Henry Alonso Paico Montero

**Contribuição das vias mediadas por
FasL ou Perforina na eliminação *in*
vivo de células-alvo por linfócitos T
CD8⁺ antígeno-específicos induzidos
pela vacinação com antígeno de
*Trypanosoma cruzi***

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

Área de concentração: Imunologia

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

Versão original

São Paulo

2017

RESUMO

Montero HAP. Contribuição das vias mediadas por FasL ou Perforina na eliminação *in vivo* de células-alvo por linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos induzidos pela vacinação com antígeno de *Trypanosoma cruzi*. [Dissertação (Mestrado em Imunologia)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2017.

Modelos murinos de infecção revelaram que as células T CD8⁺ (LTCs) são essenciais no controle de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas. No entanto, durante a doença, os LTCs são notavelmente alterados e sub-ótimos, estabelecendo a fase crônica. Nos últimos anos, vários trabalhos sob a Doença de Chagas visam melhorar o desempenho dos LTCs. Apesar dos mecanismos citotóxicos, como perforina/granzima e interações Fas/FasL, pelos LTCs serem bem caracterizados, a regulação de ambos não é completamente entendida. Deste modo, nós investigamos se alguns parâmetros podem estar envolvidos na regulação *in vivo* das respostas efectoras dos LTCs pela vacina terapêutica de *Trypanosoma cruzi* baseada em Adenovírus humano tipo 5. Nós encontramos que a carga viral e o tempo após imunização têm um impacto na comutação do fenótipo citotóxico dos LTCs. Nossa descoberta evidencia os papéis não redundantes da perforina e FasL e a importância destes parâmetros na citotoxicidade FasL-independente, eventos importantes na busca uma efetiva vacina contra a Doença de Chagas.

Palavras chave: Linfócitos T CD8⁺. Fas ligante. Perforina. Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Vacinação.

ABSTRACT

Montero HAP. Contribution of the Perforin and FasL pathways in the *in vivo* elimination of target cells by antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes triggered by vaccination with *Trypanosoma cruzi* antigen. Master Thesis [(Immunology Program)]. - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2017.

Mouse models of infection revealed that CD8⁺ T cells (CTLs) are essential to control *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease. However, during infection, CTL response is remarkably suboptimal, leading to the establishment of a chronic disease. In the last years, several groups investigate new ways to enhance the performance of CTLs. Although the effector mechanisms of target cell elimination, such as perforin/granzymes and Fas/FasL interactions, are well characterized, their regulation, kinetics and importance to the protection against *T. cruzi* is poorly understood. Here, we investigated whether immunization parameters could be involved in the *in vivo* regulation of CTL effector responses during recombinant human type 5 Adenovirus-based *Trypanosoma cruzi* therapeutic vaccine. We found that, the viral load and time post-immunization interfere with the effector mechanism used by CTLs against antigen-specific targets. Our findings shows the evidence of the non-redundant roles for perforin and FasL and the importance of those parameters in the FasL-independent cytotoxicity against Chagas' disease.

Keywords: CD8⁺ T lymphocytes. Fas Ligand. Perforin. Chagas Disease. *Trypanosoma cruzi*. Vaccination.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A Tripanossomíase americana é uma antroponose caracterizada por uma infecção parasitária sistêmica, cujo agente etiológico é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Rassi, Marin-Neto, 2010). Este parasita foi descoberto em 1909 pelo cientista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas e, em sua homenagem, foi denominada “Doença de Chagas” (Coura , Borges-Pereira, 2010).

T. cruzi pertence à família *Trypanosomatidae* e é caracterizado pela presença de um único flagelo, uma única mitocôndria contendo uma complexa região de DNA extranuclear denominada cinetoplasto e localizada perto da base do flagelo (Rassi Jr, Rassi, Marcondes de Rezende, 2012). É um parasita digenético, cujos hospedeiros naturais são insetos hematófagos, os quais são considerados os vetores da doença, e algum mamífero no qual se desenvolve a moléstia (Organizacao Mundial da Saude (OMS), 2012). A doença de Chagas é transmitida principalmente através de insetos hematófagos da subfamília *Triatominae*, tanto para seres humanos quanto para outras 150 espécies diferentes de mamíferos selvagens e animais domésticos. As principais espécies de vetores na transmissão de *T. cruzi* para o homem se encontram incluídos na família *Reduviidae*, são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata*.

Triatoma infestans representa o principal vetor na América Latina. Além dos mecanismos vetoriais, a doença pode ser transmitida por transfusão sanguínea, via placentária ou ingestão de alimentos contaminados com o protozoário (Schmunis , Yadon, 2009; Rassi , Marin-Neto, 2010; Stanaway , Roth, 2015). Neste último se confirmou a transmissão oral, proveniente de alimentos contaminados, com parasitas de Triatominae, e se observou que a glicoproteína gp82 de *T. cruzi*, pepsina-susceptível, cumpre um papel na invasão do epitélio mucoso-gástrico ao contato com o suco gástrico (6).

Atualmente, a doença constitui um problema de relevância em saúde pública mundial. Chagas é uma doença tropical negligenciada que afeta indivíduos de baixa renda de países subdesenvolvidos. Estima-se que de 10 a 15 milhões de pessoas estejam infectadas com o parasita no mundo e estima-se mais de 40.000 novos casos por ano, principalmente na América Latina onde a doença é endêmica e de 65 a 100 milhões de pessoas encontram-se em risco de serem infectadas. Além disso, a doença representa a causa de morte de aproximadamente 10,000 a 14,000 pessoas por ano no mundo (Lescure et al., 2010; Virgilio et al., 2014; Pereira et al., 2015; Stanaway, Roth, 2015; World Health Organization, 2015; Ersching, Basso, Kalich, Bortoluci, , Rodrigues, 2016). A doença de Chagas representa um problema socioeconômico que vem afetando muitos países de Latino América gerando perdas anuais na produtividade, além de cerca de 1,2 bilhões de dólares anuais (10). A Tripanossomíase americana é considerada uma das 13 doenças mais negligenciadas do mundo conforme reconhecido pela Organização mundial da Saúde (Hotez, Fenwick, Savioli, , Molyneux, 2009) e a migração internacional que acarreta no fluxo de pessoas infectadas de América Latina ao resto do mundo acaba por transforma-la em um problema para saúde pública em escala global.

1.2 CICLO DE VIDA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Estima-se que o contato do *T. cruzi* com seres humanos ocorre há cerca de 30.000–15.000 anos, quando o homem chegou ao Continente Americano. *T. cruzi* é uma espécie singular que compromete diversas linhagens com distinta morfologia, infectividade, virulência e patogenicidade (Junqueira et al., 2010). O parasita desenvolve complexas mudanças morfológicas e bioquímicas que permitem sua sobrevivência e replicação em diversos microambientes durante todo seu ciclo de vida (Figura 1).

O “barbeiro”, inseto hematófago da família *Reduviidae* é responsável pela transmissão natural de *T. cruzi* e ciclo se inicia quando os epimastigotas (localizado no estômago), se localizam na parte distal do intestino para se transformar, por processos de metaciclogênese, à forma tripomastigota metacíclica e depositada junto às fezes no ato de alimentação do vetor. Este defeca e os tripomastigotas metacíclicos

entram no hospedeiro mamífero ao riscar a pele ou esfregar os olhos. O tripomastigota metacíclico é flagelado e altamente infeccioso, circula na corrente sanguínea e mesmo podendo se replicar em vários tipos celulares, possuem um particular tropismo por células cardíacas, esqueléticas e de musculo liso (13). Logo após a invasão ao microambiente intracelular, o parasita se transforma na forma amastigota, uma forma aflagelada com alta capacidade proliferativa que se divide por fissão binária (um mecanismo de reprodução assexuada) e dependendo da célula infectada o parasita pode utilizar os metabólitos da célula hospedeira, por exemplo, indução da sínteses de arginase nos macrófagos para a produção de poliaminas, utilizadas no crescimento e favorecimento da diferenciação dos tripomastigotas (Algranati, Serra, González, 2006; Stempin, Cerban, 2007), as quais, rompem e lisam a célula hospedeira caindo novamente na corrente sanguínea.

Figura 1 - Ilustração do ciclo de vida do *T. cruzi*. Modificado de (Hernandez, 2015).

Nessa situação, quando o barbeiro ingere o sangue de um hospedeiro infectado, este se infecta com a forma tripomastigota e no intestino do vetor, o protozoário diferencia-se na forma epimastigota não infecciosa. Finalmente, o parasita se transforma em tripomastigota metacíclicas, dando novamente começo ao ciclo (Brener, 1973; Rassi, Marin-Neto, 2010).

1.3 DADOS CLÍNICOS DA DOENÇA DE CHAGAS

A Tripanossomíase apresenta duas fases clínicas: uma aguda e outra crônica (7). A fase aguda (fatal para 2-8% das pessoas infectadas) acontece no início da infecção e pode durar de 2 a 4 meses. Apresenta sintomatologia variável e se caracteriza por uma intensa parasitemia com presença do parasita em praticamente todos os órgãos e tecidos do organismo (Coura, Borges-Pereira, 2010). Nesse ponto, a maioria dos pacientes infectados experimenta febre, com aumento dos nódulos linfáticos e inflamação no local da picada. Simultaneamente, há uma intensa ativação do sistema imune com altos níveis de citocinas no plasma, intensa ativação de linfócitos T e linfócitos B, linfadenopatia e esplenomegalia (13). Após a ativação do sistema imune, aproximadamente 1-2 meses (18), são obtidas cargas parasitárias muito baixas e indetectáveis por microscopia (19). Continua a progressão para a fase intermedia (ou crônica assintomática), uma fase que geralmente é assintomática ou irreconhecível, a qual pode durar por décadas, e acontece em aproximadamente 60-70% dos pacientes. Além disso, nesta fase é possível a detecção de anticorpos específicos contra *T. cruzi* (18).

A fase crônica é iniciada 3 a 4 meses após a infecção inicial e pode durar por toda a vida do paciente. Aproximadamente 30% (10-40%), desenvolve a patologia característica da infecção com destruição de tecidos musculares e nervosos, causando danos irreversíveis em diversos órgãos sendo o trato digestório (principalmente megaesôfago e megacólon) e o tecido muscular cardíaco (principalmente cardiomiopatias como insuficiência cardíaca progressiva e a morte súbita) os mais prevalentes (Moncayo, Ortiz Yanine, 2006; Rassi Jr et al., 2012; Cerny et al., 2016).

Atualmente, as medidas preventivas para reduzir a transmissão do *T. cruzi* aos seres humanos são realizadas através de estratégias de controle dos vetores hematófagos, com o uso de inseticidas e diagnóstico da doença em doadores nos bancos de sangue. Por mais de 40 anos, o único tratamento terapêutico de pacientes infectados permanece restrito aos medicamentos *Benzonidazole* (Abarax/ELEA) e *Nifurtimox* (LAMPIT/Bayer), sendo este tratamento mais eficaz em crianças e em pessoas diagnosticadas na fase aguda da infecção (Lescure et al., 2010; Rassi, Marin-Neto, 2010; Pinto Dias, Rodriguez Coura, Shikanai Yasuda, 2014; Cerny et al., 2016). Há evidências da eficácia na fase crônica indeterminada, entretanto seu uso é limitado devido a sua pobre disponibilidade e efeitos colaterais, tais como dermatite, pruridos e manifestações gastrointestinais entre outros. Essas e outras características relevantes da doença (programas ineficazes de controle do vector, persistência do parasita, e ser uma doença negligenciada) encorajam a pesquisa e desenvolvimento de vacinas para o manejo da doença de Chagas (Sanchez-Valdez et al., 2015; Chatelain, 2016).

1.4 RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO COM *TRYPANOSOMA CRUZI*

Considerando o ciclo de vida complexo e a presença de formas extra e intracelulares do parasita no hospedeiro mamífero, é necessário um amplo espectro de respostas imunes para o controle da infecção de *T. cruzi* (Bhatia, Garg, 2005). *T. cruzi* pode ser detectado na infecção, através de células e moléculas pertencentes ao sistema imune inato e adaptativo, que interagem com proteínas e DNA dos parasitas resistentes da infecção. Portanto, o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a doença de Chagas com a capacidade de induzir uma resposta imune protetora que impeça a sobrevivência de *T. cruzi* de maneira eficiente no hospedeiro mamífero parece ser uma estratégia importante e plausível.

Na resposta imune inata contra a infecção pelo *T. cruzi*, as barreiras físicas do hospedeiro como a zona da pele onde se alimenta o inseto vetor, a mucosa do trato gastrointestinal ou a conjuntiva dos olhos representam também locais de ingresso do parasita (Stanaway, Roth, 2015). Após a entrada na corrente sanguínea, o *T. cruzi* age diretamente na imunoregulação do hospedeiro, seguido por uma intensa

resposta inflamatória que pode causar efeitos deletérios. Na fase inicial da infecção, células da imunidade inata como macrófagos e células dendríticas atuam na detecção e eliminação direta dos parasitas. Ao mesmo tempo, estas células são ativadas para se tornarem células apresentadoras de antígeno eficientes capazes de ativar e desencadear uma resposta imune adaptativa. Além disto, o sistema imune inato tem um papel importante no reconhecimento de células não hematopoiéticas infectadas que representam um dos principais alvos do parasita (Tarleton, 2007).

O reconhecimento do parasita pelo sistema imune inato é iniciado por membros da família de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os receptores do tipo Toll (TLR) têm sido o foco de muitos estudos. Modelos experimentais murinos deficientes da função de TLRs específicos ou das moléculas adaptadoras envolvidas na transdução de sinais (especialmente MyD88) tem sido amplamente estudados com o objetivo de desvendar o papel destes receptores na infecção *in vivo* pelo *T. cruzi* (13). No caso de camundongos MyD88^{-/-}, estes demonstram uma alta susceptibilidade à infecção com a cepa Y de *T. cruzi* junto com a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12p40, as quais são secretada por células da imunidade inato. Subsequentemente, a produção de IFN γ (por células TCD4⁺ do subtipo Th1 - T helper 1) foi severamente diminuída, mostrando que a via de ativação de reconhecimento dependente de MyD88 é importante na resistência do hospedeiro contra a infecção pela parasita (Kayama, Takeda, 2010). Cabe mencionar que tem sido demonstrado, em modelo *in vivo* de vacinação baseado em adenovírus recombinante, a capacidade de IL-12p40 de modular as respostas das células T CD8⁺ antígeno-específicas de maneira dose-dependente (Kim, Youn, Seo, Jin, Sung, 2008). Por outro lado, também foi evidenciado uma alta susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* em animais TLR2^{-/-} e TLR9^{-/-}, apresentando um aumento significativo da parasitemia e diminuição da taxa de sobrevivência. De mesmo modo, animais duplo *knockout* para TLR2 e TLR9 mostraram uma susceptibilidade equivalente à observada nos animais deficientes de MyD88, indicando a importância destes receptores em conjunto no reconhecimento do *T. cruzi* (27).

Como o *T. cruzi* invade a célula hospedeira e chega até o microambiente do fagolisossoma, moléculas de ácido nucleico provenientes de parasitas lisados estimulam TLR7 e 9, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias tipo Th1 (Cardoso, Reis-Cunha, Bartholomeu, 2016). Além dos TLR, os receptores citosólicos

de tipo NOD (NLR) tem um papel importante no controle da infecção devido à natureza intracelular do parasita (Figura 2). Nesse caso, animais NOD1^{-/-} mostraram ser altamente susceptíveis ao parasita, sucumbindo na infecção e exibindo alta parasitemia e grande invasão parasitaria no tecido cardíaco e esplênico (Rodrigues, Oliveira, Bellio, 2012). De forma semelhante, num modelo *in vivo* de infecção pelo *T. cruzi* se demonstrou a participação do inflamassoma NLRP3 no controle da parasitemia por meio da indução de óxido nítrico (NO) através de um mecanismo dependente de caspase 1 e IL-1R (30). Sugerindo que NOD1 e NLP3 sejam críticos no reconhecimento de formas tripomastigotas intracelulares de *T. cruzi*.

Figura 2 - Reconhecimento de *T. cruzi* pelo sistema imune inato por meio da ativação de TLRs e NLRs. Adaptado de (28).

No reconhecimento da interação hospedeira-parasito, *T. cruzi* ou suas moléculas derivadas de DNA, GIPLs (glicoinositolfosfolipidos) e mucinas como tGPI (glicosilfosfatidilinositol ligado à glicoproteínas tipo mucina de tripomastigotas) estimulam as células hospedeiras (macrófagos, cardiomiocitos e células dendríticas cutâneas) a produzirem mediadores inflamatórios a nível local e citocinas (Ferreira et al., 2014; Cardoso et al., 2016). Após o reconhecimento, os macrófagos têm um papel central no controle da infecção pelo *T. cruzi*. Ao ser uma das primeiras células a serem infectadas, funcionam como célula hospedeira do parasita assim como célula efetora da resposta imune. A primeira evidencia de que macrófagos são críticos na resistência ao parasita foi mostrado quando a depleção deste subtipo celular por tratamento com

sílica aumentou significativamente a parasitemia, ao igual que as taxas de mortalidade em camundongos infectados (Celentano, González Cappa, 1993). Os macrófagos, em conjunto com células dendríticas, induzem uma cascata de citocinas, que na fase inicial da infecção, desencadeiam na produção de interleucina-12 (IL-12). A IL-12 atua sobre as células NK para estimular a secreção de interferon-gama (IFN γ) (Junqueira et al., 2010; Basso, 2013). Além disso, as células T *T. cruzi*-específicas, produtoras de IFN γ , junto com macrófagos produtores de TNF- α migram às zonas de inflamação em resposta a diversas quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10 e CCR5), onde localmente IFN γ e TNF α participam no controle do parasita durante a fase aguda da infecção através da produção de NO (31).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NOS) derivados do NO são as principais moléculas efetoras da atividade microbida contra este microrganismo. A importância desta molécula, foi também mostrada em modelos de infecção experimental, utilizando camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e tratados com inibidores da enzima óxido nítrico sintase, mostraram aumento da parasitemia e mortalidade (Vespa, Cunha, Silva, 1994).

Finalmente, as citocinas IL-10 e IL-4 evitam a inflamação excessiva e o desenvolvimento da patologia, durante as fases agudas e crônicas, respectivamente (Sales et al., 2008; Junqueira et al., 2010). A diferença da resposta celular, parece ser que não existe um mecanismo compensatório na ausência de citocinas envolvidas na geração da resposta imune tipo I, devido a que camundongos IL-12^{-/-} e IFN γ ^{-/-} não sobrevivem ao desafio infeccioso (Cazorla, Frank, Malchiodi, 2009).

A resposta imune adaptativa controla o número de parasitas e previne a mortalidade da fase aguda. Estudos iniciais demonstram a importância das células CD4⁺ e CD8⁺ na imunidade contra *T. cruzi*, mas estas resultam ser insuficientes na resolução da infecção. Como consequência, a parasita persiste no musculo e outros tecidos. Subpopulações de linfócitos têm sido identificadas desde então, e seu papel na defesa contra infecções precisam de ser estudados a profundidade, a qual é relevante para o desenho de vacinas com a capacidade de induzir uma ótima imunidade efetora (Andrade, Gollob, Dutra, 2014).

Apesar disso, conforme a doença progride, células da imunidade inata (principalmente células dendríticas) geram a ligação entre a resposta inata e

adaptativa a través da apresentação de antígenos do parasita e a secreção de IL-12 importante na diferenciação e expansão clonal de linfócitos T CD4⁺ no subtipo Th1, assim como linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B (Figura 3). Desta maneira, a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ permite eliminar formas amastigotas intracelulares. O IFN γ , produzido por linfócitos CD4⁺ do subtipo Th1 e linfócitos TCD8⁺, melhora a eficiência de macrófagos na eliminação de formas amastigotas e tripomastigotas fagocitadas. Enquanto aos anticorpos produzidos por linfócitos B ativados (principalmente IgG1 e IgG2a), se encargam de facilitar a lise das formas tripomastigotas extracelulares e a fagocitose de parasitas opsonizados (13).

Figura 3 - Resposta imune na infecção pelo *T. cruzi*. Ilustração da resposta imune inata e adquirida desencadeada durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*. Adaptado de (37).

Dado que o parasita invade e se multiplica no citoplasma de qualquer célula nucleada do hospedeiro, incluindo macrófagos e cardiomiócitos (Parodi, Padilla, , Basombrío, 2009), a imunidade mediada por células T é crucial para a resolução da infecção. Estudos mostraram que a depleção de células T CD8⁺ ou T CD4⁺ resulta em um rápido desenvolvimento da parasitemia e morte dos camundongos. Acredita-se que linfócitos T CD8⁺ sejam as principais células envolvidas no controle da infecção, principalmente através da produção de IFN γ , perforina e a atividade citotóxica contra

células infectadas pelo parasita (Miyahira, 2008; Nunes, Andrade, Lopes, , DosReis, 2012; Tarleton, 1990). No entanto, IFN γ induz também a progressão da doença durante a fase crônica atuando como um mediador “não imunológico” de dano tecidual, diminuindo os níveis de ATP mitocondrial nas células de miocárdio. No lugar de ATP, são incrementados os níveis de IL-18 e ligantes de CCR7, os quais estão envolvidos na hipertrofia e indução de moléculas pro-fibróticas. Esse e outros efeitos prejudiciais são atribuídos principalmente a mecanismos efetores exercidos pelos LTC's, especificamente aqueles linfócitos que expressam perforina na cardiomiopatia chagásica crônica (CCC). Porém, os LTC's perforina positivas contribuem na lesão e disfunção cardíaca durante a fase crônica da infecção de *T. cruzi* e a miocardite promovida pela alta produção de IFN γ (31). Contudo, IFN γ cumpre um duplo papel na Doença de Chagas, um do tipo protetor e outro na patogênese, junto com a produção de outras citocinas como TNF α (particularmente pacientes com CCC) e que são manifestas no processo inflamatório. Apesar disso, IFN γ é também associado à funções não-inflamatórias. (31).

O papel relevante das células T CD8⁺ na resistência ao parasita foi demonstrada quando camundongos deficientes neste subtipo celular apresentaram incapacidade de sobreviver após um desafio inicial com o protozoário. Estudos subsequentes mostraram que a depleção de células T CD8⁺ durante a fase crônica da infecção resulta na exacerbação da inflamação e aumento da carga parasitária no tecido muscular cardíaco. Da mesma maneira, animais *knockout* para o gene que codifica a proteína β 2-microglobulina (que apresentam deficiência de expressão das moléculas de MHC de classe I na superfície celular e, portanto, tem desenvolvimento mínimo de células T CD8⁺) rapidamente sucumbem à infecção pelo *T. cruzi*, confirmando a importância destas células na proteção contra este microrganismo (Jordan, Hunter, 2010).

Sabe-se que somente os grânulos citotóxicos de LTCs humanos contêm granulinsina (GNLY) e que é capaz de destruir membranas microbianas pobres em colesterol. Na eliminação de protozoários parasitas como *T. cruzi*, *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) e *Leishmania major*, foi demonstrado que a GNLY (dirigido dentro da célula infectada pela PRF) leva as Grzms dentro do parasita para inativar as enzimas de defesa oxidativa gerando superóxido. Posteriormente, a célula infectada é eliminada por meio de um mecanismo de morte independente de caspase, semelhante a

apoptose, denominado “microptose” ou “morte celular micróbio-programada”. Além disso, verificou-se a função protetora da GNLY ao observar que camundongos transgênicos, a diferença dos camundongos selvagens, sobreviveram a doses letais de *T. cruzi* e *T. gondii* (43).

Com respeito ao reconhecimento de *T. cruzi* pelos linfócitos, o genoma do *T. cruzi* codifica mais de 12.000 genes, proporcionando milhares de potenciais epítomos que podem ser apresentados pelo MHC-I na superfície de células do hospedeiro infectadas com o parasita (44). Na infecção experimental pelo *T. cruzi*, a resposta dos linfócitos TCD8⁺ é altamente limitada aos epítomos expressos por diferentes membros de uma grande família de antígenos de superfície do *T. cruzi* denominada trans-sialidases (TS) (45).

Após o reconhecimento do antígeno cognato, células T CD8⁺ *naïve* iniciam um processo de expansão clonal que permite aumentar até 10.000 vezes a frequência de células antígeno-específicas dentro dos primeiros 15 dias após o desafio. Embora o repertório de possíveis epítomos seja grande, a resposta imunológica é restrita a poucos, fenômeno conhecido como *imunodominância* (Padilla, Bustamante, Tarleton, 2009). Assim, alguns clones são expandidos em grandes quantidades (dominante) em relação a outras células T antígeno específicas (subdominante). A imunodominância pode ser o resultado de diferentes fatores que regulam a formação do complexo peptídeo-MHC I na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC). Esses fatores podem incluir a concentração do antígeno, assim como a estabilidade e disponibilidade do epítopo após o processamento e translocação para o retículo endoplasmático antes de ser transportado na superfície da APC. Após a formação do complexo peptídeo-MHC I, fatores como a afinidade do TCR e a capacidade de ativação e proliferação dos linfócitos T CD8⁺ em resposta a um antígeno, podem de igual forma influenciar o fenômeno de imunodominância (47).

Por outro lado, o número limitado de epítomos podem resultar importante para evadir a indução de clones de células T potencialmente auto-reativas ou patogênicas (36). No entanto, uma importante implicação biológica para a Doença de Chagas é que a interferência detenha o *priming* das células T CD8⁺, possivelmente evadindo respostas imune específicas fortes e/ou com maior amplitude (espectro) que possam ser mais eficientes na eliminação completa do patógeno por meio das células efetoras

do hospedeiro. Esta é uma importante questão que precisa ser direcionada no campo de desenvolvimento de uma vacina, assim como também se os membros da família das TS e outros antígenos são bons candidatos de vacinas por ser imunodominante, ou pobres candidatos por serem também altamente variáveis entre as cepas e talvez ao longo do tempo (36).

Em camundongos C57BL/6, o peptídeo imunodominante TSA-1 (VDYNFTIV), derivado de TS, foi administrado como DNA junto a uma proteína rica em lisina (com a finalidade de ajudar a ubiquitinação e processamento no proteossoma) foi obtido uma boa apresentação e ativação de T CD8⁺ específicas (36). De igual forma, uma resposta imunodominante foi obtida para o peptídeo PA8 (VNHRFTLV) derivado da proteína 2 de superfície de amastigotas (ASP-2) (Rosenberg, Martin, , Tarleton, 2010). No entanto, no pico da infecção aproximadamente 30% do total das células TCD8⁺ são antígeno específicas ao peptídeo imunodominante *TsKb20* (ANYKFTLV) e 4-10% para o peptídeo subdominante *TsKb18* (ANYDFTLV).

Após a fase de expansão clonal e conforme o parasita é controlado inicia-se a fase de retração. Apesar disso, o *T. cruzi* consegue estabelecer uma infecção que é persistente, que inicialmente não é controlada pela ação de células T CD8⁺ antígeno específicas. Isso porque, o pico da resposta imune medida pelos linfócitos T CD8⁺ antígeno específicos acontece aproximadamente 30 dias depois o desafio. Este atraso no desenvolvimento da resposta imune provavelmente permite que o parasita estabeleça uma infecção latente no tecido antes de ser eliminado eficientemente pelas células citotóxicas (10,46).

Além da resposta mediada por linfócitos T, a imunidade humoral também representa um dos mecanismos importantes de defesa no controle da infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que a depleção de células B leva ao aumento da parasitemia e a persistência do parasita. Tem sido mostrado em alguns trabalhos que o parasita induz a ativação de células B policlonais durante a fase aguda da infecção. Diferentes trabalhos mostram camundongos C57Bl/6 resistentes com quantidades elevadas de IgM total circulante na fase inicial da doença, seguido por um aumento da IgM antígeno específica. À medida que o parasita é eliminado da corrente sanguínea, as imunoglobulinas mudam de classe para uma resposta mediada por IgG total e IgG específica. (Scott, Goss-Sampson, 1984; Brodskyn, Silva, Takehara, Mota, 1989;

Kumar, Tarleton, 1998; Bryan, Guyach, Norris, 2010). Como foi mencionado, os anticorpos produzidos colaboram na eliminação do parasita, isto acontece através do mecanismo de citotoxicidade dependente de anticorpo (52).

No entanto, *T. cruzi* conta com um amplo arsenal de estratégias de evasão do sistema imunológico. Até agora, os mecanismos de infecção e proliferação de *T. cruzi* através das estratégias de evasão vem-se conhecendo cada vez mais (28). Por exemplo, a modificação da superfície do parasita com a finalidade de evitar o reconhecimento pelas células responsáveis da imunovigilância, mecanismos de supressão do sistema imune (especificamente a diminuição do número de células T), desencadeando a apoptose, a produção de anticorpos inespecíficos (Acosta et al., 2007) ou pela indução dos LT reguladores (CD4⁺ FoxP3⁺), que interferem no *priming* dos LTCD8⁺ através das células dendríticas gerando LTCD8⁺ subótimos (9). Enquanto às moléculas e proteínas de mecanismos de *T. cruzi* responsáveis pela inibição ou desvio da resposta imunológica no hospedeiro se encontram: A inibição do receptor da proteína do complemento C2 tri-funcional (TcCRIT), a cruzipaína (Cz), transialidase (TS), Tc52, VSG Tox Tc (28,53,54), entre outros.

1.5 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA *TRYPANOSOMA CRUZI*

Novos procedimentos que visam a prevenção de doenças infecciosas têm sido desenvolvidos, sendo um deles a procura de alternativas de vacinação cada vez mais eficazes na administração de antígenos ou formas não patogênicas de microrganismos capazes de gerar uma resposta com memória imunológica (Robinson et. al, 2005). A proteção imunológica contra a infecção de *T. cruzi* tem sido estudado desde a segunda década do século passado. Sabe-se que em modelos murinos de infecção, a resposta imune adaptativa e especificamente os linfócitos T citotóxicos CD8⁺ são essenciais no controle de *T. cruzi* e muitos tipos de imunógenos têm sido testados (Tabela I).

Como foi visto na parte da resposta imune, o parasita consegue sobreviver apesar da geração de uma resposta imune complexa, incluindo diversos componentes da imunidade inata e adaptativa, o que sugere que as respostas naturais do sistema

imune são ineficientes. Isto implicaria que o sucesso da vacinação seria através de uma mudança na direção da resposta imune, em lugar de reforça-la (36).

Uma alternativa utilizada por vários grupos de pesquisa foi com vacinas vivas, mortas ou atenuadas para a obtenção de proteção contra Chagas, por exemplo formas epimastigotas de *Trypanosoma rangeli* (vivas ou fixadas), a espécie *Phytomonas serpus* ou inclusive clones de *T. cruzi* (Sylvio X10/4). Assim como também parasitas atenuados, através da construção de parasitas *Knock out* do gene paraflagelar de *T. cruzi* (*dhfr-TS*) e desafiado com a cepa Tulahuén ou Y, conferindo em muitos casos uma significativa proteção, refletido na diminuição da parasitemia e aumento da sobrevivência.

No entanto, ao utilizar fragmentos do parasita, foram obtidos resultados variáveis. Por exemplo, ao utilizar o flagelo inteiro ou as fracções parasitarias, provenientes do sobrenadante da cultura, observaram a indução de dano e resposta autoimune. No caso da porção flagelar conseguiu-se uma proteção parcial significativa, mas com a proteína paraflagelar Rod (PAR) via subcutânea foi encontrado uma redução da carga parasitaria com uma sobrevivência de 100%. De maneira parecida, outra estratégia na obtenção de antígenos protetores foi através da utilização de TESA (antígenos de secreção excreção de *T. cruzi*) e TCSE (extrato solúvel de *T. cruzi*) com uma sobrevivência de 60-100%, assim como também, diversas glicoproteínas purificadas (muitas de superfície e presente na maioria dos estádios da parasita) de diferentes pesos moleculares (45, 68, 72 e 90 KDa) e preparações (TcY72) foram testados. (55).

Com a ajuda da biotecnologia moderna, foi permitido a obtenção de várias cópias de um gene produtor de uma proteína imunogênica, que posteriormente será inserida no DNA bacteriano gerando num tempo curto proteínas recombinantes. As proteínas recombinantes, tais como o Antígeno repetitivo citoplasmático ou flagelar (CRA, FRA), TcSP2-CHP e mTS entre outros, foram usados com ou sem imunomoduladores (*GPanchor*) ou adjuvantes (CpG ODN, Freund, Iscomatrix-IMX). No último caso, o mTS-IMX apresentou até 50 vezes menos parasitemia que o grupo controle, não imunizado, e ~4,5 vezes menos parasitas na fase crônica (55).

Tabela I - Resumo dos principais sistemas de entrega de antígeno usados para a indução de células T CD8+ contra a infecção experimental de *T. cruzi* (Adaptado de Virgilio et al., 2014).

Sistema de entrega	Adjuvante	Antígeno <i>T. cruzi</i> /gene
PROTEÍNA RECOMBINANTE	Adjuvante de Freund	TS
	CpG ODN	TS, Cruzipaina
	Alumínio/ CpG ODN	ASP-2
DNA PLASMIDIAL	IL-12	TSA
	IL-12 / GM-CSF	TcG1, TcG2, TcG4
	--	ASP-1, ASP-2, ASP-3, ASP-4, CRP, Tc24
ADENOVÍRUS REC.	--	TS, ASP-2
DNA PLASM. + ADENOVÍRUS REC.	--	ASP-2
ADENOVÍRUS REC. + Vaccinia Ankara Modificado (MVA) REC.	--	TSA
INFLUENZA REC. + ADENOVÍRUS REC.	--	ASP-2
VÍRUS SENDAL	--	ASP-2
FEBRE AMARELA 17D	--	ASP-2
<i>Salmonella</i> REC.	--	Cruzipaina
PLASMÍDEO + MVA REC	IL-12/GM-CSF	TcG2/TcG4
PLASMÍDEO + PROT. REC.	IL-12/GM-CSF	TcG1/TcG2/TcG4

Por outro lado, as vacinas de DNA, introduzidas mais de 22 anos atrás como uma nova metodologia de vacinação, mostra uma alternativa promissória na indução de uma robusta resposta de anticorpos e citotóxicas dos linfócitos T. Mais recentemente, as dificuldades na utilização de DNA nu, impulsaram a busca de sistemas *delivery*-DNA usando vírus atenuados, bactéria e também parasitas. Estes esforços incluem melhorias nos desenhos de vetores, o uso de vetores virais ou vacinas proteicas para aumentar uma resposta estimulada com DNA (por exemplo, regimes “*prime-boost*”), além de formulações feitas com adjuvantes ou citocinas para aperfeiçoar os sistemas de entrega de DNA (36,55). Com esse propósito foram usados diversos genes (TcSP, TcSSP4, TcG1, TcG2, Tc64, Tc52, Tc24, TSA-1 e Cruzipaina) individualmente ou em conjunto com outros antígenos (TcVac2 e TcVac3), muitos deles com estratégias vacinais de *prime-boost* obtendo resultados de até mais do 90% no controle da doença (55).

Particularmente, as vacinas baseadas em vírus recombinantes nos permitem a expressão de antígenos estranhos diretamente nas células do organismo hospedeiro, apresentados por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC)

como acontece durante o processo natural de infecção (Rocha, Caetano, Machado, Bruña-Romero, 2004). Interessantemente, uma vantagem de usar vírus recombinantes pode ser seu efeito adjuvante universal apresentada pela própria partícula viral que permite uma forte estimulação do sistema imune como, por exemplo, nos vetores adenovirais.

Uma das vantagens mais ressaltantes das vacinas baseadas em adenovírus é sua habilidade de induzir excepcionalmente uma frequência alta e constante de células T CD8⁺ antígeno-específicas que, diferentemente daquelas induzidas por outras subunidades de *carriers* vacinais, como vacinas de DNA ou vetores poxvirais, não são contraídas depois da ativação inicial (57). Após a imunização, o genoma do vetor pode ser encontrado dentro dos tecidos linfáticos com grandes quantidades de células T dirigidas contra o antígeno codificado pelo vetor viral. Nesse contexto, o genoma do vetor se mantém transcricionalmente ativo, e a contínua presença de produtos do transgene parece manter altas frequências de células T CD8⁺ antígeno-específicas além de um *pool* de células T de memória em repouso (estes se diferenciam das células efectoras por apresentarem hiperresponsividade ao antígeno e ao estímulo mediado por anti-CD3, com inferior capacidade proliferativa e baixa cinética de ativação (Ahmadzadeh, Hussain, Farber, 2001), assim como também se diferenciam em LT de memória de vida longa— *long lasting* (57). No caso dos vírus recombinantes deficientes em replicação, tem a vantagem de limitar este efeito adjuvante adicional para a primeira ronda da infecção e não é esperado que induzam efeitos imunoestimuladores sistêmicos generalizados e prolongados que poderiam ter consequências deletérias (59).

Portanto, o adenovírus deficiente em replicação tem várias características que o torna um excelente candidato para o uso como sistema de entrega de genes (ou vetores) em termos de eficácia, segurança e estabilidade para induzir respostas imunes específicas (Bangari, Mittal, 2007). Além disso, mostraram serem seguros em seres humanos. Por exemplo, os adenovírus humanos (AdH) sorotipo 4 e 7 têm sido usados como vacinas vivas orais em recrutas militares dos EUA por várias décadas, sem qualquer efeito adverso conhecido. Estudos clínicos e pré-clínicos tem demonstrado a confiabilidade do desenho vetorial, robusta expressão antigênica e imunidade protetiva usando este sistema. Particularmente, o adenovírus humano sorotipo 5 (HAd5) é o mais caracterizado de todos os adenovírus e vários estudos são

focados no prospecto de vetores para vacinação (Bangari, Mittal, 2007). Além disso, tem sido extensivamente usado como vetor na maioria de ensaios de terapia genica.

Nos últimos anos, existe uma extensiva busca de uma vacina com capacidade protetora e terapêutica contra a infecção da doença de Chagas. Um dos pioneiros em utilizar as vacinas baseadas em adenovírus no Brasil foi o Prof. Dr. Mauricio M. Rodrigues (UNIFESP), testando diferentes tipos de antígenos de *T. cruzi* e obtendo melhores resultados com a proteína de superfície de amastigota 2 (ASP-2), de função desconhecida, sendo um promissor candidato para o desenvolvimento da vacina. Portanto, através do adenovírus humano tipo-5 deficiente em replicação (AdH5) como *carrier* do ASP-2 (rAdASP-2) da cepa Y de *T. cruzi* tipo II é gerada uma imunidade baseada na resposta Th1 com uma substancial resposta imune protetora mediada por células T CD8⁺ de longo prazo contra o desafio da cepa Y (11).

1.6 LINFÓCITOS CITOTÓXICOS

A sobrevivência de organismos multicelulares é absolutamente dependente de um funcionamento do sistema imunológico para proteger contra uma miríade de patógenos. Os linfócitos citotóxicos T CD8⁺ (LTCs) tem um papel essencial no combate contra tumores, infecções virais e por outros micro-organismos. Durante a ativação do sistema imune as células apresentadoras de antígeno (APC's), o receptor da célula T (TCR) do LTC, os co-estimuladores, e o receptor de sinal de citocina afinam a proliferação e sinalização e geram diferentes subtipos celulares, caracterizados pela expressão de diferentes marcadores de superfície nos LTC, e com capacidades de produzir determinadas citocinas (Figura 4). Juntos, estes mecanismos funcionam como um *checkpoint* que favorecem a ação das respostas dos LTCs permitindo defender e proteger o organismo hospedeiro durante uma infecção primária e, a sua vez, prover proteção frente uma resposta autoimune ou possível reinfecção (61,62). No entanto, num trabalho citado por Nolz e Hill, os autores mencionam que é necessário maior estimulação do TCR para o fornecimento da citotoxicidade nos LTCs, que para a expressão de pelo menos alguns marcadores de ativação (como por exemplo CD69), segundo um estudo *in vivo* que compara a infecção de citomegalovírus murino (MCMV) com MCMV-ΔRAP (mutante com falta de genes virais capazes de inibir a expressão de MHC-I) (Nolz, Hill, 2016).

Estudos recentes de células efetoras citotóxicas –LTCs e NK (*Natural Killer*) – revelaram que os mecanismos que estão envolvidos na destruição de células alvo são multifacetados. Inicialmente, acreditava-se que o simples dano na membrana bastaria para acabar com a célula-alvo, mas agora sabe-se que essa destruição é muito mais sutil e que estão envolvidas vias complexas que concluem numa morte apoptótica ou necrótica. Fisiologicamente, é preferível para o hospedeiro que as células sejam destruídas por apoptose – sendo um tipo de morte “silenciosa” ou forma de morte não-inflamatória - diferentemente da morte necrótica (Barry, Bleackley, 2002).

Por meio de microscopia, foi observado que as interações de LTCs com as células alvo foram transitórias e que os mecanismos efetores poderiam levar um sinal de morte para múltiplos alvos sequencialmente. Logo depois foi descoberto que os centros organizadores de microtúbulos (*Microtubule organizing center- MTOC*), aparelho de Golgi e grânulos líticos do LTC foram rapidamente orientados em direção à área de contato no conjugado com a célula alvo, e que a fosfatase ácida – a qual normalmente se encontra nos grânulos- foi depositado na interfase da interação entre o LTC e a célula alvo.

Figura 4 - Geração e morte de linfócitos Citotóxicos T CD8⁺ (LTCs). As células T CD8⁺ *naive* são geradas no timo e carecem de uma maquinaria de eliminação (grânulos citotóxicos), a não ser por um reconhecimento de seu TCR de um forte estímulo antigênico. Adaptado de (62).

Baseando-se nessas observações e considerando o potencial citolítico das moléculas efetoras, foi formulado o modelo de morte por exocitose de grânulos. De acordo com a descrição original, este mecanismo envolve o rearranjo do citoplasma da célula efetora que resulta em exocitose de grânulos e a liberação de uma molécula efetora essencial, a proteína formadora de poro perforina. No entanto, ultimamente têm sido incorporadas outras proteínas que são de importante contribuição ao mecanismo de destruição da célula alvo. Além disso, foi comprovado que a exocitose de grânulos (cálcio-dependente) não é a única via pelo qual os LTCs promovem a morte celular das células alvo (Barry, Bleackley, 2002).

1.6.1 Mecanismos Efetores dos LTCs

Os mecanismos efetores dos LTC's, depois da iniciação de sua proliferação é a busca de um programa de expressão gênica que fornece ao linfócito T CD8 de um robusto arsenal de mecanismos efetores para combater a infecção (Harty, Tvinnereim, White, 2000).

A eficácia com que os LTCs eliminam as células-alvo depende da mobilização adequada desses mecanismos efetores. Dentre os mecanismos efetores, incluem a citólise das células infectadas e a produção de moléculas (Figura 5), como as citocinas IFN γ e TNF α , as quimioquinas CCL3 e CCL4 ou os microbicidas como grânulos citotóxicos, que ocorrem após a ativação de células T CD8⁺ *naïve* (65).

Especificamente, o contato das LTC's ativadas com as células alvo ocorre através do reconhecimento de peptídeos restritos ao complexo maior de histocompatibilidade de classe I (MHC-I), estabelecendo uma *sinapse imunológica (SI)*. A SI é desencadeada pela estimulação do receptor da célula T (TCR) com seu alvo, resultando na secreção de várias proteínas efetoras, tais como perforina e granzimas. Essas proteínas, conseqüentemente, ativam a maquinaria de morte celular apenas das células infectadas, enquanto as células antígeno-negativas (*bystander cells*) permanecem intactas (61). Devido a expressão de moléculas de MHC classe I em todas as células nucleadas, as células T CD8⁺ efetoras podem responder contra patógenos intracelulares na maioria dos tecidos e facilitar a eliminação da infecção.

Os LTC's ativados são capazes de induzir a citólise de células infectadas por duas vias moleculares distintas: a via de exocitose de grânulos, dependente da molécula formadora de poro perforina, ou pela regulação positiva de FasL (CD95L), o qual pode iniciar a apoptose pela agregação de Fas (CD95) na célula-alvo. Ambas as vias são ativadas em resposta a sinais do TCR, estimulando uma cascata de caspases na célula alvo, o que promove a morte da célula-alvo por apoptose. Portanto, a apoptose da célula alvo pela via de exocitose de grânulos depende da liberação coordenada de perforina e enzimas granulares, tais como granzima A e B no interior da célula alvo (65).

Outro aspecto interessante que os pesquisadores observaram desde que o modelo de exocitose de grânulos foi proposto, foi a questão de como as células efetoras citotóxicas evadem a autodestruição após a degranulação. Principalmente porque é conhecido que os LTCs podem eliminar múltiplos alvos e são resistentes a sua própria maquinaria de citotoxicidade. Apesar de existir evidências que suportem esta hipótese, como a contribuição de PI-9 (*proteinase inhibitor 9*) através da inibição da granzima B, existem também outras evidências (tanto *in vitro* como *in vivo*) que indicam que as LTCs algumas vezes eliminam outras LTCs – “*fratricidal killing*”. Além disso, foi descrito outro mecanismo de impedimento da autodestruição por meio da expressão de catepsina B (uma protease lisossômica) na superfície dos LTCs durante a exocitose dos grânulos, confirmado usando inibidores de membrana a catepsina B e evidenciando suicídio perforina-dependente em LTC e células NK (Catalfamo, Henkart, 2003).

1.6.1.1 Citotoxicidade dependente da via de exocitose de grânulos dependente de perforina: Perforina + Granzima

O primeiro relato de linfócitos que matam células alvo ocorreu a mais de 50 anos atrás. Anos mais tarde, foi demonstrado a reorientação do complexo de Golgi e grânulos secretórios elétrons-densos até a célula alvo e também foi determinado a dinâmica do transporte de grânulos secretores das LTCs em direção à sinapse imunológica. Em 1980, lesões de membrana tipo poro foram observadas sobre células atacadas por células NK (Voskoboinik, Whisstock, Trapani, 2015). Poucos anos depois (Tabela II), em 1986, o grupo de Jürg Tschopp purificou 8 membros da família de serine-proteases e investigou suas especificidades. Nos anos seguintes, surgiu um

debate para nomear estas moléculas até que membros do laboratório de Chris Bleackley as chamaram de granzimas.

Na época, dados indicavam que a proteína granular perforina (conhecida como citolisina) seria o único mediador da destruição de células alvo (Ewen, Kane, Bleackley, 2012). Isso foi quando os grupos de Henkart, Okumura e Podack isolaram uma proteína monomérica de 67 kDa, denominada perforina, que ao se oligomerizar (a pH neutro e em presença de Ca^{+2}) atravessa a membrana da célula alvo formando um poro (Figura 6). Além disso, diversos autores perceberam que os poros de perforina e o Complexo de Ataque a Membrana (MAC) têm uma marcada semelhança por microscopia eletrônica. Ao mesmo tempo, diversas formas de granzimas foram identificadas como componentes abundantes e constituintes dos grânulos citotóxicos.

Tabela II. Eventos que fizeram história na descoberta e abriram o caminho na investigação da via grânulos exocitose. Adaptado de (70).

Ano	Descoberta	Laboratorio
1975	Modelo proposto de exocitose de grânulos	Berke
1978	Envolvimento provável de proteases na morte mediada por CTL e bloqueio por inibidores macro-moleculares.	Hatcher
1980	Poros de membrana na superfície de células-alvo	Henkart
1983	Primeiro isolamento de perforina, demonstração das propriedades formadoras de poro	Podack, logo Tschopp
1985	Primeiro cDNA codificante de granzima	Eisen (também Golstein, Bleackley)
1986	Função estrutural e semelhanças antigenicas de perforina e poros do complemento	Tschopp
1986	Perforina inibido por lipido	Tschopp
1986	Caracterização bioquímica detalhada das granzimas	Tschopp
1994	Camundongo deficiente em perforina	Kagi&Hengartner (também Tschopp, Clark, Okumura)

Anos depois, através de ensaios *in vitro*, foi demonstrado que estes grânulos induzem apoptose nas células alvo, de maneira conjunta com quantidades não letais de perforina (68). Em outras palavras, a liberação de grânulos citotóxicos é um dos mecanismos que os LTCs utilizam para a eliminação de células-alvo (71).

Figura 6 - Estrutura do poro por monômeros de perforina. A) Estrutura da perforina de camundongo apresentando o domínio MACPF em azul, domínio tipo-EGF e C-terminal junto a um domínio C2 de união a Cálcio e membrana. B) Estrutura da perforina de camundongo, as regiões azul, laranja e verde correspondem aos domínios presentes na figura a. C) Reconstrução crio-eletrônica do poro de perforina. D) Imagem por microscopia eletrônica da perfuração da membrana da célula alvo por meio da perforina após a formação do poro. Modificado de (Leung, Hodel, Brennan, Lukyanova, Tran, 2017; Voskoboinik et al., 2015).

Outros ensaios em camundongos *knock out*, mostraram que a perda de perforina termina com a morte celular da célula-alvo dependente de grânulo; demonstrando que a perforina é um habilitador chave de apoptose induzido por granzima (Arakaki et al, 2014). No entanto, exatamente como a PRF medeia o acesso da Grzm B principalmente na célula alvo no contexto da SI tem sido objeto de debate por mais de 2 décadas (Woodsworth, Dunsing, Coombs, 2015).

Assim, 3 modelos de ingresso destes grânulos foram propostos (Figura 7A): (A) Formação de um poro pela polimerização de perforina na membrana da célula alvo, pela qual as granzimas (A, B, granzulina) ingressam ao citosol da célula alvo, as enzimas de carga positiva contidas nos grânulos são mantidas no grânulo citotóxico por meio de um grânulo proteico de carga negativa chamado serglycina (62). (B) A expressão de receptor de manose-6 fosfato nas células alvo forma um complexo com

a granzima B, este é internalizado junto com a granzima A e granulisina, dentro de vesículas no interior da célula alvo para exercer sua função efetora, (C) O poro formado pela perforina permite o ingresso de Ca^{+2} ativando a célula alvo, e essa, na tentativa de reparar a região com dano por endocitose, acaba incorporando as moléculas líticas aderidas por uniões eletrostáticas (Chávez-Galán, Arenas-Del Angel, Zenteno, Chávez, Lascurain, 2009; Woodsworth et al., 2015).

No entanto, estudos recentes de microscopia fortemente fundamentados apoiam o modelo onde monômeros de PFN são inseridos na membrana da célula alvo (modelo A), formando poros multiméricos por meio do qual as granzimas como a Grzm B se difunde. Estes poros têm sido recentemente observados e caracterizados usando microscopia microeletrônica (Leung et al., 2017; J. a Trapani, Voskoboinik, Jenkins, 2015). Tem sido demonstrado que poros de PRF são rapidamente reparados pela célula-alvo, deixando um curto espaço de tempo para que a Grzm B ingresse ao citosol. Em conjunto, esses estudos levantam outras questões interessantes mais aprofundadas como a escala relativa de tempo de difusão, formação do poro e transferência de Grzm B (73).

A Grzm B desencadeia a via intrínseca (Figura 7B), onde a mitocôndria é a principal organela envolvida. A Grzm B cliva a procaspase-8 para gerar sua forma ativa capaz de clivar a procaspase-3, a qual a forma ativa da caspase-3 seja capaz de clivar uma série de substratos (*ROCK1*, *α -tubulina*, *filamina*, *gelsolina*, *ICAD*, *PARP*, *NuMa*, *DNA-PKcs*, *lamina B*). Esses substratos também podem ser clivados diretamente pela Grzm B; que têm como finalidade a morte da célula. Predominantemente em camundongos, a Grzm B pode clivar diretamente procaspase 3 (Susanto, Trapani, Brasacchio, 2012).

Em humanos, a granzima B pode amplificar a sinalização dos receptores de morte (DR), através de um receptor recrutador de caspase-8, ativando uma proteína *Bcl-2* proapoptótica denominada *Bid*. A proteína *Bid* produz a liberação do citocromo c, após a formação de um poro na membrana mitocondrial (*MOMP – mitochondria outer membrane permeabilization*). O citocromo C, liberado no citoplasma, se liga a procaspase-9 e juntos ao Apaf-1 formam o apoptossomo, esse complexo ativa a caspase-3 utilizando ATP para induzir a morte celular por apoptose (Kumar et al., 2015).

Os seres humanos possuem 5 tipos de granzimas (A, B, H, K e M) enquanto os camundongos contam com 10 membros desta família. As funções e características (citotoxicidade, liberação de citocromo C, produção de ROS, ativação de caspases, etc.) das Grzms A e B de camundongos são conservadas nos humanos o que faz possível estudá-las por meio de modelos murinos. Com respeito às outras granzimas, as H, K e M possuem um potencial citotóxico em ensaios *in vitro*, mas *in vivo* a granzima M não é essencial na citotoxicidade (Susanto et al., 2012; Joeckel, Bird, 2014).

Todas as granzimas humanas e a maioria de granzimas de camundongo têm sido experimentalmente envolvidas na indução de morte celular. Entretanto, não se sabe ao certo se cada uma delas têm como única ou principal finalidade a citotoxicidade. Por exemplo, tem sido comprovado a capacidade pro-inflamatória da Grzm A; assim como também, as Grzms M, K e B envolvidas em processos de modulação pro-inflamatória. A controvérsia surge devido ao fato de que os efeitos citotóxicos *in vitro* poderiam ser em decorrência à sobre-exposição das granzimas com características pro-inflamatórias, e não pela própria atividade das granzimas como acontece com algumas citocinas pro inflamatórias (Joeckel, Bird, 2014).

A

B.

Figura 7 - (A) Modelos propostos para a internalização de grânulos líticos. Modelos propostos para a internalização de grânulos líticos. a) Através da formação de polímeros de perforina, b) pela conformação de um complexo composto pelo receptor de manose-6 fosfato, da membrana da célula alvo, com a Granzima B e c) por endocitose da região de membrana danificada da célula alvo, d) gerada pela união da perforina junto com as moléculas líticas aderidas adaptado de (Chávez-Galán et al., 2009; Susanto et al., 2012; Lieberman, 2016). **(B) Clivagem de diversos substratos pela granzima B na indução de apoptose da célula alvo após o ingresso dos grânulos.**

É conhecido que na resposta efetora via granzima/perforina dos LTCs frente aos vírus, a Grzm A tem capacidade de clivar a transcriptase reversa viral. Por outro lado, proteínas adenovirais críticas na replicação adenoviral e com capacidade de inibir a Grzm B são destruídas pela Grzm H. A Grzm K cliva as proteínas chamadas “importinas” da célula hospedeira, as quais são necessárias para a replicação do vírus influenza. Apesar disso, a diferença das granzimas, somente a perforina é indispensável no controle viral. Contudo, tem sido proposto que as granzimas conseguem alcançar o microambiente extracelular de maneira perforina-independente: entre elas se encontram o escape na sinapse imunológica, degranulação inespecífica devido a estimulação por quimioquinas ou integrinas, ou simplesmente a liberação constitutiva dos LTCs (Joeckel, Bird, 2014).

Sabe-se que, para induzir apoptose é preciso a presença de perforina. Interessantemente, as modificações em genes das granzimas geraram fenótipos sutis. Nestes fenótipos, destacam algumas funções redundantes das granzimas. Se algum destes componentes falha, como por exemplo uma ineficiente ativação de caspases na célula alvo, isto afetaria seriamente a taxa de eliminação pelos LTCs, além disso, o aumento de citocinas como IFN γ (Trapani et al., 2015).

Por tanto, a descoberta das granzimas abriu campo para expandir os conhecimentos da citotoxicidade mediada por células. (69). Em consequência, existe um grande interesse por compreender as vias de sinalização de morte específicas das granzimas e seu papel específico em distintas doenças infecciosas, inflamatórias e câncer. Por exemplo, recentemente foi descoberto uma Doença Hiper-Inflamatória Fatal (DHF) causada pela deficiência congênita da perforina, isto recuperou o interesse em outras patologias onde se suspeita seu envolvimento (68).

1.6.1.2 Citotoxicidade dependente da via de receptor de morte / ligante: Fas/FasL

A citotoxicidade dependente da via de receptor de morte é um dos principais mecanismos efetores da LTCs e células NK (Kavurma, Khachigian, 2003). Em 1989, foram isolados 2 tipos de anticorpos (IgM e IgG3) citolíticos para várias linhagens celulares, onde as proteínas reconhecidas foram designadas Fas e APO-1. O Fas humano contém 325 aminoácidos. Quando a células transformadas foram tratadas

com anti-Fas (humano), as células morreram num período de 5 horas, indicando que Fas pode traduzir um sinal de morte. Ao purificar o antígeno APO-1 humano e a partir da clonagem e purificação do cDNA estabeleceu a identidade de Fas (Nagata, Golstein, 1995).

Os Linfócitos T Citotóxicos ativados apresentam um ligante específico para Fas (FasL), também chamado CD95L (CD178). Este foi identificado em 1993 como uma proteína trans-membrana tipo II de 40kDa, pertencentes à superfamília das TNF. FasL (o qual inclui TNF α , linfotoxina a [LT - α], LT-b, OX40L, CD27L e CD30L) e existem como proteínas trimericas de união a membrana. FasL é expresso depois do reconhecimento antigênico. Esta expressão acontece tanto por sínteses *de novo* como por transformação de uma forma inativa a uma ativa (Kavurma, Khachigian, 2003).

Figura 8 - Morte por apoptose após o acoplamento do FAS (CD95) na célula alvo com um linfócito T citotóxico expressando FAS ligante (FASL; CD178). Adaptado de (Barry , Bleackley, 2002).

Por outro lado, o receptor Fas (CD95) é uma glicoproteína de transmembrana de 45-48 KDa e possui um domínio de 65 aminoácidos o qual é responsável pela sinalização de morte, chamado de domínio de morte (DD). Este domínio é homólogo ao receptor de TNF α e é possível uma sobreposição funcional entre ambos receptores (74).

A sinalização por Fas é de função exclusiva na indução de morte por apoptose típica, a união ao ligante FasL (CD178) promove a formação do complexo DISC (constituídas pela região intracelular do receptor, proteínas adaptadoras e pro-caspases). No entanto, não precisa da proteína adaptadora TRAFF, seus domínios de morte (DD) requerem também do adaptador FADD para ativar a caspase iniciadora (caspase-8) (Barry, Bleackley, 2002). Isto gera a ativação da cascata de caspases iniciadoras e posteriormente as caspases executoras como caspase-3 junto à atividade polimerase da poli (ADP-ribose) e clivagem de produtos proteicos celulares como lamina B1, α -fodrina, β -actina (Figura 8). A apoptose gerada pela via Fas/FasL é morfologicamente idêntica da morte celular mediada por granzima (Groscurth, Filgueira, 1998).

O receptor Fas é expresso numa variedade de células especialmente em células de proliferação rápida como linfócitos e células tumorais (Groscurth, Filgueira, 1998). Particularmente, a proteína Fas está altamente expressa em diferentes locais, como no intestino ou fígado. Consequentemente, receptor Fas está relacionado na patogênese de algumas doenças gastrointestinais como Colite Ulcerativa (UC) ou Doença de Enxerto versus Hospedeiro (GVHD) e inclusive na hepatite. Embora, apesar de que todas as células expressam o receptor Fas na sua superfície, nem todas elas são susceptíveis à apoptose por via Fas/FasL. Este fato pode ser devido a uma alta concentração de proteínas antiapoptóticas como IAP's, que bloqueiam as proteínas executoras de apoptose como caspase-3, -7 e -9, e c-FLIP, que inibe a ação da caspase-8 (Askenasy, Yolcu, Yaniv, Shirwan, Dc, 2011).

Outro exemplo de que a presença do receptor Fas não garante a morte de uma célula pode ser evidenciada em linfócitos que se encontram na fase S ou G1 do ciclo celular, já que o receptor Fas também pode cumprir a função de co-estimulador. Por outro lado, as condições no microambiente podem influenciar no tempo de vida de uma célula estimulada pela via Fas / FasL; em células HT-29 (câncer de cólon)

tratadas com anticorpos Anti-Fas, estas são resistentes a morte, mas em condições de inflamação (tratadas com IFN γ) se tornam susceptíveis a morte pelo mesmo estímulo (Pinkoski, Brunner, Green, 2000).

As células que expressam FasL como os LTCs podem gerar dano tecidual (no contexto do infiltrado inflamatório). No entanto, igualmente a Fas, nem todas as células FasL positivas têm capacidade funcional, já que alguns tecidos FasL positivos são susceptíveis à clivagem de metaloproteases, as quais clivam a parte transmembranica da FasL produzindo sua forma solúvel (sFasL) (82).

Os linfócitos T ativados, que são FasL⁺, podem também gerar moléculas sFasL. Esses achados feitos em pacientes com leucemia granular linfocítica, linfomas de células NK e tumores de células não linfoides (Kavurma, Khachigian, 2003). O sFasL, para induzir apoptose na célula alvo precisa de altas concentrações, porém como sFasL é um pobre indutor de apoptose, ele possui uma função protetora ao reduzir o dano tecidual competindo com os linfócitos T citotóxicos (FasL positivos) que se encontram no infiltrado inflamatórios, fornecendo um ambiente de menor citotoxicidade. Em outras palavras, as células podem ter expressão normal de FasL, mas em um microambiente onde existe uma alta concentração de sFasL este perde a habilidade de induzir morte por via Fas. Um dos tipos celulares onde se evidencia a importância do sFasL é nas células do epitélio intestinal e os hepatócitos. Além disso, se conhece que células tumorais expressam sFasL como mecanismo de escape dos LTCs e assim evitar o suicídio celular (autócrina) (82).

Além das atividades Fas/FasL em mediar a indução de apoptose, majoritariamente no contexto da resposta imune. Atualmente foi estabelecido que Fas possui uma série de atividades apoptóticas e não-apoptóticas, dependendo do microambiente celular, das quais algumas se apresentam mais relevantes que outras (Paulsen, Janssen, 2011; Peter et al., 2015):

- Uma das primeiras funções do Fas/FasL descritas é a participação nos mecanismos de tolerância periférica. Isto acontece depois de desenvolvida a resposta imune contra um patógeno. Estes linfócitos não são mais necessários e são eliminados para a manutenção da homeostasia. Esta eliminação acontece através da ativação da apoptose, destacando-se dois mecanismos: A morte celular induzida por ativação (AICD - *Activation-Induced Cell Death*) e a

morte autônoma de células T ativadas (ACAD - *Activated T Cell Autonomous Death*). Durante a morte por AICD, os receptores que pertencem à família TNF se unem a seus ligantes, que são homólogos à citocina TNF- α . Quando as células T são repetidamente ativadas pelo complexo TCR/CD3, FASL passa a ser expresso na superfície celular e se liga ao FAS de superfície na mesma célula ou em células adjacentes. Isto ativa uma cascata de caspases (começando pela caspase-8) as quais induzem a morte das células por apoptose. A falha deste processo de morte celular resulta em linfo-proliferação e autoimunidade. Camundongos portadores de mutações naturais no gene codificador de FAS (*Lpr*) ou seu ligante (*Gld*) desenvolvem uma doença autoimune sistêmica acompanhada da produção de auto-anticorpos, associado com alongamento dos órgãos linfáticos periféricos (linfonodos e baço) com características similares ao Lúpus eritematoso sistêmico humano. Em seres humanos, o defeito desta via de ativação leva a uma síndrome semelhante denominada ALPS - autoimmune lymphoproliferative syndrome (Strasser, Jost, Nagata, 2009). Aliás, além dos Linfócitos Treg (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺), recentemente, foi caracterizado um fenótipo de Treg CD8⁺CD122⁺CD49^{low} ou CD122⁺ capaz de eliminar *in vitro* e *in vivo* linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ ativados, pela via Fas/FasL (nos quais camundongos *Lpr* e *Gld* foram resistentes à regulação dos Treg CD122⁺), demonstrando mais uma vez sua importância na regulação da resposta imune (Akane, Kojima, Mak, Shiku, Suzuki, 2016).

- Tradicionalmente a apoptose induzida pela via Fas/FasL é definida como um processo não inflamatório, por exemplo, em processos de regulação da resposta imune. No caso das infecções, a via Fas/FasL se apresenta altamente pro-inflamatório. Para *Yersinia pestis*, FasL expresso nas células efectoras é um alvo crucial para desativar mediante a protease *Pla*; de maneira semelhante *Escherichia coli* gera modificações pós-traducionais da molécula adaptadora FADD para deter a apoptose na célula alvo (Caulfield, Lathem, 2014; Kingfisher Biotech, 2015). Particularmente em protozoários, apesar de que as LTCs contribuírem na resistência contra a infecção de *T. cruzi*, a via mediada por perforina e granzima B não é necessária. Isto foi observado quando foi analisado a parasitemia e sobrevivência de camundongos deficientes em granzima B cujos resultados foram similares aos selvagens, além de ser

protegidos contra uma nova infecção com *T. cruzi*, comparado com camundongos $\beta 2M$ e TAP-1 deficiente na qual a infecção foi letal. Isso sugere que os LTCs têm o potencial de controlar a infecção por *T. cruzi* pela via Fas/FasL ou pela produção de citocinas. Embora, a citólise dependente de perforina mediada pelos LTCs não é uniformizada para o controle de todos os protozoários, ainda se conhece pouco sob a citólise dependente de FasL na ausência de perforina em infecções como *T. cruzi* e *T. gondii* (65).

- Fas/FasL apresenta um papel dual, não apoptótico, na sinalização da célula T, Fas pode atuar como sinal co-estimulador na ativação e proliferação da célula T modulando o sinal de ativação de TCR/CD3 de maneira dose-dependente (em baixas doses de FasL). Por outro lado, ele pode silenciar o Linfócito T bloqueando o sinal do TCR na presença de altas doses de FasL (Paulsen, Janssen, 2011).

- Wang e colaboradores sugerem que a apoptose dos osteoclastos induzido pelos osteoblastos através da via de sinalização FASL/FAS como um novo mecanismo importante na manutenção da massa óssea, observado tanto em condições fisiológicas como em osteoporose do modelo de camundongos ovariectomizados – OVX (que apresentam osteoclastos com uma reduzida expressão de FasL e um aumento da reabsorção óssea) (Wang et al., 2015).

- Entre outras funções se encontram o papel de Fas na eficiente regeneração do fígado, a ativação de Fas estimula a migração de células epiteliais renais tubulares por mecanismos dependentes da integrina $\beta 8$, a provisão de sinais mitogênicos em células *Ito* pela ativação de EGFR geradas pelo dano diante de uma redução de vitamina A. Por sua parte, FasL se encontra constitutivamente expressado em tecidos de sítios “imuno-privilegiados” como olhos e testículos; similar ao endotélio tumoral (diferente do endotélio normal - FasL^{-/-}). Sendo FasL considerado um marcador tumoral de mal prognóstico (progressão tumoral) (Paulsen, Janssen, 2011).

1.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS LTCs

As células T CD8⁺ tem como principal mecanismo efetor a citotoxicidade celular constituindo uma importante arma contra o câncer e células infectadas por patógenos intracelulares. Os avanços científicos e tecnológicos nas últimas décadas melhoraram a análise dos linfócitos T CD8⁺ em aspectos da ativação, diferenciação e funções efetoras.

In vitro, 3 complexos Peptídeo-MHC são suficientes para desencadear lise e um único LTC ativado é capaz de lisar sequencialmente várias células alvo individualmente, daí o termo “assassino em série”. Além disso, os LTCs efetores eliminam rapidamente esplenócitos peptídeo-pulsados injetados por via intravenosa e esses estudos sugerem que a eliminação mediada pelos LTCs é extremamente eficiente. No entanto, com alguns vírus, a dimensão, taxa e eficiência da eliminação mediante LTC de células infectadas não tem sido cuidadosamente quantificados *in vivo* (Nolz, Hill, 2016).

O teste *gold standard* para a avaliação da citotoxicidade celular é o ensaio de liberação de crômio radioativo (⁵¹Cr), o qual foi desenvolvido em 1968 por Brunner e colaboradores. Este ensaio se baseia na ligação e internalização de radioisótopos nas células alvo (Brunner, Mauel, Cerottini, Chapuis, 1968). Outro ensaio importante desenvolvido foi o ELISPOT, o qual é um ensaio quantitativo que permite o reconhecimento de citocinas secretadas durante as interações célula-célula, como por exemplo Interferon-γ (IFNγ) e interleucina-2 (IL-2). Da mesma forma, o ensaio de funções das células T usando citometria de fluxo policromática está em estados avançados de padronização. Esta tecnologia permite analisar de forma simultânea várias funções de células T, incluindo a secreção de citocinas e quimiocinas (como IL-2, IFNγ, TNF e CCL4); a avaliação do potencial citotóxico (mensurado pela expressão de grânulos de perforina); e a avaliação da proliferação de célula T (usando o corante fluorescente 5,6-diacetato de carboxifluoresceína éster succinimidil, CFSE). O ensaio CFSE para a proliferação de células T está sendo usado e validado para monitorar as respostas das células T induzida por vacinas.

Estas funções são geralmente analisadas seguindo estimulação *in vitro* antígeno específico. O desenvolvimento de ensaios padronizados de funções de

células T são uma ferramenta poderosa para a realização de uma caracterização e compreensão de respostas antígeno-específica de células T em infecções virais e em outras doenças infecciosas, tais como tuberculose (Luciani, Sanders, Oveissi, Pang, Chen, 2013). Por conseguinte, o desenvolvimento de ELISPOT e outros ensaios como a construção de multímetros de MHC carregados com peptídeos específicos melhoraram a detecção e caracterização de células T antígeno-específicas. A potencial importância de outras funções de células T apenas começou a ser explorado. Dessa forma, há conhecimento limitado sobre alterações nos padrões da função das células T durante as várias fases de uma infecção ou vacinação. Assim, para abordar estas questões, é necessário adotar uma abordagem sistemática (91).

Para fazer esse tipo de abordagem, as análises *in vitro* e *ex vivo* são menos informativas que os ensaios *in vivo* pelo fato de não levarem em conta a complexidade do microambiente onde a resposta imune acontece e, portanto, nem sempre reproduz o que acontece de maneira sistêmica. Por exemplo, foi observado que mesmo depois de 300 dias de exposição a um vírus, 84% das células alvo transferidas foram eliminadas *in vivo*, enquanto os ensaios *in vitro* ou *ex vivo* resultou difícil obter alguma informação (92). Além disso, vários paradigmas baseados em estudos *in vitro* foram rejeitados ou pelo menos reformulados depois de experimentos *in vivo*. Entre os quais, os resultados que mostravam que ausência de granzimas A e B prejudica a eliminação *in vitro* dos alvos pelos LTCs (93).

Vasconcelos e colaboradores infectaram experimentalmente camundongos com *T. cruzi* e imunizaram com vacinas adenovirais recombinantes para antígenos imunodominantes do *T. cruzi* gerando uma forte imunidade mediada por linfócitos T CD8⁺. É conhecido a eliminação de células infectadas por *T. cruzi* por LTCs induzidas pela vacinação com adenovírus recombinante (usada no protocolo). No entanto, não está esclarecido as propriedades eficazes dos LTCs responsáveis da resposta imune contra a infecção. Além disso, curiosamente, foram encontrados níveis maiores de expressão do receptor de morte FAS/CD95 na superfície dos LTCs de camundongos infectados comparados aos vacinados, ou vacinados e infectados. Sugerindo assim, que a vacinação interfere com os programas de morte celular estabelecidos ao final de uma resposta imune permitindo a sobrevivência e, talvez, alterando a “qualidade” de células T de memória, os quais, geram proteção contra um determinado patógeno (94). Por outro lado, em algumas infecções foi mostrado que existem respostas contra

epítomos subdominantes pelos LTCs e que isso contribui na resistência contra patógenos. Este tipo de análise tem muita relevância, uma vez que permita a determinação de hierarquia de respostas dos LTCs frente aos epítomos dominantes e subdominantes, induzidos pela mesma infecção ou vacinação em um determinado camundongo (47).

Assim, o ensaio *in vivo* vem ganhando cada vez mais atenção como ferramenta importante para compreender a avaliação de respostas imunes mediadas por LTCs. O ensaio de citotoxicidade *in vivo* pelos LTCs foi proposto por Oehen e colaboradores e está baseado na inoculação de camundongos (imunizados ou infetados) com esplenócitos singênicos marcados em proporção 1:1, onde uma população é pulsada com um peptídeo, para o qual a resposta específica do LTC vai ser analisada (Oehen, Brduscha-Riem, 1998). A presença de células marcadas no baço dos camundongos receptores é avaliada por citometria de fluxo, depois de diferentes períodos.

Recentemente foi reportado uma técnica denominada *CaFlux* que determina a frequência e potência das células TCD8 antígeno-específicas, o ensaio caracteriza a qualidade da resposta de células T através da quantificação das variações de concentração de Ca^{+2} intracelular em tempo real por microscopia de fluorescência em células T CD8⁺ respondedoras para peptídeos conhecidos, de maneira semelhante ao ELISPOT. *Caflux* tem o potencial de prover informação essencial sob o estado do sistema imune, a morbidade de alguma doença, a potência de uma terapia e inclusive a eficácia vacinal. A técnica se apresenta com maior sensibilidade ademais de menor tempo de detecção com respeito ao ELISPOT e uma resposta mensurável dos linfócitos antígeno-específicos frente ao ligante do TCR com respeito ao ensaio de multímeros. Embora, apesar disso, devido o fato de que o *CaFlux* detecta respostas de células T dependentes de Ca^{+2} , as células anérgicas, exaustas, apoptóticas e incluso as respostas de células T Fas/FasL dependentes poderiam não ser detectadas (Anikeeva, Grosso, Flomenberg, Sykulev, 2016).

Por tanto, atualmente tem se levantado a questão de quais são os fatores ou parâmetros interveem neste *switch* de mecanismos citotóxicos mediado pelos LTCs e como isso é regulado e existem até a data pouquíssimas referencias de ensaios *ex vivo* e *in vivo* que verdadeiramente esclareçam esta controversa (Meiraz, Garber,

Harari, Hassin, Berke, 2009; Eshima et al., 2012; Martinez-Lostao, Anel, Pardo, 2015; Voskoboinik et al., 2015; Coe et al., 2016; Tao et al., 2016).

Utilizando o sistema utilizado pelo grupo de Vasconcelos, neste trabalho vamos a investigar se alguns parâmetros podem estar envolvidos na regulação da resposta citotóxica dependente de perforina e FasL dos LTCs por meio de um modelo *in vivo* não infeccioso de vacinação terapêutica contra *T. cruzi* baseada no adenovírus humano tipo 5 contendo 2 tipos de transgenes (AdH5.ASP-2 e AdH5.β-gal) e possivelmente elucidar se estes parâmetros são determinantes na regulação da mudança de fenótipo citotóxico.

Desta forma, esclarecer os mecanismos de regulação das principais vias citotóxicas dos linfócitos T CD8⁺ na eliminação de células-alvo é importante e abre caminho para múltiplas aplicações de diferente natureza, desde o campo do conhecimento da Imunologia básica, passando pelo controle de qualidade de vacina, até de conhecimento para novas abordagens terapêuticas ou tratamentos complementares na Imunoterapia (Yong et al., 2012; Keller, Bollard, 2014; Martinez-Lostao et al., 2015; Coe et al., 2016), essencialmente importantes no tratamento de doenças infecciosas, neoplásicas ou autoimunidades.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Nossos resultados demonstram que a dose viral de inoculação e o tempo após imunização influenciam a citotoxicidade mediada pelos linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos, dependente de Fas/FasL.
- Nossos resultados reforçam a ideia de que os mecanismos efetores citotóxicos dos linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos dependentes de Perforina e FasL não são redundantes *in vivo*.

REFERÊNCIAS*

1. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388–402.
2. Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop*. 2010;115(1–2):5–13.
3. Rassi Jr A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26:275–91.
4. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*. 2009;115:14–21.
5. Stanaway JD, Roth G. The Burden of Chagas Disease. *Glob Heart*. 2015;10(3):139–44.
6. Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2009;104 Suppl:101–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753464>
7. Lescure F-X, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis*. 2010;10:556–70.
8. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2015.
9. Ersching J, Basso AS, Kalich VLG, Bortoluci KR, Rodrigues MM. A Human Trypanosome Suppresses CD8+ T Cell Priming by Dendritic Cells through the Induction of Immune Regulatory CD4+ Foxp3+ T Cells. *PLoS Pathog*. 2016;12(6):1–23.

*De acordo com:

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

10. Virgilio S, Pontes C, Dominguez MR, Ersching J, Rodrigues MM, Vasconcelos JR. CD8 + T Cell-Mediated Immunity during Trypanosoma cruzi Infection : A Path for Vaccine Development ? 2014;2014.
11. Pereira IR esende, Vilar-Pereira G, Marques V, da Silva AA lice, Caetano B, Moreira OC ruz, et al. A human type 5 adenovirus-based Trypanosoma cruzi therapeutic vaccine re-programs immune response and reverses chronic cardiomyopathy. PLoS Pathog. 2015;11(1):e1004594.
12. Hotez PJ, Fenwick A, Savioli L, Molyneux DH. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. Lancet. 2009;373(9674):1570–5.
13. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, et al. The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. Expert Rev Mol Med. 2010;12:1–23.
14. Stempin CC, Cerban FM. Macrófagos e inducción de arginasa como mecanismo de evasión de parásitos. Medicina (B Aires). 2007;67(6 II):737–46.
15. Algranati ID, Serra MP, González CCNS. Biología molecular del metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos . Expresión de genes heterólogos de ornitina y arginina decarboxilasa en Trypanosoma cruzi . Rev Química Viva. 2006;2:78–94.
16. Hernandez Torres M. Papel de BIM na resposta imune ao Trypanosoma cruzi durante a infecção experimental e em decorrência da vacinação com DNA plasmidial e adenovírus recombinante. 2015;
17. Brener Z. Biology of Trypanosoma cruzi. Annu Rev Microbiol. 1973;27(1):347–82.
18. Sanchez-Valdez FJ, Perez BC, Ferreira A, Basombrio MA, Perez Brandan C, Ferreira A, et al. Gene-deleted live-attenuated Trypanosoma cruzi parasites as vaccines to protect against Chagas disease. Expert Rev Vaccines. 2015;14(5):681–97.

19. Chatelain E. Chagas Disease Research and Development: Is There Light at the End of the Tunnel? *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2016;15:98–103. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2001037016300836>
20. Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol*. 2006;100(8):663–77.
21. Cerny N, S??nchez Alberti A, Bivona AE, De Marzi MC, Frank FM, Cazorla SI, et al. Coadministration of cruzipain and GM-CSF DNAs, a new immunotherapeutic vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection. *Hum Vaccines Immunother*. 2016;12(2):438–50.
22. Pinto Dias JC, Rodriguez Coura J, Shikanai Yasuda MA. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. 2014;47(1):123–5.
23. Bhatia V, Garg N. Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. *Expert Rev Vaccines*. 2005;4(6):867–80.
24. Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(4):430–4.
25. Kayama H, Takeda K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect*. 2010;12(7):511–7.
26. Kim DJ, Youn JI, Seo SH, Jin HT, Sung YC. Differential regulation of antigen-specific CD8(+) T cell responses by IL-12p40 in a dose-dependent manner. *J Immunol*. 2008;180(11):7167–74.
27. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2006;177(6):3515–9.
28. Cardoso MS, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC. Evasion of the immune response by *trypanosoma cruzi* during acute infection. *Front Immunol*.

2016;6(JAN):1–15.

29. Rodrigues MM, Oliveira AC, Bellio M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *J Parasitol Res.* 2012;2012:507874.
30. Gonçalves VM, Matteucci KC, Buzzo CL, Miollo BH, Ferrante D, Torrecilhas AC, et al. NLRP3 Controls *Trypanosoma cruzi* Infection through a Caspase-1-Dependent IL-1R-Independent NO Production. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(10):1–11.
31. Ferreira LLRP, Frade AAF, Baron MA, Navarro IC, Kalil J, Chevillard C, et al. Interferon- γ and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. *World J Cardiol.* 2014;6(8):782–90.
32. Celentano AM, González Cappa SM. In vivo macrophage function in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Acta Trop.* 1993;55(3):171–80.
33. Basso B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World J Exp Med.* 2013;3(1):1–10.
34. Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun.* 1994;62(11):5177–82.
35. Sales P a, Golgher D, Oliveira R V, Vieira V, Arantes RME, Lannes-Vieira J, et al. The regulatory CD4+CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* 2008 May;10(6):680–8.
36. Cazorla SI, Frank FM, Malchiodi EL. Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection. *Expert Rev Vaccines.* 2009;8(7):921–35.
37. Andrade D V., Gollob KJ, Dutra WO. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(7):1–10.

38. Parodi C, Padilla AM, Basombrío MA. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:288–94.
39. Miyahira Y. *Trypanosoma cruzi* infection from the view of CD8+ T cell immunity an infection model for developing T cell vaccine. *Parasitol Int*. 2008;57(1):38–48.
40. Tarleton R. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 1990;144(2):717–24.
41. Nunes MP, Andrade RM, Lopes MF, DosReis G a. Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts. *J Immunol*. 2012;160(3):1313–9.
42. Jordan KA, Hunter CA. Experimental Parasitology Regulation of CD8 + T cell responses to infection with parasitic protozoa. *Exp Parasitol*. 2010;126(3):318–25.
43. Dotiwala F, Mulik S, Polidoro RB, Ansara JA, Burleigh BA, Walch M, et al. Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. *Nat Med* [Internet]. 2016;22(2):210–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26752517>
44. Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, Sullivan S, et al. CD8+ T-Cell Responses to *Trypanosoma cruzi* Are Highly Focused on Strain-Variant trans -Sialidase Epitopes. *PLoS Pathog*. 2006;2(8):0731–40.
45. Tzelepis F, Alencar BCG De, Penido MLO, Claser C, Machado A V, Brunaromero O, et al. Infection with *Trypanosoma cruzi* Restricts the Repertoire of Parasite-Specific CD8+ T Cells Leading to Immunodominance. *J Immunol*. 2008;(16):1737–48.
46. Padilla AM, Bustamante JM, Tarleton RL. CD8 + T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Curr Opin Immunol*. 2009;21:385–90.
47. Dominguez MR, Silveira EL V, de Vasconcelos JRC, de Alencar BCG,

Machado A V., Bruna-Romero O, et al. Subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes contribute to resistance against experimental infection with a human protozoan parasite. PLoS One. 2011;6(7):12–20.

48. Rosenberg CS, Martin DL, Tarleton RL. CD8+ T Cells Specific for Immunodominant Trans-sialidase Epitopes Contribute to Control of Trypanosoma cruzi Infection but are Not Required for Resistance¹. J Immunol. 2010;185(1):560–8.
49. SCOTT MT, GOSS-SAMPSON M. Restricted IgG isotype profiles in T. cruzi infected mice and Chagas' disease patients. Clin exp Immunol. 1984;58:372–9.
50. Brodskyn CI, Silva AM, Takehara HA, Mota I. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with Trypanosoma cruzi. Immunol Cell Biol. 1989;343–8.
51. Kumar S, Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of Trypanosoma cruzi. Parasite Immunol. 1998;20(5):207–16.
52. Bryan M a, Guyach SE, Norris K a. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in Trypanosoma cruzi infection of susceptible and resistant mice. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(7):1–16.
53. Dosreis GA. Evasion of immune responses by Trypanosoma cruzi , the etiological agent of Chagas disease Evasion of immune responses by Trypanosoma cruzi , the etiological agent of Chagas disease. 2011;44(2):84–90.
54. Lidani KCF, Bavia L, Ambrosio AR, de Messias-Reason IJ. The Complement System: A Prey of Trypanosoma cruzi. Front Microbiol [Internet]. 2017;8(April):607. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00607/abstract>
55. Rodríguez-Morales O, Monteón-Padilla V, Carrillo-Sánchez SC, Ríos-Castro M, Martínez-Cruz M, Carabarin-Lima A, et al. Experimental Vaccines against Chagas Disease: A Journey through History. J Immunol Res.

2015;2015.

56. Rocha CD, Caetano BC, Machado AV, Bruña-Romero O. Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. *Int Microbiol.* 2004;7(2):83–94.
57. Tatsis N, Fitzgerald JC, Reyes-Sandoval A, Harris-McCoy KC, Hensley SE, Zhou D, et al. Adenoviral vectors persist in vivo and maintain activated CD8+ T cells: Implications for their use as vaccines. *Blood.* 2007;110(6):1916–23.
58. Ahmadzadeh M, Hussain SF, Farber DL. Heterogeneity of the memory CD4 T cell response: persisting effectors and resting memory T cells. *J Immunol.* 2001;166(2):926–35.
59. Machado A V., 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* [Internet]. 2006;17(9):898–908. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/hum.2006.17.898>
60. Bangari DS, Mittal SK. Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *October.* 2007;454(1):42–54.
61. Halle S, Keyser KA, Stahl FR, Busche A, Marquardt A, Zheng X, et al. In Vivo Killing Capacity of Cytotoxic T Cells Is Limited and Involves Dynamic Interactions and T Cell Cooperativity. *Immunity.* 2016;44(2):233–45.
62. Lieberman J. Cytotoxic Lymphocytes. *Encycl Immunobiol Acad Press* [Internet]. 2016;3(Cytotoxic Lymphocytes):363–73. Available from: <http://www.idi.harvard.edu/uploads/investigators/201605-EncyclopedialImmunobio.pdf>
63. Nolz JC, Hill AB. Strength in Numbers: Visualizing CTL-Mediated Killing In Vivo. *Immunity* [Internet]. 2016;44(2):207–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.026>

64. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2002;2(6):401–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093006>
65. Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8 γ T CELL EFFECTOR MECHANISMS IN RESISTANCE TO INFECTION. 2000;275–308.
66. Duan S, Thomas PG. Balancing Immune Protection and Immune Pathology by CD8(+) T-Cell Responses to Influenza Infection. *Front Immunol* [Internet]. 2016;7(February):25. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4742794&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
67. Catalfamo M, Henkart PA. Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(5):522–7.
68. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(6):388–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25998963>
69. Ewen CL, Kane KP, Bleackley RC. A quarter century of granzymes. *Cell Death Differ* [Internet]. 2012;19(1):28–35. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3252830&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
70. Trapani JA. Granzymes, cytotoxic granules and cell death: the early work of Dr. Jurg Tschopp. *Cell Death Differ* [Internet]. 2012;19(1):21–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2011.156>
71. Law RHP, Lukyanova N, Voskoboinik I, Caradoc-Davies TT, Baran K, Dunstone MA, et al. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature* [Internet]. 2010;468(7322):447–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21037563>
72. Leung C, Hodel AW, Brennan AJ, Lukyanova N, Tran S. Real-time visualization of perforin nanopore assembly. *Nat Nanotechnol* [Internet]. 2017;in press(February). Available from:

<http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2016.303>

73. Woodsworth DJ, Dunsing V, Coombs D. Design Parameters for Granzyme-Mediated Cytotoxic Lymphocyte Target-Cell Killing and Specificity. *Biophys J* [Internet]. 2015;109(3):477–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2015.06.045>
74. Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascurain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2009;6(1):15–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19254476> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4002546>
75. Trapani JA, Voskoboinik I, Jenkins MR. Perforin-dependent cytotoxicity: “Kiss of death” or prolonged embrace with darker elation-sequences? *Oncoimmunology* [Internet]. 2015;4(9):e1036215. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2015.1036215>
76. Susanto O, Trapani JA, Brasacchio D. Controversies in granzyme biology. *Tissue Antigens*. 2012;80(6):477–87.
77. Kumar R, Patel SK, Rami Reddy BV, Bhatt M, Karthik K, Gandham RK, et al. Apoptosis and other alternate mechanisms of cell death. *Asian J Anim Vet Adv*. 2015;10(10):646–68.
78. Joeckel LT, Bird PI. Are all granzymes cytotoxic in vivo? *Biol Chem*. 2014;395(2):181–202.
79. Kavurma MM, Khachigian LM. Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression. *Cell Death Differ*. 2003;10(1):36–44.
80. Nagata S, Golstein P. The Fas Death Factor. *Science* (80-). 1995;267(5203):1449–56.
81. Groscurth P, Filgueira L. Physiology. *Curr Opin Hematol*. 1998;13(1):17–21.
82. Askenasy N, Yolcu ES, Yaniv I, Shirwan H, Dc W. Induction of tolerance using Fas ligand : a double-edged immunomodulator Review in translational

hematology Induction of tolerance using Fas ligand: a double-edged immunomodulator. *Hematology*. 2011;105(4):1396–404.

83. Pinkoski, Michael J; Brunner Thomas; Green DLT. Fas and Fas ligand in gut and liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2000;(278):G354–66. Available from: <http://www.ajpgi.org>
84. Paulsen M, Janssen O. Pro- and anti-apoptotic CD95 signaling in T cells. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2011;9(1):7. Available from: <http://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/1478-811X-9-7>
85. Peter ME, Hadji a, Murmann a E, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak a, et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ* [Internet]. 2015;22(4):549–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2015.3>
86. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. *Immunity* [Internet]. 2009;30(2):180–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.001>
87. Akane K, Kojima S, Mak TW, Shiku H, Suzuki H. CD8+CD122+CD49^{low} regulatory T cells maintain T-cell homeostasis by killing activated T cells via Fas/FasL-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016;113(9):2460–5. Available from: <http://www.pnas.org/content/113/9/2460.full>
88. Caulfield AJ, Lathem WW. Disruption of Fas-Fas Ligand Signaling, Apoptosis, and Innate Immunity by Bacterial Pathogens. *PLoS Pathog*. 2014;10(8):8–11.
89. Kingfisher Biotech. The Role of FasL / Fas Signaling Network in Infections and Tumorigenesis. 2015;1–6.
90. Brunner KT, Mauel J, Cerottini J, Chapuis B. Quantitative Assay of the Lytic Action of Immune Lymphoid Cells on 5 " Cr-Labelled Allogeneic Target Cells In vitro ; Inhibition by Isoantibody and by Drugs. 1968;(1967).
91. Luciani F, Sanders MT, Oveissi S, Pang KC, Chen W. Increasing viral dose

causes a reversal in CD8+ T cell immunodominance during primary influenza infection due to differences in antigen presentation, T cell avidity, and precursor numbers. *J Immunol* [Internet]. 2013;190(1):36–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233728>

92. 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.
93. Regner M, Pavlinovic L, Koskinen A, Young N, Trapani JA, Müllbacher A. Cutting edge: rapid and efficient in vivo cytotoxicity by cytotoxic T cells is independent of granzymes A and B. *J Immunol* [Internet]. 2009;183(1):37–40. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/183/1/37.full>
94. Vasconcelos JR, Bruña-Romero O, Araújo AF, Dominguez MR, Ersching J, de Alencar BCG, et al. Pathogen-induced proapoptotic phenotype and high CD95 (Fas) expression accompany a suboptimal CD8+ T-cell response: Reversal by adenoviral vaccine. *PLoS Pathog*. 2012;8(5).
95. 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* [Internet]. 1998;161(10):5338–46. Available from: <http://ebooks.cambridge.org/ref/id/CBO9781107415324A009%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25246403%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4249520%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9820507>
96. Anikeeva N, Grosso D, Flomenberg N, Sykulev Y. Evaluating frequency and quality of pathogen-specific T cells. *Nat Commun* [Internet]. 2016;7:13264. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms13264%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27786275>
97. Meiraz A, Garber OG, Harari S, Hassin D, Berke G. Switch from perforin-expressing to perforin-deficient CD8+ T cells accounts for two distinct types of effector cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Immunology*. 2009;128(1):69–82.

98. Martínez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res.* 2015;21(22):5047–56.
99. Eshima K, Chiba S, Suzuki H, Kokubo K, Kobayashi H, Iizuka M, et al. Ectopic expression of a T-box transcription factor, eomesodermin, renders CD4 + Th cells cytotoxic by activating both perforin- and FasL-pathways. *Immunol Lett* [Internet]. 2012;144(1–2):7–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2012.02.013>
100. Coe GL, Redd PS, Paschall A V, Lu C, Gu L, Cai H, et al. Ceramide mediates FasL-induced caspase 8 activation in colon carcinoma cells to enhance FasL-induced cytotoxicity by tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(August):30816. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27487939>
101. Tao J, Li L, Wang Y, Fu R, Wang H, Shao Z. Increased TIM3+CD8+T cells in Myelodysplastic Syndrome patients displayed less perforin and granzyme B secretion and higher CD95 expression. *Leuk Res.* 2016;51:49–55.
102. Keller MD, Bollard CM. Immunologic special forces : anti-pathogen cytotoxic T-lymphocyte immunotherapy following hematopoietic stem cell transplantation. *ImmunoTargets Ther.* 2014;3:97–106.
103. Yong X, Xiao YF, Luo G, He B, Lü MH, Hu CJ, et al. Strategies for enhancing vaccine-induced CTL antitumor immune responses. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012.
104. Boscardin SB, Kinoshita SS, Adriana E, Rodrigues MM, Fujimura AE. Immunization with cDNA Expressed by Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* Elicits Protective Immune Response against Experimental Infection
Immunization with cDNA Expressed by Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* Elicits Protective Immune Response against Experime. 2003;71(5):2744–57.
105. De Alencar BCG, Persechini PM, Haolla FA, De Oliveira G, Silverio JC, Lannes-Vieira J, et al. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against

a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect Immun.* 2009;77(10):4383–95.

106. Clemente T, Dominguez MR, Vieira NJ, Rodrigues MM, Amarante-Mendes GP. In vivo assessment of specific cytotoxic T lymphocyte killing. *Methods* [Internet]. 2013;61(2):105–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.02.007>
107. Yardeni T, Eckhaus M, Morris HD, Huizing M, Hoogstraten-Miller S. Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim (NY)* [Internet]. 2011;40(5):155–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21508954> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3158461>
108. Akondy RS, Johnson PLF, Nakaya HI, Edupuganti S, Mulligan MJ, Lawson B, et al. Initial viral load determines the magnitude of the human CD8 T cell response to yellow fever vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2015;112(10):3050–5. Available from: <http://www.pnas.org/content/112/10/3050.long>
109. Appay V, Douek DC, Price DA. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med.* 2008;14(6):623–8.
110. He J-S, Gong D-E, Ostergaard HL. Stored Fas ligand, a mediator of rapid CTL-mediated killing, has a lower threshold for response than degranulation or newly synthesized Fas ligand. *J Immunol.* 2010;184(2):555–63.
111. Lettau M, Kabelitz D, Janssen O. Lysosome-Related Effector Vesicles in T Lymphocytes and NK Cells. *Scand J Immunol.* 2015;82(3):235–43.
112. Wayne Juang SW. Regulation of FasL expression, and delineation of differentiation states of cytotoxic lymphocytes. Department of Medical Microbiology and Immunology University of Alberta; 2015.
113. Rode M, Balkow S, Sobek V, Brehm R, Martin P, Kersten A, et al. Perforin and fas act together in the induction of apoptosis, and both are critical in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Virol.*

2004;78(22):12395–405.

114. Janssen EM, Lemmens EE, Gour N, Reboulet RA, Green DR, Schoenberger SP, et al. Distinct roles of cytolytic effector molecules for antigen-restricted killing by CTL in vivo. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2010;88(7):761–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2939217%7B%7Dtool=pmcentrez%7B%7Drendertype=abstract>
115. Mateo V, Ménager M, De Saint-Basile G, Stolzenberg MC, Roquelaure B, André N, et al. Perforin-dependent apoptosis functionally compensates Fas deficiency in activation-induced cell death of human T lymphocytes. *Blood*. 2007;110(13):4285–92.
116. Muhl T, Krawczak M, ten Haaf P, Hunsmann G, Sauermann U. MHC Class I Alleles Influence Set-Point Viral Load and Survival Time in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Monkeys. *J Immunol* [Internet]. 2002;169(6):3438–46. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.169.6.3438>
117. Leggatt G. Peptide Dose and/or Structure in Vaccines as a Determinant of T Cell Responses. *Vaccines* [Internet]. 2014;2(3):537–48. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-393X/2/3/537/htm>
118. Shanker A, Brooks AD, Jacobsen KM, Wine JW, Wilttrout RH, Yagita H, et al. Antigen Presented by Tumors In vivo Determines the Nature of CD8 + T-Cell Cytotoxicity. 2009;(16):6615–23.
119. Zelinskyy G, Werner T, Dittmer U. Natural regulatory T cells inhibit production of cytotoxic molecules in CD8⁺ T cells during low-level Friend retrovirus infection. *Retrovirology* [Internet]. 2013;10:109. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24156479>
120. John LB, Darcy PK. The double-edged sword of IFN- γ -dependent immune-based therapies. 2016;94(6):527–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2016.37>
121. Medema JP, de Jong J, Peltenburg LT, Verdegaal EM, Gorter a, Bres S a,

et al. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001;98(20):11515–20. Available from: <http://www.pnas.org/content/98/20/11515>

122. Hassin D, Garber OG, Meiraz A, Schiffenbauer YS, Berke G. Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable. *Immunology*. 2011;133(2):190–6.
123. Leignadier J, Favre S, Luther SA, Luescher IF. CD8 engineered cytotoxic T cells reprogram melanoma tumor environment. *Oncoimmunology* [Internet]. 2016;5(3):e1086861. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27141342>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4839323>
124. Ishikawa T, Yamada H, Oyamada A, Goshima F, Nishiyama Y, Yoshikai Y. Protective role of Fas-FasL signaling in lethal infection with herpes simplex virus type 2 in mice. *J Virol*. 2009;83(22):11777–83.
125. Akimzhanov AM, Wang X, Sun J, Boehning D. T-cell receptor complex is essential for Fas signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010;107(34):15105–10. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2930531&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
126. Cruz AC, Ramaswamy M, Ouyang C, Klebanoff CA, Sengupta P, Yamamoto TN, et al. Fas/CD95 prevents autoimmunity independently of lipid raft localization and efficient apoptosis induction. *Nat Commun* [Internet]. 2016;7:13895. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms13895>
127. Muñoz Petecua NC. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DE LINFOCITOS T CD8+ DE MEMORIA [Internet]. Bogotá - Colombia; 2011. Available from: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8763/tesis698.pdf?sequence=1>

128. Blair D a, Turner DL, Bose TO, Pham Q-M, Bouchard KR, Williams KJ, et al. Duration of antigen availability influences the expansion and memory differentiation of T cells. *J Immunol.* 2011;187(5):2310–21.
129. Tada Y, O-Wang J, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Okada S, et al. Cutting edge: a novel role for Fas ligand in facilitating antigen acquisition by dendritic cells. *J Immunol.* 2002;169:2241–5.
130. Zhong B, Ma G, Sato A, Shimoizato O, Liu H, Li Q, et al. Fas ligand DNA enhances a vaccination effect by coadministered DNA encoding a tumor antigen through augmenting production of antibody against the tumor antigen. *J Immunol Res.* 2015;2015.
131. Zhu Y, Huang B, Shi J. Fas ligand and lytic granule differentially control cytotoxic dynamics of natural killer cell against cancer target. 2016;7(30).
132. Elemans M, Seich al Basatena N-K, Asquith B. The Efficiency of the Human CD8+ T Cell Response: How Should We Quantify It, What Determines It, and Does It Matter? *PLoS Comput Biol.* 2012;8(2):e1002381.
133. Hagn M, Sontheimer K, Dahlke K, Brueggemann S, Kaltenmeier C, Beyer T, et al. Human B cells differentiate into granzyme B-secreting cytotoxic B lymphocytes upon incomplete T-cell help. *Immunol Cell Biol.* 2012;90(June 2011):457–67.
134. Hoves S, Trapani JA, Voskoboinik I. The battlefield of perforin/granzyme cell death pathways. *J Leukoc Biol [Internet].* 2010;87(2):237–43. Available from:
<http://www.jleukbio.org/content/87/2/237%5Cnhttp://www.jleukbio.org/content/87/2/237.full%5Cnhttp://www.jleukbio.org/content/87/2/237.full.pdf%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915166>
135. Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. 2016;
136. Schirmbeck R, Reimann J, Kochanek S, Kreppel F. The immunogenicity of adenovirus vectors limits the multispecificity of CD8 T-cell responses to vector-encoded transgenic antigens. *Mol Ther.* 2008;16(9):1609–16.

137. de Aquino MTP, Malhotra A, Mishra MK, Shanker A. Challenges and future perspectives of T cell immunotherapy in cancer. *Immunol Lett* [Internet]. 2015;166(2):117–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2015.05.018>
138. Chen J, Hsu H-C, Zajac AJ, Wu Q, Yang P, Xu X, et al. In vivo analysis of adenovirus-specific cytotoxic T lymphocyte response in mice deficient in CD28, fas ligand, and perforin. *Hum Gene Ther* [Internet]. 2006;17(6):669–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16776575>