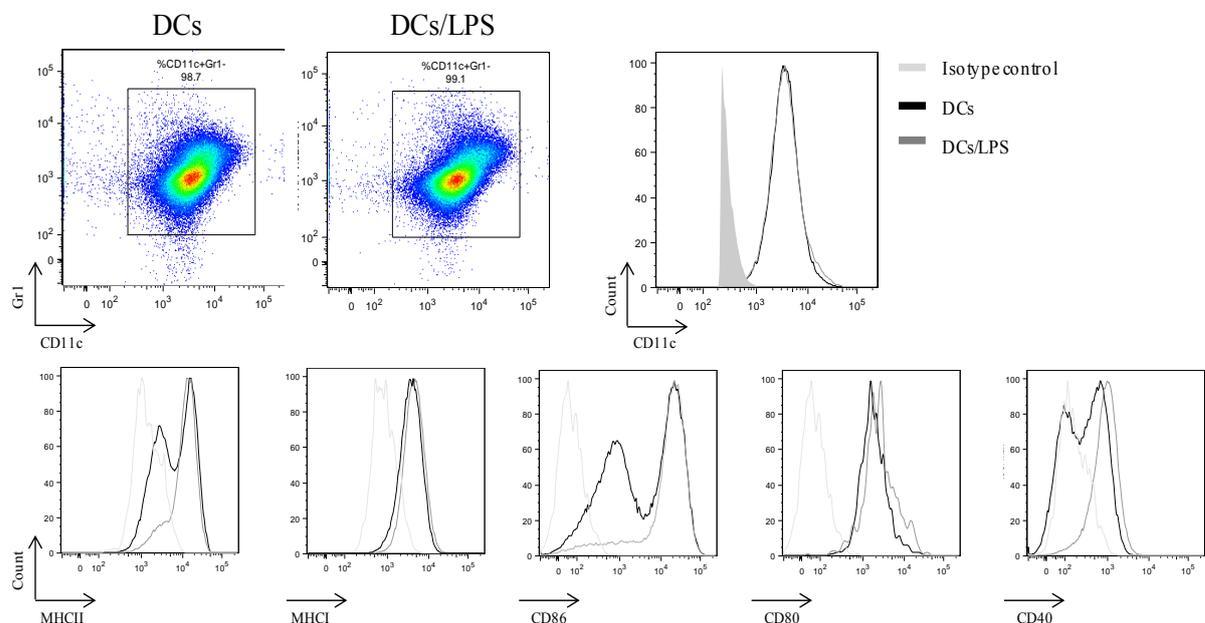


Figura 23: BMDCs CD11c+Gr1- cultivadas com GM-CSF e estimuladas com LPS acentuam a expressão dos marcadores MHCII, CD86, CD80 e CD40. 5×10^6 células da medula óssea/placa de animais C57Bl/6 cultivadas em meio de cultura contendo 200U/mL de GM-CSF por 7 dias foram (linhas cinza escuro) ou não (linhas pretas) estimuladas por 18 horas com LPS. As BMCDs foram marcadas com controles isotipos (linhas cinza claro) anticorpos CD11c, Gr1, MHCI, MHCII, CD80, CD86 e CD40 e analisadas por citometria de fluxo.

4.9 Proliferação *in vivo* das células OT-IGal-1KO apresenta perfil similar ao de células OT-I

Padronizado a cultura das BMDCs e com a obtenção de células OT-IGal-1KO, o passo seguinte foi a realização do ensaio de proliferação *in vivo*. O ensaio foi realizado com imunização de animais C57Bl/6 CD45.1 no dia 0 através da injeção subcutânea no coxim plantar dos animais com BMDCs ativadas com LPS e pulsadas (pata direita) ou não (pata esquerda - controle) com o peptídeo SIINFEKL. No dia 1, células OT-I CD45.2 ou células OT-IGal-1KO CD45.2 foram obtidas do linfonodos de animais OT-I ou OT-IGal-1KO e selecionadas através de colunas de seleção negativa (Miltenyi Biotec) para a molécula CD8a com a pureza >95% de células CD8+ (Figura 24).

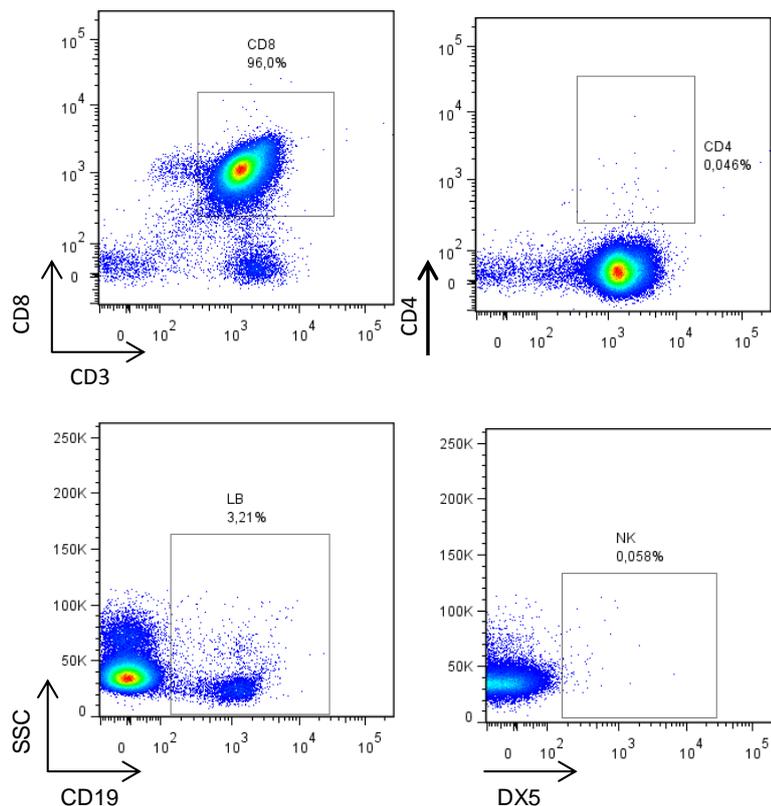


Figura 24: **Caracterização fenotípica das células de animais transgênicos para o TCR OT-I pós coluna de seleção negativa de células T CD8a+.** Células do linfonodo poplíteo de animais transgênicos para o TCR OT-I foram isoladas por kit II de isolamento de células T CD8a+ (Miltenyi Biotec). As células foram marcadas com anticorpos CD3, CD4, CD8, CD19 e DX5 e analisadas por citometria de fluxo.

Em seguida, essas células foram marcadas com 5 μM do corante *Cell Trace Violet dye* (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) e injetadas por via endovenosa retroorbital. Após 3 dias da injeção das células nós analisamos o perfil de proliferação. Diferente do que foi observado *in vitro*, a proliferação *in vivo* das células Gal-1KO mostrou um perfil muito similar ao da proliferação de células WT apesar de ainda observamos maior número de células em divisão no pico de divisão 9 das células Gal-1KO comparado ao de células WT (**Figura 25**).

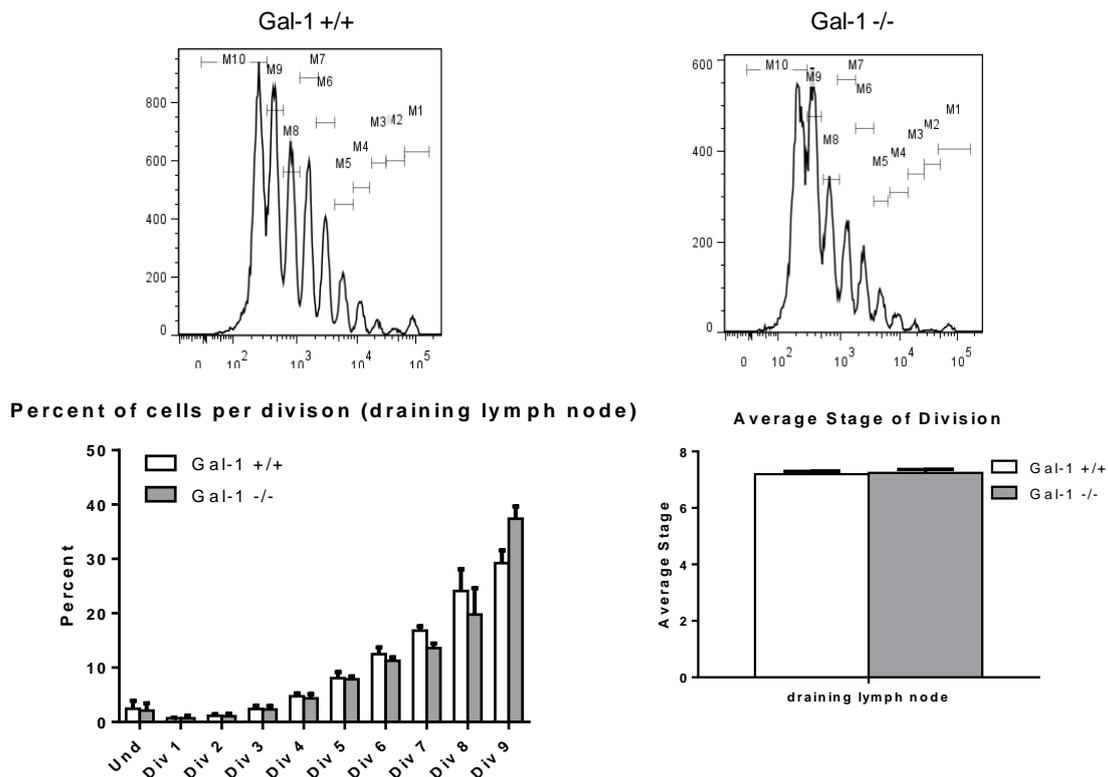


Figura 25. Células OT-IGal-1/- possuem número de divisões similar ao de animais OT-IGal-1/+ após 3 dias de imunização *in vivo* com DCs pulsadas com o peptídeo da OVA SIINFEKL. Animais C57BL/6CD45.1 foram imunizados i.f. com $0,5 \times 10^6$ DCs estimuladas 18 horas com LPS e pulsadas (pata direita) ou não (pata esquerda) por 1 hora com o peptídeo da OVA SIINFEKL. No dia seguinte esses animais receberam $0,3 \times 10^6$ células OT-IGal-1/+CD45.2 ou células OT-IGal-1/-CD45.2 marcadas por 15 minutos com $5 \mu\text{M}$ de CFSE. 72 horas mais tarde, foi avaliado o perfil de diluição de CFSE das células CD8+CD45.2+ do linfonodo poplíteo dos animais. O histograma na parte superior representa os picos de diluição do CFSE das células em divisão. Abaixo gráficos das porcentagens e da taxa média de divisão de células OT-IGal-1/+CD45.2+ ou Gal-1/-CD45.2+ que sofreram os números indicados de divisões em resposta a imunização conforme determinado a partir dos perfis de diluição de CFSE.

A hipótese para o evento observado *in vivo* é de que fisiologicamente a diferença do modelo *knockout* e o selvagem ocorre em um período mais tardio da divisão celular. No entanto, não podemos observar pelo fato de, após o terceiro dia, não haver como diferenciar os picos de divisão das células em proliferação (**Figura 26**).

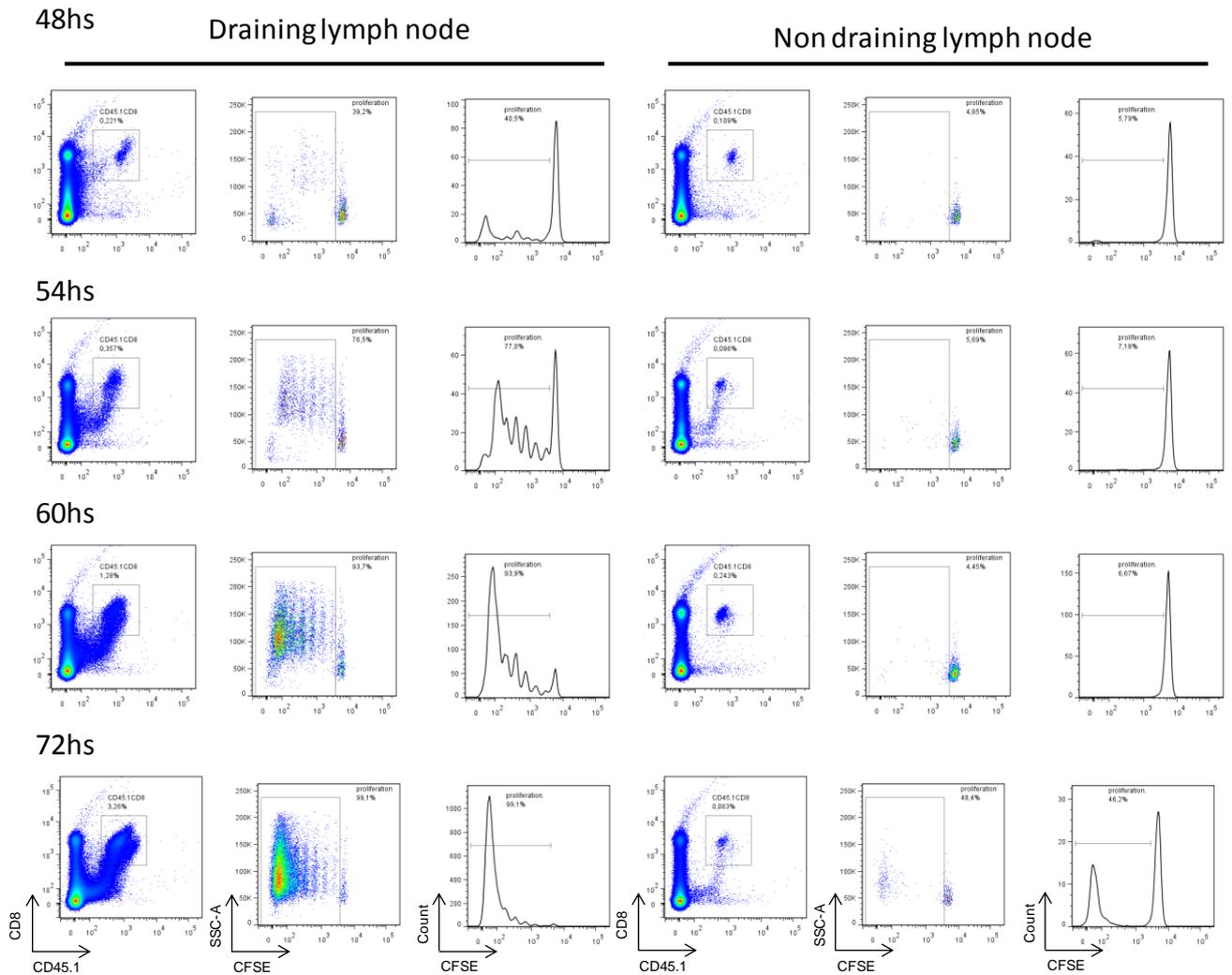


Figura 26. **Cinética de proliferação das células OT-I após 48, 54, 60 e 72 horas de imunização *in vivo* com DCs pulsadas com o peptídeo da OVA SIINFEKL e injeção das células OT-I.** Animais C57BL/6CD45.2 foram imunizados i.f. com $0,5 \times 10^6$ DCs estimuladas 18 horas com LPS e pulsadas (draining lymph node) ou não (non draining lymph node) por 1 hora com o peptídeo da OVA SIINFEKL. No dia seguinte esses animais receberam $0,3 \times 10^6$ células OT-ICD45.1 marcadas por 15 minutos com $5 \mu\text{M}$ de CFSE. 48, 54, 60 e 72 horas mais tarde, foi avaliado o perfil de diluição de CFSE das células CD8+CD45.1+ do linfonodo poplíteo dos animais. Os “dot plots” representam as populações de células CD8+CD45.1+ e os picos de diluição do CFSE das células em divisão que também está representado por histograma.

4.10 Perfil de degranulação em animais Gal-1KO

A principal organela na função efetora de linfócitos T citotóxicos e das células NK é o lisossomo secretório. Lisossomos secretórios especializados são grânulos líticos, contendo proteínas citolíticas tais como perforina e granzimas, em adição as hidrolases lisossomais tais como catepsina B e D, β -hexosaminidase e as proteínas de membrana lisossomal, LAMP-1, LAMP-2 e LAMP-3.

A expressão da proteína de membrana lisossomal, LAMP-1 (CD107a), na superfície celular tem sido descrita como marcador de degranulação de células

citotóxicas e foi mostrada ser fortemente regulada e ter sua expressão aumentada na superfície das células após estimulação acompanhando a perda de perforina (158).

A literatura mostra que Gal-1 interfere na degranulação de mastócitos atuando como inibidor desse processo (100). Com o objetivo de avaliar se há relação dessa lectina com a degranulação de linfócitos TCD8⁺, nós realizamos ensaio de marcação de CD107a em células TCD8⁺ efetoras ativadas *in vitro* de animais *knockouts* para o gene *Isgal1* (Figura 27).

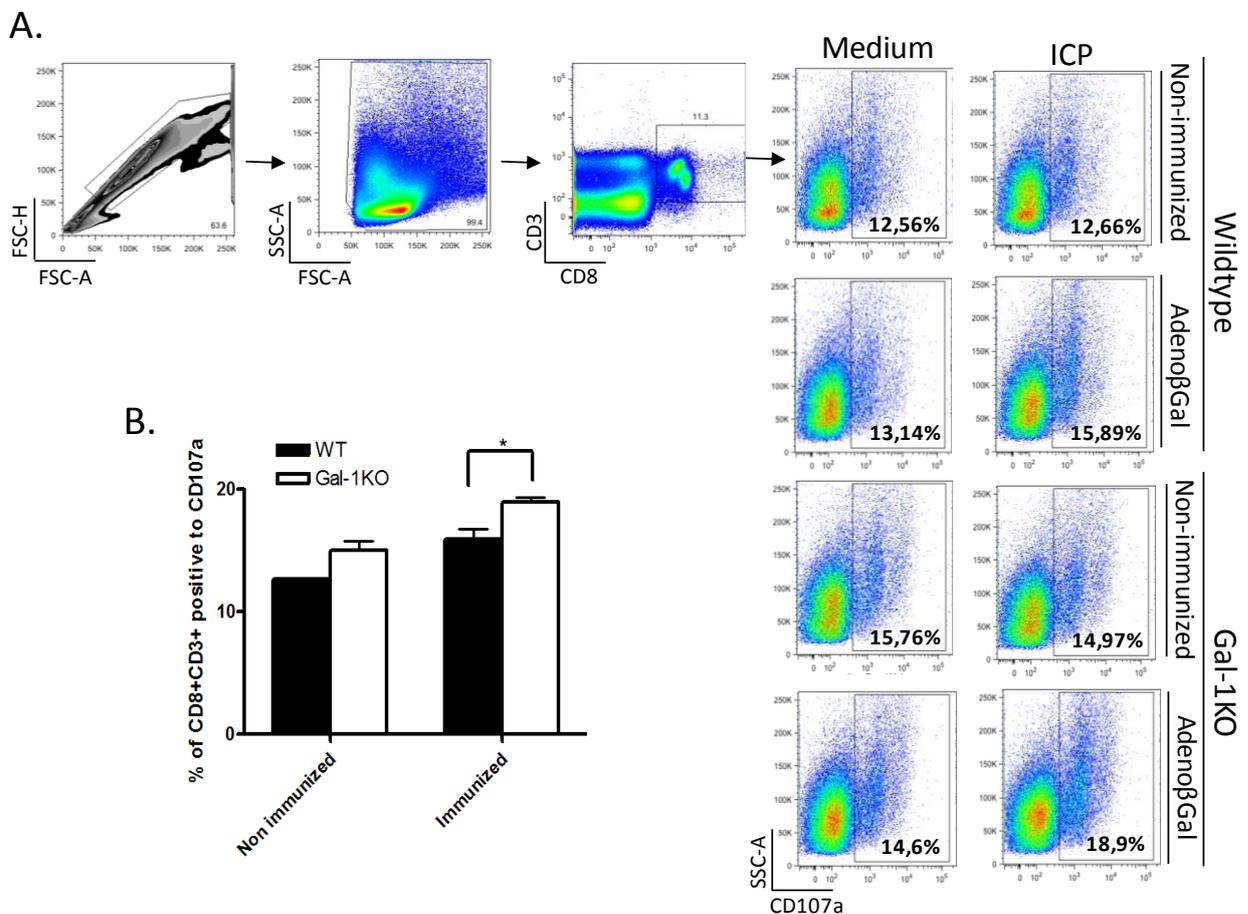


Figura 27: Células TCD8⁺ de camundongos Gal-1KO apresentam maior degranulação do que a de animais selvagens. Esplenócitos de animais C57Bl/6 e C57Bl/6Gal-1KO foram cultivados na presença de anti-CD107a, com ou sem o peptídeo ICP. Após 12 h, as células foram marcadas para detectar CD8 e CD3. Os resultados são apresentados como a média de 3 animais por grupo. Os asteriscos indicam que o número de SFCs dos animais WT imunizados que receberam ICP foram significativamente menores do que os animais Gal-1KO imunizados (A); Gráfico representativo da proporção de células CD8+CD3+ positivas para marcação com CD107a de superfície (P<0,05) (B).

Nossos resultados mostram que Gal-1, assim como visto para mastócitos, interfere controlando a degranulação de CTLs, já que na sua ausência, há maior exposição de LAMP-1 nas células de animais Gal-1KO em resposta à ligação do

TCR, o que indica que nesses animais há maior degranulação quando comparados a animais selvagens. Apesar de haver maior degranulação, animais Gal-1KO apresentam menor morte de células alvo. Isso sugere mais uma vez que nossa hipótese sobre a ação de Gal-1 na ação efetora das CTLs sobre as células alvo pode estar correta. No entanto, outro fato que deve ser avaliado é se a ausência de expressão de Gal-1 altera o número de células efetoras nos animais *knockouts* da proteína.

4.11 Animais Gal-1KO possuem maior número de células produtoras de interferon (ELISPOT)

Em 2009, trabalho elegante de M. Carrie Miceli e colaboradores mostrou que a expressão induzida de Gal-1 por linfócitos TCD8⁺ ativados regula a proliferação de células T e que as células hiperproliferaram na deficiência de Gal-1 em resposta a ligação do TCR (29, 126, 149).

Os linfócitos TCD8⁺ se tornam competentes matadores (células efetoras) somente após ativação pelas APCs (12), que estimulam o complexo TCR induzindo a expressão gênica, formação de lisossomos secretórios e proliferação celular (CTL antígeno-específico passa por uma série de duplicações celulares) (28).

Em relação à diferenciação de CTLs em células efetoras e de memória, o T-box dos fatores de transcrição Eomesodermina (Eomes) e T-bet parecem ser essenciais (36). T-bet é induzido rapidamente sobre estimulação do complexo TCR e é requerido no programa inicial de produção de citocinas (37), enquanto Eomes é induzido mais tarde durante a diferenciação e manutenção da expressão de IFN- γ . Runx3 é requerido para a expressão de Eomes e perforina, e ambos Eomes e Runx3 se ligam ao locus *Prf1*; Runx3 é o regulador primário da expressão de *Gzmb*, mas sinergiza com T-bet e Eomes, respectivamente, para promover a transcrição dos genes *Infg* e *Prf1* (159).

Baseados nos dados acima descritos, e visto que a produção de citocinas como o IFN- γ é uma das características de ativação dos linfócitos, nós avaliamos, por meio da técnica de ELISPOT, a frequência de células TCD8⁺ produtoras dessa citocina nos animais Gal-1KO (**Figura 28**).

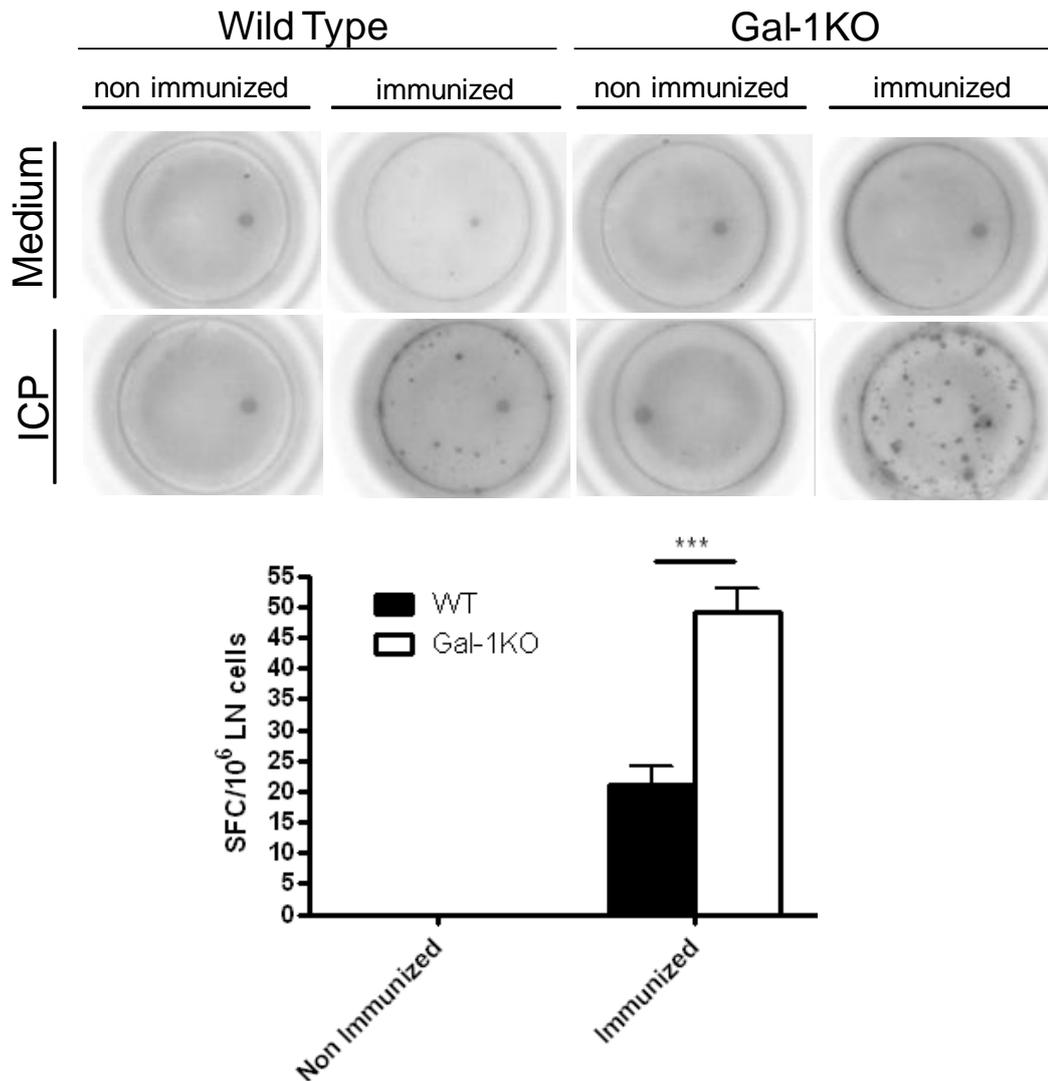


Figura 28: **A administração de ICP mostra números maiores de células específicas para o peptídeo no LN de camundongos Gal-1KO imunizados com o vírus adenoβgal do que em camundongos selvagens.** C57BL/6 e C57Bl/6Gal-1KO foram imunizados i.m. com 2×10^8 do vírus Ad5βgal. Sete dias mais tarde, a frequência de células produtoras de IFN- γ foi estimada *ex vivo* utilizando ELISPOT na presença de peptídeos ICP. Os resultados são apresentados como médias por desvio padrão de 3 animais por grupo (A); gráfico representativo do número de células produtoras de interferon gama de animais WT e Gal-1KO ($p < 0,001$) (B).

Nós mostramos, por meio dessa técnica que, na deficiência de Gal-1, há maior número de CTLs produtoras de interferon gama em resposta à ligação do TCR, como visto por M. Carrie Miceli e colaboradores (127), e que, portanto, Gal-1 regula a resposta primária de CTLs *in vivo*. Apesar de haver um número maior de células produtoras de interferon, a citotoxicidade *in vivo* nos animais Gal-1KO apresenta nível inferior de ação efetora sobre células alvo e, mais uma vez, reforça a idéia de que Gal-1 participa da ação efetora das CTLs.

4.12 Papel de FAS-FASL e Gal-1 na função efetora das CTLs

A apoptose ainda é a forma mais estudada de morte celular nos dias de hoje (160). Ela pode ser desencadeada por FAS, protótipo dos receptores de morte, expresso constitutivamente na maioria dos tecidos celulares e caracterizado pela presença de um a seis domínios ricos em cisteína nas suas porções extracelulares, que medeiam a interação deste com FASL (161). Esta interação resulta na ativação de uma cascata de sinalização intracelular, a qual tem início com a agregação dessas moléculas na superfície culminando na morte da célula que expressa FAS (162). Dados da literatura mostraram que camundongos mutantes para FAS (MRL/lpr), por exemplo, desenvolvem uma linfoacumulação natural com esplenomegalia e linfadenopatia. Esses camundongos apresentam uma falha na sinalização de apoptose com comprometimento do processo de deleção clonal periférica de linfócitos, com risco de haver, posteriormente, o desenvolvimento de uma doença autoimune (152, 153).

Matarrese e colaboradores (163) mostraram em 2005 que Gal-1 está relacionada a via dos receptores de morte e induz, por si só, a morte celular. Entre os mecanismos potencialmente envolvidos neste efeito e sugeridos pelo trabalho está a interação direta de Gal-1 com receptores FAS, em que utilizando anticorpos neutralizantes anti-Fas (clone ZB4) eles foram capazes de inibir a morte celular induzida por Gal-1. Nesse trabalho, a cascata apoptótica desencadeada por Gal-1 envolve a ativação de caspase-8.

Visto que a via FAS-FASL é um dos mecanismos utilizados pela CTL para eliminar seus alvos, que Gal-1 tem relação com essa via e sabendo que FASL é fortemente regulado pela CTL e estocada em grânulos líticos (77), nós fomos avaliar a relação de Gal-1 e a via desses ligantes de morte, porém agora, Gal-1 no controle de FASL (**Figura 29**).

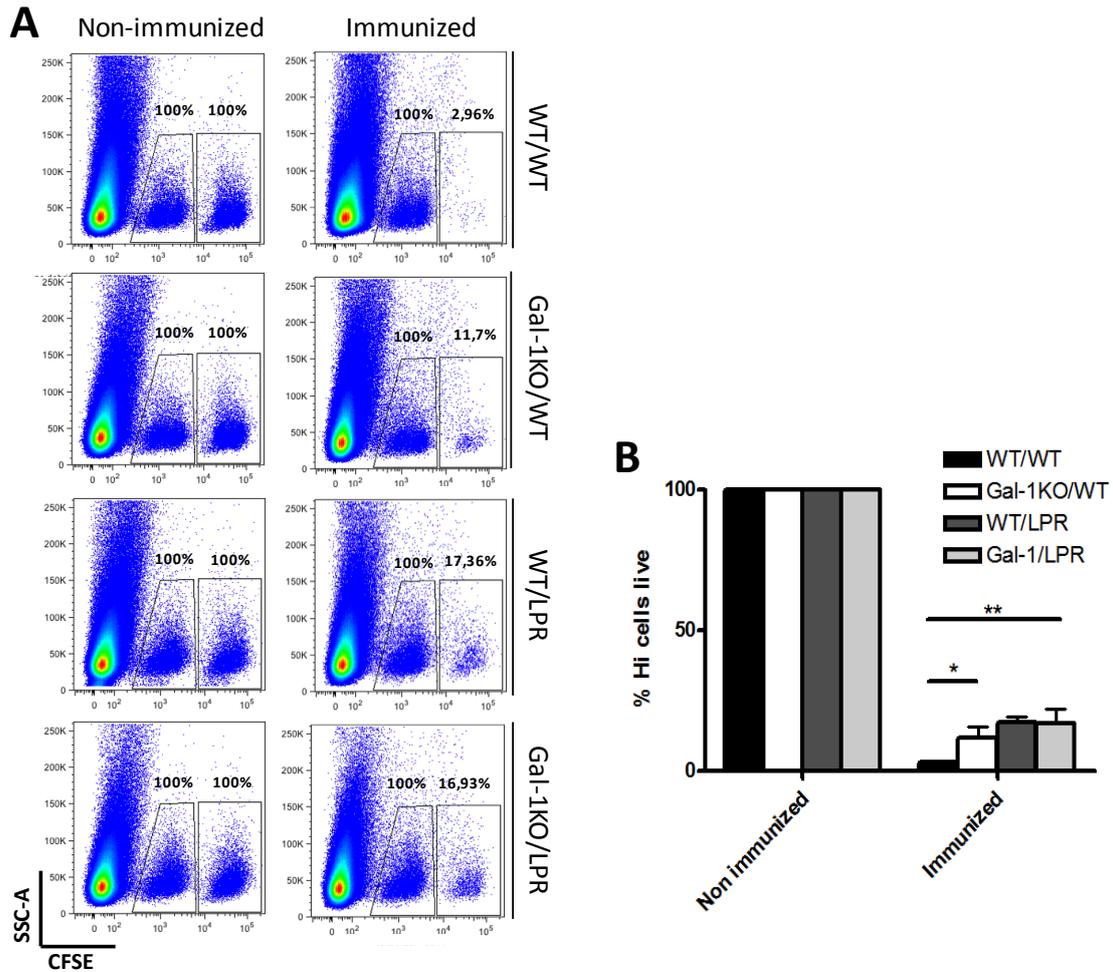
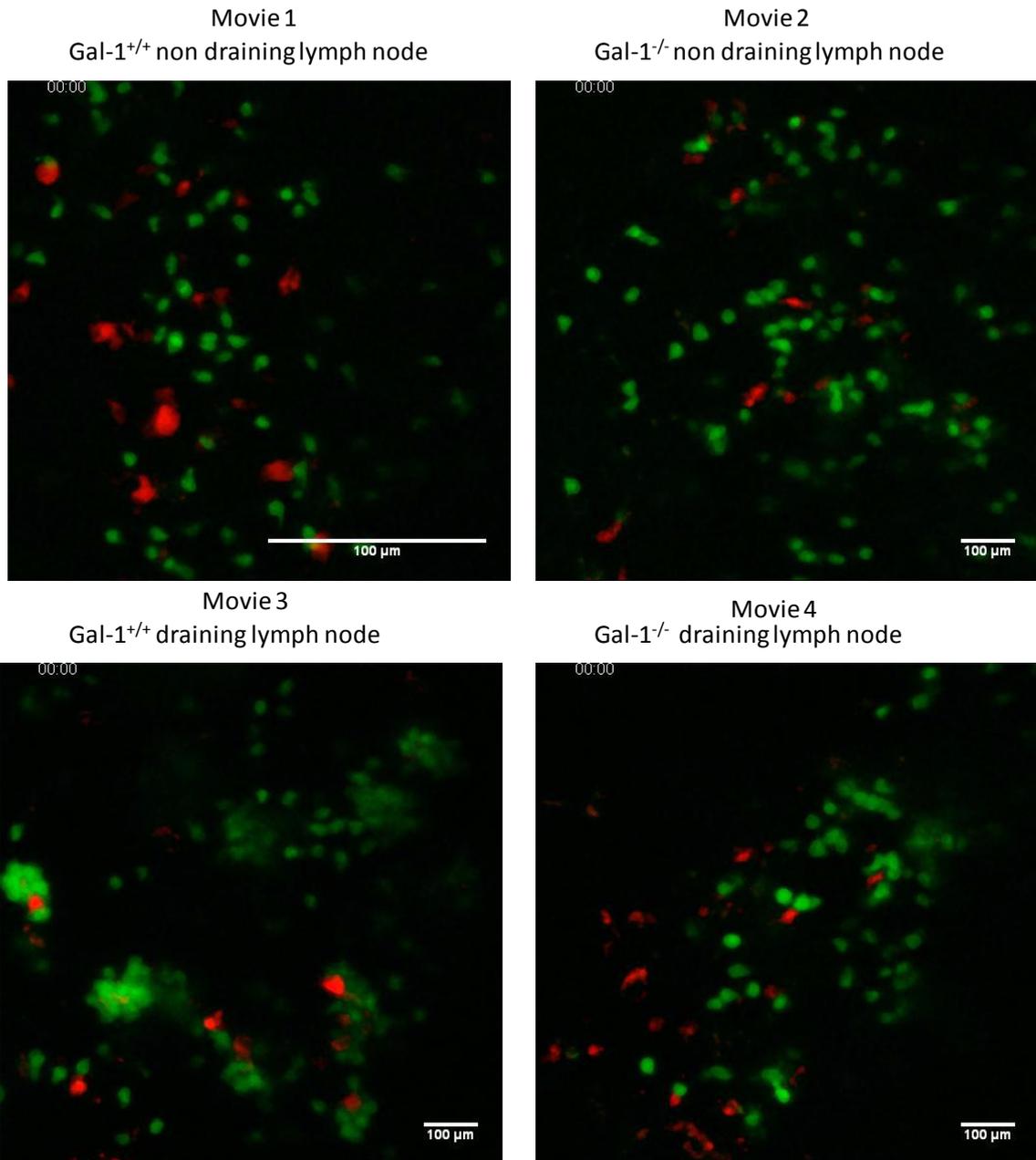


Figura 29: Células TCD8⁺ tem potencial efetor similar ao de animais selvagens em camundongos *Knockout* para galectina-1 (Gal-1KO) quando há ausência de FAS nas células alvo. Camundongos Gal-1KO e C57Bl/6 foram imunizados ou não (controle) com 2×10^8 PFU de Ad5 β -gal e após 8 dias foram inoculados com 20×10^6 esplenócitos marcados com 1 μ g de CFSE e 20×10^6 esplenócitos singênicos (WT) ou de animais LPR (LPR) marcados com 10 μ g de CFSE pulsados com 0,1 μ g/mL do peptídeo ICP. FSC por SSC; Dotplot FSC por CFSE das populações de células Low(Lo) (não pulsada com ICP - não alvo) e Hi (pulsada com ICP - alvo para CD8) para CFSE. As porcentagens foram calculadas baseadas na média de 3 animais por grupo apenas nas células positivas para CFSE (A). Gráfico representativo das células alvo (CFSE Hi) vivas dos grupos de animais WT e Gal-1KO que receberam como células alvo células singênicas ou células de animais LPR (*P<0,05; **P<0,01) (B).

Nós observamos que, na deficiência de Gal-1, o número de células alvo deficientes na expressão de FAS nos animais Gal-1KO é similar ao de animais WT. Este achado fortemente indica a relação de Gal-1 no controle da via FAS-FASL utilizada por CTLs. Portanto, nossos resultados apontam para o fato de que Gal-1 deva regular a resposta efetora das CTLs por uma via que envolve a regulação da expressão ou da atividade biológica de FASL.

4.13 Células OT-IGal-1^{-/-} fazem contatos menos duradouros e menos estáveis com DCs durante a apresentação de antígenos pelas APCs no linfonodo

Por fim, para avaliar se há ou não diferença nas interações iniciais entre as células dendríticas e as células TCD8⁺ e, por isso, diferença na ativação das células T CD8⁺ pela não expressão de Gal-1, nós realizamos a técnica de microscopia *two photon*, atualmente entre as principais técnicas para estudos *in vivo*. Um milhão de DCs CMTMR⁺ pulsadas ou não com peptídeo SIINFEKL foram injetadas i.f. em animais C57Bl/6CD45.1. Dezoito horas mais tarde, as células T OT-I ou OT-IGal-1^{-/-} obtidas dos respectivos animais foram marcadas com 10 μ M de CFSE e então sofreram transferência adotiva endovenosa. Após 3 horas, os animais foram anestesiados via i.p. e então iniciadas as imagens. As células puderam ser detectadas em até 200 μ m a partir da superfície dos linfonodos. As imagens foram projetadas com o software Image J (NIH), em que o protocolo de aquisição e análise foi o mesmo em todas as condições experimentais, para serem comparadas de forma idêntica. Nos linfonodos não drenantes de ambos os animais que receberam as células T OT-I ou OT-IGal-1^{-/-}, nós pudemos observar rápida interação entre as OT-I/OT-IGal-1^{-/-} e as DCs, sendo tal evento bem descrito na literatura (164, 165), uma vez que na ausência de N4-DCs não há ligação estável entre as células (**Filme 1 e Filme 2**). No entanto, a presença de N4-DCs causou uma parada marcante de células OT-I e contato duradouro entre DC e células T em que observamos a formação de ilhas das células T OT-I ao redor das DCs, processo já bem descrito na literatura (166). No entanto, fato inédito foi observado no mesmo ensaio realizado com as células OT-IGal-1^{-/-}, em que houve a presença do peptídeo de alta afinidade SIINFEKL induziu contatos menos duradouros e menos estáveis comparados ao das células OT-I. Nós observamos que com as células OT-IGal-1^{-/-} há menor número de ilhas de DCs e linfócitos T e também menor quantidade de células OT-I nessas ilhas (**Filme 3 e Filme 4**).



Filmes 1-4. **Células OT-IGal-1^{-/-} fazem contatos menos duradouros e menos estáveis com DCs durante a apresentação de antígenos pelas APCs no linfonodo.** Animais C57BL/6CD45.1 foram imunizados i.f. com 1×10^6 DCs estimuladas 18 horas com LPS, marcadas com $5 \mu\text{M}$ de CMTMR+ (vermelho) e pulsadas (draining lymph node – **Movie 3 e Movie 4**) ou não (non draining lymph node – **Movie 1 e Movie 2**) por 1 hora com o peptídeo da OVA SIINFEKL. No dia seguinte esses animais receberam 5×10^6 células OT-IGal-1^{+/+}CD45.2 ou células OT-IGal-1^{-/-}CD45.2 marcadas com $10 \mu\text{M}$ de CFSE. Três horas mais tarde, foi avaliada por microscopia intravital *two photon* o linfonodo poplíteo dos animais. As imagens foram projetadas com o software Image J (NIH), em que o protocolo de aquisição e análise foi o mesmo em todas as condições experimentais, para serem comparadas de forma idêntica.

Juntos os resultados aqui avaliados mostraram que na ausência de Gal-1, há menor número ou tempo de interação entre as células apresentadoras de antígeno e os linfócitos T CD8⁺. Apesar disso, os resultados sugerem que as células Gal-1^{-/-} proliferam mais e possuem potencial de ativação superior ao de células selvagens. Apesar disso, a função citotóxica é inferior ao de células selvagens.

5 DISCUSSÃO

A morte direta de células alvo por linfócitos T citotóxicos desempenha um papel fundamental na imunidade protetora a infecções virais e transformação celular (tumores). Algumas viroses tais como as causadas por vírus influenza (gripe) causam infecções agudas e são rapidamente eliminadas. Em contraste, o vírus herpes causa infecção latente e permanece no hospedeiro. No primeiro caso, linfócitos T CD8⁺ eliminam o vírus da gripe e promovem imunidade de longo prazo. Nas viroses por vírus *epstein barr* e citomegalovírus há uma permanente vigilância desses agentes por células do sistema imunológico, que incluem linfócitos TCD8⁺ (167).

Linfócitos T citotóxicos são células altamente específicas e sobre as células-alvo envolve a interação de proteínas de adesão e sinalização dentro de uma sinapse imunológica (32). A maneira pela qual estas células exercem suas funções ocorre através da morte das células-alvo, tanto por interação de receptores de morte ou por via de secreção de grânulos citotóxicos (168). Assim, quando o receptor de célula T do linfócito TCD8⁺ encontra um peptídeo antigênico, para o qual ele é específico, em moléculas de MHC de classe I em uma APC, aquela célula se diferencia em célula efetora e sua diferenciação é acompanhada por síntese de grânulos citotóxicos e de seus constituintes (169).

Os avanços científicos e tecnológicos nos últimas duas décadas tem aprimorado a análise da ativação, diferenciação e função efetora das CTLs. O teste clássico para avaliar a citotoxicidade celular é o ensaio de liberação de cromo radioativo (⁵¹Cr), desenvolvido em 1968 por Brunner e colaboradores com base na ligação e internalização de radioisótopos pelas células alvo (170).

O desenvolvimento do *enzyme-linked immunosorbent spot assays* (ELISPOT) e a construção de moléculas multiméricas de MHC mais peptídeos específicos melhorou a detecção e caracterização de células T antigêno-específicas. No entanto, as análises *in vitro* são menos informativas do que os ensaios *in vivo*, uma vez que não levam em conta a complexidade do microambiente em que a resposta imune ocorre e, por isso, nem sempre reproduzem o que ocorre *in vivo*. Por exemplo, observou-se que, mesmo após 300 dias de exposição ao agente viral, 84% das células alvo transferidas foram eliminadas *in vivo*, enquanto que os resultados foram negativos quando observados *in vitro* ou *ex vivo* (171). Além disso, vários

paradigmas baseados em estudos *in vitro* foram rejeitados ou pelo menos reformulados após experiências *in vivo*. Este é o caso dos resultados que mostram que a ausência de granzimas A e B prejudicam a citotoxicidade *in vitro* das CTLs (72). Os mesmos autores mostraram mais tarde que animais deficientes em ambas as granzimas A e B são capazes de eliminar as células alvo *in vivo* rapidamente e de uma maneira semelhante a animais selvagem sem utilizar quaisquer mecanismos de compensação, tais como aumento da expressão de granzimas órfãos ou interações FAS- FASL (72).

Proteômica representa uma poderosa ferramenta usada para analisar a composição e função de organelas intracelulares. A partir da análise por esta técnica da composição de grânulos secretórios das células TCD8⁺, nós evidenciamos a Gal-1 como um novo componente dessa organela, candidata a participante da maquinaria efetora das células citotóxicas.

Neste trabalho foram aplicadas as técnicas de microscopia eletrônica e confocal com o objetivo específico de co-localizar Gal-1 com lisossomos secretórios de células citotóxicas. Fica evidente nas fotomicrografias eletrônicas que Gal-1 está localizada em diversos compartimentos intracelulares, como nucléolo e mesmo no citosol, e esta evidência está de acordo com a literatura, que mostra a localização nuclear e citoplasmática de Gal-1 em diversos tipos celulares (87, 88, 134). No entanto, nossos dados apresentam pela primeira vez um novo compartimento de localização de Gal-1 em CTLs, o lisossomo. Essa nova localização é corroborada através da técnica de microscopia confocal e co-localização de Gal-1 com a molécula de membrana lisossomal, Lamp-1, e de matriz da organela, granzima B e perforina. Schafer e colaboradores mostraram através de membranas plasmáticas de vesículas por imunopurificação em que o interior destas simulava o meio extracelular, que Gal-1 parece utilizar a mesma via de FGF-2 para ser secretado das células e que este mecanismo está presente em membranas plasmáticas (91) e, portanto, pode ser também a forma que Gal-1 utiliza para entrar nos lisossomos.

O fato de termos observado na fotomicrografia eletrônica e confocal que Gal-1 está presente nos lisossomos também sugere que Gal-1 deva participar dos eventos efetores das células citotóxicas na região de liberação dos grânulos citotóxicos. Diversos são os potenciais mecanismos que indagam a participação desta molécula em colaborar na função destas células e atuar a esse nível. Em 2009, um trabalho de Stowell e colaboradores mostraram que Gal-1 exógena induz a

exposição de PS em leucócitos sem alterar sua viabilidade, e que a exposição contínua a essa lectina manteve a externalização de PS durante o período em que Gal-1 estava presente (172). Em 2006, Fischer e colaboradores já haviam mostrado que CTLs antígeno específicas expõem PS na superfície celular e que esta exposição ocorre por ativação da célula (173). Esse trabalho mostrou que a PS exposta estava distribuída em proximidade com moléculas de sinalização em *membrane rafts*, podendo modular a formação de contato intercelular entre células T e APCs. Nesse trabalho eles levantam a questão da exposição de PS contribuir significativamente com os eventos que ocorrem na sinapse imunológica, como por exemplo, alterando a fluidez da membrana ou a adesão célula-célula. Também nesse trabalho foi demonstrado que o bloqueio da exposição de PS durante o reconhecimento de antígenos resulta em uma inibição significativa da secreção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α , assim como da internalização do TCR, eventos ligados a ativação das células. Foi também demonstrado que após a ativação, o aumento dos níveis de cálcio inibiu a atividade da flipase que mantém a PS no folheto interno da membrana plasmática. Pode ser que a Gal-1 liberada na sinapse tenha um papel na manutenção dessa estrutura ou na ativação dessas células, indiretamente pela manutenção da exposição de PS. Gal-1 pode estar iniciando o processo de exposição de PS, agindo de forma sinérgica ao aumento dos níveis de cálcio com essa externalização. Dessa forma, nos animais Gal-1KO, a ausência da exposição de PS durante a ação efetora prejudicaria a estabilidade e estrutura da sinapse, além de potencialmente interferir no tempo de contato entre as células efetoras e alvo, um dos fatores importantes para a função das CTLs. Tal fato é importante no contexto de células citotóxicas, em que Gal-1 ao induzir continuamente a exposição de fosfatidilserina, manteria a sinapse imunológica e a ativação das células.

Outra ação de Gal-1 na função efetora das células citotóxicas pode ser na indução de morte da célula alvo através de receptores. A literatura cita que Gal-1 pode se ligar a receptores como CD45/CD3 e CD43/CD7, fazendo com que estes formem *glicolattices* na superfície das células (interações proteína-Gal-1-proteína) e sinalizem vias de morte (115). Vários trabalhos mostraram que Gal-1 pode se ligar a esses receptores na membrana das células, dependendo do seu estado de ativação (96, 115). Neste contexto, é válido ressaltar que muitas células imunológicas são suscetíveis a morte por Gal-1 quando ativadas (110, 174), sendo este o estado de células infectadas, por exemplo, por alguns vírus. Já se sabe que células, como os

macrófagos, possuem receptores intracelulares como RIG-1 e TLRs endossomais que reconhecem patógenos e levam à vias de ativação dessas células.

Gal-1 poderia também ter um papel no controle da resposta dos linfócitos TCD8⁺, após sua ação efetora. Estudos com marcação para lisossomos secretórios mostram que a liberação de poucos grânulos é suficiente para induzir a morte de células alvo. Além disso, o centro organizador de microtúbulos dessas células pode rapidamente tornar-se polarizado para outro alvo, e permitir a morte de várias células por uma mesma efetora. Esse mecanismo permite às CTLs induzirem morte das células alvo de forma rápida e eficiente (175). No entanto, para que ela se desligue de uma célula e possa executar sua função efetora em outra, um dos mecanismos responsáveis é o desligamento entre moléculas de adesão, moléculas co-estimuladoras e complexos TCR-MCH classe I. M. Carrie Miceli e colaboradores mostraram em 2009 que Gal-1 exógena pode diminuir a avides da ligação entre TCR e pMHC (127). Este pode ser um papel importante de Gal-1 liberada na sinapse imunológica, em que ao ser liberada na fenda sináptica e reduzir a avides antígeno-TCR, facilita o desligamento de CTLs e seu alvo e permite que o linfócito TCD8⁺ possa exercer o *killing* de outros alvos. Dentro desse mesmo contexto, já se sabe que MHC classe I, entre outras proteínas, pode ser removido da célula alvo quando a efetora se desloca desta em direção a outra célula alvo e, como resultado, isso pode provocar a susceptibilidade da CTL à morte fratricida por outras CTLs, estabelecendo então um mecanismo de autorregulação para uma regulação negativa da resposta imune (6, 176). No entanto, a ausência de Gal-1 pode ser um fator que torna a proporção de morte fratricida por este mecanismo bem maior do que em indivíduos saudáveis e por isso, a ausência de Gal-1 prejudicaria a função efetora e a homeostasia das CTLs.

Sabe-se também que Gal-1 pode controlar diversos processos de ativação nas células T. Chung e colaboradores mostraram em 2005 que Gal-1 regula, entre outros processos, a fosforilação da cadeia zeta do complexo de TCR, dificultando o processo de ativação dessas células, após a apresentação de peptídeos de microorganismos patogênicos, por exemplo, por APCs (110). Além disso, Gal-1 também foi relacionada com a inibição da cascata Ras-Mek-ERK, que também faz parte da ativação de células. No caso do *Human immunodeficiency virus* (HIV), que tem como um de seus principais alvos as células TCD4⁺ (177), a ação de Gal-1 (Gal-1 liberada pela célula efetora e entrando na célula alvo via poros formados por

perforina) permitiria que essas células tivessem seu processo de ativação inibido, assim impedindo a estimulação dessas células por estímulos de sobrevivência, por exemplo, ou mesmo das vias de proteção da apoptose que a ativação induz, o que contribuiria para o processo de indução de morte de células TCD4⁺ infectadas por vírus HIV, por outras moléculas do grânulo como granzima B.

Apesar de estarmos levando em conta, até o momento, que o efeito de Gal-1 pode ser via grânulos, não se pode esquecer que essa lectina também é secretada diretamente pela membrana por vias ainda não estabelecidas (89, 90). Este fato é relevante e conduz a pensar que o efeito de Gal-1 na função efetora das CTLs pode ser dado via membrana plasmática. Além disso, por essa mesma via de secreção Gal-1 pode estar atuando na homeostasia das células TCD8⁺, evitando uma ação exacerbada e controlando a população de células. Trabalho de Matarrese e colaboradores (163) mostraram que Gal-1 pode sensibilizar células T não ativadas e aumentar em células T ativadas a morte celular "fisiológica" mediada por FAS. Nesse trabalho foi demonstrado que Gal-1 não só reforça a morte celular mediada por FAS, mas também induz a morte celular por si só de linfócitos não ativados. Os mecanismos potencialmente envolvidos neste efeito podem incluir: interação direta de Gal-1 com receptores FAS; aumento da expressão na superfície celular de CD95/Fas em células T não ativadas; alterações da permeabilidade da membrana mitocondrial (MMP - *Mitochondrial Membrane Permeabilization*), ou seja, hiperpolarização da mitocôndria, em células T não ativadas.

Nos ensaios de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, Gal-1 pareceu um potencial componente da resposta efetora de células TCD8⁺. Já se sabe que animais mutantes homozigotos *null* para Gal-1 (Gal-1^{-/-}) são viáveis e se tornam adultos sem nenhuma anormalidade fenotípica óbvia, exceto deficiência na rede olfatória (178) e redução na sensibilidade térmica (179). Nesse contexto se torna também relevante o fato, sugerido neste trabalho, da redução do potencial citotóxico nesses animais *Knockouts*, que poderá explicar outros mecanismos ineficientes ainda não observados nesses animais pela não ciência deste evento. A redução do potencial citotóxico foi observado mesmo visto que linfócitos TCD8⁺ efetores Gal-1KO apresentam maior perfil de ativação, proliferação, degranulação e se encontram em maior número. No entanto, essa redução não é drástica e isto pode ser devido a diversos fatores. Na literatura há diversas moléculas que participam desse processo, como é o caso de perforina e granzimas. Isto pode explicar por que Gal-1 não é a

única molécula envolvida e não houve redução total da função das CTLs. Além disso, no novo cenário formado com o advento dos animais transgênicos, em que animais deficientes em granzimas A e B são capazes de eliminar células alvo tão rápido e de maneira similar aos indivíduos selvagens, surge a necessidade de esclarecer quais as moléculas são fundamentais na função e controle da ação citotóxica das células citotóxicas. Nossos estudos colocam em evidência que Gal-1 é candidata a essa função e parece participar desse processo. O fato de nossos dados indicarem a participação de Gal-1 no controle da via dos receptores de morte FAS-FASL levanta algumas hipóteses sobre a importância de Gal-1 para a citotoxicidade das CTLs: Gal-1 dos lisossomos influencia a exposição de FASL talvez controlando sua estabilidade ou por interagir com esta e permitir que ela ali se localize; Gal-1 participa da sinalização que encaminha FASL para o compartimento lisossomal. Além disso, os achados que Gal-1 interage com Gemin4, um membro do complexo de proteínas dos *survival of motor neuron* (SMN), e é coimunoprecipitado com os complexos nucleares SMN (134), envolvido no processo que direciona o *splicing* de pré-RNA (180), dão uma visão mecanicista do seu potencial papel na via de *splicing* (181) e indica outra hipótese de que Gal-1 esteja envolvida na regulação da expressão de FASL. A confirmação dessa ação evidencia um novo papel para galectinas e abre novas portas de estudo no campo das moléculas que se ligam a açúcares. Com este fim são necessários estudos adicionais para comprovar que esta molécula realmente tenha esse papel.

Durante os últimos anos, tem havido uma crescente valorização do efeito das interações proteína-glicanos sobre a regulamentação da imunidade inata e adaptativa. As células centrais na ponte entre essas respostas estão as células dendríticas (DCs), que não só podem induzir ativação como também tolerância periférica por promover a diferenciação de células T reguladoras (Tregs), incluindo Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e células Treg do tipo 1. Galectina-1 tem sua máxima expressão em DCs após estas serem expostas a estímulos tolerogênicos. Rabinovich e colaboradores descreveram em 2009 que, após a exposição a Gal-1, DCs adquirem função reguladora dependente de interleucina 27 (IL-27) e promovem a tolerância das células T mediada por IL-10, dessa forma, suprimindo neuroinflamação autoimune (182). No entanto, nossos dados mostram o outro lado da moeda na ativação das células T, em que a expressão endógena de Gal-1 em

linfócitos é importante para estabelecer um contato duradouro e estável entre essas células e APCs.

A estrutura fundamental reconhecida por Gal-1 é a unidade de dissacarídeo N-acetil-lactosamina (Gal- β 1-4Glc-NAc) presente em moléculas de superfície dos leucócitos tais como CD2 e integrinas, os quais foram identificados como potenciais receptores para a Gal-1 (183). Dentre a gama de receptores de adesão com potencial participação na adesão célula alvo/célula citotóxica, estão inclusas as β 2-integrinas e CD2, todos acumulados na pSMAC das células ativadas e este pode ser um dos mecanismos em que Gal-1 controle essas interações. As imagens de microscopia two photon descritas nesse trabalho, portanto, sugerem que Gal-1 controla o contato DCs-linfócitos T, mas continua obscuro se esse efeito é via proteínas de adesão. Apesar do observado, a rápida interação entre essas células parece permitir maior perfil de ativação, proliferação e células específicas não deixando de lado o fato de o modelo utilizado para o protocolo de microscopia two photon diferir dos protocolos de proliferação e ativação *in vitro* e do protocolo de citotoxicidade *in vivo* e *in vitro*.

Enfim, entender como funcionam CTLs e NKs e seus componentes expande as possibilidades de tratamentos e expõe novos alvos terapêuticos. Dessa forma, nosso trabalho evidencia mais um potencial componente da maquinaria citotóxica das células citotóxicas, fundamentais na resolução de certas patologias, e insere Gal-1 em um novo contexto no sistema imune.

6 CONCLUSÃO

- Galectina-1 é um dos constituintes dos lisossomos das células citotóxicas.
- Galectina-1 contribui para a total eficácia da função efetora de células TCD8⁺ no modelo de citotoxicidade *in vitro* utilizando o clone de células L1210 e no modelo de imunização com adenovírus 5 humano adenoβgal.
- Galectina-1 regula a via de FASL nas células TCD8⁺ no modelo de imunização com adenovírus 5 humano adenoβgal mas não no modelo de citotoxicidade *in vitro* utilizando o clone de células L1210 e L1210Fas como células alvo.
- A expressão de galectina-1 nos linfócitos T CD8⁺ é importante para o estabelecimento de contato duradouro entre essas células e células dendríticas durante o processo de apresentação de antígenos.

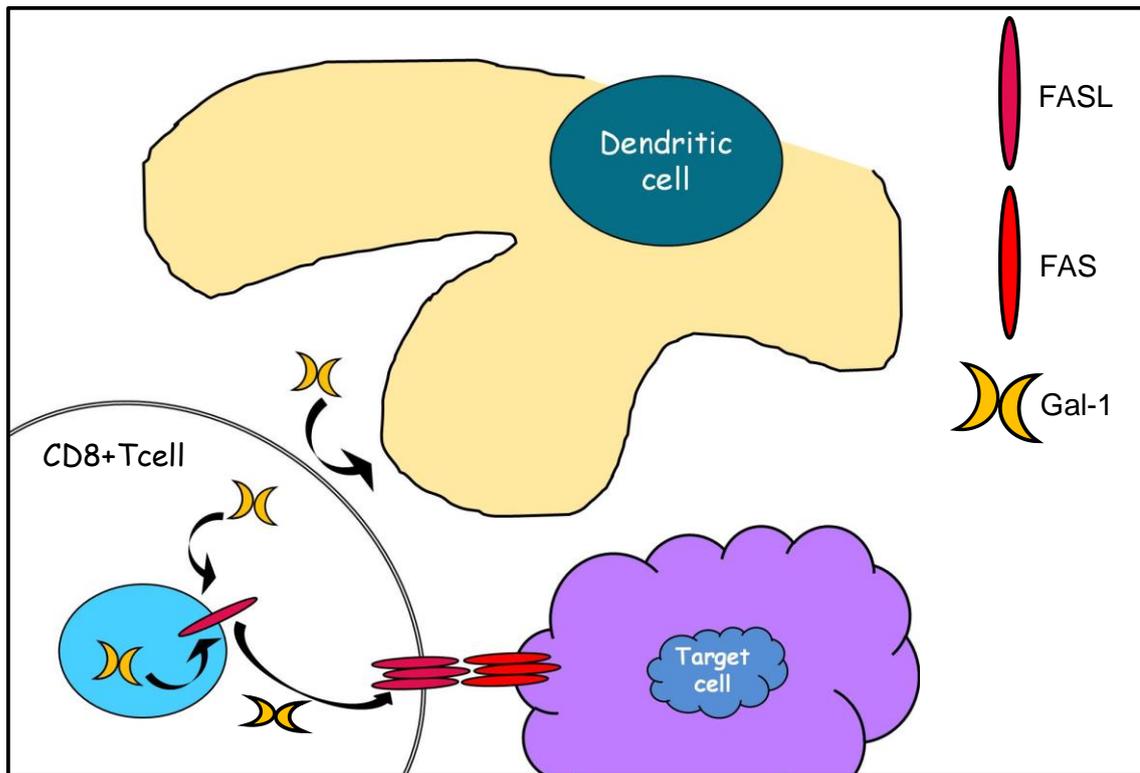


Figura 30 - Galectina-1 é um dos constituintes dos lisossomos das células citotóxicas e contribui para a total eficácia da função efetora de células TCD8⁺ através da regulação da via de FasL. Além disso, a expressão de galectina-1 nos linfócitos T CD8⁺ é importante para o estabelecimento de contato duradouro entre essas células e células dendríticas durante o processo de apresentação de antígenos.

REFERÊNCIAS*

1. Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res.* 2003;90:127-56.
2. Rothstein TL, Mage M, Jones G, McHugh LL. Cytotoxic T lymphocyte sequential killing of immobilized allogeneic tumor target cells measured by time-lapse microcinematography. *J Immunol.* 1978;121(5):1652-6.
3. Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ.* 2008;15(2):226-33.
4. Vivier E, Nunes JA, Vely F. Natural killer cell signaling pathways. *Science.* 2004;306(5701):1517-9.
5. Gregoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E, et al. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev.* 2007;220:169-82.
6. Vyas YM, Maniar H, Dupont B. Visualization of signaling pathways and cortical cytoskeleton in cytolytic and noncytolytic natural killer cell immune synapses. *Immunol Rev.* 2002;189:161-78.
7. Inoue H, Miyaji M, Kosugi A, Nagafuku M, Okazaki T, Mimori T, et al. Lipid rafts as the signaling scaffold for NK cell activation: tyrosine phosphorylation and association of LAT with phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C-gamma following CD2 stimulation. *Eur J Immunol.* 2002;32(8):2188-98.
8. Vyas YM, Mehta KM, Morgan M, Maniar H, Butros L, Jung S, et al. Spatial organization of signal transduction molecules in the NK cell immune synapses during MHC class I-regulated noncytolytic and cytolytic interactions. *J Immunol.* 2001;167(8):4358-67.
9. Orange JS, Harris KE, Andzelm MM, Valter MM, Geha RS, Strominger JL. The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14151-6.
10. Lou Z, Jevremovic D, Billadeau DD, Leibson PJ. A balance between positive and negative signals in cytotoxic lymphocytes regulates the polarization of lipid rafts during the development of cell-mediated killing. *J Exp Med.* 2000;191(2):347-54.
11. Sancho D, Nieto M, Llano M, Rodriguez-Fernandez JL, Tejedor R, Avraham S, et al. The tyrosine kinase PYK-2/RAFTK regulates natural killer (NK) cell cytotoxic response, and is translocated and activated upon specific target cell recognition and killing. *J Cell Biol.* 2000;149(6):1249-62.
12. Bossi G, Trambas C, Booth S, Clark R, Stinchcombe J, Griffiths GM. The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol Rev.* 2002;189:152-60.

*De acordo com:

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

13. Katz P, Zaytoun AM, Lee JH, Jr. Mechanisms of human cell-mediated cytotoxicity. III. Dependence of natural killing on microtubule and microfilament integrity. *J Immunol.* 1982;129(6):2816-25.
14. Carpen O, Virtanen I, Lehto VP, Saksela E. Polarization of NK cell cytoskeleton upon conjugation with sensitive target cells. *J Immunol.* 1983;131(6):2695-8.
15. Kupfer A, Dennert G, Singer SJ. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(23):7224-8.
16. Orange JS, Ramesh N, Remold-O'Donnell E, Sasahara Y, Koopman L, Byrne M, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(17):11351-6.
17. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(11):867-78.
18. Casrouge A, Beaudoin E, Dalle S, Pannetier C, Kanellopoulos J, Kourilsky P. Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol.* 2000;164(11):5782-7.
19. Blattman JN, Antia R, Sourdive DJ, Wang X, Kaech SM, Murali-Krishna K, et al. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med.* 2002;195(5):657-64.
20. Henrickson SE, Mempel TR, Mazo IB, Liu B, Artyomov MN, Zheng H, et al. T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation. *Nat Immunol.* 2008;9(3):282-91.
21. Miller MJ, Wei SH, Parker I, Cahalan MD. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science.* 2002;296(5574):1869-73.
22. Stoll S, Delon J, Brotz TM, Germain RN. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science.* 2002;296(5574):1873-6.
23. Mempel TR, Henrickson SE, Von Andrian UH. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature.* 2004;427(6970):154-9.
24. Purbhoo MA, Irvine DJ, Huppa JB, Davis MM. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol.* 2004;5(5):524-30.
25. Irvine DJ, Purbhoo MA, Krogsgaard M, Davis MM. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature.* 2002;419(6909):845-9.
26. Sykulev Y, Joo M, Vturina I, Tsomides TJ, Eisen HN. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity.* 1996;4(6):565-71.

27. Griffiths GM. Endocytosing the death sentence. *J Cell Biol.* 2003;160(2):155-6.
28. Bossi G, Griffiths GM. CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Semin Immunol.* 2005;17(1):87-94.
29. Tham EL, Mescher MF. Signaling alterations in activation-induced nonresponsive CD8 T cells. *J Immunol.* 2001;167(4):2040-8.
30. Tham EL, Shrikant P, Mescher MF. Activation-induced nonresponsiveness: a Th-dependent regulatory checkpoint in the CTL response. *J Immunol.* 2002;168(3):1190-7.
31. Faroudi M, Utzny C, Salio M, Cerundolo V, Guiraud M, Muller S, et al. Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14145-50.
32. Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature.* 1998;395(6697):82-6.
33. Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity.* 2001;15(5):751-61.
34. Krummel MF, Sjaastad MD, Wulfiging C, Davis MM. Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science.* 2000;289(5483):1349-52.
35. Wulfiging C, Sumen C, Sjaastad MD, Wu LC, Dustin ML, Davis MM. Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nature immunology.* 2002;3(1):42-7.
36. Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, et al. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science.* 2003;302(5647):1041-3.
37. Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science.* 2002;295(5553):338-42.
38. Egawa T, Tillman RE, Naoe Y, Taniuchi I, Littman DR. The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *J Exp Med.* 2007;204(8):1945-57.
39. Setoguchi R, Tachibana M, Naoe Y, Muroi S, Akiyama K, Tezuka C, et al. Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development. *Science.* 2008;319(5864):822-5.
40. Woolf E, Xiao C, Fainaru O, Lotem J, Rosen D, Negreanu V, et al. Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(13):7731-6.

41. Lyubchenko TA, Wurth GA, Zweifach A. Role of calcium influx in cytotoxic T lymphocyte lytic granule exocytosis during target cell killing. *Immunity*. 2001;15(5):847-59.
42. Blott EJ, Griffiths GM. Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(2):122-31.
43. Stinchcombe JC, Griffiths GM. Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:495-517.
44. Cullen SP, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ*. 2008;15(2):251-62.
45. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(12):940-52.
46. Hong W. SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1744(3):493-517.
47. Paumet F, Le Mao J, Martin S, Galli T, David B, Blank U, et al. Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment. *J Immunol*. 2000;164(11):5850-7.
48. Hibi T, Hirashima N, Nakanishi M. Rat basophilic leukemia cells express syntaxin-3 and VAMP-7 in granule membranes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;271(1):36-41.
49. Guo Z, Turner C, Castle D. Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells. *Cell*. 1998;94(4):537-48.
50. Brumell JH, Volchuk A, Sengelov H, Borregaard N, Cieutat AM, Bainton DF, et al. Subcellular distribution of docking/fusion proteins in neutrophils, secretory cells with multiple exocytic compartments. *J Immunol*. 1995;155(12):5750-9.
51. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):107-17.
52. Lutcke A, Olkkonen VM, Dupree P, Lutcke H, Simons K, Zerial M. Isolation of a murine cDNA clone encoding Rab19, a novel tissue-specific small GTPase. *Gene*. 1995;155(2):257-60.
53. Jordens I, Fernandez-Borja M, Marsman M, Dusseljee S, Janssen L, Calafat J, et al. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol*. 2001;11(21):1680-5.
54. Wang T, Hong W. Interorganellar regulation of lysosome positioning by the Golgi apparatus through Rab34 interaction with Rab-interacting lysosomal protein. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4317-32.

55. Delter JC et al. Rab geranylgeranyl transferase ω -mutation in the gunmetal mouse reduces Rab prenylation and platelet synthesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97:4144-9.
56. Stinchcombe JC GG. Normal and abnormal secretion by haemopoietic cells. *Immunology.* 2001;103:10-6.
57. Swank RT, Novak EK, McGarry MP, Zhang Y, Li W, Zhang Q, et al. Abnormal vesicular trafficking in mouse models of Hermansky-Pudlak syndrome. *Pigment Cell Res.* 2000;13 Suppl 8:59-67.
58. Shirakawa R, Higashi T, Kondo H, Yoshioka A, Kita T, Horiuchi H. Purification and functional analysis of a Rab27 effector munc 13-4 using a semi-intact platelet dense-granule secretion assay. *Methods Enzymol.* 2005;403:778-88.
59. Tolmachova T, Abrink M, Futter CE, Authi KS, Seabra MC. Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(14):5872-7.
60. Ward DM, Shiflett SL, Huynh D, Vaughn MB, Prestwich G, Kaplan J. Use of expression constructs to dissect the functional domains of the CHS/beige protein: identification of multiple phenotypes. *Traffic.* 2003;4(6):403-15.
61. Ma JS, Haydar TF, Radoja S. Protein kinase C delta localizes to secretory lysosomes in CD8+ CTL and directly mediates TCR signals leading to granule exocytosis-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 2008;181(7):4716-22.
62. Ma JS, Monu N, Shen DT, Mecklenbrauker I, Radoja N, Haydar TF, et al. Protein kinase Cdelta regulates antigen receptor-induced lytic granule polarization in mouse CD8+ CTL. *J Immunol.* 2007;178(12):7814-21.
63. Cuervo AM, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science.* 1996;273(5274):501-3.
64. Agarraberes FA, Dice JF. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 13):2491-9.
65. Rous BA, Reaves BJ, Ihrke G, Briggs JA, Gray SR, Stephens DJ, et al. Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell.* 2002;13(3):1071-82.
66. Robinson MS, Bonifacino JS. Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(4):444-53.
67. Burkhardt JK, Hester S, Argon Y. Two proteins targeted to the same lytic granule compartment undergo very different posttranslational processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(18):7128-32.
68. Griffiths GM, Isaacs S. Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. *J Cell Biol.* 1993;120(4):885-96.

69. Nakajima H, Park HL, Henkart PA. Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. *J Exp Med*. 1998;181(3):1037-46.
70. Shresta S, Graubert TA, Thomas DA, Raptis SZ, Ley TJ. Granzyme A initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis. *Immunity*. 1999;10(5):595-605.
71. Barry M, Heibein JA, Pinkoski MJ, Lee SF, Moyer RW, Green DR, et al. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol*. 2000;20(11):3781-94.
72. Regner M, Pavlinovic L, Koskinen A, Young N, Trapani JA, Mullbacher A. Cutting edge: rapid and efficient in vivo cytotoxicity by cytotoxic T cells is independent of granzymes A and B. *J Immunol*. 2009;183(1):37-40.
73. Trapani JA, Sutton VR. Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(5):533-43.
74. Podack ER, Hengartner H. Structure of perforin and its role in cytolysis. *Year Immunol*. 1989;6:245-61.
75. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*. 1998;282(5386):121-5.
76. Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, et al. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol*. 1995;154(8):3806-13.
77. Bossi G, Griffiths GM. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med*. 1999;5(1):90-6.
78. He JS, Ostergaard HL. CTLs contain and use intracellular stores of FasL distinct from cytolytic granules. *J Immunol*. 2007;179(4):2339-48.
79. Casey TM, Meade JL, Hewitt EW. Organelle proteomics: identification of the exocytic machinery associated with the natural killer cell secretory lysosome. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6(5):767-80.
80. Stowell SR, Dias-Baruffi M, Penttila L, Renkonen O, Nyame AK, Cummings RD. Human galectin-1 recognition of poly-N-acetyllactosamine and chimeric polysaccharides. *Glycobiology*. 2004;14(2):157-67.
81. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 1183:158-82.
82. Cho M, Cummings RD. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(10):5207-12.

83. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994;76(4):597-8.
84. Outenreath RL, Jones AL. Influence of an endogenous lectin substrate on cultured dorsal root ganglion cells. *J Neurocytol*. 1992;21(11):788-95.
85. Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J*. 2004;19(7-9):441-9.
86. Lohr M, Lensch M, Andre S, Kaltner H, Siebert HC, Smetana K, Jr., et al. Murine homodimeric adhesion/growth-regulatory galectins-1, -2 and -7: comparative profiling of gene/ promoter sequences by database mining, of expression by RT-PCR/immunohistochemistry and of contact sites for carbohydrate ligands by computational chemistry. *Folia Biol (Praha)*. 2007;53(4):109-28.
87. Clerch LB, Whitney P, Hass M, Brew K, Miller T, Werner R, et al. Sequence of a full-length cDNA for rat lung beta-galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin. *Biochemistry*. 1988;27(2):692-9.
88. Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1473(1):172-85.
89. Camby I, Belot N, Lefranc F, Sadeghi N, de Launoit Y, Kaltner H, et al. Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61(7):585-96.
90. Clause N, van den Brule F, Waltregny D, Garnier F, Castronovo V. Galectin-1 expression in prostate tumor-associated capillary endothelial cells is increased by prostate carcinoma cells and modulates heterotypic cell-cell adhesion. *Angiogenesis*. 1999;3(4):317-25.
91. Schafer T, Zentgraf H, Zehe C, Brugger B, Bernhagen J, Nickel W. Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 is mediated by direct translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(8):6244-51.
92. Ahmad N, Gabius HJ, Sabesan S, Oscarson S, Brewer CF. Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *Glycobiology*. 2004;14(9):817-25.
93. Schwarz FP, Ahmed H, Bianchet MA, Amzel LM, Vasta GR. Thermodynamics of bovine spleen galectin-1 binding to disaccharides: correlation with structure and its effect on oligomerization at the denaturation temperature. *Biochemistry*. 1998;37(17):5867-77.
94. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J*. 2004;19(7-9):433-40.
95. Dias-Baruffi M, Zhu H, Cho M, Karmakar S, McEver RP, Cummings RD. Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic

recognition of leukocytes without inducing apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(42):41282-93.

96. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*. 1995;378(6558):736-9.

97. Stowell SR, Arthur CM, Dias-Baruffi M, Rodrigues LC, Gourdine JP, Heimburg-Molinaro J, et al. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. *Nat Med*.16(3):295-301.

98. Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, et al. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med*. 1999;190(3):385-98.

99. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell*. 2004;5(3):241-51.

100. Rabinovich GA, Sotomayor CE, Riera CM, Bianco I, Correa SG. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur J Immunol*. 2000;30(5):1331-9.

101. Correa SG, Sotomayor CE, Aoki MP, Maldonado CA, Rabinovich GA. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. *Glycobiology*. 2003;13(2):119-28.

102. Almkvist J, Dahlgren C, Leffler H, Karlsson A. Activation of the neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase by galectin-1. *J Immunol*. 2002;168(8):4034-41.

103. van der Leij J, van den Berg A, Blokzijl T, Harms G, van Goor H, Zwiars P, et al. Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. *J Pathol*. 2004;204(5):511-8.

104. van der Leij J, van den Berg A, Harms G, Eschbach H, Vos H, Zwiars P, et al. Strongly enhanced IL-10 production using stable galectin-1 homodimers. *Mol Immunol*. 2007;44(4):506-13.

105. Toscano MA, Commodaro AG, Ilarregui JM, Bianco GA, Liberman A, Serra HM, et al. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol*. 2006;176(10):6323-32.

106. Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, Mencarelli A, Palazzetti B, Federici B, et al. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1381-94.

107. Santucci L, Fiorucci S, Cammilleri F, Servillo G, Federici B, Morelli A. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology*. 2000;31(2):399-406.

108. Offner H, Celnik B, Bringman TS, Casentini-Borocz D, Nedwin GE, Vandenberg AA. Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 1990;28(2):177-84.
109. Wang L, Friess H, Zhu Z, Frigeri L, Zimmermann A, Korc M, et al. Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. *Lab Invest.* 2000;80(8):1233-41.
110. Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, Miceli MC. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol.* 2000;165(7):3722-9. Epub 2000/10/18.
111. Vespa GN, Lewis LA, Kozak KR, Moran M, Nguyen JT, Baum LG, et al. Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. *J Immunol.* 1999;162(2):799-806.
112. Rabinovich GA, Alonso CR, Sotomayor CE, Durand S, Bocco JL, Riera CM. Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2. *Cell Death Differ.* 2000;7(8):747-53.
113. Houzelstein D, Goncalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, Cooper DN, Drickamer K, et al. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol Biol Evol.* 2004;21(7):1177-87.
114. Cheung P, Pawling J, Partridge EA, Sukhu B, Grynopas M, Dennis JW. Metabolic homeostasis and tissue renewal are dependent on beta1,6GlcNAc-branched N-glycans. *Glycobiology.* 2007;17(8):828-37.
115. Pace KE, Lee C, Stewart PL, Baum LG. Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol.* 1999;163(7):3801-11.
116. Fajka-Boja R, Szemes M, Ion G, Legradi A, Caron M, Monostori E. Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines. *Immunol Lett.* 2002;82(1-2):149-54.
117. Carlow DA, Williams MJ, Ziltener HJ. Modulation of O-glycans and N-glycans on murine CD8 T cells fails to alter annexin V ligand induction by galectin 1. *J Immunol.* 2003;171(10):5100-6.
118. Galvan M, Tsuboi S, Fukuda M, Baum LG. Expression of a specific glycosyltransferase enzyme regulates T cell death mediated by galectin-1. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275(22):16730-7.
119. Kopitz J, von Reitzenstein C, Burchert M, Cantz M, Gabius HJ. Galectin-1 is a major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on human neuroblastoma cells in culture. *The Journal of biological chemistry.* 1998;273(18):11205-11.
120. Jameson SC. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(8):547-56.

121. Andre S, Kaltner H, Furuike T, Nishimura S, Gabius HJ. Persubstituted cyclodextrin-based glycoclusters as inhibitors of protein-carbohydrate recognition using purified plant and mammalian lectins and wild-type and lectin-gene-transfected tumor cells as targets. *Bioconjug Chem.* 2004;15(1):87-98.
122. Kopitz J, von Reitzenstein C, Andre S, Kaltner H, Uhl J, Ehemann V, et al. Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(38):35917-23.
123. Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, Baum LG. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J Exp Med.* 1997;185(10):1851-8.
124. Stowell SR, Karmakar S, Stowell CJ, Dias-Baruffi M, McEver RP, Cummings RD. Human galectin-1, -2, and -4 induce surface exposure of phosphatidylserine in activated human neutrophils but not in activated T cells. *Blood.* 2007;109(1):219-27.
125. Toscano MA, Bianco GA, Illarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nature immunology.* 2007;8(8):825-34.
126. Deeths MJ, Kedl RM, Mescher MF. CD8+ T cells become nonresponsive (anergic) following activation in the presence of costimulation. *J Immunol.* 1999;163(1):102-10.
127. Liu SD, Tomassian T, Bruhn KW, Miller JF, Poirier F, Miceli MC. Galectin-1 tunes TCR binding and signal transduction to regulate CD8 burst size. *J Immunol.* 2009;182(9):5283-95. Epub 2009/04/22.
128. Kessel D. Some determinants of camptothecin responsiveness in leukemia L1210 cells. *Cancer research.* 1971;31(12):1883-7. Epub 1971/12/01.
129. Kessel D. Transport and accumulation of triazenoimidazoles by L1210 cells. *Cancer research.* 1971;31(2):135-9. Epub 1971/02/01.
130. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med.* 1997;185(2):317-28. Epub 1997/01/20.
131. Machado AV, Cardoso JE, Claser C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O. Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther.* 2006;17(9):898-908. Epub 2006/09/16.
132. Tzelepis F, Persechini PM, Rodrigues MM. Modulation of CD4(+) T cell-dependent specific cytotoxic CD8(+) T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. *PLoS One.* 2007;2(4):e393. Epub 2007/04/27.

133. Rigato PO, de Alencar BC, de Vasconcelos JR, Dominguez MR, Araujo AF, Machado AV, et al. Heterologous plasmid DNA prime-recombinant human adenovirus 5 boost vaccination generates a stable pool of protective long-lived CD8(+) T effector memory cells specific for a human parasite, *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 79(5):2120-30.
134. Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL, Patterson RJ. Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic acids research.* 2001;29(17):3595-602.
135. Cui W, Kaech SM. Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev.* 236:151-66.
136. Oehen S, Brduscha-Riem K. Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division. *J Immunol.* 1998;161(10):5338-46.
137. Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Gazzinelli RT, Persechini PM, Rodrigues MM. Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. *Infect Immun.* 2006;74(4):2477-81.
138. Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Claser C, Machado AV, Bruna-Romero O, et al. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. *J Immunol.* 2008;180(3):1737-48.
139. Oukka M, Cohen-Tannoudji M, Tanaka Y, Babinet C, Kosmatopoulos K. Medullary thymic epithelial cells induce tolerance to intracellular proteins. *J Immunol.* 1996;156(3):968-75.
140. Barber DL, Wherry EJ, Ahmed R. Cutting edge: rapid in vivo killing by memory CD8 T cells. *J Immunol.* 2003;171(1):27-31.
141. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med.* 2000;191(5):771-80.
142. Becker TC, Wherry EJ, Boone D, Murali-Krishna K, Antia R, Ma A, et al. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med.* 2002;195(12):1541-8.
143. Tan JT, Ernst B, Kieper WC, LeRoy E, Sprent J, Surh CD. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J Exp Med.* 2002;195(12):1523-32.
144. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science.* 2003;300(5617):337-9.
145. Sun JC, Bevan MJ. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science.* 2003;300(5617):339-42.

146. Kaech SM, Wherry EJ. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity*. 2007;27(3):393-405.
147. Hernandez J, Aung S, Redmond WL, Sherman LA. Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J Exp Med*. 2001;194(6):707-17.
148. Mescher MF, Agarwal P, Casey KA, Hammerbeck CD, Xiao Z, Curtsinger JM. Molecular basis for checkpoints in the CD8 T cell response: tolerance versus activation. *Semin Immunol*. 2007;19(3):153-61.
149. Tham EL, Mescher MF. The poststimulation program of CD4 versus CD8 T cells (death versus activation-induced nonresponsiveness). *J Immunol*. 2002;169(4):1822-8.
150. Stambas J, Doherty PC, Turner SJ. An in vivo cytotoxicity threshold for influenza A virus-specific effector and memory CD8(+) T cells. *J Immunol*. 2007;178(3):1285-92.
151. Takai S, Sabzevari H, Farsaci B, Schlom J, Greiner JW. Distinct effects of saracatinib on memory CD8+ T cell differentiation. *J Immunol*. 188(9):4323-33.
152. Green DR. Fas Bim boom! *Immunity*. 2008;28(2):141-3.
153. Chesnutt MS, Finck BK, Killeen N, Connolly MK, Goodman H, Wofsy D. Enhanced lymphoproliferation and diminished autoimmunity in CD4-deficient MRL/lpr mice. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998;87(1):23-32.
154. Rieux-Laucat F, Fischer A, Deist FL. Cell-death signaling and human disease. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(3):325-31.
155. Bidere N, Su HC, Lenardo MJ. Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:321-52.
156. Huang JF, Yang Y, Sepulveda H, Shi W, Hwang I, Peterson PA, et al. TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science*. 1999;286(5441):952-4.
157. Hudrisier D, Riond J, Mazarguil H, Gairin JE, Joly E. Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner. *J Immunol*. 2001;166(6):3645-9.
158. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of immunological methods*. 2003;281(1-2):65-78. Epub 2003/10/29.
159. Cruz-Guilloty F, Pipkin ME, Djuretic IM, Levanon D, Lotem J, Lichtenheld MG, et al. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J Exp Med*. 2009;206(1):51-9.

160. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews*. 2008;9(3):231-41.
161. Adam-Klages S, Adam D, Janssen O, Kabelitz D. Death receptors and caspases: role in lymphocyte proliferation, cell death, and autoimmunity. *Immunologic research*. 2005;33(2):149-66.
162. Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(15):10932-7.
163. Matarrese P, Tinari A, Mormone E, Bianco GA, Toscano MA, Ascione B, et al. Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(8):6969-85. Epub 2004/11/24.
164. Moreau HD, Lemaitre F, Terriac E, Azar G, Piel M, Lennon-Dumenil AM, et al. Dynamic in situ cytometry uncovers T cell receptor signaling during immunological synapses and kinapses in vivo. *Immunity*. 2012;37(2):351-63. Epub 2012/06/12.
165. Hugues S, Fetler L, Bonifaz L, Helft J, Amblard F, Amigorena S. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol*. 2004;5(12):1235-42. Epub 2004/11/02.
166. Celli S, Day M, Muller AJ, Molina-Paris C, Lythe G, Bousso P. How many dendritic cells are required to initiate a T-cell response? *Blood*. 2012;120(19):3945-8. Epub 2012/09/22.
167. Wong P, Pamer EG. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:29-70.
168. Pardo J, Aguilo JI, Anel A, Martin P, Joeckel L, Borner C, et al. The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes Infect*. 2009;11(4):452-9.
169. Lettau M, Schmidt H, Kabelitz D, Janssen O. Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol Lett*. 2007;108(1):10-9.
170. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*. 1968;14(2):181-96.
171. Barchet W, Oehen S, Klenerman P, Wodarz D, Bocharov G, Lloyd AL, et al. Direct quantitation of rapid elimination of viral antigen-positive lymphocytes by antiviral CD8(+) T cells in vivo. *Eur J Immunol*. 2000;30(5):1356-63.
172. Stowell SR, Karmakar S, Arthur CM, Ju T, Rodrigues LC, Riul TB, et al. Galectin-1 induces reversible phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Mol Biol Cell*. 2009;20(5):1408-18.

173. Fischer K, Voelkl S, Berger J, Andreesen R, Pomorski T, Mackensen A. Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8+ T cells. *Blood*. 2006;108(13):4094-101.
174. He J, Baum LG. Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(6):4705-12.
175. Trambas CM, Griffiths GM. Delivering the kiss of death. *Nature immunology*. 2003;4(5):399-403.
176. Stinchcombe JC, Majorovits E, Bossi G, Fuller S, Griffiths GM. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature*. 2006;443(7110):462-5.
177. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 2002;417(6884):95-8. Epub 2002/05/03.
178. Tenne-Brown J, Puche AC, Key B. Expression of galectin-1 in the mouse olfactory system. *Int J Dev Biol*. 1998;42(6):791-9.
179. McGraw J, Gaudet AD, Oschipok LW, Steeves JD, Poirier F, Tetzlaff W, et al. Altered primary afferent anatomy and reduced thermal sensitivity in mice lacking galectin-1. *Pain*. 2005;114(1-2):7-18.
180. Paushkin S, Gubitza AK, Massenet S, Dreyfuss G. The SMN complex, an assemblysome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14(3):305-12.
181. Vyakarnam A, Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol*. 1997;17(8):4730-7.
182. Ilarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, et al. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nature immunology*. 2009;10(9):981-91. Epub 2009/08/12.
183. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*. 2006;16(11):137R-57R. Epub 2006/07/15.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Lista das proteínas mais abundantes identificadas nos grânulos das CTLs

Tabela 1. Lista das proteínas mais abundantes identificadas nos preparados das amostras dos grânulos das CTLs em 1D-SDS-PAGE. A maioria das bandas visualizadas no 1D SDS-PAGE marcadas com Coomassie Blue foram cortadas do gel e submetidas a digestão por tripsina no gel e análise MS/MS. Devido a complexidade das amostras, como cada banda provavelmente contém muitas proteínas diferentes, somente proteínas com alta pontuação no MS-Fit, cobertura dos peptídeos acima de 35% e um número significativo de pareamento de peptídeos foram selecionados nessa primeira pesquisa. Trinta e nove proteínas foram, portanto, nomeadas como as proteínas mais abundantes em nossa fração de grânulos das CTLs, incluindo as esperadas perforina e as granzimas A, B, C, E, F e G.

<i>Protein ID</i>	<i>Accession nr</i>	<i>MW/pI</i>	<i>Coverage</i>	<i>Matched peptides</i>
Heat shock protein HSP90-beta (TSTA)	P11499	83,326/5.0	42%	24
NEDD1 protein	P33215	72,970/8.3	23%	11
BIP/GRP78	P20029	72,423/5.1	59%	38
Heat-shock cognate 71kDa protein	P08109	70,872/5.4	50%	36
Perforin	P10820	62,082/8.4	39%	25
T-complex protein 1/TCP-1 theta/CCT-theta	P42932	59,556/5.4	37%	17
Zinc finger protein 94 (Zfp-94)	Q9Z1D9	59,156/7.8	35%	18
Pyruvate kinase, M2 isozyme	P52480	57,888/7.2	50%	31
protein disulfide isomerase A3 precursor (ERp60)	P27773	56,622/6.0	46%	23
Alpha enolase/Enolase-1	P17182	47,141/6.4	55%	27
DNase gamma/DHP2/LS-DNase/DNase I-like 3	O55070	35,760/8.9	40%	14
Purine nucleoside phosphorylase/Inosine phosphorylase	P23492	32,277/5.8	54%	18
Granzyme A precursor/TSP-1/CTLA-3	P11032	28,599/9.5	61%	19
Phosphomannomutase 2 (PMM 2)	Q9Z2M7	27,657/6.0	61%	15
Granzyme F precursor/MCSP-3/CCP4	P08883	27,643/9.9	40%	11
Granzyme E precursor/CCP3	P08884	27,494/9.7	49%	13
Granzyme B/CTLA-1/CCP1	P04187	27,470/9.8	50%	15
Granzyme G precursor/MCSP-1	P13366	27,381/9.6	61%	13
Granzyme C/CCP2	P08882	27,311/9.3	62%	17
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 (UCH-L1)	Q9R0P9	24,838/5.1	40%	10
Ras-related Rab-17	P35292	23,640/5.4	39%	7
Ras-related protein Rab-2A	P53994	23,548/6.1	57%	9
PPIase precursor/Rotamase/Cyclophilin B	P24369	22,713/9.5	56%	15
Peroxiredoxin 1 (thioredoxin peroxidase 2)	P35700	22,177/8.3	41%	9
60S ribosomal protein L9	P51410	21,882/10	58%	12
Ferritin light chain 1	P29391	20,803/5.7	46%	7
Adenine phosphoribosyltransferase/APRT	P08030	19,763/6.3	58%	9
Translationally controlled tumor protein (TCTP)	P14701	19,462/4.8	42%	12
40S ribosomal protein S10	P09900	18,916/10.2	70%	14
Cofilin	P18760	18,560/8.2	69%	12
PPIase/Rotamase/Cyclophilin A	P17742	17,972/7.7	45%	12
40S ribosomal protein S16	P14131	16,356/10.2	68%	11
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	P08228	15,943/6.0	54%	9
Myosin light chain alkali (MLC3nm)	Q60605	15,731/4.8	62%	8
Cystatin C	P21460	15,531/9.2	53%	6
Profilin I	P10924	14,957/8.5	46%	8
Galactin-1	P10812	14,866/5.3	62%	10
Histone H2A	P22752	14,182/10.9	63%	7
Histone H2B	P10854	13,936/10.3	65%	18

APÊNDICE B – Lista das proteínas dos grânulos das CTLs

Tabela 2. **Lista de proteínas identificadas por eletroforese 2D.** Para maximizar a identificação das proteínas presentes em nossa fração de grânulo, nós separamos as amostras por 2D-SDS-PAGE, usando diferentes gradientes de PI. Contando que a maioria das granzimas são básicas e se incluem, tanta quanto nós sabemos, os constituintes mais abundantes dos grânulos secretórios, não foi uma surpresa descobrir que uma grande quantidade das proteínas não foram separadas por focalização isoelétrica em gradientes de pI 3-6 e pI 5-8. De fato, uma forte marcação foi sempre detectada em uma borda muito básica nos géis com os PI de 3-6 e 5-8 (dados não mostrados). Embora tenha sido corrido muitos géis 2D-SDS-PAGE com PI 7-10, nenhum trouxe uma boa resolução das proteínas básicas dos grânulos citotóxicos. Então, nós não fomos capazes de isolar bandas únicas das proteínas básicas. Contudo, por amostragem consistente na borda de base de ambos os géis de PI 3-6 e 5-8, nós identificamos com sucesso as granzimas, tão bem quanto às outras proteínas tais como ciclofilinas A e B e NUDIX.

Table II - List of proteins identified by 2D-electrophoresis					
Spot	Protein ID	Accession nº	MW/pI	Coverage	Matched peptides
1	β -spectrin/fodrin	Q62261	274425/5.7	27%	65
2	*BIP/GRP78	P20029	72423/5.1	54%	26
3	*Heat-shock cognate 71kDa protein	P08109	70872/5.4	36%	20
4	75 kDa glucose regulated protein (GRP 75)/Mortalin	P38647	73529/5.9	19%	8
5	Vimentin	P20152	53688/5.1	21%	12
6	Calreticulin/calregulin/ERP60	NP_031617	48136/4.33	53%	24
7	Calreticulin/calregulin/ERP60	NP_031617	48136/4.33	54%	23
8	*Disulfide isomerase ER-60	P27773	56622/6.0	42%	20
9	Angiopoietin-related protein 2 precursor	Q9R045	57119/7.3	20%	7
10	*Alpha enolase/Enolase-1	P17182	47453/6.4	76%	34
11	*Alpha enolase/Enolase-1	P17182	47453/6.4	45%	18
12	Cathepsin D precursor	P18242	44954/6.7	34%	13
13	Cathepsin D precursor	P18242	44954/6.7	34%	12
14	β -actin	NP_001092	42052/5.29	42%	12
15	Aldose reductase	P45376	35733/6.7	24%	7
16	NUDIX	NP_705789	35623/9.15	38%	13
17	*Granzyme E	P08884	27494/9.7	26%	5
18	*Granzyme A/CTLA-3/TSP-1	P11032	28599/9.5	41%	9
19	*Granzyme A/CTLA-3/TSP-1	P11032	28599/9.5	57%	17
20	*Granzyme A/CTLA-3/TSP-1	P11032	28599/9.5	46%	10
21	Chloride intracellular channel protein 1/NCC27/p64 CLCP	Q9Z1Q5	27013/5.1	44%	9
22	Chloride intracellular channel protein 1/NCC27/p64 CLCP	Q9Z1Q5	27013/5.1	39%	9
23	Proteasome subunit alpha type 1/Macropain subunit C2	Q9R1P4	29547/6.0	34%	9
24	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3 (UCH-L3)	Q9JK81	26152/5.0	43%	7
25	Phosphoglycerate mutase 1/PGAM-B	Q9DBJ1	28832/6.7	59%	13
26	*Granzyme C/CCP2	P08882	27311/9.3	75%	25
27	Triosephosphate isomerase/TIM	P17751	26713/6.9	48%	13
28	Triosephosphate isomerase/TIM	P17751	26713/6.9	40%	9
29	*Translationally controlled tumor protein (TCTP)	P14701	19462/4.8	37%	8
30	*Translationally controlled tumor protein (TCTP)	P14701	19462/4.8	44%	12
31	*Adenine phosphoribosyltransferase/APRT	P08030	19763/6.3	58%	8
32	*Granzyme B/CTLA-1/CCP1	P04187	27470/9.8	30%	7
33	MAPK 9/JNK2	Q9WTV6	48190/5.6	21%	9
34	Nucleoside diphosphate kinase B (NDK B)/ NM23-M2	Q01768	17363/7.0	68%	9
35	Partitioning defective-6 homolog gamma/PAR6A	Q9JK84	42341/7.4	14%	4
36	PCNA/cyclin ?	P17918	28785/4.7	16%	5
	phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP)	P70296	20831/5.2	55%	7
	*PPase/Rotamase/Cyclophilin A	P17742	17972/7.7	50%	9
	*Pyruvate kinase, M2 isozyme	P52480	57888/7.2	17%	8
	Ras-related protein Rab-18??	P35293	23035/5.2	34%	6
	Ras-related protein Rab-5A??	Q9CQD1	23599/8.3	32%	6
	Serine protease inhibitor A3K/Serpin A3K/Contrapsin	P07759	46880/5.1	14%	4
	*Superoxide dismutase [Cu-Zn]	P08228	15943/6.0	57%	10
	Trangelin 2	Q9WVA4	23597/6.6	34%	7

* Also identified by 1D-electrophoresis

APÊNDICE C – *In vivo* assessment of specific cytotoxic T lymphocyte killing

Methods 61 (2013) 105–109



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymeth



In vivo assessment of specific cytotoxic T lymphocyte killing

T. Clemente^{a,b}, M.R. Dominguez^{c,d}, N.J. Vieira^{a,b}, M.M. Rodrigues^{c,d}, G.P. Amarante-Mendes^{a,b,*}

^a Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Instituto de Investigação em Imunologia, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), Brazil

^c Centro de Terapia Celular e Molecular (CTC-Mol), Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

^d Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 27 February 2013

Keywords:

In vivo cytotoxic assay

CTLs

TCD8+ cells

CFSE

Human recombinant replication-deficient adenovirus 5

Adenoβgal

ABSTRACT

The direct killing of target cells by cytotoxic T lymphocytes (CTLs) plays a fundamental role in protective immunity to viral, bacterial, protozoan and fungi infections, as well as to tumor cells. *In vivo* cytotoxic assays take into account the interaction of target and effector cells in the context of the proper microenvironment making the analysis biologically more relevant than *in vitro* cytotoxic assays. Thus, the development, improvement and validation of *in vivo* methods are necessary in view of the importance of the results they may provide. We describe and discuss in this manuscript a method to evaluate *in vivo* specific cytotoxic T lymphocyte killing. We used as model system mice immunized with human recombinant replication-deficient adenovirus 5 (HAd5) containing different transgenes as the trigger of a CTL-mediated immune response. To these mice, we adoptively transferred syngeneic cells labeled with different vital fluorescent dyes. Donor cells were pulsed (target) or not (control non-target) with distinct CD8 T-cell epitopes, mixed in a 1:1 ratio and injected *i.v.* into immunized or non-immunized recipient mice. After 18–24 h, spleen cells are collected and analysed by flow cytometry. A deviation from the 1:1 ratio of control and target cell populations indicates antigen specific lysis of target cells.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cellular cytotoxicity is the main effector mechanism of CD8+ T cells (also known as CTLs-cytotoxic T lymphocytes) constituting an important weapon against cancer and pathogen-infected cells. The scientific and technological advances in the last couple of decades have improved the analysis of CTL activation, differentiation and effector function. The classical test to assess cellular cytotoxicity is the radioactive chromium (⁵¹Cr) release assay, which was developed in 1968 by Brunner and colleagues based on binding and internalization of radioisotopes by target cells [1]. The development of the enzyme-linked immunosorbent spot assays (ELISPOT) and the construct of multimeric MHC molecules plus particular peptides improved the detection and characterization of antigen-specific T cells. However, *in vitro* and *ex vivo* analysis are less informative than *in vivo* assays since they do not take into account the complexity of the microenvironment where the immune response occurs and, therefore, do not always reproduce what occurs *in vivo*.

For instance, it was observed that even after 300 days of exposure to viral agent, 84% of target cells transferred were eliminated *in vivo*, while negative results were observed *in vitro* or *ex vivo* [2]. In addition, several paradigms based on *in vitro* studies were dismissed or at least reformulated after *in vivo* experiments. In this case, the results showed that absence of granzymes A and B impair *in vitro* CTL killing [3]. The same authors showed later that mice deficient in both granzymes A and B are able to eliminate target cells *in vivo* as quickly and in a similar manner than wild-type mice without using any compensatory mechanisms, such as increased expression of orphan granzymes or FAS–FASL interactions [3]. Thus, *in vivo* assays have been gaining more and more attention as important tools to comprehensively evaluate CTL-mediated immune responses.

The *in vivo* CTL assay we describe here was first proposed by Oehen and colleagues [4] and is based on inoculation of immunized or infected mice with a 1:1 proportion of labeled syngeneic spleen cells, where one population is pulsed with a peptide for which the specific CTLs response will be analyzed. The presence of labeled cells in the spleen of the recipient mice is evaluated after different periods of time by flow cytometry. We detail the procedure and analysis of the *in vivo* CTL assay using a model of genetic immunization using as vector human recombinant replication-

* Corresponding author. Address: Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 1730 – Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-900, Brazil. Fax: +55 11 3091 7224.

E-mail address: gpam@usp.br (G.P. Amarante-Mendes).

deficient adenovirus 5 (HAd5) containing different transgenes and discuss the use and limitations of this test.

2. Immunization with recombinant adenoviruses

Adenoviruses have several characteristics that make them excellent candidates for use as gene delivery system (or vectors) to induce specific immune responses [5]. Adenoviruses exert an adjuvant-like effect by stimulating the innate immune system via both Toll-like receptors (TLR)-dependent and -independent mechanisms [6]. Inoculation of adenoviruses triggers a characteristic immune response based on the development of neutralizing antibodies and CTLs, aiming to neutralize the extracellular viral particles and attack the virus-infected cells, respectively [7,8]. To illustrate the analysis of specific CTL responses *in vivo*, C57Bl/6 mice were immunized or not *l.m.* with 2×10^8 PFU (plaque forming unit) of HAd5 expressing the β -galactosidase gene (Ad β -gal), in a total volume of 100 μ l (50 μ l was injected into the left and 50 μ l into the right Tibialis anterioris muscle). Alternatively, A/Sn mice were immunized with HAd5 expressing the Amastigote Surface Protein (ASP)-2 of *Trypanosoma cruzi* [9] or the AdTAWETGQA [10]. The dose and the route of immunization were the same as described above for Ad β -gal.

3. Processing of target cells

Once a CTL bearing a specific TCR finds a cognate peptide associated with a MHC class I molecule on the surface of a target cell, the CTL become activated and can kill the target cell. Normally, cytosolic proteins are processed by the proteasome, generating peptides that are transported to the endoplasmic reticulum (ER) via a "pore" formed by TAP-1 and TAP-2 (TAP: transporter associated with antigen processing) proteins. There, the peptides associate with nascent MHC class I molecules and the peptide-MHC complexes migrate to the plasma membrane. In our protocol, we directly load specific peptides into MHC class I-expressing splenocytes (see below). Considering that all nucleated cells express MHC class I on its surface and splenocytes are relatively easy to obtain in great numbers and to trace *in vivo*, syngeneic splenocytes have been used as targets for the *in vivo* CTL assay. To obtain the splenocytes, wild type or FAS-deficient, *lpr* C57Bl/6 (MHC class I H2-K^b), or A/Sn (MHC class I H2-K^a) mice were sacrificed in CO₂ chamber followed by cervical dislocation (procedures used in all experiments described here were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo). With the aid of sterile surgical material, spleens were removed and placed into tissue culture plates containing 4 ml RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (RPMI-10). Next, splenocytes suspensions were prepared by gently macerating the spleens with the aid of a 5 ml syringe plunger. Samples were either transferred to 15 ml conical tubes and incubated for 15 min at 4 °C to decant tissue debris or subjected to a cell strainer (Becton Dickinson). After this step, single cell suspensions were centrifuged at 300g for 10 min at 4 °C. Supernatants were carefully discarded and pellets were gently mixed and resuspended in 1 ml of hypotonic solution (0.15 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 mM Na EDTA, pH 7.2–7.3) per spleen to lyse red blood cells. After 2 min incubation, 4 ml of RPMI-10 were added for each 1 ml of the cell suspensions and samples were centrifuged again. Finally, pellets were gently resuspended in 1 ml of RPMI-10 per spleen and cell concentration and viability evaluated by trypan blue staining in a Neubauer hemocytometer. At this point it is important to put aside $2.5\text{--}10 \times 10^5$ cells that will be used as a negative control for the flow cytometry analysis of the splenocyte staining (see below).

4. Labeling control and target cells with CFSE

To prepare the populations of target and control cells, splenocytes obtained as described above were divided into two tubes containing 5×10^7 cells/ml and labeled with pre-warmed (10 min, 37 °C) CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl diester – Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) at either 1 μ M (CFSE^{low}) or 10 μ M (CFSE^{high}) of the fluorescent dye in PBS. Splenocyte suspensions should be homogenized well, incubated at 37 °C for 15 min and centrifuged at 300g for and 10 min at 4 °C. Supernatants were discarded and pellets gently released before resuspended in pre-warmed (37 °C) RPMI-10. Splenocyte suspensions were adjusted to a concentration of 2.5×10^7 cells/ml. It is important to mention that other staining reagent, such as Cell Trace Violet Cell Proliferation Kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), PKH26 (Sigma-Aldrich), PKH67 (Sigma-Aldrich) and CellVue® Clar-et (Sigma-Aldrich), can be used in place of or in association to CFSE.

5. Pulse target cells with specific peptides

As mentioned above, CTL will only kill target cells bearing the specific peptide associated with self-MHC class I molecules. In the study described here, the target CFSE^{high} cells were pulsed with 1 μ g/ml of the H2-K^b restricted ICPMYARV peptide, a representative β -Gal epitope (β -Gal 497–504) [11], for 40 min at 37 °C (protected from light), while the control CFSE^{low} cells remained unpulsed or were pulsed with an irrelevant peptide (PA8-VNHRFTLV). Alternatively, in the case of A/Sn mice, cells were pulsed with 1 μ g/ml of H-2K^a restricted TEWETGQI, PETLGHEI or YEIVAGYI from ASP-2 [10]. After cell-tracer and peptide labeling, cells were centrifuged at 300g for 10 min at 4 °C, washed twice in 5 ml of fresh RPMI-10 and finally resuspended in 1 ml of fresh RPMI-10. At this point it is important to re-evaluate cell concentration and viability, which needs to be equal or higher than 95%.

6. Injection of labeled cells in mice

In procedures requiring the delivery of agents intravascularly in mice, it is common to use one of the lateral tail veins. However, this can be technically tricky and there is a high risk of failure. Retro-orbital injections are considered by many a more humane alternative and easier to perform [12]. Thus, we suggest the retro-orbital route to inoculate the CFSE-labeled cells. Briefly, each mouse received a mixture of 2×10^7 CFSE^{low} and 2×10^7 CFSE^{high} cells in a total volume of 200 μ l of RPMI-1640 without serum. Animals were properly anesthetized before the injection. After 16–20 h, mice were sacrificed in CO₂ chamber, followed by cervical dislocation and their spleens removed and processed for flow cytometry.

7. Flow cytometry analysis/specificity of the immune response

Initially, we illustrated the specificity of this assay and its dependence on CD8 T cells by evaluating *in vivo* specific CTL response after immunization with HAd5 wild type and CD8 KO C57Bl/6 mice. To obtain back the injected CFSE^{low} and CFSE^{high} cells, splenocytes were prepared from the injected mice accordingly to the same procedure described above. Single-cell suspensions were washed three times in RPMI-10 and fixed with 1.0% paraformaldehyde. At least 100,000 events were acquired on a FACSCanto flow cytometer (Becton Dickinson) and then analyzed with FlowJo (TreeStar). Samples were analyzed using the following gate strategies: FSC-A \times FSC-H to exclude doublets, then FSC-A (or FSC-H) \times SSC-A to exclude debris and finally SSC-A \times CFSE (Fig. 1). CFSE^{low} cells represent non-target controls and were always pres-

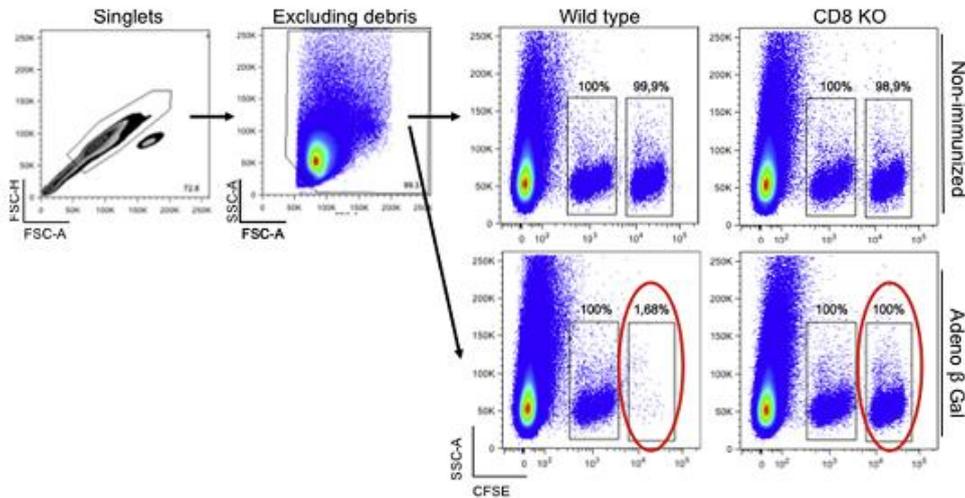


Fig. 1. *In vivo* killing of target cells depend on CD8 lymphocytes. Wild type and CD8KO C57Bl/6 mice were immunized or not with Ad5βGal *Lm*. Seven days later, *in vivo* cytotoxic activity was estimated by injecting each mouse with syngeneic CFSE-labeled splenocytes coated with or without 1 μg/ml of the specific peptide (ICP). Results are expressed as means of three mice per group and are representative of experiments performed at least three times with similar results.

ent in both immunized and non-immunized mice at the same extent. Target CFSE^{high} cells were located on the right of the CFSE^{low} cells in non-immunized mice or in CD8 KO mice, but were absent or in lower numbers in immunized and fully immunocompetent mice (Fig. 1). The total dose of antigen used during the immunization procedure and the level of infection are important factors that determine the degree of the *in vivo* CTL response (data not shown).

To prove the specificity of the CTL response, we compared the presence of CFSE^{high} cells pulsed with either the specific peptide (ICP) or an unrelated peptide (PA8). As expected, we observed the disappearance of the CFSE^{high} cells only when they were loaded with the specific peptide and injected in immunized mice (Fig. 2). CFSE^{high} cells loaded with the unrelated peptide remain at the same frequency as the CFSE^{low} non-target cells (Fig. 2).

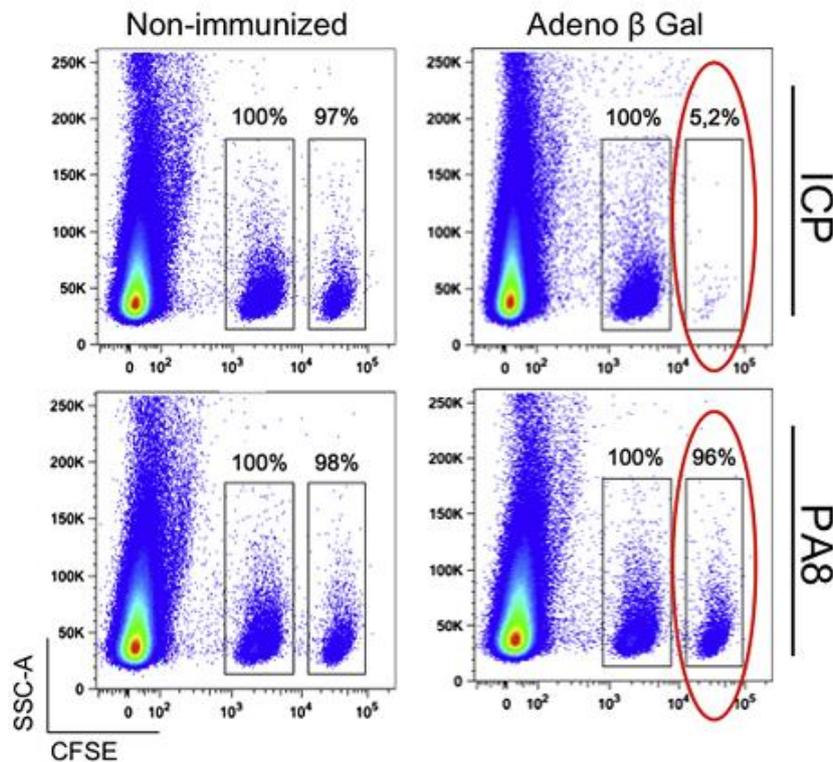


Fig. 2. *In vivo* CTL killing of target cells is antigen-specific. Wild type C57Bl/6 mice were immunized or not with Ad5βGal *Lm*. Seven days later, *in vivo* cytotoxic activity was estimated by injecting each mouse with syngeneic CFSE-labeled splenocytes with or without 1 μg/ml of the specific ICP or the irrelevant PA8 peptides. Results are expressed as means of three mice per group and are representative of experiments performed twice with similar results.

8. Combined use of other dyes

Other dyes may be used as alternative to or in parallel with CFSE. Among the various commercially available vital markers we show here the results with Cell Trace Violet dye (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). The labeling consists in a protocol similar to that of CFSE. Non target cells were labeled with 1 μ M of CFSE and the target cell population labeled with 5 μ M of Cell Trace Violet. As expected, we observed the disappearance of the cell trace violet-positive cells only when they were loaded with the specific peptide and injected in immunized mice (Fig. 3). The CFSE non-target cells remained at the same frequency in the immunized and non-immunized mice (Fig. 3).

The use of a second marker in addition to the CFSE allows, for instance, to compare the CTL responses to different epitopes. This type of analysis has gained much importance for the investigation of immunodominance, since it allows to determine the hierarchy of CTL responses to dominant and subdominant epitopes induced by

the same infection or vaccination in a given mouse. On the one hand, CTL responses against subdominant epitopes have been shown to exist in some infections and to contribute to the resistance against pathogens. On the other hand, dominant epitopes available in recombinant vaccine vectors may restrict the response to the transgene. Another marker that can be used is the PKH26, a lipophilic cell tracking dye (PKH26GL-kit, Sigma). In this case, splenocytes were separated in three equal portions and labeled with CFSE^{high} and CFSE^{low}, as described above, and with 10 μ M of PKH26 diluent C. After labeling, the three samples were washed and the CFSE^{high} pulsed with 1 μ g/ml of the peptide representing one epitope and the PKH26-labeled population pulsed with 1 μ g/ml of the peptide representing a second epitope. The cell populations were mixed at 1:1:1 ratio, centrifuged, resuspended in RPMI-10 and injected intravenously in immunized or non-immunized mice. After 16–20 h, spleens were processed as described above and samples were analyzed by flow cytometry. Fig. 4 represents the results with A/Sn (H-2^a) mice genetically vaccinated with

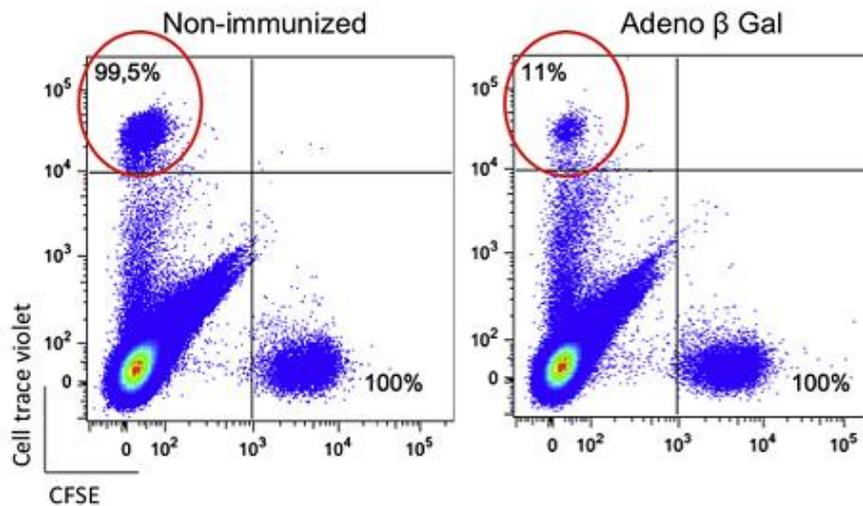


Fig. 3. *In vivo* CTL assay with two different vital fluorescent dyes. Wild type C57Bl/6 mice were immunized or not with Ad5 β Gal *i.m.* Seven days later, *in vivo* cytotoxic activity was estimated by injecting each mouse with a mixture of unpulsed control CFSE-labeled and 1 μ g/ml ICP-pulsed cell trace violet-labeled syngeneic splenocytes. Results are expressed as means of three mice per group and are representative of experiments performed twice with similar results.

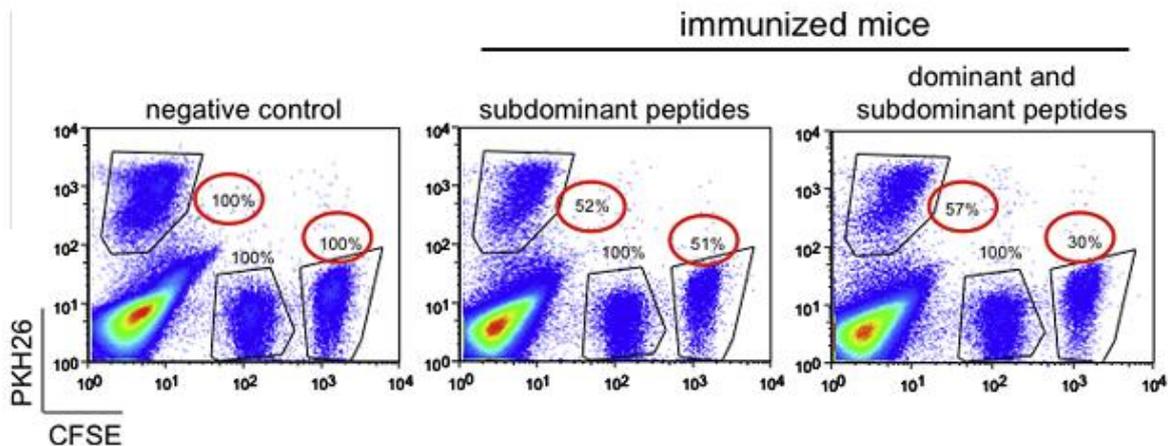


Fig. 4. *In vivo* CTL killing of target cells presenting dominant or subdominant peptides. A/Sn mice were primed *i.m.* with 100 μ g of pcDNA3 or pIGSPCL9 plasmids, three weeks later, these mice were boosted *i.m.* with 2×10^8 PFU Ad β Gal or AdASP-2. Fourteen days after boost, *in vivo* cytotoxic activity was estimated by injecting each mouse with syngeneic PKH26 or CFSE-labeled splenocytes coated with or without 2 μ g of the indicated peptide. Results are expressed as mean + SD of four mice per group and are representative of experiments performed at least twice with similar results.

a heterologous prime-boost vaccination. First, the animals were primed with 100 µg of plasmidial DNA 28 days before analysis and boosts were performed with 2×10^8 PFU of HAd5 7 days before analysis, both administered by *i.m.* route. As described by Dominguez and colleagues [10], the vectors encode the amastigote surface protein 2 of *T. cruzi* (ASP-2). The controls were immunized with an empty plasmid. The response induced by this immunization protocol was easily detected *in vivo* using target cells coated with any of the three ASP-2 peptides, namely TEWETGQI (dominant), PETLGHEI and YEIVAGYI (subdominants) restricted by H-2^a haplotype. The CFSE non-target cells remained always at the same frequency regardless of the immunization vector used, whereas the relative frequency of target cells depended on the dominant nature of the peptides used to pulse them (Fig. 4).

9. Calculating the cytotoxicity

The percentage of specific lysis was determined using the formula:

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

10. Statistical analysis

All statistical analysis described here were performed with Graphpad Prism (Graphpad Software Company Incorporation). Values were expressed as means \pm SD. These values were compared using two-way ANOVA followed by *BonFeroni* tests. The differences were considered significant when the *P* value was <0.05 .

11. Tips

The *in vivo* CTL assay is relatively complex if taken into account the wide-range of manipulation that can be applied to the system, both during the cell processing and labelling and the data acquisition and analysis. However, the reproducibility can be very high if some considerations were followed:

1. To make sure that the CFSE staining occurs with success without major loss in cell viability, the PBS used to prepare the CFSE^{high} and CFSE^{low} solutions should be pre-warmed at 37 °C and labeling should not take more than 15 min.
2. The RPMI-10 medium that is used during the peptide pulse of CFSE^{high} cells must also be pre-warmed at 37 °C. This will ensure proper peptide loading to the MHC class I.
3. Prepare 1 µM CFSE solution from the 10 µM solution and not directly from the stock. This will help to avoid mistakes and guarantee a good separation between the CFSE^{high} and CFSE^{low} populations in the flow cytometer.

4. It is strongly advisable to check the labeling procedure by running unlabeled, CFSE^{low} and CFSE^{high} samples in the flow cytometer before injecting the mice. If the labeling procedure does not result in proper separation of the three fluorescence peaks, start new labeling and do not inject the mice, since the results will be unreliable.
5. Attention should be given to the fact that the mix of CFSE^{low} and CFSE^{high} cells should be injected in RPMI-1640 without fetal calf serum, since the presence of bovine serum proteins may trigger an inflammatory process and interfere with the results.
6. In case of models of viral infection, store small aliquots of pfu-determined preparations to avoid frequent freeze and defrosting cycles and consequent decay of the viral particles. The same apply to the peptide samples.
7. To analyze the cytotoxic response for more than one peptide simultaneously (as in the case of subdominant) using more than one dye-life it is necessary to standardize concentrations of the dyes to be able to provide appropriate compensation between the marks.

12. Conclusion

The protocol described in this study allows a meticulous *in vivo* evaluation of cytotoxic T cell activity.

Acknowledgments

We thank Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for their ongoing support of the work carried out in our laboratories.

References

- [1] K.T. Brunner, J. Mael, J.C. Cerottini, B. Chapuis, *Immunology* 14 (1968) 181–196.
- [2] W. Barchet, S. Oehen, P. Klenerman, D. Wodarz, G. Bocharov, A.L. Lloyd, M.A. Nowak, H. Hengartner, R.M. Zinkernagel, S. Ehl, *Eur. J. Immunol.* 30 (2000) 1356–1363.
- [3] M. Regner, L. Pavlinovic, A. Koskinen, N. Young, J.A. Trapani, A. Müllbacher, *J. Immunol.* 183 (2009) 37–40.
- [4] S. Oehen, K.J. Brduscha-Riem, *Immunology* 161 (1998) 5338–5346.
- [5] D.S. Bangari, S.K. Mittal, *Vaccine* 24 (2006) 849–862.
- [6] J. Zhu, X. Huang, Y. Yang, *J. Virol.* 81 (2007) 3170–3180.
- [7] S.K. Mittal, M.R. McDermott, D.C. Johnson, L. Prevec, F.L. Graham, *Virus Res.* 28 (1993) 67–90.
- [8] Y. Yang, J.M. Wilson, *Science* 273 (1996) 1862–1864.
- [9] B.C. de Alencar, P.M. Persechini, F.A. Haolla, G. de Oliveira, J.C. Silverio, J. Lannes-Vieira, A.V. Machado, R.T. Gazzinelli, O. Bruna-Romero, M.M. Rodrigues, *Infect. Immun.* 77 (2009) 4383–4395.
- [10] M.R. Dominguez, E.L. Silveira, J.R. de Vasconcelos, B.C. de Alencar, A.V. Machado, O. Bruna-Romero, R.T. Gazzinelli, M.M. Rodrigues, *PLoS One* 6 (2011) e22011.
- [11] M. Oukka, M. Cohen-Tannoudji, Y. Tanaka, C. Babinet, K. Kosmatopoulos, *J. Immunol.* 156 (1996) 968–975.
- [12] T. Yardeni, M. Eckhaus, H.D. Morris, M. Huizing, S. Hoogstraten-Miller, *Lab Anim. (N.Y.)* 40 (2011) 155–160.