

MARYANNE MELANIE GONZALES CARAZAS

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

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

Área de concentração: Imunologia

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

Versão original

São Paulo
2017

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

Mostra-se um esquema comparativo dos tipos de vacinas utilizadas para estimular a resposta mediada por linfócitos T CD8⁺. Apesar de que algumas conseguiram ativar fortemente a resposta de linfócitos T CD4⁺, não conseguiram induzir a ativação de linfócitos T CD8⁺. (Adaptado de Koup & Bouek, 2011)

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1 Ativação dos linfócitos T CD8⁺

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

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

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

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

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

1.2 Resposta efetora dos linfócitos T CD8⁺

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

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

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

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

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

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

1.3 Regulação da resposta imune gerada pelos linfócitos T CD8⁺

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

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

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

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

1.4 A via intrínseca da apoptose

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

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

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

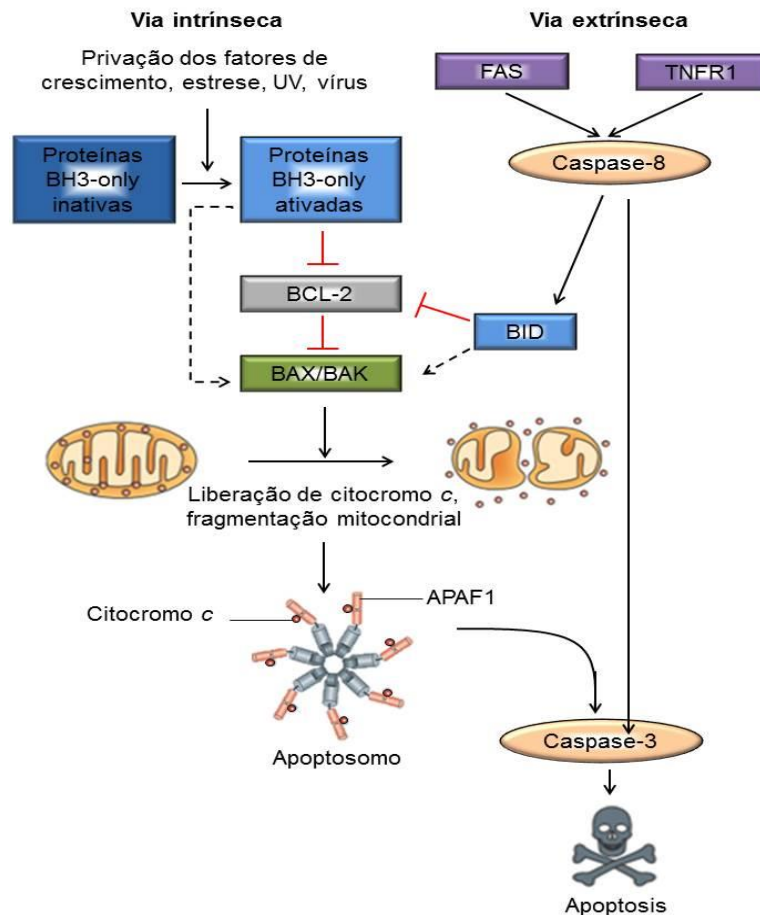


Figura 1 - Vias de morte celular por apoptose.

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

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

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

1.5 Família de proteínas Bcl-2

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

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

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

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

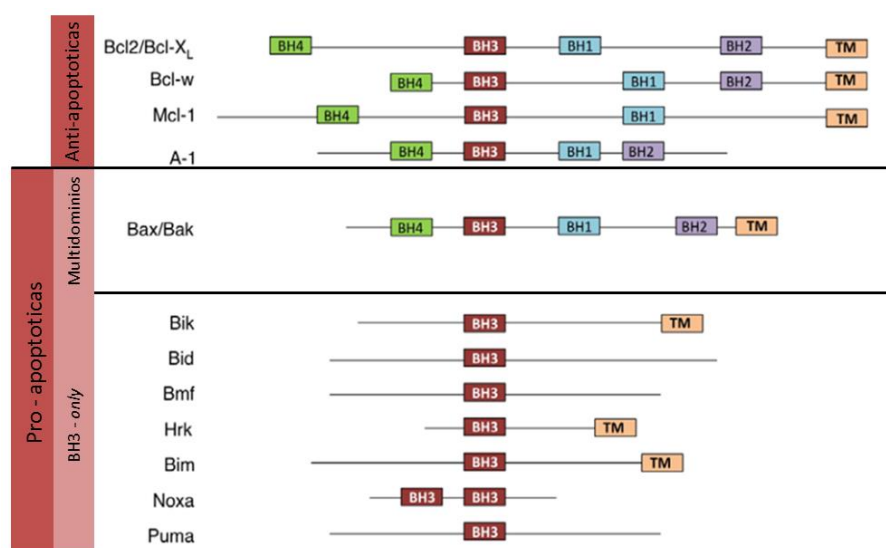


Figura 2 - Organização dos domínios de vários membros da família Bcl-2.

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

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

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

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

1.6 A proteína BIM

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

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

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

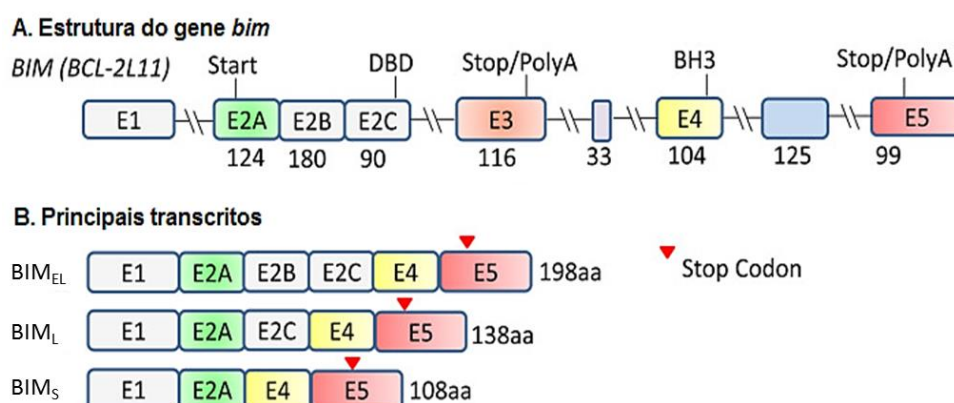


Figura 3 - A estrutura genética de *bim* e as principais isoformas transcritas

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

1.7 Camundongos *bim*^{-/-}

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

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

1.8 Relação entre BIM e linfócitos T

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

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

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS *

1. Cox MA, Kahan SM, Zajac AJ. Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. *Virology* [Internet]. 2013;435(1):157–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23217625>
2. Nagata T, Koide Y. Induction of Specific CD8, Induction of Specific CD8. *Biomed Res Int* [Internet]. 2010 May;2010, 2010:e764542. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20>
3. Antony PA, Piccirillo CA, Akpinarli A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, et al. CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol (Baltimore, Md 1950)* [Internet]. 2005 Mar;174(5):2591–601. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728465>
4. Dockree T, Holland CJ, Clement M, Ladell K, McLaren JE, van den Berg HA, et al. CD8+ T-cell specificity is compromised at a defined MHC/CD8 affinity threshold. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2017;95(1):68–76. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/icb.2016.85>
5. Koup RA, Douek DC. Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2011;1(1):a007252. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22229122>
6. Robert-Guroff M. Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2007 Dec [cited 2017 Mar 13];18(6):546–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18063357>
7. Momotaro-Gene Inc. Study of a Recombinant Adenovirus to Treat Localized Prostate Cancer. In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2015-[2017feb23]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01931046?term=Ad5&recr=Open&rank=3>. NLM Identifier: NCT01931046
8. McMaster University. Phase 1 Clinical Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of an Adenovirus-based Tuberculosis Vaccine Administered by Aerosol. In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2016-[2017feb23]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02337270?term=Ad5&recr=Open&rank=5>. NLM Identifier: NCT02337270
9. Yi Zeng, Centers for Disease Control and Prevention, China. Clinical Trial of Recombinant Adenovirus Type 5 AIDS Vaccine. In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2016-[2017feb23]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02762045?term=Ad5&recr=Open&rank=6>. NLM Identifier: NCT02762045
10. Shenzhen SiBiono GeneTech Co.,Ltd. Recombinant Adenoviral Human p53 Gene in Treatment of Malignant Pleural Effusion. In: *ClinicalTrials.gov* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2015-[2017feb23]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02429726?term=adenovirus&recr=Open&rank=15>. NLM Identifier: NCT02429726

*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

11. Kovesdi I, Hedley SJ. Adenoviral producer cells. *Viruses* [Internet]. 2010;2(8):1681–703. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994701>
12. Tatsis N, Fitzgerald JC, Reyes-Sandoval A, Harris-McCoy KC, Hensley SE, Zhou D, et al. Adenoviral vectors persist in vivo and maintain activated CD8+ T cells: implications for their use as vaccines. *Blood*. 2007;110(6).
13. Steffensen MA, Holst PJ, Steengaard SS, Jensen BAH, Bartholdy C, Stryhn A, et al. Qualitative and quantitative analysis of adenovirus type 5 vector-induced memory CD8 T cells: not as bad as their reputation. *J Virol* [Internet]. 2013 Jun [cited 2017 Feb 25];87(11):6283–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23536658>
14. Bolinger B, Sims S, Swadling L, O'Hara G, de Lara C, Baban D, et al. Adenoviral Vector Vaccination Induces a Conserved Program of CD8+ T Cell Memory Differentiation in Mouse and Man. *Cell Rep* [Internet]. 2015 Nov;13(8):1578–88. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124715012048>
15. Kastenmuller W, Gasteiger G, Gronau JH, Baier R, Ljapoci R, Busch DH, et al. Cross-competition of CD8+ T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination. *J Exp Med* [Internet]. 2007 Sep 3 [cited 2017 Mar 2];204(9):2187–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709425>
16. Barefoot B, Thornburg NJ, Barouch DH, Yu J-S, Sample C, Johnston RE, et al. Comparison of multiple vaccine vectors in a single heterologous prime-boost trial. *Vaccine* [Internet]. 2008 Nov 11;26(48):6108–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18809447>
17. Molinier-Frenkel V, Lengagne R, Gaden F, Hong S-S, Choppin J, Gahery-Ségard H, et al. Adenovirus hexon protein is a potent adjuvant for activation of a cellular immune response. *J Virol* [Internet]. 2002 Jan;76(1):127–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739678>
18. Yang TC, Dayball K, Wan YH, Bramson J. Detailed analysis of the CD8+ T-cell response following adenovirus vaccination. *J Virol* [Internet]. 2003 Dec;77(24):13407–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645597>
19. Nielsen KN, Steffensen MA, Christensen JP, Thomsen AR. Priming of CD8 T Cells by Adenoviral Vectors Is Critically Dependent on B7 and Dendritic Cells but Only Partially Dependent on CD28 Ligation on CD8 T Cells. *J Immunol*. 2014;193(3).
20. Kambayashi T, Laufer TM. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2014;14(11):719–30. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri3754>
21. Miller MJ, Hejazi AS, Wei SH, Cahalan MD, Parker I. T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2004;101(4):998–1003. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14722354>
22. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, et al. The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. *Science* (80-). 1999;285(5425).
23. Dustin ML, Chakraborty AK, Shaw AS. Understanding the structure and function of the immunological synapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2010 Oct;2(10):a002311. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843980>
24. Kupfer A, Monks CRF, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N. Three-dimensional

- segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* [Internet]. 1998 Sep;395(6697):82–6. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/25764>
25. Cole DK, Miles KM, Madura F, Holland CJ, Schauenburg AJA, Godkin AJ, et al. T-cell receptor (TCR)-peptide specificity overrides affinity-enhancing TCR-major histocompatibility complex interactions. *J Biol Chem* [Internet]. 2014;289(2):628–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24196962>
 26. Bromley SK, Iaboni A, Davis SJ, Whitty A, Green JM, Shaw AS, et al. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol* [Internet]. 2001;2(12):1159–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11713465>
 27. Dustin ML. The immunological synapse. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2014;2(11):1023–33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25367977>
 28. Ito H, Seishima M. Regulation of the induction and function of cytotoxic T lymphocytes by natural killer T cell. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2010;2010:641757. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20508728>
 29. Zinkernagel RM, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* [Internet]. 1974 Oct;251(5475):547–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4547543>
 30. Kyaw T, Winship A, Tay C, Kanellakis P, Hosseini H, Cao A, et al. Cytotoxic and Proinflammatory CD8+ T Lymphocytes Promote Development of Vulnerable Atherosclerotic Plaques in ApoE-Deficient Mice Clinical Perspective. *Circulation*. 2013;127(9).
 31. Rauf A, Khatri M, Murgia M V., Saif YM. Fas/FasL and perforin–granzyme pathways mediated T cell cytotoxic responses in infectious bursal disease virus infected chickens. *Results Immunol* [Internet]. 2012 [cited 2016 Jan 6];2:112–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211283912000147>
 32. Shen DT, Ma JSY, Mather J, Vukmanovic S, Radoja S. Activation of primary T lymphocytes results in lysosome development and polarized granule exocytosis in CD4+ and CD8+ subsets, whereas expression of lytic molecules confers cytotoxicity to CD8+ T cells. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2006;80(4):827–37. Available from: <http://www.jleukbio.org/content/80/4/827>
 33. Yagi H, Conroy PJ, Leung EWW, Law RHP, Trapani JA, Voskoboinik I, et al. Structural Basis for Ca²⁺-mediated Interaction of the Perforin C2 Domain with Lipid Membranes. *J Biol Chem* [Internet]. 2015 Oct [cited 2016 Jan 7];290(42):25213–26. Available from: <http://www.jbc.org/content/290/42/25213>
 34. Traore DAK, Brennan AJ, Law RHP, Dogovski C, Perugini MA, Lukyanova N, et al. Defining the interaction of perforin with calcium and the phospholipid membrane. *Biochem J* [Internet]. 2013 Dec;456(3):323–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24070258>
 35. McCormack R, de Armas L, Shiratsuchi M, Podack ER. Killing machines: three pore-forming proteins of the immune system. *Immunol Res* [Internet]. 2013;57(1–3):268–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24293008>
 36. Pardo J, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Naval J, Müllbacher A, et al. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol* [Internet]. 2004;167(3):457–68. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15534000>

37. Cullen SP, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ* [Internet]. 2008;15(2):251–62. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.cdd.4402244>
38. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* [Internet]. 1993 Dec;75(6):1169–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7505205>
39. Caulfield AJ, Lathem WW. Disruption of Fas-Fas Ligand Signaling, Apoptosis, and Innate Immunity by Bacterial Pathogens. *PLoS Pathog* [Internet]. 2014 Aug [cited 2016 Jan 6];10(8). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4125287/>
40. Sainz Jr. B, Mossel EC, Peters CJ, Garry RF. Interferon-beta and interferon-gamma synergistically inhibit the replication of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV). *Virology* [Internet]. 2004 Nov [cited 2016 Jan 13];329(1):11–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682204005422>
41. Zhang B, Karrison T, Rowley DA, Schreiber H. IFN-gamma- and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers. *J Clin Invest* [Internet]. 2008;118(4):1398–404. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18317595>
42. Groettrup M, Khan S, Schwarz K, Schmidtke G. Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? *Biochimie* [Internet]. 2001 Apr;83(3–4):367–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11295499>
43. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ., Zajac AJ, Miller JD, et al. Counting Antigen-Specific CD8 T Cells: A Reevaluation of Bystander Activation during Viral Infection. *Immunity*. 1998;8(2):177–87.
44. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. Vol. 14, *Current Opinion in Immunology*. 2002. p. 354–9.
45. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2007 Jul;7(7):532–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17589543>
46. Lohman BL, Razvi ES, Welsh RM. T-lymphocyte downregulation after acute viral infection is not dependent on CD95 (Fas) receptor-ligand interactions. 1996;70(11):8199–203.
47. Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, et al. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* [Internet]. 2002 Oct;419(6907):634–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature01101>
48. Yeh W-C, Itie A, Elia AJ, Ng M, Shu H-B, Wakeham A, et al. Requirement for Casper (c-FLIP) in Regulation of Death Receptor-Induced Apoptosis and Embryonic Development. *Immunity*. 2000;12(6):633–42.
49. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci*. 1994;107(12).

50. Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* [Internet]. 2003;4(5):410–5. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni0503-410>
51. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* [Internet]. 1972 Aug;26(4):239–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027>
52. Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*. 2014;112:24–49.
53. Poon IKH, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2014;14(3):166–80. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3607>
54. Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J, Ameisen JC. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ* [Internet]. 2002;9(1):65–81. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.cdd.4400951>
55. Hu L, Su C, Song X, Shi Q, Fu J, Xia X, et al. Tetrachlorobenzoquinone triggers the cleavage of Bid and promotes the cross-talk of extrinsic and intrinsic apoptotic signalings in pheochromocytoma (PC) 12 cells. *Neurotoxicology*. 2015;49:149–57.
56. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* [Internet]. 1998;281(5381):1312–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721091>
57. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara R, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol* [Internet]. 2013;14(1):32. Available from: <http://bmccellbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2121-14-32>
58. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2007;35(4):495–516. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117903/>
59. Rath PC, Aggarwal BB. TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol* [Internet]. 1999;19(6):350–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10634209>
60. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2001 Jan;26(1):61–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11165519>
61. Landes T, Martinou J-C. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: The role of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2011;1813(4):540–5.
62. James D, Parone PA, Terradillos O, Lucken-Ardjomande S, Montessuit S, Martinou J-C. Mechanisms of mitochondrial outer membrane permeabilization. *Novartis Found Symp* [Internet]. 2007;287:170-6-82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18074638>
63. Bhola PD, Letai A. Mitochondria—Judges and Executioners of Cell Death Sentences. *Mol Cell*. 2016;61(5):695–704.

64. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008;9(1):47–59. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm2308>
65. Doerflinger M, Glab JA, Puthalakath H. BH3-only proteins: a 20-year stock-take. *FEBS J* [Internet]. 2015;282(6):1006–16. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.13190>
66. Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* [Internet]. 2000 Dec 8;103(6):839–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136969>
67. Hsu SY, Lin P, Hsueh AJ. BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Mol Endocrinol* [Internet]. 1998;12(9):1432–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9731710>
68. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, et al. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* [Internet]. 1998;17(2):384–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1170389/>
69. Czabotar PE, Colman PM, Huang DCS. Bax activation by Bim? Cell Death Differ [Internet]. 2009;16(9):1187–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19557009>
70. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, et al. Apoptosis Initiated When BH3 Ligands Engage Multiple Bcl-2 Homologs, Not Bax or Bak. *Science* (80-) [Internet]. 2007;315(5813):856–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17289999>
71. Gavathiotis E, Reyna DE, Davis ML, Bird GH, Walensky LD. BH3-Triggered Structural Reorganization Drives the Activation of Proapoptotic BAX. *Mol Cell*. 2010;40(3):481–92.
72. Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol CB* [Internet]. 2000 Oct;10(19):1201–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050388>
73. Andrew Sunters SF de M. FoxO3a Transcriptional Regulation of Bim Controls Apoptosis in Paclitaxel-treated Breast Cancer Cell Lines. *J Biol Chem* [Internet]. 2004;278(50):49795–805. Available from: https://www.researchgate.net/publication/9064201_FoxO3a_Transcriptional_Regulation_of_Bim_Controls_Apoptosis_in_Paclitaxel-treated_Breast_Cancer_Cell_Lines
74. Gogada R, Yadav N, Liu J, Tang S, Zhang D, Schneider A, et al. Bim, a Proapoptotic Protein, Up-regulated via Transcription Factor E2F1-dependent Mechanism, Functions as a Prosurvival Molecule in Cancer. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Apr [cited 2016 Jan 4];288(1):368–81. Available from: <http://www.jbc.org/content/288/1/368>
75. Potluri V, Noothi SK, Vallabhapurapu SD, Yoon S-O, Driscoll JJ, Lawrie CH, et al. Transcriptional Repression of Bim by a Novel YY1-RelA Complex Is Essential for the Survival and Growth of Multiple Myeloma. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(7):e66121. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0066121>
76. Montanez E, Karaköse E, Tischner D, Villunger A, Fässler R. PINCH-1 promotes Bcl-

- 2-dependent survival signalling and inhibits JNK-mediated apoptosis in the primitive endoderm. *J Cell Sci*. 2012;125(21).
77. Liu K, Liu F, Zhang N, Liu S, Jiang Y. Pokemon Silencing Leads to Bim-Mediated Anoikis of Human Hepatoma Cell QGY7703. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2012;13(12):5818–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22754333>
 78. Piazza R, Magistrini V, Mogavero A, Andreoni F, Ambrogio C, Chiarle R, et al. Epigenetic silencing of the proapoptotic gene BIM in anaplastic large cell lymphoma through an MeCP2/SIN3a deacetylating complex. *Neoplasia* [Internet]. 2013;15(5):511–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23633923>
 79. San José-Eneriz E, Agirre X, Jiménez-Velasco A, Cordeu L, Martín V, Arqueros V, et al. Epigenetic down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer* [Internet]. 2009;45(10):1877–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19403302>
 80. U M, Miyashita T, Shikama Y, Tadokoro K, Yamada M. Molecular cloning and characterization of six novel isoforms of human Bim, a member of the proapoptotic Bcl-2 family. *FEBS Lett* [Internet]. 2001 Nov 30;509(1):135–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734221>
 81. Marani M, Tenev T, Hancock D, Downward J, Lemoine NR. Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2002;22(11):3577–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11997495>
 82. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* [Internet]. 1999 Mar;3(3):287–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10198631>
 83. Strasser A, Puthalakath H, Bouillet P, Huang DC, O'Connor L, O'Reilly LA, et al. The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2000;917:541–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11268382>
 84. Sionov RV, Vlahopoulos SA, Granot Z. Regulation of Bim in Health and Disease. *Oncotarget* [Internet]. 2015;6(27):23056–134. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
 85. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Köntgen F, et al. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* [Internet]. 1999 Nov;286(5445):1735–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10576740>
 86. O'Reilly LA, Cullen L, Visvader J, Lindeman GJ, Print C, Bath ML, et al. The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *Am J Pathol* [Internet]. 2000;157(2):449–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10934149>
 87. Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang L-C, Coultas L, Puthalakath H, et al. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* [Internet]. 2002 Feb;415(6874):922–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11859372>

88. Jay DC, Mitchell DM, Williams MA. Bim mediates the elimination of functionally unfit Th1 responders from the memory pool. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(6):e67363. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23840678>
89. Kurtulus S, Sholl A, Toe J, Tripathi P, Raynor J, Li K-P, et al. Bim controls IL-15 availability and limits engagement of multiple BH3-only proteins. *Cell Death Differ* [Internet]. 2015;22(1):174–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25124553>
90. Grayson JM, Weant AE, Holbrook BC, Hildeman D. Role of Bim in regulating CD8+ T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* [Internet]. 2006 Sep;80(17):8627–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16912311>
91. Lopes AR, Kellam P, Das A, Dunn C, Kwan A, Turner J, et al. Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection. *J Clin Invest* [Internet]. 2008 May;118(5):1835–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18398508>
92. Lin Y-C, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun* [Internet]. 2014;5(11):4767. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms5767>
<http://www.nature.com/ncomms/2014/140903/ncomms5767/full/ncomms5767.html#ref7>
93. Hübner A, Cavanagh-Kyros J, Rincon M, Flavell R a, Davis RJ. Functional cooperation of the proapoptotic Bcl2 family proteins Bmf and Bim in vivo. *Mol Cell Biol*. 2010;30(1):98–105.
94. Clemente T, Dominguez MR, Vieira NJ, Rodrigues MM, Amarante-Mendes GP. In vivo assessment of specific cytotoxic T lymphocyte killing. *Methods* [Internet]. 2013;61(2):105–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23454288>
95. Boscardin SB, Kinoshita SS, Fujimura AE, Rodrigues MM. Immunization with cDNA expressed by amastigotes of *Trypanosoma cruzi* elicits protective immune response against experimental infection. *Infect Immun* [Internet]. 2003;71(5):2744–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704149>
96. Boyle JS, Koniaras C, Lew AM. Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int Immunol* [Internet]. 1997;9(12):1897–906. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466317>
97. Tabe L, Krieg P, Strachan R, Jackson D, Wallis E, Colman A. Segregation of mutant ovalbumins and ovalbumin-globin fusion proteins in *Xenopus* oocytes. Identification of an ovalbumin signal sequence. *J Mol Biol* [Internet]. 1984;180(3):645–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6543229>
98. Nakagawa S, Niimura Y, Gojobori T, Tanaka H, Miura K. Diversity of preferred nucleotide sequences around the translation initiation codon in eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2008 Feb [cited 2016 Jan 18];36(3):861–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2241899/>
99. Grzegorski SJ, Chiari EF, Robbins A, Kish PE, Kahana A. Natural Variability of Kozak Sequences Correlates with Function in a Zebrafish Model. *PLoS One* [Internet]. 2014 Sep [cited 2016 Jan 18];9(9):e108475. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0108475>

100. Bernard P, Couturier M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* [Internet]. 1992 Aug;226(3):735–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1324324>
101. Hatfield L, Hearing P. Redundant elements in the adenovirus type 5 inverted terminal repeat promote bidirectional transcription in vitro and are important for virus growth in vivo. *Virology* [Internet]. 1991 Sep;184(1):265–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1871971>
102. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* [Internet]. 2004 Jun;33(2):95–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15121163>
103. Hunt MA, Currie MJ, Robinson BA, Dachs GU. Optimizing Transfection of Primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells Using Commercially Available Chemical Transfection Reagents. *J Biomol Tech* [Internet]. 2010 Jul [cited 2016 Jan 17];21(2):66–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2884313/>
104. Luo J, Deng Z-L, Luo X, Tang N, Song W-X, Chen J, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc* [Internet]. 2007 May [cited 2016 Jan 17];2(5):1236–47. Available from: <http://www.nature.com/nprot/journal/v2/n5/full/nprot.2007.135.html>
105. Tubo NJ, Jenkins MK. TCR signal quantity and quality in CD4+ T cell differentiation. *Trends Immunol* [Internet]. 2014 Dec [cited 2017 Mar 3];35(12):591–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490614001707>
106. Dustin ML. What Counts in the Immunological Synapse? *Mol Cell* [Internet]. 2014 Apr [cited 2017 Mar 2];54(2):255–62. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276514003104>
107. Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* [Internet]. 1988 Dec 5 [cited 2017 Feb 22];263(34):18545–52. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/content/short/263/34/18545>
108. Reynier MO, Abou Hashieh I, Crotte C, Carbuccia N, Richard B, Gérolami A. Monensin action on the Golgi complex in perfused rat liver: evidence against bile salt vesicular transport. *Gastroenterology* [Internet]. 1992 Jun [cited 2017 Feb 22];102(6):2024–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1587420>
109. Cabral PC. Desenvolvimento de modelo experimental murino para o estudo da imunobiologia do melanoma. [Internet]. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; 2016. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42133/tde-16112016-093857/pt-br.php>
110. Rock KL, York IA, Saric T, Goldberg AL. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol*. 2002;80:1–70.
111. Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvetnick N. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* [Internet]. 1998 Jul;4(7):781–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9662368>

112. Kissler S, Anderton SM, Wraith DC. Antigen-presenting Cell Activation: a Link Between Infection and Autoimmunity? *J Autoimmun* [Internet]. 2001 May;16(3):303–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334496>
113. Di Genova G, Savelyeva N, Suchacki A, Thirdborough SM, Stevenson FK. Bystander stimulation of activated CD4⁺ T cells of unrelated specificity following a booster vaccination with tetanus toxoid. *Eur J Immunol* [Internet]. 2010 Apr;40(4):976–85. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200940017>
114. Tiago Clemente. Novo papel da galectina-1 como molécula efetora de células citotóxicas. [Internet]. [São Paulo]: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; 2014. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42133/tde-11072014-141421/>
115. Green AM, DiFazio R, Flynn JL. IFN- γ from CD4 T Cells Is Essential for Host Survival and Enhances CD8 T Cell Function during Mycobacterium tuberculosis Infection. *J Immunol* [Internet]. 2013 Mar 15;190:270–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164422>
116. O'Brien S, Thomas RM, Wertheim GB, Zhang F, Shen H, Wells AD. Ikaros imposes a barrier to CD8⁺ T cell differentiation by restricting autocrine IL-2 production. *J Immunol* [Internet]. 2014 Jun 1;192(11):5118–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24778448>
117. Hor JL, Whitney PG, Zaid A, Brooks AG, Heath WR, Mueller SN. Spatiotemporally Distinct Interactions with Dendritic Cell Subsets Facilitates CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Activation to Localized Viral Infection. *Immunity* [Internet]. 2015 Sep [cited 2017 Mar 3];43(3):554–65. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107476131500309X>
118. Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2010 Jun;22(3):333–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20363604>
119. Yang TC, Millar J, Groves T, Zhou W, Grinshtein N, Parsons R, et al. On the Role of CD4⁺ T Cells in the CD8⁺ T-Cell Response Elicited by Recombinant Adenovirus Vaccines. *Mol Ther* [Internet]. 2007 May;15(5):997–1006. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17375073>
120. Ludwinski MW, Sun J, Hilliard B, Gong S, Xue F, Carmody RJ, et al. Critical roles of Bim in T cell activation and T cell-mediated autoimmune inflammation in mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2009 Jun;119(6):1706–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19411758>
121. Urra H, Dufey E, Lisbona F, Rojas-Rivera D, Hetz C. When ER stress reaches a dead end. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2013 Dec;1833(12):3507–17. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016748891300311X>
122. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* [Internet]. 2008 Oct 27;27(50):6407–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955969>
123. Santella L, Ercolano E, Nusco GA. The cell cycle: a new entry in the field of Ca²⁺ signaling. Available from: <http://download.springer.com/static/pdf/282/art%253A10.1007%252Fs00018-005-5083-6.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2Fs00018>

-005-5083-

6&token2=exp=1488537875~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F282%2Fart%25253A10.1007%25252Fs00018-005-508

124. Prlic M, Bevan MJ. Exploring regulatory mechanisms of CD8+ T cell contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 Oct 28;105(43):16689–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18946035>
125. Knocke S, Fleischmann-Mundt B, Saborowski M, Manns MP, Kühnel F, Wirth TC, et al. Tailored Tumor Immunogenicity Reveals Regulation of CD4 and CD8 T Cell Responses against Cancer. *Cell Rep* [Internet]. 2016 Nov;17(9):2234–46. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124716315248>
126. Ali HR, Provenzano E, Dawson S-J, Blows FM, Liu B, Shah M, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Ann Oncol* [Internet]. 2014 Aug 1;25(8):1536–43. Available from: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdu191>
127. Flecken T, Schmidt N, Hild S, Gostick E, Drognitz O, Zeiser R, et al. Immunodominance and functional alterations of tumor-associated antigen-specific CD8 + T-cell responses in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* [Internet]. 2014 Apr;59(4):1415–26. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.26731>
128. Mcgray AJR, Bernard D, Hallett R, Kelly R, Jha M, Gregory C, et al. Combined vaccination and immunostimulatory antibodies provides durable cure of murine melanoma and induces transcriptional changes associated with positive outcome in human melanoma patients. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/onci.19534?needAccess=true>
129. Grinshtein N, Ventresca M, Margl R, Bernard D, Yang T-C, Millar JB, et al. High-dose chemotherapy augments the efficacy of recombinant adenovirus vaccines and improves the therapeutic outcome. *Cancer Gene Ther* [Internet]. 2009 Apr 7;16(4):338–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18989352>
130. van der Burg SH, Arens R, Ossendorp F, van Hall T, Melief CJM. Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2016 Mar 11;16(4):219–33. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc.2016.16>
131. Karan D, Krieg AM, Lubaroff DM. Paradoxical enhancement of CD8 T cell-dependent anti-tumor protection despite reduced CD8 T cell responses with addition of a TLR9 agonist to a tumor vaccine. *Int J Cancer* [Internet]. 2007 Oct 1;121(7):1520–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.22873>
132. Coulie PG, Karanikas V, Lurquin C, Colau D, Connerotte T, Hanagiri T, et al. Cytolytic T-cell responses of cancer patients vaccinated with a MAGE antigen. *Immunol Rev* [Internet]. 2002 Oct;188(1):33–42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-065X.2002.18804.x>
133. Stewart B, Wild CP, International Agency for Research on Cancer, WHO. *World Cancer Report 2014* [Internet]. 2014. Available from: http://www.thehealthwell.info/search-results/world-cancer-report-2014?source=relatedblock&content=resource&member=572160&catalogue=none&collection=Conditions,Chronic Conditions,Cancer&tokens_complete=true
134. Alexander-Miller MA, Derby MA, Sarin A, Henkart PA, Berzofsky JA. Supraoptimal peptide-major histocompatibility complex causes a decrease in bc1-2 levels and

allows tumor necrosis factor alpha receptor II-mediated apoptosis of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* [Internet]. 1998 Oct 19;188(8):1391–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9782116>