

*Larissa Nogueira de Almeida*

**Captopril, um potencializador do sistema cinina:  
aplicações no desenvolvimento de adjuvantes vacinais**

**Dissertação submetida à Universidade Federal  
do Rio de Janeiro visando à obtenção do grau  
de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Captopril, um potencializador do sistema cinina: aplicações  
no desenvolvimento de adjuvantes vacinais

Larissa Nogueira de Almeida

1 volume

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Imunobiologia da Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador: Dr. Julio Scharfstein

Rio de Janeiro  
Setembro de 2010

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Imunologia Molecular sob orientação do Professor Julio Scharfstein. O laboratório é integrante do Programa de Imunobiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro. O trabalho foi desenvolvido na vigência de auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e da Fundação Bill & Melinda Gates (Bill & Melinda Gates Foundation).

Ficha catalográfica:

Almeida, Larissa Nogueira

Captopril, um potencializador do sistema cinina: aplicações no desenvolvimento de adjuvantes vacinais – Larissa Nogueira de Almeida. (Rio de Janeiro): UFRJ, IBCCF<sup>o</sup>, 2010.

xv 103f.: 1,5 cm

Orientador: Julio Scharfstein

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – UFRJ, IBCCF<sup>o</sup>, Programa de Imunobiologia, 2010.

Referências Bibliográficas: f.79-88

1. Sistema Cinina 2. Adjuvantes vacinais 3. Linfócitos T citotóxicos

I. Scharfstein, Julio II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica

Carlos Chagas Filho III. Título

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proteger e iluminar meu caminho.

Ao meu orientador, Professor Julio Scharfstein, pela dedicação e confiança que depositou em mim desde o início da minha jornada, mesmo com todos os obstáculos enfrentados. Agradeço as idéias (às vezes mirabolantes, e quase sempre brilhantes) e a maneira paciente de encaminhar meu amadurecimento científico.

Aos meus queridos pais, Milton e Luciene, que sempre apoiaram meu desejo de continuar estudando. Agradeço pelo carinho, pelas orações diárias, pelo exemplo de caráter que me deram e por me ensinarem a lutar sempre pelos meus sonhos. Amo vocês!

A minha irmã, Débora, pela amizade que redescobri, pelo apoio incondicional e pela promessa de nunca mais nos perdermos.

Aos amigos, que passaram e que ficaram, pelos momentos de descontração e por aqueles em que simplesmente me ofereceram um ombro pra chorar. Um agradecimento especial à Ana, Aline, Eugênia e Taciana, que nos últimos meses se mostraram muito mais do que amigas, e me fizeram, cada uma a sua maneira, acreditar mais em mim. Aos amigos de faculdade, Paula, Gustavo e Gabrielle, agradeço por continuarem presentes nos momentos mais importantes, quando a convivência diária se tornou impossível. Muito obrigada pelo carinho de todos vocês!

Aos meus tios e tias: Eni, Ismael, Nilza, Silvânia, Sílvio, Sueli e Tida, e suas famílias, por me ajudarem, de forma direta ou indireta, a chegar até aqui.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Molecular: Alda, Ana Cristina, Carlinha, Daniela, Daniele, Davi, prof. Erik, Erivan, Iracema, Juliana, Leila, Letícia, Lucas, Rafaela e Vítor. Agradeço por tudo que me ensinaram com relação à teoria e à prática realizadas no laboratório, mas agradeço, sobretudo, por proporcionarem um ambiente de trabalho tão agradável.

Às queridas Verônica, Alessandra e Ilka, que me ajudaram no início da realização deste projeto, e que mesmo não estando mais presentes no laboratório, continuam sendo exemplos a seguir na minha vida científica.

À Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Monteiro, por todo o empenho na realização da primeira fase do projeto, que deu origem a grande parte do trabalho que desenvolvi durante o Mestrado. Agradeço pelos ensinamentos práticos e pela orientação acadêmica, e principalmente por compreender e respeitar meu desejo de me tornar independente.

Aos professores Alexandre Morrot, Luciana Arruda e Maria Bellio, pela colaboração nas diferentes fases do projeto, pelas discussões e pela ajuda nas decisões experimentais mais difíceis.

Aos professores Turan Urmenyi e Joseli Lannes-Vieira, pela colaboração na fase final de desenvolvimento do projeto. Um agradecimento especial as suas respectivas alunas, Cíntia

Simas e Isabela Pereira, pelos ensinamentos e pela paciência em me ajudar sempre que necessário.

Ao professor Robson Coutinho, pela revisão feita no prazo tão curto, pelo esclarecimento de todas as dúvidas e pelas palavras de incentivo que tanto me encorajaram.

Aos funcionários do IBCCF, principalmente Sandrinha, Gabriela e Zezinho, pela disposição para resolver os probleminhas de rotina.

## RESUMO

Os mecanismos de ação de alguns dos adjuvantes imunológicos convergem na ativação de células dendríticas (DC), fazendo a ligação entre a imunidade inata e a adaptativa. A bradicinina, um nonapeptídeo liberado por clivagem proteolítica dos cininogênios, foi descrita como um sinal de perigo endógeno que induz a maturação de DCs através da ativação dos receptores B<sub>2</sub>R. Com base em conhecimentos adquiridos no modelo de infecção pelo *T. cruzi*, decidimos explorar o papel do sistema cinina no desenvolvimento de estratégias vacinais contra infecção por este parasita. Utilizamos um inibidor da enzima conversora de angiotensina (captopril) como ferramenta farmacológica, visando o aumento da meia-vida das cininas no sistema. Na primeira fase deste projeto (BALB/c - cepa Dm28c), investigamos os efeitos imunoprotetores da imunização com DCs estimuladas *in vitro* com antígeno (Ag - extrato de Epi)/Cap/BK. Observamos que os animais imunizados/reforçados com DCs CD11c<sup>+</sup> estimuladas com Ag/Cap/BK se mostraram resistentes ao desafio letal pelo parasita, além de apresentarem altas frequências de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ag-específicas produtoras de IFN- $\gamma$ , tanto no linfonodo quanto no coração. No modelo de imunização com formulações baseadas em alum, observamos que o pré-tratamento com captopril dos animais imunizados/infectados é essencial para a indução da expressão de CCR5 pelos linfócitos T, caracterizando um fenótipo de capacitação migratória destas células para tecidos periféricos (p. ex., coração). Na segunda fase do projeto (C57BL/6 - cepa CL), estabelecemos um modelo de indução de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (CTLs) anti-TsKb-20 (peptídeo da família trans-sialidase) pela imunização com formulações contendo BK. Observamos a geração de CTLs (*in vivo*) no baço de animais imunizados com [Alum/Ag-Epi/TsKb20/BK], sem o pré-tratamento com captopril. Resultados preliminares indicam, ainda, que a liberação lenta de BK/Ag, em emulsão com adjuvante de Freund incompleto, é capaz de induzir a geração de CTLs Ag-específicas. Nossos resultados sugerem que o sistema cinina pode ser eficientemente explorado em estratégias de vacinação contra patógenos intracelulares, implicando a função central de células T CD8<sup>+</sup> efetoras/memória nos mecanismos imunoprotetores dos animais imunizados. Como perspectivas, consideramos as possíveis aplicações dos esquemas de imunização na área de vacinação veterinária contra vírus e outros patógenos intracelulares.



## ABSTRACT

The mechanisms of action of some immunological adjuvants converge in the activation of dendritic cells (DC), making the link between innate and adaptive immunity. Bradykinin, a nonapeptide released by proteolytic cleavage of kininogens, was described as an endogenous danger signal that induces the maturation of DCs via activation of B<sub>2</sub>R receptors. Based on knowledge gained in the model of infection with *T. cruzi*, we decided to explore the role of kinin system in the development of vaccination strategies against infection by this parasite. We used an inhibitor of angiotensin converting enzyme (captopril) as pharmacological tool, in order to increase the half-life of kinins in the system. In the first phase of this project (BALB/c - Dm28c strain), we investigated the effects of immunization with immunoprotective DCs stimulated *in vitro* with antigen (Ag - Epi extract)/Cap/ BK. We observed that immunized/boosted animals with CD11c<sup>+</sup> DCs stimulated with Ag/Cap/BK were resistant to lethal challenge by the parasite, and have high frequencies of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> ag-specific IFN- $\gamma$ -producing T cells, both in lymph node and heart. In the model of immunization with alum-based formulations, we found that pretreatment with captopril in immunized/infected animals is essential for the induction of CCR5 expression by T lymphocytes, indicating a migratory capacity phenotype to peripheral tissues (p. ex., heart). In the second phase of the project (C57BL/6 - CL strain), we established a model of induction of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells (CTLs) anti-TsKb-20 (peptide of trans-sialidase family) by immunization with formulations containing BK. We observed the generation of CTLs (*in vivo*) in the spleens of mice immunized with [Alum/Ag-Epi/TsKb20/BK] without pretreatment with captopril. Preliminary results also indicate that the slow release of BK/Ag, in emulsion with incomplete Freund's adjuvant, can induce the generation of Ag-specific CTLs. Our results suggest that the kinin system can be efficiently exploited in vaccination strategies against intracellular pathogens, implying the central role of CD8<sup>+</sup> effector/memory T cells in immunoprotective mechanisms of the immunized animals. As perspectives, we consider the possible applications of the immunization schemes in veterinary vaccination against virus and other intracellular pathogens.

## LISTA DE ABREVIATURAS

7-NI - 7-Nitroindazol

Ag - antígeno

APC - célula apresentadora de antígeno

APN - aminopeptidase N

APP - aminopeptidase P

B<sub>1</sub>R - receptor de bradicinina (1)

B<sub>2</sub>R - receptor de bradicinina (2)

BK - bradicinina

Cap - captopril

CFA - Adjuvante de Freund completo

CFSE - *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl diester*

COS - cicloxigenase

CTL - linfócito T citotóxico

DAG - diacilglicerol

DAMP - *damage associated molecular pattern*

DC - célula dendrítica

ECA - enzima conversora de angiotensina

Epi - eppimastigota

GPCR -receptor acoplado à proteína G regulatória

HK - *high molecular weight kininogen*

ICAM-1 - *intercellular adhesion molecule 1*

IFA - adjuvante de Freund incompleto

IP3 - inositol-tri-fosfato

LBK - lisil-bradicinina

LD - linfonodo drenante

LIT - *liver infusion tryptose*

LK - *low molecular weight kininogen*

LPS - lipopolissacarídeo

MHC - *major histocompatibility complex*

MPLA - monofosforil lipídeo A

MyD88 - *myeloid differentiation factor 88*

NEP - endopeptidase neutra

NIK - *NF- $\kappa$ B inducing kinase*

NK - *natural killer*

NKT - *natural killer T cells*

NLR - *nucleotide-binding domain and leucine rich repeat-containing receptor*

NO - óxido nítrico

OVA - ovalbumina

PAMP - *pathogen-associated molecular pattern*

PKC - protein quinase C

PLC $\beta$  - fosfolipase-C  $\beta$

PRR - *pattern recognition receptor*

RLR - *retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptor*

SFB - soro fetal bovino

SIGIRR - *single immunoglobulin IL-1R-related protein*

T<sub>CM</sub> - células T de memória central

TCR - receptor de célula T

TCT - tripomastigota de cultura de tecido

T<sub>EM</sub> - células T efectoras/memória

Tip-DC - *tumour-necrosis factor and inducible nitric-oxide synthase-producing dendritic cell*

TLR - *Toll-like receptor*

TRIF - *Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter inducing interferon- $\beta$*

TS - trans-sialidase

VCAM-1 - *vascular cell adhesion molecule 1*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Imunidade inata e seus receptores .....	1
1.1.1	Células Dendríticas .....	2
1.2	Imunidade adaptativa e ativação de células T .....	7
1.3	Adjuvantes Imunológicos .....	13
1.4	Sistema de Cininas.....	17
1.4.1	Integração entre a inflamação e o sistema imune: um novo papel para as cininas.....	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
2.1	Objetivo geral .....	30
2.2	Objetivos específicos .....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
3.1	Camundongos .....	31
3.2	Parasitas .....	31
3.3	Imunização e infecção no modelo BALB/c - cepa Dm28c .....	32
3.3.1	Imunização com DCs.....	32
3.3.1.1	Isolamento e estímulo de DCc CD11c <sup>+</sup> esplênicas.....	32
3.3.1.2	Determinação da produção de IL-12 intracelular pelas DCs CD11c <sup>+</sup> .....	33
3.3.1.3	Esquema vacinal utilizando DCs .....	33
3.3.1.4	Determinação da produção de IFN- $\gamma$ por células do linfonodo drenate (LD) de animais imunizados.....	34
3.3.1.5	Avaliação da produção de IFN- $\gamma$ por linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> isolados do LD e coração de animais imunizados .....	34
3.3.2	Imunização com formulações contendo Alum .....	35
3.3.2.1	Esquema vacinal .....	35
3.3.2.2	Avaliação da expressão de CCR5 e CCR7 por células T do LD.....	35

3.4	Imunização no modelo C57BL/6 - cepa CL-Brener.....	36
3.4.1	Esquema vacinal .....	36
3.4.2	Análise de atividade citotóxica das células T CD8 <sup>+</sup> <i>in vivo</i> .....	37
3.5	Análises estatísticas.....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
4.1	Fase I.....	39
4.2	Fase II .....	39
4.2.1	Efeitos imunoprotetores de DCs CD11c <sup>+</sup> estimuladas <i>in vitro</i> com Cap/Ag/BK.....	39
4.2.2	Proteção de animais B <sub>2</sub> R <sup>-/-</sup> pela imunização com DCs B <sub>2</sub> R <sup>+/+</sup> estimuladas <i>in vitro</i> com Cap/Ag/BK .....	44
4.2.3	Reversão do efeito protetor de DCs pelo tratamento com inibidor de NO sintase .....	46
4.2.4	Aumento na expressão de CCR5 por células T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> do LD de camundongos imunizados com [Cap + Alum/Ag/BK].....	49
4.2.5	Perda de autenticidade genética da linhagem de camundongos BALB/c.....	54
4.2.6	Análise da atividade citotóxica de células T CD8 <sup>+</sup> no modelo de imunização C57BL/6- cepa CL-Brener.....	59
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
5.1	O efeito potencializador de captopril no modelo de vacinação contra infecção por <i>T. cruzi</i> .....	65
5.2	Perda de autenticidade genética da linhagem de camundongos BALB/c efeito.....	71
5.3	Indução de CTLs em camundongos C57BL/6 imunizados com TsKb-20/BK .....	74
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>89</b>

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Imunidade inata e seus receptores

As células do sistema imune inato reconhecem patógenos invasores através de receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptors* - PRRs), que são ativados por padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular pattern* - PAMPs), induzindo mecanismos de defesa inatos. Os diferentes PRRs podem ser classificados em receptores secretados, transmembrana e citosólicos. Os receptores secretados se ligam à superfície celular do patógeno, podendo ativar as vias clássica ou da lectina do sistema complemento, e opsonizar os patógenos para subsequente fagocitose por macrófagos e neutrófilos (revisado por GORDON, 2002).

Os PRRs transmembrana incluem os receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors* - TLRs) e os receptores do tipo lectina C. Os TLRs são amplamente expressos por diferentes tipos celulares do sistema imune, como células dendríticas (DCs), macrófagos, células NK (*natural killer*), mastócitos neutrófilos, células B e T, e também por células não-imunes, como fibroblastos, queratinócitos e células epiteliais. A maioria dos TLRs está expressa na superfície celular (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 e 11), enquanto outros estão presentes dentro de compartimentos endossomais (TLR3, 7, 8 e 9). Os TLRs tem especificidade definida para padrões moleculares amplamente distribuídos, conservados entre bactérias, vírus e parasitas, sendo que cada um reconhece um estímulo microbiano específico. Por exemplo, TLR4 reconhece lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias. TLR2 reconhece componentes da parede celular de bactérias como peptidoglicanas de bactérias Gram-positivas, lipoproteínas e ácido lipoteicóico, e certos componentes da parede celular de fungos. TLR5 reconhece flagelina e TLR11 reconhece profilina de *Toxoplasma gondii*. Os receptores intracelulares reconhecem RNA dupla-fita (TLR3), RNA fita simples (TLR7/8) e motivos de CpG presentes no DNA de

bactérias e vírus (TLR9) (revisado por AKIRA & TAKEDA, 2004; GERMAIN, 2004). A família de receptores do tipo lectina C inclui os receptores dectina-1 e dectina-2, que detectam  $\beta$ -glucana e manose, respectivamente, na parede celular de fungos como *Candida albicans* (ROBINSON *et al.*, 2009; revisado por BROWN, 2006).

Os PRRs citosólicos incluem os RLRs (*retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors*) e os NLRs (*nucleotide-binding domain and leucine rich repeat-containing receptors*). Os RLRs detectam fragmentos de RNA viral gerados pela RNA polimerase III no citosol de células infectadas. O reconhecimento do patógeno ocorre, por exemplo, através da ligação do RNA ao domínio helicase do receptor RIG-1 (*Retinoic acid-induced gene*), sinalização através de seus domínios de recrutamento de caspases e ativando a produção de IFN- $\alpha/\beta$  para combater a infecção (SAITO *et al.*, 2007). Estudos recentes tem evidenciado que determinados fragmentos de DNA viral servem como molde para a RNA polimerase III, gerando fragmentos de RNA dupla-fita que serão reconhecidos por RIG-1, culminando com a produção de interferons do tipo 1 (CHIU *et al.*, 2009; ABLASSER *et al.*, 2009). Os NLRs representam uma grande família de sensores intracelulares capazes de detectar patógenos e sinais de estresse. Os membros dessa família detectam, muitas vezes indiretamente, produtos de degradação de peptideoglicanas, toxinas e RNA de bactérias, além de sinais endógenos como o ATP, cristais de ácido úrico e radiação ultravioleta (revisado por FRITZ *et al.*, 2006). Estes receptores estão envolvidos ainda na ativação de complexos protéicos multiméricos conhecidos como inflamassomos, que controlam a ativação de caspase-1 e a secreção de citocinas dependentes de caspase-1, como IL-1 $\beta$  (revisado por MARTINON *et al.*, 2009).

### 1.1.1 Células Dendríticas

As células dendríticas (*dendritic cells* - DCs) são células apresentadoras de antígenos (*antigen presenting cells* - APCs) profissionais que agem na interface entre o sistema imune



inato e o adaptativo. Durante seu desenvolvimento, as DCs agem como sentinelas nos tecidos periféricos, sendo capazes de capturar, processar e apresentar antígenos para as células T virgens. Desta forma, as DCs são importantes não apenas para a indução de respostas imunes primárias, mas também para a indução de tolerância imunológica, assim como para a regulação do tipo de resposta imune mediada pela célula T (revisado por BANCHEREAU & STEINMAN, 1998).

Existem diversos subtipos de DCs e os especialistas usam uma combinação de variáveis, incluindo origens do desenvolvimento e características biológicas (como fenótipo, função e localização no microambiente) para classificar as DCs em subtipos. Ainda assim, há divergências sobre qual a melhor combinação de variáveis deve ser usada para esse propósito. Por exemplo, a classificação com base nas vias de desenvolvimento pode ser falha, uma vez que essas vias ainda não foram completamente elucidadas. Na verdade, está cada vez mais claro que a bifurcação no desenvolvimento de DCs, que dá origem a distintos subtipos, ocorre relativamente tarde no desenvolvimento de DCs. O mesmo vale para a classificação com base em marcadores fenotípicos, já que subpopulações funcionalmente muito semelhantes podem ser diferenciadas por apenas um marcador fenotípico. Pulendran e colaboradores acreditam que a maneira mais informativa de classificar as DCs seja com base em propriedades biológicas, localização no microambiente e fenótipo, conforme demonstrado na Tabela 1 (revisado por PULENDRAN *et al.*, 2008).

Principais subtipos de DCs (camundongos)	Fenótipo	Órgão	Microambiente	Citocinas
<b>CD8<math>\alpha</math><sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> (DCs linfóides)</b>	CD11c <sup>high</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> DEC205 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>	Baço, LN, PP, LP	Áreas ricas em células T	? IL -12p70 ? IL -10
<b>CD8<math>\alpha</math><sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> (DCs mielóides)</b>	CD11c <sup>high</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> DEC205 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	Baço, LN, PP, LP	Zona marginal (baço); sinus subcapsular (LN); domo subepitelial (PP)	? IL -12p70 ? IL -10
<b>DCs Plasmacitóides</b>	CD11c <sup>int</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+/-</sup> CD11b <sup>-</sup> B220 <sup>+</sup> Gr-1 <sup>+</sup>	Baço, LN, PP, LP (?)	Zona marginal (baço); áreas ricas em células T (LN)	IFN - $\gamma$ (exeto na PP)
<b>Células de Langerhans</b>	CD11c <sup>high</sup> CD8 $\alpha$ <sup>dull</sup> DEC205 <sup>high</sup> Langerina <sup>+</sup>	Epitélio da pele, LN	Epitélio da pele; áreas ricas em células T (LN)	?
<b>DCs Dermais</b>	CD11c <sup>high</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> DEC205 <sup>+</sup>	Derme da pele, LN	Derme da pele; áreas ricas em células T (LN)	?
<b>CD8<math>\alpha</math><sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup></b>	CD11c <sup>high</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD11b <sup>-</sup> DEC205 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>	PP	Áreas de células T (domo subepitelial); epitélio associado ao folículo	? IL -12p70 ? IL -10
<b>Derivadas de monócitos (DCs inflamatórias)</b>	CD11c <sup>int</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> DEC205 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>	Baço inflamado, LN	?	?

**Tabela 1: Principais subtipos de células dendríticas em camundongos.** LN: linfonodo; PP: placa de Peyer; LP: lâmina própria. (adaptado de PULENDRAN *et al.*, 2008).

Já Shortman e Naik consideram simplesmente 3 grandes categorias de DCs: pré-DCs, DCs convencionais e DCs inflamatórias. As pré-DCs ainda não possuem forma e função de DCs, podendo rapidamente se desenvolver em DCs com ou sem estímulos inflamatórios, a exemplo dos monócitos e DCs plasmacitóides. As DCs convencionais compreendem 2 subtipos: (i) DCs migratórias e (ii) DCs residentes. As primeiras tem como representantes as DCs e as células de Langerhans e se caracterizam pela captura de antígenos na periferia e migração através dos vasos linfáticos para os linfonodos. As últimas, representadas pelas DCs tímicas e esplênicas, capturam e apresentam antígenos externos e auto-antígenos nos próprios órgãos linfóides. Finalmente, as DCs inflamatórias, como por exemplo, as Tip-DCs (*tumour-necrosis factor- and inducible nitric-oxide synthase-producing*) são encontradas apenas em consequência de uma infecção ou inflamação (revisado por SHORTMAN & NAIK, 2007).

No estágio imaturo, as DCs possuem capacidade de capturar antígenos com muita eficiência. O contato com o patógeno/antígeno ou seus derivados induz mudanças fenotípicas e funcionais nas DCs, fenômeno conhecido como maturação. O processo de maturação das DCs é contínuo e tem início nos sítios periféricos, durante o encontro com os estímulos de maturação, sendo completado nos órgãos linfóides secundários, durante a interação com as células T (revisado por BANCHEREAU *et al.*, 2000). A DC madura é uma célula altamente eficiente na apresentação de antígenos, e não mais na sua captura. A mudança funcional de uma célula que captura antígenos para uma célula apresentadora é acompanhada de uma série de mudanças no fenótipo dessa célula, como: (i) a perda de receptores de endocitose e fagocitose, (ii) o aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80, CD86), (iii) mudanças da morfologia celular, como perda de estruturas adesivas, reorganização do citoesqueleto e aumento da mobilidade, (iv) translocação de compartimentos de MHCII para a superfície celular e (v) secreção de citocinas que diferenciam e polarizam células efetoras (revisado por REIS E SOUSA, 2006).

Diversos fatores são capazes de induzir ou regular a maturação de DCs. De acordo com o modelo de perigo proposto por Matzinger, as APCs são ativadas por sinais de perigo liberados por células que sofreram injúria, causada pela exposição a um patógeno, dano mecânico, toxinas e outros (MATZINGER, 1994). Esse modelo se contrapõe ao paradigma vigente até aquele momento, em que o sistema imune era capaz de diferenciar moléculas próprias das não-próprias, e responder apenas às últimas, derivadas de agentes invasores. Os sinais de perigo podem ser de origem exógena, como as moléculas associadas a patógenos (PAMPs) que são reconhecidas pelos PRRs, ou de origem endógena, geralmente gerados a partir de dano tecidual com degradação de matriz extracelular ou liberação de moléculas intracelulares. Como exemplos de sinais de perigo endógenos podemos citar o ácido úrico (SHI *et al.*, 2003), ATP (SCHNURR *et al.*, 2000; LA SALA *et al.*, 2001), proteínas de choque

térmico (*heat shock proteins* - HSP) (BASU *et al.*, 2000; BINDER *et al.*, 2000), pequenos fragmentos de ácido hialurônico e heparan sulfato, (JIANG *et al.*, 2005; JOHNSON *et al.*, 2002) e bradicinina (ALIBERTI *et al.*, 2003). Atualmente, a denominação DAMP (*damage associated molecular pattern*) é utilizada para se referir a todos os sinais de perigo, compreendendo os PAMPs específicos de patógenos e os sinais de alarme endógenos, uma vez que todos são capazes de ativar as células do sistema imune inato (revisado por MATZINGER, 2007).

Após a maturação, as DCs migram para os órgãos linfóides secundários, como baço e linfonodos, onde completam sua maturação interagindo com células T e B. Essa migração é mediada por diversas quimiocinas e seus receptores. A maturação de DCs é geralmente acompanhada de uma mudança do perfil de receptores de quimiocinas expressos na superfície. Por exemplo, observa-se regulação negativa de CCR1 e CCR5 e a regulação positiva de CCR4 (que facilita a interação entre DCs-células T no linfonodo) e CCR7 (que é fundamental para a migração de DCs através dos vasos linfáticos periféricos). As DCs chegam aos vasos linfáticos periféricos atraídas pelo gradiente quimiotático de CCL21 e CCL19, secretados pelo endotélio do vaso linfático e por DCs dos órgãos linfóides secundários (OHL *et al.*, 2004; revisado por SWARTZ *et al.*, 2008). Além da função das quimiocinas, evidências sugerem que os vasos linfáticos podem desempenhar um papel ativo na transmigração de DCs. Foi demonstrado, por exemplo, que a exposição a citocinas inflamatórias induz ativação do endotélio linfático, levando à expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) e VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) e E-selectina (JOHNSON *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que nem todas as DCs presentes nos órgãos linfóides secundários são provenientes da periferia. Além das DCs que circulam na periferia e migram para os órgãos linfóides secundários após um estímulo de maturação, cerca de metade das

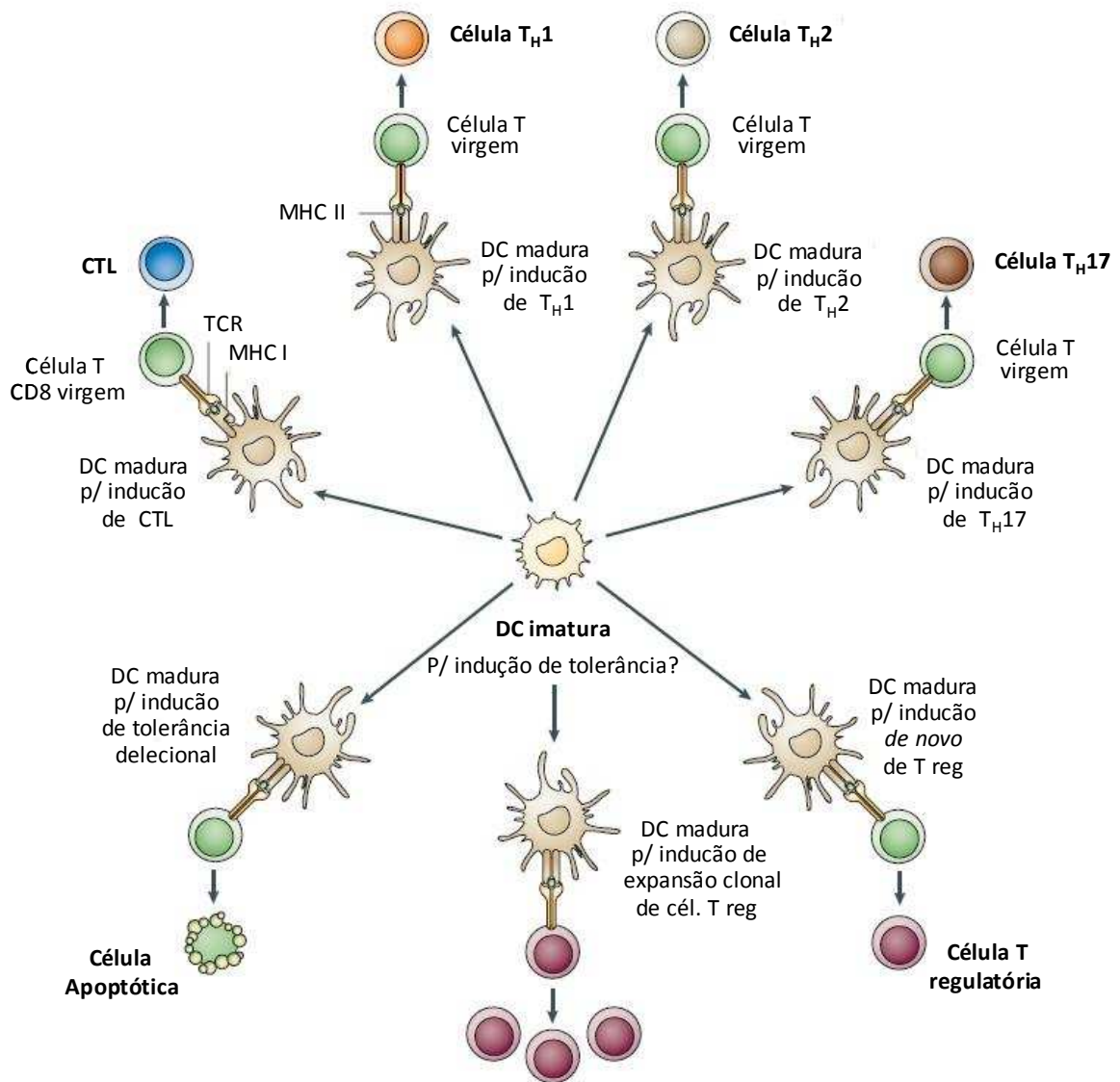
DCs residentes nos órgãos linfóides secundários são derivadas de precursores da medula óssea (VILLADANGOS & HEATH, 2005). A maioria dessas células se encontra num estado imaturo nos linfonodos, e está constantemente capturando antígenos provenientes da linfa. Caso entrem em contato com um estímulo de maturação, essas células migram para a zona de células T, onde vão interagir com as células T e dar início à resposta imune adaptativa (revisado por REIS E SOUSA, 2006).

## 1.2 Imunidade adaptativa e ativação de células T

A resposta imune adaptativa é iniciada nas áreas ricas em células T dos órgãos linfóides secundários, onde as células T virgens encontram as APC, principalmente DCs, que apresentam antígenos provenientes da periferia. As células T são ativadas por diversos sinais, provenientes tanto da APC quanto do microambiente, para se diferenciarem. Os sinais de ativação para a célula T virgem são transmitidos (i) após reconhecimento do complexo MHC-antígeno pelo TCR (receptor de célula T); (ii) após ligação a moléculas co-estimulatórias expressas na superfície da DC; (iii) por citocinas liberadas pelas DCs no microambiente, desempenhando funções relacionadas com diferenciação das células T; e (iv) por quimiocinas e outros mediadores inflamatórios, capazes de direcionar a migração das células T para o sítio de infecção/injúria. Sabe-se que o perfil de citocinas “polarizantes” produzidas pelas DCs é influenciado pelos estímulos que estas receberam durante seu processo de maturação. Regidos pelos sinais transmitidos pelas citocinas polarizantes, linfócitos T virgens diferenciam-se em células T *helper* (T CD4<sup>+</sup> - T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub>), T regulatórias (T CD4<sup>+</sup>) e T citotóxicas (T CD8<sup>+</sup>). Em contrapartida, as DCs mantidas em estado “imaturo” graças a ausência de inflamação (“*steady state*”) induzem tolerância imunológica através de mecanismos de anergia ou deleção clonal, ou dependentes da conversão de células T virgens em T regulatórias (revisado por REIS E SOUSA, 2006; JOFFRE *et al.*, 2009; Figura 1).

A diferenciação de células T virgens para o perfil  $T_H1$  é estimulada pela citocina IL-12. O principal efetor da sinalização pelo receptor de IL-12 é o fator de transcrição STAT4, que promove a expressão de múltiplos genes. STAT4 colabora com o fator de transcrição T-bet, cuja expressão é induzida pela sinalização do TCR. Uma vez translocado para o núcleo, T-bet promove a expressão dos genes de IFN- $\gamma$  e da cadeia  $\beta$  do receptor de IL-12, aumentando a sensibilidade da célula T à IL-12 (THIEU *et al.*, 2008). Além disso, a sinalização parácrina do receptor de IFN- $\gamma$  aumenta a expressão de T-bet através do fator de transcrição STAT1, amplificando assim a resposta da célula  $T_H1$ . Caracterizadas pela produção de IFN- $\gamma$ , as  $T_H1$  desempenham um papel essencial no combate a patógenos intracelulares, na ativação de macrófagos e na indução da produção de IgG2a pelas células B (revisado por MURPHY & REINER, 2002).

A diferenciação das células  $T_H2$  é estimulada na presença da citocina IL-4. Juntamente com a sinalização do TCR, IL-4 ativa a via de sinalização de STAT6 que induz a expressão do fator de transcrição GATA-3. Esse fator de transcrição é fundamental para a diferenciação do subtipo  $T_H2$ , já que é capaz de reorganizar a estrutura da cromatina no chamado locus  $T_H2$ , induzindo a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 (revisado por ANSEL *et al.*, 2006). A secreção destas citocinas pelas células  $T_H2$  é responsável pelo recrutamento de eosinófilos para os sítios inflamatórios e pela indução da produção de IgG1 e IgE pelas células B (revisado por MURPHY & REINER, 2002). Após vários anos de intensa controvérsia, alguns estudos apontaram um papel chave para basófilos na indução de respostas  $T_H2$  (PERRIGOUE *et al.*, 2009; SOKOL *et al.*, 2009). No entanto, devido à escassez destas células, subsistem algumas dúvidas sobre o papel do eixo DCs/basófilos na indução de respostas  $T_H2$ .



**Figura 1: Função efetora da célula dendrítica.** De acordo com o esquema, DCs imaturas podem dar origem a diversos tipos de DCs “efetoras”, i.e., capazes de induzir a diferenciação de distintos subtipos de células T. A qualidade (ou mesmo, ausência) dos sinais que promovem a maturação das DCs é por sua vez determinante na indução da diferenciação das células T, incluindo imunidade, tolerância ou auto-imunidade. TCR: *T-cell receptor*; CTL: *cytotoxic T lymphocyte* (adaptado de REIS E SOUSA, 2006).

A polarização para o subtipo  $T_H17$  ocorre através da expressão do fator de transcrição ROR $\gamma$ t induzida pelas citocinas IL-6 e TGF- $\beta$ . ROR $\gamma$ t é o principal fator de transcrição responsável pela diferenciação das células  $T_H17$ , sendo capaz de induzir a expressão de IL-17 por essas células. Além do requerimento de IL-6 e TGF- $\beta$  para a diferenciação das células  $T_H17$  a partir de precursores imaturos, sabe-se que IL-23 desempenha um importante papel na expansão e manutenção desta população, induzindo a produção de IL-17, IL-6 e TNF- $\alpha$  pelas células diferenciadas. Essas células contribuem decisivamente na imunopatogênese de diversas doenças autoimunes, por exemplo, na artrite reumatóide, esclerose múltipla, no lúpus sistêmico eritomatoso e asma (revisado por BETTELLI *et al.*, 2007).

Existem ainda as células T regulatórias (T reg), geradas no contexto de tolerância e caracterizadas pela expressão do fator de transcrição Foxp3. Apesar dos distintos subfenótipos descobertos recentemente, as T reg são classificadas em basicamente dois grandes grupos, de acordo com sua origem de desenvolvimento: as T reg naturais, originadas no timo e as T reg periféricas, diferenciadas a partir de células T virgens na periferia (revisado por FEUERER *et al.*, 2009). As células T reg estão envolvidas na manutenção de tolerância imunológica ao próprio, no controle de doenças autoimunes e na prevenção de respostas descontroladas contra patógenos e alérgenos (revisado por SAKAGUCHI *et al.*, 2008).

Pelo fato de reconhecer peptídeos antigênicos associados a moléculas de MHC-classe I, as células T  $CD8^+$  citotóxicas (CTLs) são importantes mediadores da resposta imune adaptativa contra patógenos intracelulares e tumores. Tal como ocorre na diferenciação de  $T_H$ , a geração de CTLs por linfócitos virgens precursores requer a ativação de um programa de proliferação e diferenciação em células T efectoras citotóxicas. Além do primeiro sinal, mediado por TCR, a ativação deste programa de diferenciação requer sinais provenientes de DCs ativadas, do “apoio” de células T  $CD4^+$ , e de mediadores inflamatórios e fatores de



crescimento solúveis (revisado por BEVAN, 2004; revisado por CASTELLINO & GERMAIN, 2006).

Na sequência de uma infecção por determinados vírus, bactérias ou parasitas, células T CD8<sup>+</sup> virgens antígeno-específicas passam por um rápido processo de diferenciação e proliferação, dando origem a células efetoras citotóxicas, na chamada fase de expansão. Essas CTLs circulam entre os tecidos linfóides e não-linfóides para restringir a multiplicação do agente infeccioso. Após a eliminação do patógeno, inicia-se a fase de contração, resultando na diminuição drástica de CTLs. Em contrapartida, observa-se o surgimento de uma população de células T de memória de longa duração, capaz de gerar CTLs no caso de uma re-infecção (KAECH *et al.*, 2002).

Estudando a cinética da geração de linfócitos CD8 de memória, Mercado e colaboradores (2000) definiram as diferentes etapas desta “programação”: durante o primeiro dia de infecção, observa-se uma breve sinalização do TCR que instrui a célula T CD8<sup>+</sup> virgem a se desenvolver subsequentemente na ausência de estímulo antigênico (MERCADO *et al.*, 2000). Posteriormente outros grupos demonstraram que a duração do estímulo inicial pelo TCR controla o tamanho da população de células T CD8<sup>+</sup> mas não a sua funcionalidade, ou seja, a capacidade de atingir os estágios efetor e memória (PRLIC *et al.*, 2006). No entanto, sabe-se que os níveis de antígeno, assim como o encontro de células T CD8<sup>+</sup> com DCs tolerogênicas, são fatores determinantes na indução de tolerância nestes linfócitos. A tolerância ocorre quando os níveis de antígeno tornam-se muito altos (induzindo anergia), ou quando os níveis de antígenos tornam-se muito baixos, provocando morte celular (deleção clonal).

As CTLs matam células-alvo utilizando granzimas e perforinas. Além disso, as CTLs podem rapidamente produzir citocinas, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , tornando mais eficiente o combate ao invasor, seja ele um vírus, uma bactéria ou mesmo um protozoário intracelular.

(revisado por CHÁVEZ-GALÁN *et al.* 2009). Além de ter sua importância bem estabelecida no controle de infecções virais e bacterianas, as células T CD8<sup>+</sup> tem sido amplamente estudadas na infecção chagásica, tanto no modelo murino (MARTIN *et al.*, 2006; TZELEPIS *et al.*, 2008), quanto em pacientes cronicamente infectados (DIEZ *et al.*, 2006; ALVAREZ *et al.*, 2008).

Entre as proteínas que o *T. cruzi* expressa durante o seu desenvolvimento intracelular, os antígenos polimórficos da superfamília das trans-sialidase (TS) provem peptídeos dominantes reconhecidos por CTLs (MARTIN *et al.*, 2006; TZELEPIS *et al.*, 2008). Em amastigotas, os antígenos (relacionados com TS) melhor caracterizados são membros da subfamília MASP (LOW *et al.*, 1998).

Conforme já mencionado, as células T de memória são caracterizadas por sua capacidade de responder com eficácia a um segundo desafio com o mesmo antígeno (resposta secundária). A função protetora depende da geração de (i) células T efetoras/memória (T<sub>EM</sub>), capazes de migrar para os tecidos periféricos inflamados, onde desempenham função efetora imediata, e (ii) células de memória central (T<sub>CM</sub>), capazes de migrar para as áreas de células T dos órgãos linfóides secundários, onde em seguida proliferam e se diferenciam em células T CD8<sup>+</sup> efetoras ao serem confrontadas com estímulo antigênico (revisado por SALLUSTO *et al.*, 2004).

Atualmente existem dois modelos propostos para a geração diferencial de células efetoras e células de memória. No primeiro modelo, os precursores de células de memória recebem sinais quantitativamente diferentes daqueles recebidos pelos precursores de células efetoras. Neste cenário, acredita-se que níveis crescentes de estímulo pelas interações MHC-TCR, moléculas co-estimulatórias e mediadores inflamatórios podem induzir uma diferenciação mais profunda, irremediavelmente comprometida com a função efetora. No segundo modelo, os precursores de memória são derivados de células que receberam sinais

qualitativamente diferentes. Neste cenário, sinais específicos seriam requeridos para direcionar a diferenciação de células de memória, como um fator de crescimento ou molécula co-estimulatória específicos, ou ainda, a interação com um subtipo especializado de DC (revisado por PRLIC *et al.*, 2007). Existem evidências que suportam os dois modelos, mas estudos adicionais são necessários para identificar os sinais ambientais que induzem a geração de precursores de células T CD8<sup>+</sup> de memória e efetoras.

### 1.3 Adjuvantes Imunológicos

Os adjuvantes imunológicos são utilizados em formulações vacinais com o objetivo de melhorar a função do sistema imune, tornando um microrganismo ou antígeno mais imunogênico. Os adjuvantes são representados por diferentes classes de compostos como sais minerais, emulsões, micropartículas, lipossomos, compostos particulados e produtos microbianos. Estes compostos tem sido identificados de forma empírica, pela sua capacidade de estimular a resposta imune contra antígenos co-administrados em modelos experimentais. Postula-se que os adjuvantes desempenham suas funções através da ativação do sistema imune inato, promovendo o recrutamento de células para o local de inoculação da vacina e ativação e maturação de células apresentadoras de antígenos profissionais (revisado por DE GREGORIO *et al.*, 2009).

Diversos compostos microbianos usados como adjuvantes são capazes de ativar diretamente as APCs através de TLRs. Esse é o caso do monofosforil lipídeo A (*monophosphoryl lipid A* - MPLA), um composto derivado do LPS, que apresenta toxicidade de 100 a 10.000 vezes menor do que o LPS, e age promovendo aumento da capacidade de ativação de células T por APCs (DE BECKER *et al.*, 2000). Esta molécula foi descrita classicamente como adjuvante que favorece o desenvolvimento de respostas T<sub>H</sub>1, com produção de IFN- $\gamma$  e anticorpos do isotipo IgG2a (ULRICH & MYERS, 1995).

Recentemente, Mata-Haro e colaboradores demonstraram que a baixa toxicidade e os efeitos adjuvantes do MPLA estão associados à sinalização de TLR4 dependente da molécula adaptadora TRIF (*Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter inducing interferon- $\beta$* ), diferentemente da sinalização associada a efeitos pró-inflamatórios do LPS via TLR4/MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) (MATA-HARO *et al.*, 2007).

Adicionalmente, os oligonucleotídeos de CpG (*cytosine phosphate guanosine oligodeoxynucleotide* - CpG ODN), presentes em DNA bacteriano e viral, são reconhecidos através da interação com TLR9, e são comumente utilizados como adjuvantes devido a sua capacidade de melhorar a atividade funcional das APCs e ativar a produção de citocinas e quimiocinas que sustentam o desenvolvimento das respostas adaptativas (revisado por KLINMAN *et al.*, 2009). Foi demonstrado no modelo de vacinação contra *Leishmania major* que esses eventos são dependentes da ativação de determinados subtipos de DCs, que apresentam melhora na apresentação de antígenos após a imunização, e que, uma vez ativadas, são capazes de produzir citocinas, como IL-12p70 e IFN- $\gamma$  (SHAH *et al.*, 2003).

O uso de derivados microbianos em vacinas pode não ser recomendado, devido à toxicidade intrínseca presente na maioria destes compostos. Para superar esta limitação, desenvolveram-se estratégias capazes de modificar circuitos de sinalização intracelulares, através da superexpressão ou supressão de moléculas que integram as vias de sinalização ativadas por estes adjuvantes (revisado por WALES *et al.*, 2007). Por exemplo, Andreakos e colaboradores demonstraram que a superexpressão de NIK (*NF- $\kappa$ B inducing kinase*), uma enzima que ativa NF- $\kappa$ B, induz maior apresentação de antígenos por DCs a células T e, conseqüentemente, maior proliferação de células T antígeno-específicas e maior produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ANDREAKOS *et al.*, 2006). Mais recentemente, o mesmo grupo de pesquisa mostrou que a expressão de uma versão mutante da molécula adaptadora MyD88, denominada MyD88lrp, pode ser usada

como adjuvante em esquemas vacinais, uma vez que essa molécula ativa especificamente DCs, resultando em aumento na produção de citocinas, expressão de moléculas co-estimulatórias e ativação de células T. Os autores sugerem que a molécula mutante impediria a interação entre MyD88 e o receptor órfão SIGIRR (*single immunoglobulin IL-1R-related protein*), resultando na ativação espontânea de DCs imaturas (DREXLER *et al.*, 2010). Estes trabalhos demonstram que diversas moléculas sinalizadoras intracelulares podem ser candidatas a adjuvantes moleculares, pois sua habilidade em se manter confinadas na célula produtora permite o desenvolvimento de respostas imunes mais específicas e localizadas.

Estudos recentes revelaram que os chamados adjuvantes particulados, que durante muito tempo foram considerados apenas como veículos carreadores capazes de aumentar o tempo de exposição ao antígeno ou estimular a endocitose do antígeno pelas DCs, desempenham um importante papel na ativação do sistema imune *in vivo*. Alguns destes adjuvantes são capazes de estimular DCs indiretamente, agindo sobre células do estroma linfóide e outros tipos de células do sangue. Um importante exemplo é o adjuvante MF59, que induz a produção de citocinas por monócitos, macrófagos e granulócitos humanos, e também é capaz de promover a diferenciação de monócitos em DCs (SEUBERT *et al.*, 2008). Interessantemente, análises de imunofluorescência e *microarray* mostraram que o MF59 induz a produção de quimiocinas no músculo, a regulação positiva de receptores de citocinas e o recrutamento de leucócitos (MOSCA *et al.*, 2008).

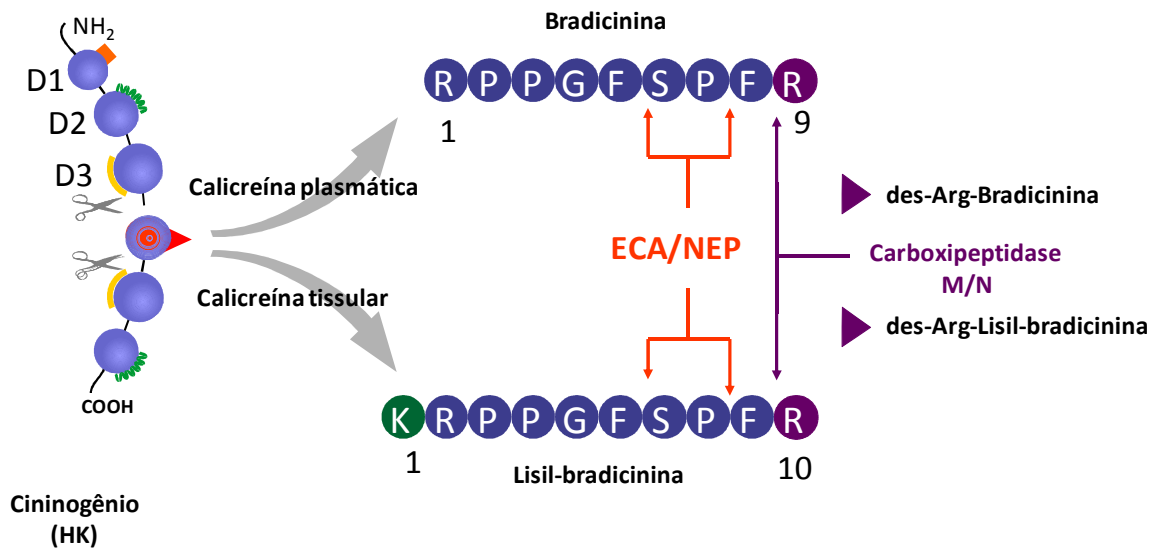
Dentre os adjuvantes particulados, as formulações contendo sais de alumínio, continuam sendo as mais amplamente usadas como adjuvantes clínicos (NAIM *et al.*, 1997). Existem diversos compostos contendo sais de alumínio, genericamente referidos apenas como alum, mas apenas dois deles são licenciados para uso em humanos: o hidróxido de alumínio e o fosfato de alumínio (HEM *et al.*, 2007). Ainda não existe um consenso acerca dos mecanismos de ação do alum, mas existem pelo menos três hipóteses para explicar os seus

efeitos estimulatórios sobre o sistema imune: o alum (i) forma um depósito pelo qual o antígeno é lentamente liberado; (ii) induz inflamação, recrutando e ativando APCs; e (iii) a adsorção de antígeno solúvel no alum converte-o em antígeno particulado, facilitando sua fagocitose pelas APCs (MANNHALTER *et al.*, 1985; revisado por BREWER, 2006). Essas hipóteses não são excludentes, mas a segunda hipótese é atualmente a mais estudada. Está claro ainda que o alum promove imunidade humoral através da ativação de células B (JORDAN *et al.*, 2004). Uma série de trabalhos demonstrou que o alum estimula DCs inflamatórias e outras APCs através da ativação do inflamassoma NALP3 (EISENBARTH *et al.*, 2008; KOOL *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008). O inflamassoma NALP3 é um complexo molecular formado pelo NALP3 (um membro da família dos NLRs), pelas proteínas adaptadoras ASC e CARDINAL e pela pró-caspase-1. Agindo como um segundo sinal, este complexo é ativado por múltiplos agonistas, como ATP endógeno e ácido úrico, levando ao processamento e liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33 (AGOSTINI *et al.*, 2004; MARTINON *et al.*, 2006). No caso da imunização com alum, a ativação do inflamassoma NALP3 e a subsequente liberação de IL-1 $\beta$  induzem o recrutamento de monócitos imaturos e DCs para o local da injeção. A produção de IL-1 $\beta$  também leva à ativação de monócitos inflamatórios e sua migração aos linfonodos drenantes. (EISENBARTH *et al.*, 2008; KOOL *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008). Em camundongos imunizados com OVA-alum, monócitos inflamatórios e DCs carregados com OVA migram para o linfonodo drenante e aumentam a expressão de moléculas co-estimulatórias, como CD86, induzindo a expansão de células T antígeno-específicas (KOOL *et al.*, 2008). Os dados são consistentes com a ideia de que a produção de IL-1 $\beta$  dependente de NALP3 por DCs polariza uma resposta adaptativa celular do tipo T<sub>H</sub>2, estimulando a produção de IL-4 e IL-5 por células T CD4 (SOKOLOVSKA *et al.*, 2007). Porém, ainda não se sabe exatamente como

o alum inicia a ativação de linfócitos e como isso favorece a polarização para o eixo  $T_H2$  sobre o eixo  $T_H1$ .

#### 1.4 Sistema de Cininas

Conforme ilustrado no esquema apresentado na Figura 2, as cininas são um grupo de peptídeos de 9 a 11 aminoácidos relacionados com a bradicinina, um nonapeptídeo hipotensor originalmente descrito por Beraldo e Rocha e Silva (ROCHA E SILVA *et al.*, 1949). Ao longo de várias décadas, os estudos sobre cininas concentraram-se sobre seus efeitos na regulação do tônus vascular e propriedades nociceptivas e pró-inflamatórias (revisado por CALIXTO *et al.*, 2004; CUNHA *et al.*, 2007). O nome genérico de “cininas” foi adotado consensualmente porque existem outros peptídeos biologicamente ativos relacionados com a BK, destacando-se, entre estes, a lisil-bradicinina (LBK) e os correspondentes derivados de cininas truncados na região C-terminal, i.e., des-Arg-BK ou des-Arg-LBK. As cininas são produzidas a partir da clivagem proteolítica de glicoproteínas presentes em altas concentrações no soro, denominadas cininogênios. Sintetizados no fígado, os cininogênios são codificados por um único gene, contendo múltiplos domínios funcionais, e cuja transcrição é regulada através de processamento alternativo (MERKULOV *et al.*, 2008). Enquanto a calicreína plasmática libera BK de HK (*high molecular weight kininogen*), a calicreína tissular cliva a extremidade N-terminal de HK/LK (*low molecular weight kininogen*) em uma posição anterior, liberando o decapeptídeo LBK (revisado por BHOOLA *et al.*, 1992). Além de serem geradas por proteases endógenas as cininas podem ser proteoliticamente liberadas por diversos patógenos. Por exemplo, o *Trypanosoma cruzi* libera cininas através da cruzipaína (DEL NERY *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 2002), o *Staphylococcus aureus* emprega a stafopaína e a bactéria periodontal *Porphyromonas gingivalis* expressa a gingipaína (IMAMURA *et al.*, 2003)



**Figura 2:** Componentes do sistema caliceína-cinina.

Os efeitos biológicos clássicos das cininas são mediados por dois subtipos de receptores acoplados à proteína G regulatória (GPCRs), B<sub>2</sub>R (expresso constitutivamente) e B<sub>1</sub>R (induzido na inflamação). Conforme brevemente mencionado acima, o receptor B<sub>2</sub>R é expresso constitutivamente em diversos tipos celulares, como células endoteliais, epiteliais, musculares e neuronais, e sua ativação promove vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa e dor (revisado por MARCEAU e BACHVAROV, 1998). O receptor B<sub>2</sub>R é expresso por CD11c<sup>+</sup> DCs convencionais esplênicas de camundongo, sendo a sinalização por BK/LBK implicada na maturação destas APCs, conforme documentado pelo nosso grupo (ALIBERTI *et al.*, 2003).

Diversos mecanismos contribuem para o efeito eminentemente parácrino das cininas sobre B<sub>2</sub>R e/ou B<sub>1</sub>R. Primeiramente, BK/LBK (agonistas de B<sub>2</sub>R) são rapidamente degradadas pela ECA/cinina II, uma di-peptidil carboxipeptidase abundantemente expressa na superfície de células endoteliais (LEVIN *et al.*, 1982). Além de suprimir os efeitos



vasodiladores de cininas, a ECA aumenta a pressão arterial pelo fato de converter o peptídeo angiotensina I em angiotensina II, um potente vasopressor (JASPARD *et al.*, 1993). Conforme será discutido nesta dissertação, a ECA é também expressa por outros tipos celulares, inclusive por células do sistema imune inato, como macrófagos (IGIC & BEHNIA, 2003) e DCs (DANILOV *et al.*, 2003). Cabe esclarecer que, uma vez liberadas de cininogênios, as cininas podem ser degradadas e/ou processadas por outras metalopeptidases, como a endopeptidase neutra (NEP), ou por metalopeptidases, como aminopeptidase P (APP) e a aminopeptidase N (APN) (revisado por BLAIS *et al.*, 2000). Os metabólitos que resultam da degradação de LBK/BK pela ECA ou NEP não são capazes de sinalizar células através de B<sub>2</sub>R ou B<sub>1</sub>R (revisado por BHOOLA *et al.*, 1992). O segundo mecanismo de regulação dos sinais deflagrados por BK/LBK parece ser relacionado com a localização preferencial de B<sub>2</sub>R em domínios lipídicos, as cavéolas. Uma vez exposto a altas concentrações de BK/LBK, B<sub>2</sub>R sofre endocitose, sendo internalizado em células de músculo liso (de WEERD & LEEB-LUNDBERG, 1997).

Além do processamento dependente de ECA/NEP, LBK/BK podem ser metabolizadas por duas metalopeptidases (carboxi-peptidases), denominadas de “cininase I”: (i) a carboxipeptidase N (LEVIN *et al.*, 1982), presente no plasma e a carboxipeptidase M, uma metalopeptidase ancorada na superfície de células, inclusive de macrófagos, através de uma âncora GPI (DEDDISH *et al.*, 1998). Em ambos os casos, a arginina C-terminal de BK/LBK é removida, gerando agonistas seletivos para B<sub>1</sub>R (des-Arg<sup>9</sup>-BK ou des-Arg<sup>10</sup>-LBK).

Em contraste, o receptor B<sub>1</sub>R tem sua expressão induzida sob condições fisiopatológicas, como injúria, infecção e inflamação crônica, possuindo baixa expressão em tecidos normais. Além de controlar funções vasculares, a ativação do receptor B<sub>1</sub>R promove hiperalgesia (PESQUERO *et al.*, 2000) e está associada a processos de reparação, como angiogênese e fibrose (revisado por MARCEAU *et al.*, 1998). Adicionalmente, as CD11c<sup>+</sup>

DCs de origem esplênica não sofrem maturação *in vitro* quando estimuladas por des-Arg-LBK (ALIBERTI *et al.*, 2003).

Conforme ocorre com outros GPCRs, as via de ativação intracelular controladas por B<sub>2</sub>R variam de uma célula para outra, sendo via de regra dependentes de acoplamento a diferentes subtipos de proteínas G heterotriméricas (revisado por LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005). Por exemplo, a sinalização de células endoteliais via B<sub>2</sub>R envolve acoplamento pela via G<sub>αq</sub>/fosfolipase-C β (PLCβ)-dependente, gerando inositol-tri-fosfato (IP3), diacilglicerol (DAG), e promovendo aumento dos níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelular. O aumento de Ca<sup>2+</sup> nas células endoteliais, por sua vez, ativa a produção de óxido nítrico (NO) pela enzima NO sintase endotelial, e o NO liberado por essas células induz o aumento dos níveis de GMP cíclico nas células de músculo liso, promovendo o relaxamento da vasculatura. Além disso, DAG e Ca<sup>2+</sup> ativam diferentes isoformas da proteína kinase C (PKC-α, -ε e -ζ), que participam de diversas vias de sinalização (NISHIZUKA, 1992).

As cininas podem, ainda, ativar as fosfolipases A2 e D, assim como a esfingosina kinase, resultando na geração dos segundos mensageiros lipídicos ácido aracdônico, ácido fosfatídico e esfingosina-1 fosfato. As prostaglandinas (geradas a partir do ácido aracdônico) tem sido relacionadas com a formação de edema induzida por BK, mas ainda não se sabe se, neste caso, o ácido fosfatídico e a esfingosina-1 fosfato desempenham alguma função fisiológica (BURCH & AXELROD, 1987; BLAUKAT & DIKIC, 2001). Através da geração dos segundos mensageiros, as cininas ativam múltiplos fatores de transcrição, que regulam a produção de algumas citocinas envolvidas na inflamação e injúria, assim como a expressão do receptor B<sub>1</sub>R, conforme demonstrado em fibroblastos humanos (PHAGOO *et al.*, 1999). Dentre esses fatores de transcrição, podemos citar a ativação de NF-κB e STAT3, e a indução da expressão de IL-1β, IL-6 e IL-8 (PAN *et al.*, 1996; HAYASHI *et al.*, 2000; revisado por LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005).

Conforme já mencionado, após a ativação por altas concentrações de BK/LBK, os receptores B<sub>2</sub> são rapidamente desensibilizados e internalizados, induzidos pela fosforilação de resíduos de serina e treonina específicos na porção terminal dos receptores. Essa fosforilação é mediada por kinases associadas a GPCRs, principalmente a GRK4 $\alpha$  (BLAUKAT *et al.*, 2001; BLAUKAT, 2003). Em contrapartida, a desensibilização dos receptores B<sub>1</sub> é menos eficiente do que B<sub>2</sub>R, tornando as respostas controladas pelo receptor induzido mais prolongadas do que aquelas induzidas por B<sub>2</sub>R (revisado por LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005).

#### 1.4.1 Integração entre a inflamação e o sistema imune: um novo papel para as cininas

Depois de várias décadas de estudos sobre as funções imunológicas “inatas” do sistema complemento, avanços recentes neste campo de investigação apontaram funções imunoregulatórias para as anafilatoxinas C5a e C3a do sistema complemento na regulação do braço adaptativo da resposta imune (RICKLIN *et al.*, 2010). Conforme relatarei mais detalhadamente adiante, os trabalhos do nosso grupo forneceram as primeiras evidências que a ativação do sistema cinina em sítios de infecção promove o entrelaçamento funcional entre respostas imunes inatas e adaptativas (MONTEIRO *et al.*, 2006; 2007; 2009). Conforme mencionei anteriormente, estes estudos foram precedidos por achados descritos em camundongos imunizados com OVA/alum/BK, demonstrando que a BK polariza a resposta adaptativa anti-Ovalbumina (OVA) para o perfil T<sub>H</sub>1 pela via B<sub>2</sub>R/IL-12-dependente, revertendo a resposta T<sub>H</sub>2 classicamente induzida em animais BALB/c imunizados com OVA/alum (ALIBERTI *et al.*, 2003). Estes achados foram enriquecidos por evidências obtidas *in vitro*, indicando que a BK exógena ativa células dendríticas (DCs) esplênicas através do receptor B<sub>2</sub>R, induzindo a produção da citocina IL-12 e de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) (ALIBERTI *et al.*, 2003). Ainda no mesmo estudo, foi

demonstrado que a ativação de DCs imaturas pela via B<sub>2</sub>R é potencializada por inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA).

Cientes de que o *T. cruzi* e a bactéria periodontal *Porphyromonas gingivalis* são munidos de cisteíno proteases liberadoras de cininas (MONTEIRO *et al.*, 2006; 2007; 2009) desenvolvemos modelos de infecção com estes patógenos intracelulares, com o intuito de testar a hipótese de trabalho acima descrita, qual seja: determinar se a geração de cininas nos sítios de infecção/inflamação era de fato capaz de estimular a geração de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  através de mecanismos dependentes da ativação de B<sub>2</sub>R + DCs. Conforme relatarei a seguir, este objetivo foi parcialmente alcançado.

Primeiramente, estudos realizados no modelo subcutâneo de infecção (pata) pelo *T. cruzi* revelaram que a resposta inflamatória edematogênica disparada por tripomastigotas envolve ativação sequencial dos receptores TLR2, CXCR2 e B<sub>2</sub>R nas primeiras horas da infecção (MONTEIRO *et al.*, 2006; SCHMITZ *et al.*, 2009). O primeiro achado importante deste estudo foi a demonstração que tanto o extravazamento de plasma (na bolsa da bochecha) quanto o edema mediado por B<sub>2</sub>R eram reduzidos pelo tratamento prévio de tripomastigotas como inibidores irreversíveis da cruzipaina (MONTEIRO *et al.*, 2006). Em seguida, os autores obtiveram evidências de que a expressão da cruzipaina pelos parasitas era uma condição necessária, mas insuficiente para gerar cininas vasoativas no espaço intersticial: camundongos injetados com epimastigotas, um estágio de desenvolvimento do protozoário que não expressa quantidades apreciáveis do lipídeo ligante de TLR2, não produziram inflamação edematogênica significativa, nem mesmo mediante tratamento com inibidores de ECA. Os estudos de microscopia intravital na bolsa da bochecha forneceram outros dados importantes. Por exemplo, verificou-se que a aplicação tópica de baixas concentrações da cruzipaina pré-ativada na bolsa da bochecha (estado de repouso, i.e., não-inflamado) não induzia significativo aumento de permeabilidade vascular (MONTEIRO *et al.*, 2006).

Entretanto, observou-se que a sensibilização dos vasos com a cruzipaina juntamente com a fonte de substrato (i.e., cininogênio humano purificado) induzia um edema B<sub>2</sub>R-dependente (bloqueado por HOE-140) e potenciado por captopril, tal como ocorria com tripomastigotas. Com base nestes estudos, os autores previram que os tripomastigotas deveriam possuir um segundo fator, capaz de provocar acúmulo de proteínas plasmáticas (inclusive cininogênios) no sítio de infecção periférica. Uma vez alcançada esta condição, as cininas vasoativas poderiam amplificar a inflamação através de ativação de receptores B<sub>2</sub>R expressos no endotélio.

A busca deste segundo fator teve como foco a GPI-mucina, uma âncora expressa por tripomastigotas. Sabia-se que a âncora de tripomastigotas continha lipídeos não-saturados (ausentes em epimastigotas) que são essenciais para estímulo de TLR2 (ALMEIDA & GAZZINELLI, 2001). Estudos realizados com animais TLR2<sup>-/-</sup> pré-tratados com captopril confirmaram que, de fato, a ativação de TLR2 é necessária para que os tripomastigotas possam induzir a formação de significativo edema inflamatório pela via cruzipaina → cinina/B<sub>2</sub>R (MONTEIRO *et al.*, 2006). Com base nestes estudos, os autores relacionaram a geração de cininas no sítio de infecção periférica à capacidade de tripomastigotas iniciarem a inflamação mediante ativação de TLR2 expressos em células sentinelas do sistema imune inato, provavelmente macrófagos residentes. Em outra evidência experimental chave, os autores mostraram que camundongos depletados de neutrófilos tampouco desenvolviam respostas edematogênicas apreciáveis quando injetados com tripomastigotas na presença de captopril. Sabendo que neutrófilos ativados são capazes de produzir fatores que aumentam a permeabilidade vascular, Monteiro e colaboradores (2006) postularam que a ativação de neutrófilos poderia provocar um discreto extravazamento de plasma, mas suficiente para permitir o rápido acúmulo de cininogênio (substrato da cruzipaina) no sítio de infecção (Figura 3). De acordo com este modelo, a ativação sequencial de TLR2/neutrófilos seria

apenas a primeira etapa de um processo de inflamação que é posteriormente amplificado pela geração (proteolítica) de altos níveis de cininas. Ao estimular receptores B<sub>2</sub>R nas células endoteliais, as cininas reforçariam ainda mais a intensidade do edema intersticial (*feedback* positivo). Atuando como contra-regulador da resposta inata orquestrada por TLR2/neutrófilos, a enzima ECA degrada as cininas liberadas pela cruzipaina (e possivelmente pelas calicreínas tissulares), evitando assim que a inflamação prossiga de modo descontrolado. A dissecção da dinâmica do processo inflamatório desencadeado por tripomastigotas foi posteriormente enriquecida pelo trabalho publicado por Schmitz e colaboradores (2009). Ao focalizar sua atenção nos efeitos de tGPI-mucinas sobre macrófagos, os autores mostraram que a ativação de TLR2 induz a secreção de quimiocinas CXC (KC/MIP-2), que por sua vez ativam neutrófilos/endotélio através da ativação de receptores CXCR2 (GPCRs), causando extravasamento inicial de plasma no interstício (SCHMITZ *et al.*, 2009).

Uma vez esclarecida a relação funcional entre TLR2/B<sub>2</sub>R e seu papel na dinâmica da resposta inflamatória induzida pelos tripomastigotas Dm28c, Monteiro e colaboradores (2006) estudaram os efeitos imunológicos resultante da ativação plena deste eixo. Isso foi feito mediante injeção sistêmica (i.p.) de uma dose única inibidores de ECA (captopril) 1 h antes de infectar animais selvagens *versus* TLR2<sup>-/-</sup>, B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> e depletados de neutrófilos. Estes estudos demonstram que esta manobra (potencialização do efeito de cininas pelo captopril) aumentou a frequência de DCs produtoras de IL-12 nos linfonodos drenantes e a resposta adaptativa (aumento da produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T anti-*T. cruzi*) (MONTEIRO *et al.*, 2006). Tal como previsto, esta manobra não foi capaz de induzir a polarização da resposta T<sub>H</sub>1 em animais TLR2<sup>-/-</sup> infectados e pré-tratados com captopril. O mesmo aconteceu com animais desprovidos de neutrófilos e com camundongos B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>. Finalmente, experiências complementares realizadas em animais TLR2<sup>-/-</sup> ou depletados de neutrófilos reconstituídos com uma fonte exógena de cininogênio humano (injetado na pata, juntamente com os

parasitas) demonstraram que a geração de cininas (pela via cruzipáina-dependente) era capaz de resgatar a resposta  $T_H1$  nestes animais, sendo este efeito abolido por HOE-140. Com base nestes resultados, os autores postularam que o aumento da concentração local de BK/LBK nos sítios de infecção e/ou linfonodos drenantes, possivelmente agindo em conjunto com outros fatores pró-inflamatórios gerados nestes microambientes, otimizam o processo de maturação de DCs, convertendo estas células sentinelas em APCs indutoras de resposta  $T_H1$ . Em resumo, os estudos no modelo de infecção subcutânea sugeriram que a geração proteolítica de cininas no sítio de infecção é dependente do suprimento da fonte de substrato (cininogênio) proveniente do plasma, função esta atribuída ao eixo TLR2/CXCR2/neutrófilos. Além disso, estes estudos demonstram que o efeito “adjuvante” de cininas é potencializado mediante administração de uma dose única de inibidores de ECA nos animais infectados (Fig. 3). Estas observações serviram de base para o desenvolvimento de uma nova estratégia de vacinação, descrita mais adiante neste texto.





inicial da infecção, a ativação de B<sub>2</sub>R era dispensável para indução de uma resposta adaptiva do tipo-1 no tecido linfóide, mas poderia ter alguma repercussão no potencial migratório destas células. Não obstante estes resultados, os defeitos imunológicos nos camundongos B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> tornaram-se mais evidentes nas fases mais tardias da infecção aguda (28 dias). O comprometimento da resposta tipo-1 tornou-se generalizado, afetando tanto o baço quanto a resposta periférica. De modo surpreendente, a grave deficiência de resposta T<sub>H</sub>1 nos B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> foi acompanhada por um robusto aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IL-17 (resposta antígeno-específica). Os resultados de experiências envolvendo transferência adotiva de linfócitos T CD4<sup>+</sup> versus CD8<sup>+</sup> de animais B<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> infectados para animais B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> susceptíveis foram de suma importância, porque demonstraram que a geração/sustentação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> efetores/memória com atividade imunoprotetora depende criticamente de sinalização intacta de B<sub>2</sub>R em DCs, conforme explicado abaixo. Ainda que os motivos por trás das diversas disfunções imunoregulatórias observadas no B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> não fossem esclarecidos no referido trabalho, é importante ressaltar que a injeção intravenosa de B<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> DCs em recipientes B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> corrigiu todas as alterações fenotípicas (inclusive o fenótipo de resistência ao desafio agudo e o desvio para T<sub>H</sub>17) de outro modo presentes nos animais B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>. A visão sobre o mecanismo de ação de DCs neste processo foi enriquecida por estudos complementares *in vitro*: ao analisar a interação de CD11c<sup>+</sup> DCs com tripomastigotas de Dm28c, os autores documentaram que os parasitas induzem a maturação (aumento de expressão de CD80, CD86, CD40 e IL-12) de DCs de animais selvagens ou isoladas de camundongos TLR2<sup>-/-</sup> ou TLR4<sup>-/-</sup> deficientes, mas não de DCs provenientes de B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>. Estudos adicionais comprovaram que os parasitas estimulam as DCs através de cininas liberadas proteoliticamente pela cruzipaina. Com base nestes resultados, os autores sugeriram que estes eventos podem ocorrer quando os tripomastigotas invadem o baço, já que o endotélio neste órgão linfóide é fenestrado, permitindo livre acesso de proteínas plasmáticas,

inclusive cininogênios, no parênquima linfóide. Ainda que os mecanismos tradicionais de integração entre o sistema imune inato e adaptativo pareçam ser bem preservados no baço, possivelmente envolvendo TLRs (BAFICA *et al.*, 2006), o engajamento de B<sub>2</sub>R expresso por DCs parece ser importante para a indução/sustentação da migração e/ou persistência de células T efetoras na periferia. Por motivos ainda não esclarecidos, a deficiência na sinalização pela via B<sub>2</sub>R causa um progressivo comprometimento da resposta imunoprotetora do tipo-1 nos animais B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup>, sendo o efeito atrelado ao aumento da resposta T<sub>H</sub>17.

### **Hipótese de trabalho e Justificativa do projeto**

Os estudos realizados por Aliberti e colaboradores (2003) originaram um pedido de patente submetido ao INPI (aguardando parecer nesta data). Naquela ocasião, ainda não sabíamos que a ativação de DCs pela via BK/B<sub>2</sub>R poderia ter impacto positivo na geração de linfócitos T CD8<sup>+</sup> efetores, conforme sugerido por Monteiro e colaboradores (2007). Com o propósito de transpor os conhecimentos obtidos na pesquisa básica para área de pesquisa aplicada, nos últimos anos aperfeiçoamos um esquema de vacinação não-convencional empregando o captopril como potencializador dos efeitos adjuvantes da BK. As nossas formulações vacinais (Fase I) foram compostas de alum (hidróxido de alumínio), BK sintética e extrato protéico solúvel fervido de epimastigotas de *T. cruzi*. Optamos pelo emprego de antígenos de epimastigotas porque pretendíamos evitar a indução de anticorpos imunoprotetores dirigidos contra glicoproteínas da superfamília das trans-sialidasas (TS). Deste modo, imaginamos que os eventuais efeitos benéficos do esquema vacinal seriam predominantemente dependentes do componente adaptativo da resposta imune, tendo como premissa que esta resposta é fortemente dependente dos efeitos do adjuvante empregado no esquema vacinal. Entre diversos obstáculos técnicos a serem superados, havia um que mereceu nossa preocupação desde o início da fase I deste projeto. Os membros da

superfamília TS (com potencial antigênico e expressão diferenciada na superfície de epimastigotas, em relação aos tripomastigotas) são a fonte principal de epítomos dominantes reconhecidos por CTLs imunoprotetoras (MARTIN *et al.*, 2006; TZELEPIS *et al.*, 2008). Portanto, a idéia de empregar extratos de epimastigotas como imunógeno poderia não ser bem sucedida, a não ser que o adjuvante fosse tão eficaz a ponto de gerar respostas CTLs robustas contra epítomos sub-dominantes, de natureza ainda desconhecida. A decisão de ferver os extratos foi tomada por outro motivo: era necessário evitar efeitos pró-inflamatórios eventualmente induzidos por proteases parasitárias, inclusive pela própria cruzipaina. Finalmente, e considerando a necessidade de evitar que a BK sintética sofresse degradação pela ECA (presente nos sítios de vacinação), utilizamos como ferramenta farmacológica o pré-tratamento dos animais imunizados com captopril, pelo fato de ser um medicamento genérico, de baixo custo. Os trabalhos realizados pela Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Monteiro (dados não publicados) forneceram o embasamento para os estudos que foram realizados durante o desenvolvimento do meu projeto de Mestrado. Para facilitar a compreensão dos resultados obtidos durante o Mestrado, os principais resultados obtidos pela referida pesquisadora (ilustrados no Anexo I) serão descritos no início da seção de Resultados (Fase I).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Explorar o papel do sistema cinina no desenvolvimento de estratégias vacinais contra infecção pelo *T. cruzi*.

### 2.2 Objetivos específicos

Modelo camundongos BALB/c - parasitas cepa Dm28c

- 1) Avaliar os efeitos imunogênicos das DCs estimuladas *in vitro* com Ag+Cap/BK.
- 2) Caracterizar o perfil de expressão de CCR5/CCR7 de linfócitos T efetores/memória induzidos pelo esquema vacinal completo.
- 3) Avaliar o efeito da substituição de BK por MPLA, no esquema de vacinação potenciado por captopril.

Modelo camundongos C57BL/6 - parasitas cepa CL-Brener

- 4) Padronizar a formulação vacinal para análise da geração de linfócitos T citotóxicos (CTL) ag-específicos *in vivo*.
- 5) Verificar se a inclusão de BK em adjuvantes de liberação lenta poderia aumentar a frequência de CTL ag-específicas nos animais imunizados.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Camundongos

Os experimentos foram realizados com camundongos BALB/c e C57BL/6 B<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> (selvagens) e B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> (*knock out*) machos com 8 a 12 semanas de idade. Os animais foram mantidos no Biotério do que atende ao Laboratório de Imunologia Molecular (IBCCF, UFRJ), em temperatura controlada (22 ± 2°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas com livre acesso à água e ração. Os protocolos experimentais utilizando animais foram aprovados no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o n° IBCCF 1001.

#### 3.2 Parasitas

Tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) da cepa Dm28c do *Trypanosoma cruzi* foram recolhidos do sobrenadante de culturas de células LLCMK<sub>2</sub> após 4-5 dias de infecção. As células LLCMK<sub>2</sub> são mantidas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB; GIBCO). Os parasitas recentemente liberados foram lavados 3x com PBS antes da inoculação nos camundongos. Epimastigotas de *T. cruzi* (Epi) das cepas Dm28c e CL-Brener foram cultivados a 28°C em meio LIT (*liver infusion tryptose* - SIGMA) contendo 10% de SFB. O extrato de epimastigotas usado como antígeno foi obtido através de 5 ciclos consecutivos de congelamento/descongelamento dos parasitas, seguido de uma etapa de fervura em banho-maria, por 5 minutos. A quantificação de proteínas do extrato foi realizada utilizando o kit de dosagem de proteínas Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories), a partir de uma curva padrão de BSA, seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.3 Imunização e infecção no modelo BALB/c - cepa Dm28c

#### 3.3.1 Imunização com DCs

##### 3.3.1.1 Isolamento e estímulo de DCc CD11c<sup>+</sup> esplênicas

Células de baço de camundongos BALB/c ou C57BL/6 B<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> foram obtidas a partir do tratamento com 1mg/ml de colagenase D (Sigma-Aldrich) e 100 µg/ml de DNase I fração IX (Sigma-Aldrich) por 60 min a 37°C, em meio RPMI 1640 (Sigma). Após esse período, as hemácias da suspensão celular foram lisadas com solução de lise de hemácias (ACK) por 5 min a temperatura ambiente. As células foram lavadas e incubadas com micro esferas magnéticas conjugadas a anti-CD11c de camundongo (Milteny Biotec) em PBS contendo 2% de SFB por 20 min a 4°C, conforme recomendações do fabricante. A suspensão celular foi lavada, ressuspensa em PBS-SFB 2% e transferida para a coluna magnética. As DCs CD11c<sup>+</sup> foram separadas através de seleção positiva em coluna acoplada a um separador magnético (Milteny Biotec). As células positivamente selecionadas apresentavam cerca de 80% de pureza como determinado por análises de citometria de fluxo seguida da marcação das células com anticorpo anti-CD11c conjugado a FITC (BD Pharmingen). As DCs foram então plaqueadas em placas de 24 poços (1 x 10<sup>6</sup> células/poço), em RPMI-1640 (suplementado com 10% de SFB inativado, 100 U/ml penicilina, e 100 µg/ml estreptomicina (Sigma)). Em seguida, as células foram pulsadas com extrato fervido solúvel de epimastigotas de *T. cruzi* como fonte de antígeno (Ag-Epi - 25 µg/ml), e estimuladas com 10 nM de bradicinina sintética (BK – Calbiochem), na presença ou ausência de 25 µM de captopril (Cap – Sigma), por 18 h a 37°C. Quando indicado, adicionamos 0,1 µM de HOE-140 (antagonista de B<sub>2</sub>R – Sigma) ou 1 µM de 7-Nitroindazol (inibidor de NO sintase – Sigma) ao meio de cultura durante o estímulo das DCs.

### 3.3.1.2 Determinação da produção de IL-12 intracelular pelas DCs CD11c<sup>+</sup>

Após as 18 h de estímulo 37°C, uma parte das células foi tratada com 10 µg/ml de Brefeldina A por 4 h, a fim de paralisar a secreção de citocinas. Essas células foram então lavadas em PBS e incubadas com anticorpo bloqueador do receptor Fc (anti-CD16/CD32 Fcγ III/II - 1 µg/10<sup>6</sup>) por 15 min a 4°C. Após esse período, as DCs foram incubadas com anticorpo anti-CD11c conjugado a FITC (BD Pharmingen) por 30 min a 4°C, lavadas duas vezes em PBS-SFB 1% e fixadas com 4% de paraformaldeído. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo anti-IL-12p40/70 conjugado a PE em PBS-SFB 1% contendo 0,5% de saponina (Sigma-Aldrich) como agente permeabilizante, por 30 min a 4°C. As células foram lavadas e ressuspensas em PBS para leitura no citômetro de fluxo. As células foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), e os dados foram analisados utilizando os *softwares* CELLQuest<sup>TM</sup> (BD Biosciences) ou Win-MDI (TSRI).

### 3.3.1.3 Esquema vacinal utilizando DCs

Com o objetivo de avaliar a imunogenicidade das DCs estimuladas com Ag-Epi na presença ou ausência de BK e Cap, 1 x 10<sup>6</sup> DCs CD11c<sup>+</sup> (estimuladas *in vitro* como descrito no item 3.3.1.1) foram injetadas na base da cauda de camundongos BALB/c ou C57BL/6 B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> *naive*. Os animais foram re-imunizados com DCs duas semanas depois, repetindo as mesmas condições do esquema inicial, e, após mais duas semanas, foram infectados i.p. com uma dose letal de *T. cruzi* (2.5 x 10<sup>6</sup>). No caso dos experimentos para análise dos índices de mortalidade, os animais infectados foram monitorados diariamente, até 30 dias depois da infecção

#### 3.3.1.4 Determinação da produção de IFN- $\gamma$ por células do linfonodo drenate (LD) de animais imunizados

A fim de avaliar a produção de IFN- $\gamma$  por células T *T. cruzi*-específicas presentes no LD, duas semanas após a infecção os animais imunizados com DCs foram sacrificados e os linfonodos aórticos foram retirados. As células totais foram plaqueadas ( $1 \times 10^6$ /poço) em RPMI-1640 (suplementado com 10% de SFB inativado, 100 U/ml penicilina, e 100  $\mu$ g/ml estreptomicina (Sigma)) e pulsadas com antígeno de Epi (Ag-Epi - 25  $\mu$ g/ml). Após 72 h de incubação a 37°C, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos e a quantificação dos níveis de IFN- $\gamma$  foi feita pelo método de ELISA (RD systems), conforme recomendações do fabricante. Os valores são representados em pg ou ng de citocina/ml (média  $\pm$  desvio padrão).

#### 3.3.1.5 Avaliação da produção de IFN- $\gamma$ por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> isolados do LD e coração de animais imunizados

Duas semanas após a infecção, sacrificamos os animais imunizados com DCs e retiramos os linfonodos aórticos e o coração. Para obtenção das células, o coração foi tratado com 1mg/ml de colagenase D (Sigma-Aldrich) e 100  $\mu$ g/ml de DNase I fração IX (Sigma-Aldrich) por 3 h a 37°C, em meio RPMI 1640 (Sigma). Células totais do linfonodo ou do coração foram incubadas com microesferas magnéticas conjugadas a anti-CD4<sup>+</sup> e anti-CD8<sup>+</sup> de camundongo (Milteny Biotec) em PBS-SFB 2% por 20 min a 4°C, conforme recomendações do fabricante. A suspensão celular foi lavada, ressuspendida em PBS-SFB 2% e submetida à coluna magnética. As células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram separadas através de seleção positiva em coluna acoplada a um separador magnético (Milteny Biotec). As células positivamente selecionadas apresentavam 85-95% de pureza como determinado por análise de citometria de fluxo após a marcação das células com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 de



camundongo conjugado a FITC (BD Pharmingen). Os ensaios de resposta das células T foram realizados através da co-cultura de  $1 \times 10^6$  células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> com  $1 \times 10^4$  DCs esplênicas isoladas de camundongos BALB/c *naive* (conforme descrito no item 3.3.1.1) como células apresentadoras de antígenos (APCs), previamente pulsadas com 25 µg/ml de Ag-Epi (18h). O sobrenadante das co-culturas foi recolhido após 72 h de incubação a 37°C e os níveis de IFN-γ foram quantificados por ELISA (R&D systems).

### 3.3.2 Imunização com formulações contendo Alum

#### 3.3.2.1 Esquema vacinal

Camundongos BALB/c foram imunizados na base da cauda (via subcutânea) com formulações contendo antígeno de Epi (Ag-Epi - 50 µg/animal), BK sintética (Calbiochem - 10 µg/animal) pré-adsorvida ao hidróxido de alumínio (alum - 5 mg/animal). Quando indicado, os animais foram pré-tratados com 10 mg/kg de captopril (Sigma) por via intra peritoneal, e/ou com 100 µg/kg de HOE-140 (Sigma), administrado por via subcutânea. Em todos os experimentos, os camundongos foram re-imunizados duas semanas depois, com o mesmo esquema inicial. Duas semanas após este reforço, os camundongos foram infectados com  $2.5 \times 10^6$  TCT/animal por via intraperitoneal.

#### 3.3.2.2 Avaliação da expressão de CCR5 e CCR7 por células T do LD

Quatro dias após a infecção, os camundongos foram sacrificados e os linfonodos aórticos retirados. As suspensões celulares preparadas a partir dos linfonodos foram plaqueadas ( $1 \times 10^6$ /poço) em RPMI-1640 (suplementado com 10% de SFB inativado, 100 U/ml penicilina, e 100 µg/ml estreptomicina (Sigma)) e pulsadas com antígeno de Epi (Ag-Epi - 25 µg/ml). Após as 18 h de incubação a 37°C, as células foram tratadas com 10 µg/ml

de Brefeldina A por 4 h. Essas células foram então lavadas em PBS e incubadas com anticorpo bloqueador do receptor Fc por 15 min a 4°C. Após esse período, as células foram incubadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 conjugados a FITC e anticorpos anti-CCR5 e anti-CCR7 conjugados a APC (BD Biosciences) por 30 min a 4°C, lavadas duas vezes em PBS-SFB 1% e fixadas com 4% de paraformaldeído. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo anti-IFN- $\gamma$  conjugado a PE (XMG1.2; eBiosciences) em PBS-SFB 1% contendo 0,5% de saponina (Sigma-Aldrich) como agente permeabilizante, por 30 min a 4°C. As amostras foram analisadas no FACSCalibur (BD Biosciences), e os dados foram analisados utilizando os *softwares* CELLQuest™ (BD Biosciences) ou Win-MDI (TSRI).

### 3.4 Imunização no modelo C57BL/6 - cepa CL-Brener

#### 3.4.1 Esquema vacinal

Camundongos C57BL/6 foram imunizados na base da cauda (via subcutânea) com formulações vacinais de diferentes composições, sendo elas:

(a) formulações contendo antígeno de Epi CL-Brener (Ag-Epi - 50  $\mu$ g/animal), peptídeo TsKb-20 (ANYDFTLV) em diferentes concentrações (100 ou 10  $\mu$ g/animal) e BK sintética (Calbiochem - 10  $\mu$ g/animal), pré-adsorvidos ao hidróxido de alumínio (alum - 5 mg/animal);

(b) formulações contendo Ag-Epi (50  $\mu$ g/animal), peptídeo TsKb-20 (10  $\mu$ g/animal) e monofosforil lipídeo A (MPLA, gentilmente cedido pelo Dr. Steve Reed (Infectious Disease Research Institute, Seattle) – 20  $\mu$ g/animal);

(c) Ag-Epi (50  $\mu$ g/animal) e peptídeo TsKb-20 (10  $\mu$ g/animal), em emulsão com volume equivalente de adjuvante de Freund completo (CFA, contendo 1 mg de *Mycobacterium tuberculosis* inativada pelo calor para cada 1 ml de solução – Sigma); ou

(d) Ag-Epi (50 µg/animal), peptídeo TsKb-20 (10 µg/animal) e BK sintética (Sigma - 10 µg/animal), em emulsão com volume equivalente de adjuvante de Freund incompleto (IFA – Sigma).

Quando indicado, os animais foram pré-tratados com 10 mg/kg de captopril (Sigma) por via intra peritoneal, e/ou com 100 µg/kg de HOE-140 (Sigma), administrado por via subcutânea. Em todos os experimentos, os camundongos foram re-imunizados duas semanas depois, seguindo o mesmo esquema vacinal utilizado na primeira imunização.

### 3.4.2 Análise de atividade citotóxica das células T CD8<sup>+</sup> *in vivo*

Células de baço foram retiradas de camundongos BALB/c *naïve* e as hemácias da suspensão celular foram lisadas com solução de lise de hemácias (ACK). Os esplenócitos foram separados em duas populações: (i) uma delas foi incubada em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB inativado e 1µM do peptídeo sintético TsKb-20 (ANYDFTLV), enquanto (ii) a outra população permaneceu e apenas em RPMI-1640 contendo 10% de SFB, ambas incubadas por 40 min a 37°C. Após esse período, as células foram lavadas em PBS e marcadas com CFSE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl diester*), durante 5 min, em duas concentrações distintas: (i) CFSE<sub>high</sub> (células incubadas com peptídeo) e (ii) CFSE<sub>low</sub> (células em repouso). As duas populações de células foram lavadas com PBS e misturadas uma à outra (*pool* contendo  $1 \times 10^7$  de cada população) antes de serem injetadas por via intravenosa nos camundongos C57BL/6 imunizados com as formulações descritas anteriormente. O baço dos animais recipientes foi retirado 20 horas após a transferência das células marcadas, e os esplenócitos foram fixados em paraformaldeído a 4%. A intensidade de fluorescência das células foi analisada por citometria de fluxo. A porcentagem de lise celular específica foi determinada utilizando a seguinte fórmula:  $1 - [(\%$

$$\frac{\text{CFSE}_{\text{high}} \text{ imunizado} / \% \text{ CFSE}_{\text{low}} \text{ imunizado}}{(\% \text{CFSE}_{\text{high}} \text{ naive} / \% \text{ CFSE}_{\text{low}} \text{ naive})} \times 100\%.$$

### 3.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prisma. Os dados foram comparados utilizando análise de variância não-pareada (ANOVA), seguida do pós-teste de Turkey. Adotou-se o nível de significância mínimo de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Fase I

Para a melhor compreensão dos resultados obtidos durante a realização do projeto de Mestrado, é necessária uma breve descrição dos resultados anteriormente obtidos pela Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Monteiro, principal executora deste projeto, realizado entre 2004-2009. Os resultados obtidos naquele período (Fase I) estão reunidos no Anexo I desta dissertação, como parte do manuscrito em preparação.

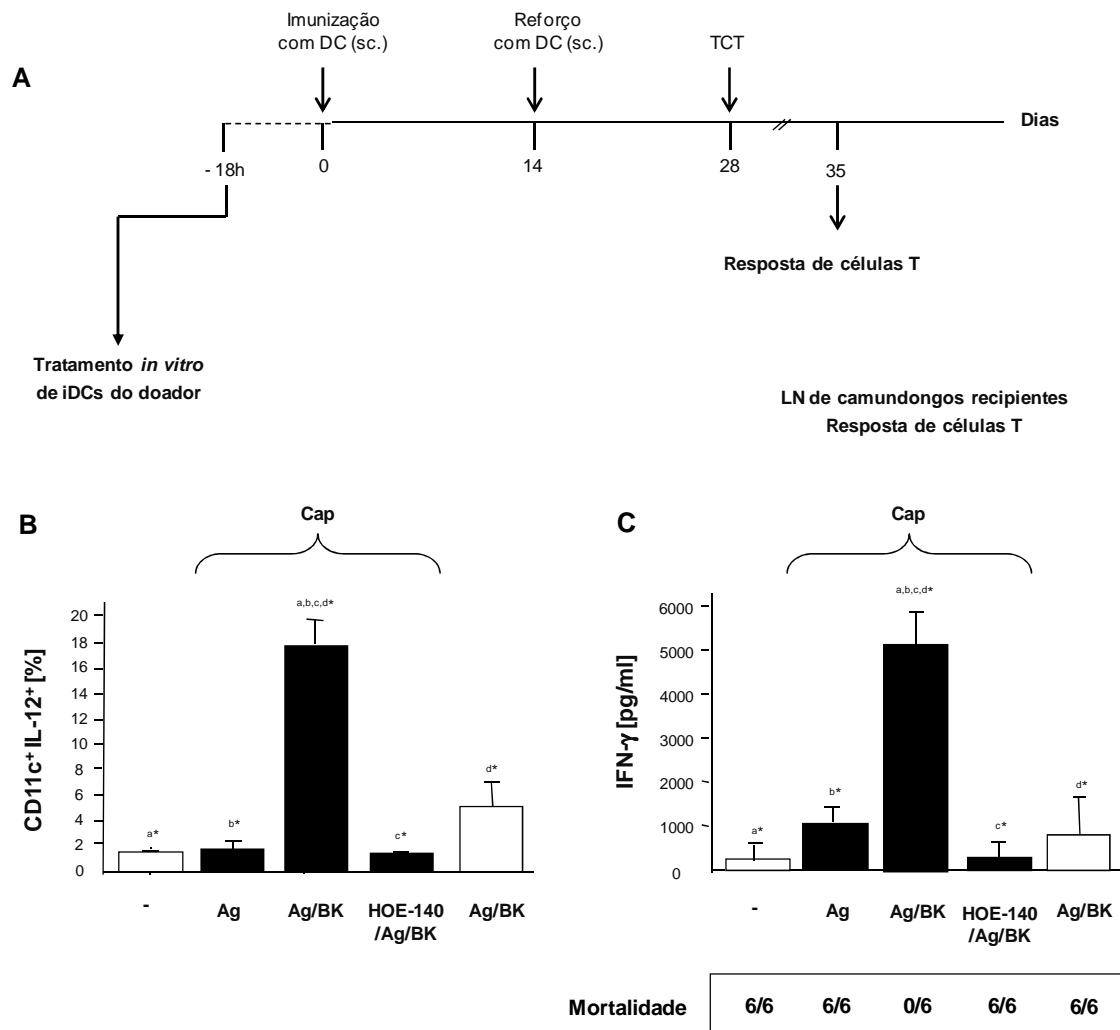
A partir dos resultados obtidos na Fase I, demos início a Fase II deste projeto, que compreende os experimentos realizados durante meu período de Mestrado, em colaboração com a Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina, cujos resultados serão descritos a seguir.

### 4.2 Fase II

#### 4.2.1 Efeitos imunoprotetores de DCs CD11c<sup>+</sup> estimuladas *in vitro* com Cap/Ag/BK

Na primeira fase do projeto, verificamos que o esquema vacinal completo [Cap + Alum/BK/Ag] foi capaz de proteger os camundongos contra a infecção letal por *T. cruzi* (Fig. 1, Anexo I). Observamos também que esses animais desenvolviam resposta imune do tipo 1 antígeno-específica, com a presença de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  nos linfonodos drenantes (LD) e, principalmente, no coração (Fig. 6, Anexo I). Segundo nossa hipótese de trabalho, o efeito adjuvante da BK seria decorrente da sua capacidade de estimular a maturação de DCs CD11c<sup>+</sup> convencionais via ativação de B<sub>2</sub>R. Como prova de conceito, decidimos estudar o uso de DCs convencionais no esquema de imunização contra *T. cruzi*. Com esse propósito, DCs CD11c<sup>+</sup> foram isoladas de baço de camundongos BALB/c normais e

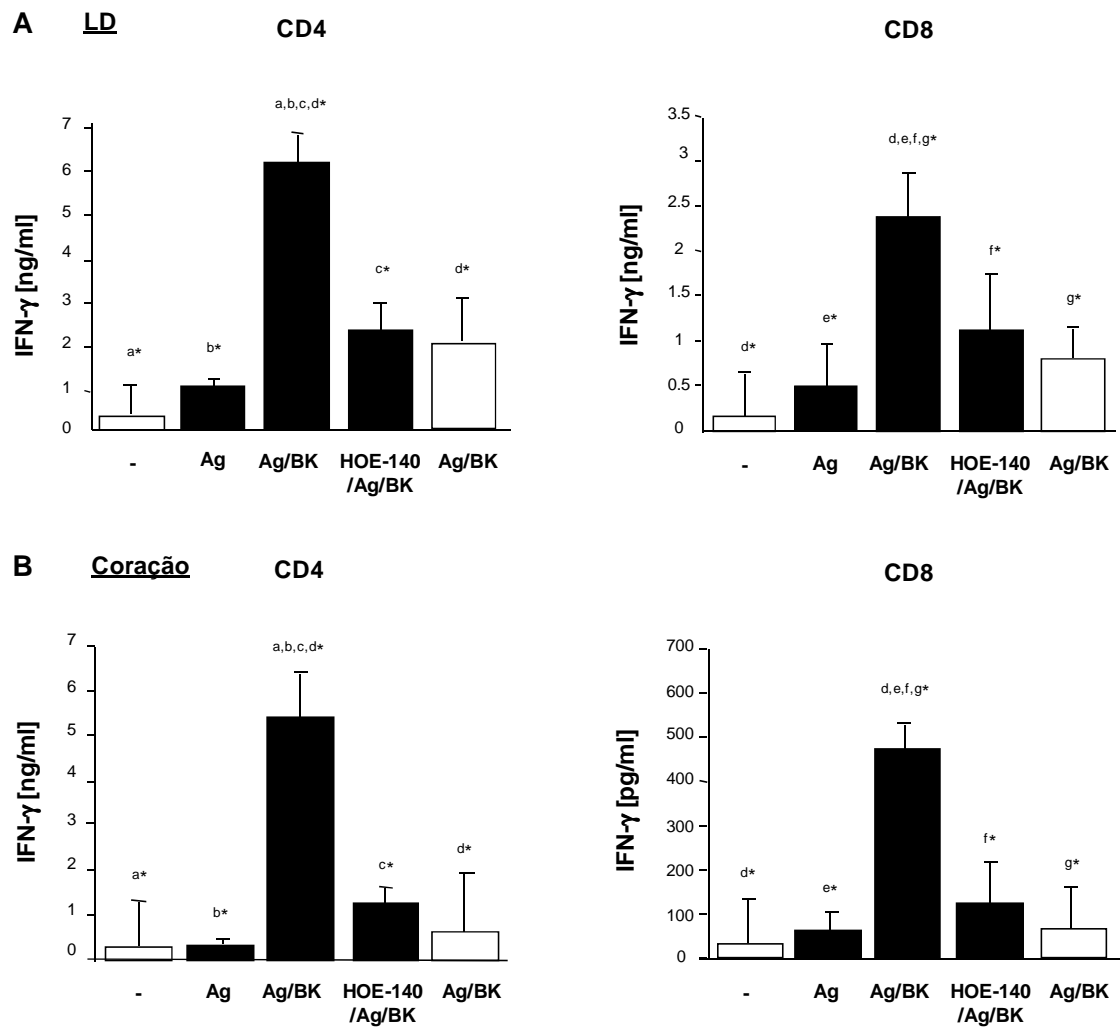
estimuladas *in vitro* com [Cap/Ag/BK] por 18 h. Primeiramente, avaliamos a produção de IL-12p70 por estas células. Conforme descrito em trabalhos anteriores (MONTEIRO *et al.*, 2007), observamos que o tratamento com Cap, Ag e BK induziu aumento na porcentagem de células produtoras de IL-12, em contraste com as células incubadas apenas com Cap e Ag, ou na ausência de Cap (Fig. 1B). Conforme esperado, a produção de IL-12 foi bloqueada pelo tratamento das células com HOE-140 (Fig. 1B). Após essa avaliação, os camundongos BALB/c foram imunizados com as DCs estimuladas *in vitro*, e duas semanas depois receberam o reforço, nas mesmas condições. Duas semanas após o reforço, os animais foram desafiados com TCTs (cepa Dm28c). A avaliação do perfil de resposta de linfócitos T foi realizada uma semana após o desafio, mediante estímulo com Ag *in vitro* das células isoladas de LD de animais imunizados (Fig. 1A). Através da medida de citocinas por ELISA, observamos que as células T dos animais que receberam DCs ativadas com o esquema completo (Cap/Ag/BK) secretaram altos níveis de IFN- $\gamma$ , enquanto as células daqueles que receberam DCs tratadas na presença de HOE-140 produziram menores níveis de IFN- $\gamma$  (Fig. 1C). É importante ressaltar que as DCs incubadas na ausência de Cap, ou de BK, induziram a produção de baixos níveis de IFN- $\gamma$  pelas células T dos animais imunizados (Fig. 1C). Com relação ao fenótipo de suscetibilidade X resistência dos animais imunizados, observamos que apenas os animais que foram imunizados/re-imunizados com DCs incubadas com estímulo completo [Cap/Ag/BK] sobreviveram após o desafio agudo com TCTs, em contraste com todos os outros grupos que apresentaram 100% de mortalidade (Fig. 1C, painel inferior).



**Figura 1: Imunização com DCs CD11c<sup>+</sup> estimuladas *in vitro* com Cap/Ag/BK induz resposta imune tipo-1 *T. cruzi*-específica. (A) Esquema de imunização: 1 x 10<sup>6</sup> DCs CD11c<sup>+</sup> isoladas do baço de BALB/c *naïve* foram incubadas durante 18 h com inibidor da ECA (Cap, 25  $\mu$ M), Ag (25  $\mu$ g/ml) e BK (10nM). Os controles incluem DCs incubadas sem Cap, ou BK, ou na presença de antagonista de B<sub>2</sub>R (HOE-140, 100 nM). Os camundongos foram imunizados com as DCs (por via subcutânea) no dia 0 e receberam um reforço nas mesmas condições 14 dias depois. No dia 28, os camundongos controle e imunizados foram desafiados com uma dose letal de TCT Dm28c (2,5 x 10<sup>6</sup>, i.p.). Os animais foram sacrificados 7 dias após a infecção e as respostas de células T foram analisadas. (B) Frequência de DCs CD11c<sup>+</sup> produtoras de IL-12 depois de estímulo *in vitro*. Brefeldina A foi adicionada durante as últimas 4h de estímulo, e as DCs foram marcadas com anti-CD11c e anti-IL-12, e então analisadas utilizando um citômetro FACSCalibur (BD Biosciences). (C) Células do linfonodo drenante (LN) foram recolhidas e estimuladas *in vitro* com Ag (25  $\mu$ g/ml) por 72h a 37 °C. Os níveis de IFN- $\gamma$  no sobrenadante das culturas foram determinados por ELISA. Os valores são a média  $\pm$  desvio padrão de um experimento representativo com células individuais de 5 animais/grupo. Para avaliação do índice de mortalidade, os animais infectados foram monitorados diariamente, até 30 dias depois da infecção. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. As estatísticas foram feitas por ANOVA e as comparações de pares foram feitas pelo teste de Turkey.**

Nós então nos perguntamos se a imunização com DCs poderia restaurar o perfil de resposta de células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  produtoras de IFN- $\gamma$  obtido nos experimentos usando moléculas adsorvidas em alum (Fig. 6, Anexo I). Com o objetivo de detectar a contribuição relativa de células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  isoladas do LD e do coração, realizamos ensaios de cocultura das células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  com DCs esplênicas (previamente incubadas com Ag) como células apresentadoras de antígenos. Verificamos que as células T ( $CD4^+$  ou  $CD8^+$ ) isoladas de LD de animais que receberam DCs tratadas com o esquema completo (Cap/Ag/BK) produziram altos níveis de IFN- $\gamma$ , quando comparadas às células isoladas de animais imunizados com DCs tratadas na ausência de Cap (Fig. 2A). Como esperado, as células T isoladas do linfonodo drenante de todos os outros grupos experimentais apresentaram produção de IFN- $\gamma$  significativamente menor (Fig. 2A). Confirmamos, ainda, a presença de células T ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) Ag-específicas no infiltrado cardíaco dos animais imunizados, sendo apenas as células isoladas dos animais imunizados com DCs [Cap/Ag/BK] capazes de produzir altos níveis de IFN- $\gamma$  (Fig. 2B), assim como observado nas células de LD (Fig. 2A). Esses resultados demonstram que DCs estimuladas *in vitro* podem ser eficientemente usadas no esquema de vacinação, conferindo proteção aos animais imunizados através da indução da produção de IFN- $\gamma$  por células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , no linfonodo drenante e no coração. Mostramos também que a presença de Cap e BK no estímulo das DCs é indispensável para a geração de resposta imune do tipo-1 nos animais vacinados.



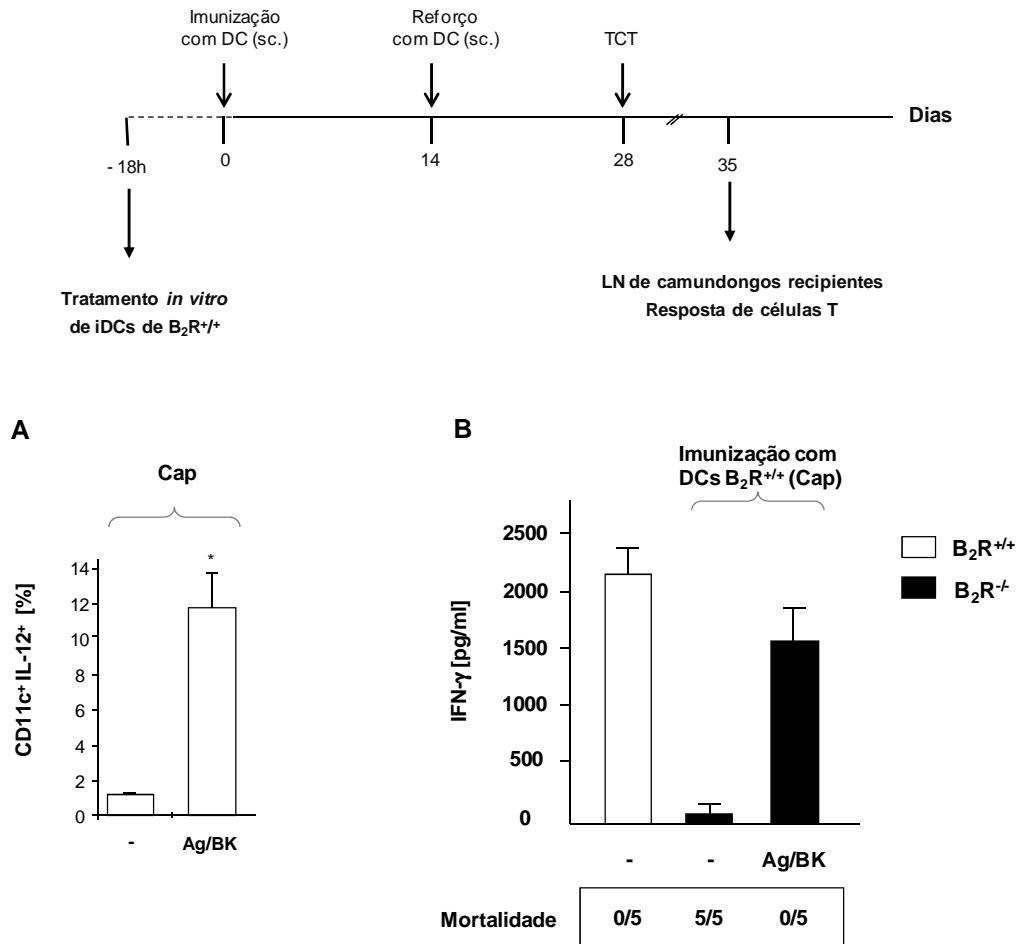


**Figura 2: Presença de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  no LD e coração de animais imunizados com DCs estimuladas com Cap/Ag/BK.** Uma semana após a infecção, células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram purificadas do linfonodo drenante (A) ou coração (B) dos camundongos imunizados com DCs CD11c<sup>+</sup> estimuladas *in vitro*, na presença (■) ou ausência (□) de captopril, e foram co-cultivadas com DCs CD11c<sup>+</sup> (pulsadas com 25  $\mu$ g/ml de Ag) por 72h a 37°C. Os sobrenadantes de cultura foram coletados e os níveis de IFN- $\gamma$  foram determinados por ELISA. Os valores são a média  $\pm$  desvio padrão de um experimento representativo com células de 8 animais/grupo. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. As estatísticas foram feitas por ANOVA e as comparações de pares foram feitas pelo teste de Turkey.

#### 4.2.2 Proteção de animais $B_2R^{-/-}$ pela imunização com DCs $B_2R^{+/+}$ estimuladas *in vitro* com Cap/Ag/BK

Estudos publicados pelo nosso grupo apontam que os camundongos C57BL/6 deficientes do receptor  $B_2$  ( $B_2R^{-/-}$ ) são mais suscetíveis à infecção intraperitoneal pelo *T. cruzi*, apresentando maiores taxas de parasitemia e mortalidade quando comparados aos animais selvagens ( $B_2R^{+/+}$ ) (MONTEIRO *et al.*, 2007). No decorrer da infecção, os camundongos  $B_2R^{-/-}$  desenvolvem menores frequências de células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  ativadas (produtoras de  $IFN-\gamma$ ) no baço e coração (MONTEIRO *et al.*, 2007). Baseado nesses resultados, decidimos investigar se a imunização de camundongos  $B_2R^{-/-}$  com DCs isoladas de doadores selvagens e estimuladas *in vitro* seria capaz de restaurar o fenótipo resistente dos animais  $B_2R^{+/+}$ . Com este propósito, DCs  $CD11c^+$  foram isoladas do baço de camundongos  $B_2R^{+/+}$  e estimuladas *in vitro* por 18 h com Cap, Ag e BK ou apenas com Cap (Fig. 3). Inicialmente, verificamos que dentre as células tratadas na presença de Cap/Ag/BK havia uma maior proporção de células  $CD11c^+$  produtoras de IL-12, em relação às células incubadas sem Ag e BK (Fig. 3A). Camundongos  $B_2R^{-/-}$  foram imunizados e re-imunizados com essas DCs, nos dias 0 e 14, e infectados com dose letal de TCTs no dia 28. Utilizamos como controle camundongos  $B_2R^{+/+}$  não imunizados e infectados. Uma semana após a infecção analisamos a resposta de células T isoladas do LD dos animais infectados. Como esperado, as células dos animais  $B_2R^{+/+}$  secretaram altos níveis de  $IFN-\gamma$ , enquanto nos animais  $B_2R^{-/-}$  que receberam DCs tratadas apenas com Cap, as células T secretaram uma quantidade desprezível desta citocina (Fig. 3B). Compatível com nossa hipótese de trabalho, a imunização de animais  $B_2R^{-/-}$  com DCs  $B_2R^{+/+}$  estimuladas *in vitro* com Cap/Ag/BK foi capaz de restaurar o perfil de produção de  $IFN-\gamma$  por células T do LD, em níveis similares aos observados nos camundongos controle  $B_2R^{+/+}$  infectados (Fig. 3B). Além disso, os camundongos imunizados com DCs  $B_2R^{+/+}$  estimuladas com Cap/Ag/BK resistiram à infecção letal, assim como os

animais selvagens  $B_2R^{+/+}$  (Fig. 3B, painel inferior). Em conjunto estes resultados sugerem que a proteção induzida pela imunização com DCs estimuladas com Cap/Ag/BK é dependente da sinalização via  $B_2R$  nas DCs, sendo requerida para o desenvolvimento dos mecanismos de resistência contra a infecção pelo *T. cruzi*.

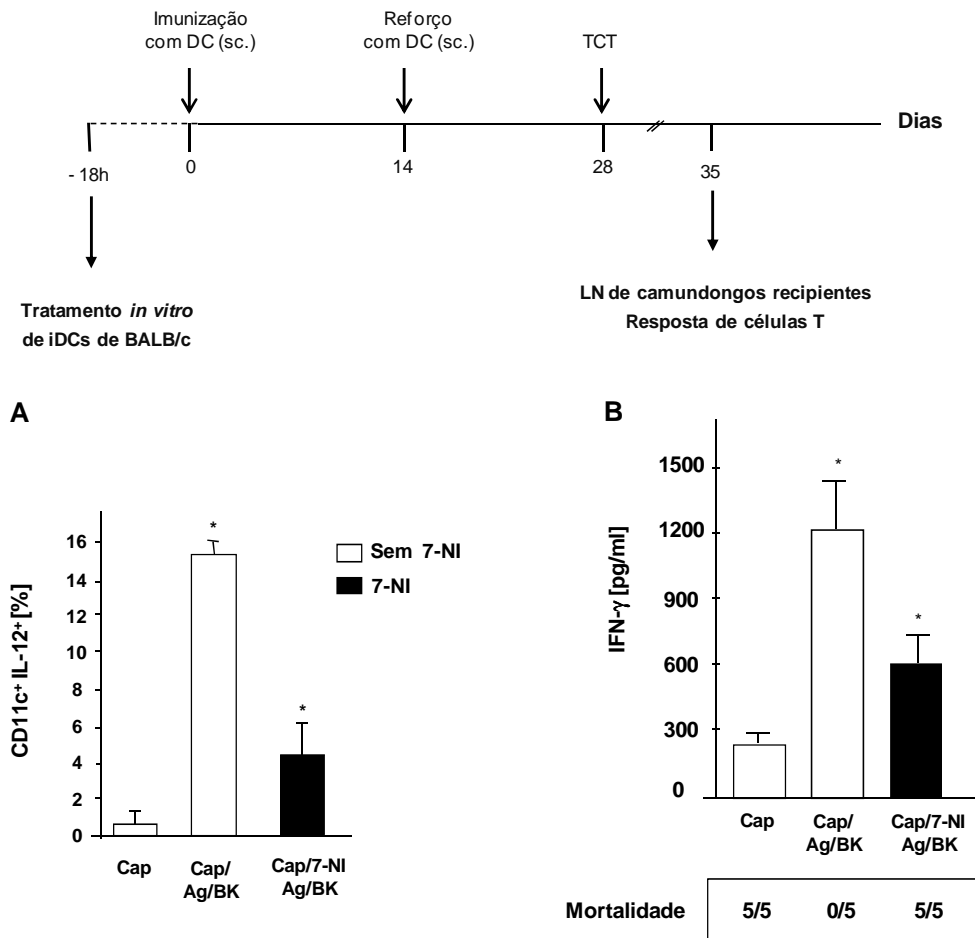


**Figura 3: Imunização com DCs  $B_2R^{+/+}$  estimuladas *in vitro* com Cap/Ag/BK induz resposta imune tipo-1 *T. cruzi*-específica em camundongos  $B_2R^{-/-}$ .** (A) Frequência de DCs  $CD11c^+ B_2R^{+/+}$  produtoras de IL-12 depois de estímulo *in vitro* com Cap ou Cap/Ag/BK. Brefeldina A foi adicionada durante as últimas 4h de estímulo, e as DCs foram marcadas com anti-CD11c e anti-IL-12, e então analisadas utilizando um citômetro FACSCalibur (BD Biosciences). (B) Células do linfonodo drenante (LD) dos camundongos recipientes (ou controle  $B_2R^{-/-}$ ) foram recolhidas 7 dias após a infecção e estimuladas *in vitro* com Ag (25  $\mu$ g/ml) por 72h a 37 °C. Os níveis de IFN- $\gamma$  no sobrenadante das culturas foram determinados por ELISA. Os valores são a média  $\pm$  desvio padrão de um experimento representativo com células individuais de 5 animais/grupo. Para avaliação do índice de mortalidade, os animais infectados foram monitorados diariamente, até 30 dias depois da infecção. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. As estatísticas foram feitas por ANOVA e as comparações de pares foram feitas pelo teste de Turkey.

#### 4.2.3 Reversão do efeito protetor de DCs pelo tratamento com inibidor de NO sintase

Conforme descrito anteriormente, resultados obtidos na primeira fase deste projeto sugerem uma importante participação da enzima óxido nítrico (NO) sintase na proteção induzida pelo esquema vacinal otimizado (Cap + [Alum/Ag/BK]), uma vez que o grupo de camundongos tratados com um inibidor desta enzima (7-Nitroindazol, 7-NI) apresentou menor produção de IFN- $\gamma$  e suscetibilidade (mortalidade = 100%) à infecção letal (Fig. 10, Anexo I). Diversos trabalhos da literatura indicam que NO participa na regulação da maturação e migração de DCs. Por exemplo, Paolucci e colaboradores demonstraram que DCs humanas expostas ao NO durante sua maturação adquirem maior habilidade em ativar células T, independente de qual seja o estímulo de maturação da DC - LPS, TNF- $\alpha$  ou anti-CD40 (PAOLUCCI *et al.*, 2003). Mais recentemente, outro grupo de pesquisadores sugeriu que a modulação da maturação de DCs ocorre devido à ação autócrina do NO, gerado principalmente pela ação da NO sintase neuronal das próprias DCs (ADLER *et al.*, 2010). Para explorar o mecanismo de ação do NO no modelo de imunização com DCs, realizamos ensaios de imunização com DCs CD11c<sup>+</sup> isoladas de camundongos BALB/c, tratadas *in vitro* com Ag/BK, Ag/BK/7-NI, ou sem estímulo, sempre na presença de captopril. A análise da produção de citocina após 18 h de estímulo indicou que as DCs tratadas com 7-NI possuíam menor frequência de produção de IL-12, quando comparadas às células incubadas com Cap/Ag/BK na ausência deste inibidor (Fig. 4A). Após essa avaliação, os camundongos BALB/c foram imunizados com as DCs estimuladas *in vitro*, e duas semanas depois receberam o reforço, nas mesmas condições. Duas semanas após o reforço, os animais foram desafiados com TCTs (cepa Dm28c). A avaliação do perfil de resposta de linfócitos T foi realizada uma semana após o desafio, mediante estímulo com Ag *in vitro* das células de LD de animais imunizados (Fig. 4). O perfil de maturação das DCs se refletiu no fenótipo de resposta dos camundongos BALB/c imunizados com essas células, uma vez que apenas os

animais que receberam DCs estimuladas na ausência de 7-NI foram capazes de resistir à infecção pelo *T. cruzi* (Fig. 4B, painel inferior), além de apresentarem produção de IFN- $\gamma$  por células T do LD significativamente superior em relação aos animais que receberam DCs estimuladas na presença de 7-NI (Fig. 4B). Estes resultados indicam que o bloqueio da produção de NO anula o efeito protetor do nosso esquema vacinal com DCs, possivelmente porque a ausência de sinalização autócrina pelo NO modula negativamente a maturação completa das DCs.



**Figura 4: Tratamento *in vitro* com inibidor de NO sintase reverte efeito protetor da imunização com DCs** (A) Frequência de DCs CD11c<sup>+</sup> de camundongos BALB/c produtoras de IL-12 depois de estímulo *in vitro* com Cap, Cap/Ag/BK ou Cap/Ag/BK/7-NI (7-Nitroindazol, inibidor da NO sintase – 1  $\mu$ M). Brefeldina A foi adicionada durante as últimas 4h de estímulo, e as DCs foram marcadas com anti-CD11c e anti-IL-12, e então analisadas utilizando um citômetro FACSCalibur (BD Biosciences). (B) Células do linfonodo drenante (LD) dos animais recipientes foram recolhidas 7 dias após a infecção e estimuladas *in vitro* com Ag (25  $\mu$ g/ml) por 72h a 37 °C. Os níveis de IFN- $\gamma$  no sobrenadante das culturas foram determinados por ELISA. Os valores são a média  $\pm$  desvio padrão de um experimento representativo com células individuais de 5 animais/grupo. Para avaliação do índice de mortalidade, os animais infectados foram monitorados diariamente, até 30 dias depois da infecção. Os dados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares. As estatísticas foram feitas por ANOVA e as comparações de pares foram feitas pelo teste de Turkey.

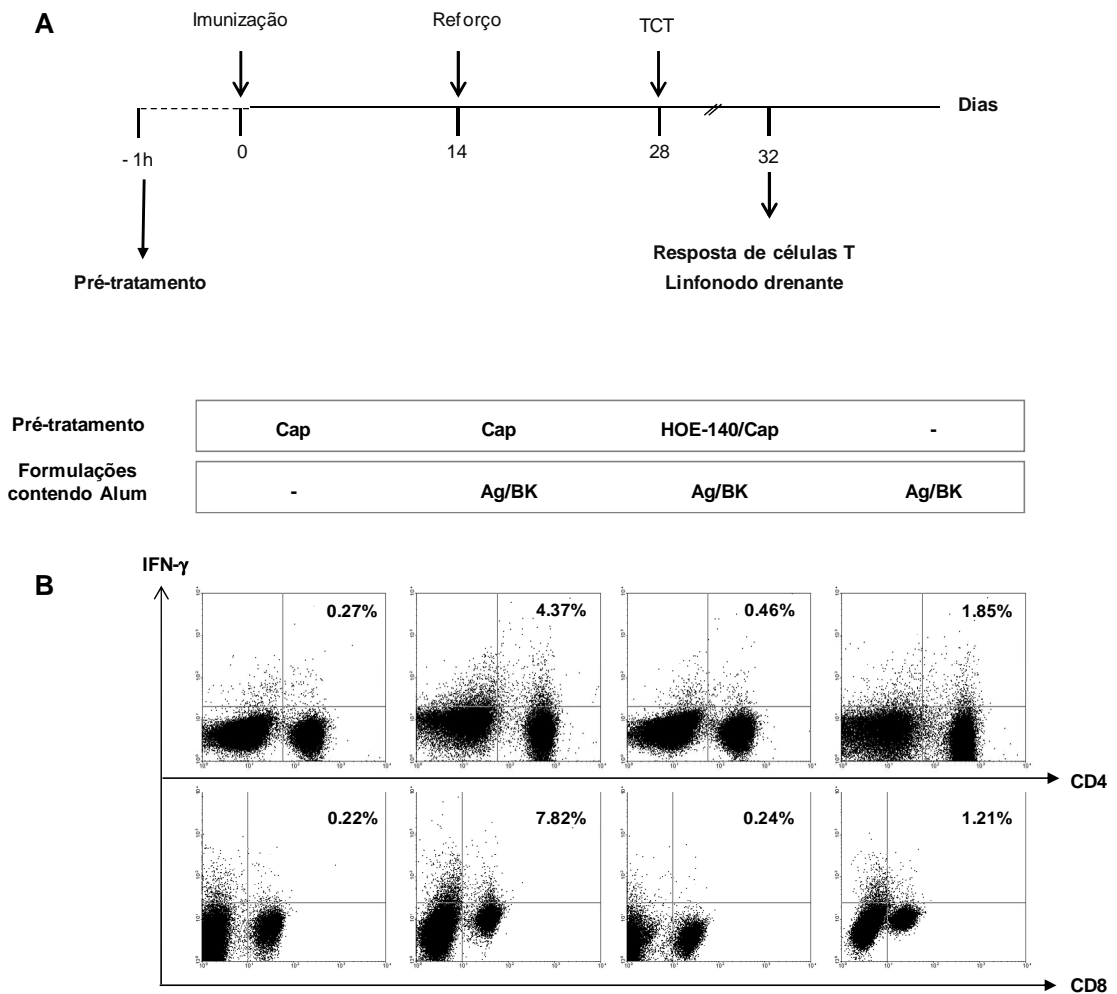
#### 4.2.4 Aumento na expressão de CCR5 por células T $\text{IFN-}\gamma^+$ do LD de camundongos imunizados com [Cap + Alum/Ag/BK]

Nossos resultados indicam que em ambos os esquemas de vacinação – imunização com antígeno pré-adsorvido em alum e imunização com DCs estimuladas *in vitro* – linfócitos ativadores produtores de  $\text{IFN-}\gamma$  estão seletivamente presentes no coração apenas dos animais imunizados com esquema completo [Cap + Alum/Ag/BK] e dos animais imunizados com DCs estimuladas com [Cap/Ag/BK] (Fig. 6B, Anexo I e Fig. 2B, respectivamente). De acordo com nossa hipótese de trabalho, a presença destas células nos tecidos-alvo de infecção pelo parasita, neste caso o coração, é essencial para o desenvolvimento dos mecanismos de proteção dos camundongos imunizados. Alguns trabalhos relacionam a participação de receptores de quimiocinas expressos por células T no recrutamento dessas células para o coração durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*. O CCR5 é o principal receptor de quimiocina envolvido neste recrutamento. Tem sido mostrado, por exemplo, a presença de seus ligantes (CCL3, CCL4, and CCL5) em associação com células T  $\text{CD4}^+$  e  $\text{CD8}^+$  no coração de camundongos infectados, e um aumento na expressão do próprio CCR5 em células T  $\text{CD8}^+$  destes animais (MACHADO *et al.*, 2005). Adicionalmente, estudos com camundongos deficientes em CCR5 mostram que esses animais apresentam maiores níveis de parasitemia e parasitismo cardíaco na fase aguda da infecção, correlacionados com a inibição da migração de células T para o coração e menor sobrevivência (MACHADO *et al.*, 2005; HARDISON *et al.*, 2006).

Decidimos, então, investigar de que maneira as células T ativadas de animais imunizados com esquema completo (no modelo de imunização com antígeno pré-adsorvido em alum) conseguem alcançar o coração. Com este propósito, os experimentos de imunização foram realizados seguindo o esquema vacinal descrito na figura 5A. Camundongos BALB/c foram pré-tratados com captopril 1 h antes da imunização com

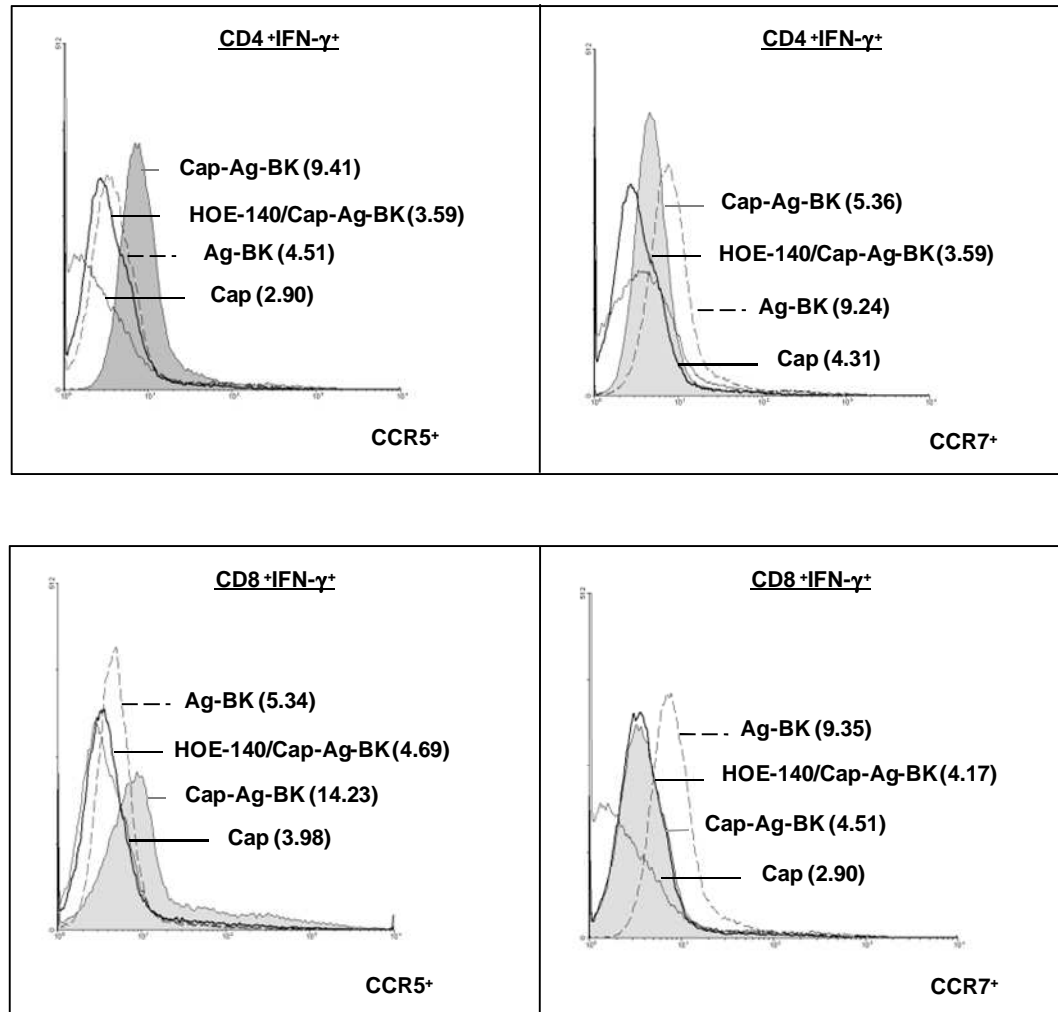
[Alum/Ag/BK]. Quando indicado, os camundongos foram pré-tratados com HOE-140 1 h antes da imunização. Como controle havia, ainda, animais não imunizados e animais imunizados que não receberam captopril. Todos receberam o reforço após 14 dias, nas mesmas condições da imunização inicial, e depois de mais duas semanas, foram infectados com TCTs (Fig. 5A). Quatro dias após a infecção, analisamos o fenótipo de ativação e a expressão de receptores de quimiocinas na superfície de células T isoladas de LD. Na figura 5B, podemos observar uma maior proporção de células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  produtoras de IFN- $\gamma$  provenientes dos animais imunizados com esquema otimizado [Cap + Alum/Ag/BK] (Fig. 5B). Em contraste, a frequência de células IFN- $\gamma^+$  dos animais não tratados com Cap/imunizados foi reduzida, enquanto os animais tratados com HOE-140 apresentaram frequência de células IFN- $\gamma^+$  semelhante à dos animais não imunizados (Fig. 5B).





**Figura 5: Aumento da frequência de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  nos camundongos imunizados com esquema completo.** (A) Esquema vacinal: Camundongos BALB/c machos foram pré-tratados ou não com uma dose única captopril (10 mg/kg i.p.) 1 h antes da imunização. Quando indicado, os animais foram pré-tratados 1 h antes da imunização com antagonista de B<sub>2</sub>R (HOE-140, 100  $\mu$ g/kg s.c.). A imunização consistiu na injeção de 100  $\mu$ l de formulações baseadas em alum (5 mg), contendo Ag (50  $\mu$ g) e BK (10  $\mu$ g), por via subcutânea na base da cauda. Os camundongos receberam um reforço 14 dias depois, exatamente como feito na primeira imunização. No dia 28, os camundongos controle e imunizados foram desafiados com uma dose letal de TCT Dm28c (2,5 x 10<sup>6</sup>, i.p.). (B) Frequência de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> Ag-específicas produtoras de IFN- $\gamma$  de animais vacinados. Células do LD foram retiradas 4 dias após a infecção e estimuladas com Ag (25  $\mu$ g/ml) por 6 h a 37°C. Brefeldina A foi adicionada, e as células foram marcadas com anti-CD8, anti-CD4, e anti-IFN- $\gamma$ , e foram então analisadas no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences). Os números representam a porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ . Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com resultados similares (n=5/grupo).

A análise da expressão dos receptores de quimiocinas pelos linfócitos T  $\text{IFN-}\gamma^+$  revelou que houve um aumento significativo na expressão de CCR5, principalmente pelas células T  $\text{CD8}^+$ , mas também pelas T  $\text{CD4}^+$ , especificamente nas células isoladas dos camundongos imunizados com [Cap + Alum/Ag/BK] (Fig. 6;  $\text{CD8}$ : 14,23% e  $\text{CD4}$ : 9,41%). É importante frisar que os níveis de expressão de CCR5 nas células T  $\text{CD4}^+$  e  $\text{CD8}^+$   $\text{IFN-}\gamma^+$  nos grupos de animais imunizados sem Cap ou pré-tratados com HOE-140 foram semelhantes aos níveis detectados nas células isoladas dos animais não imunizados (Fig. 6). Esses achados coincidem com a nossa hipótese de que as células T de animais imunizados com esquema otimizado podem apresentar maior capacidade migratória para tecidos periféricos nos estágios iniciais da infecção. Pudemos também detectar diferenças um pouco mais sutis na expressão de CCR7, que se encontrou negativamente modulada nas células T  $\text{CD4}^+$  e  $\text{CD8}^+$   $\text{IFN-}\gamma^+$  isoladas do LD de animais imunizados com [Cap + Alum/Ag/BK] (Fig. 6 -  $\text{CD4}$ : 5,36% e  $\text{CD8}$ : 4,51%), em comparação com os animais não tratados com Cap (Fig. 6 -  $\text{CD4}$ : 9,24% e  $\text{CD8}$ : 9,35%). Novamente, o fenótipo das células T de animais imunizados com esquema completo foi condizente com a proporção dessas células encontradas no coração, uma vez que a menor expressão de CCR7 sugere uma menor propensão de *homing* dessas células para tecidos linfóides. Concluimos, portanto, que o aumento dos níveis de cininas induzido pelo tratamento com Cap durante o processo de imunização resulta no aumento da expressão de CCR5 e redução da expressão de CCR7 pelas células do LD. Finalmente, consideramos que a modulação da expressão destes receptores pode ser responsável pelo maior recrutamento de células T do tecido linfóide para o coração nos grupos de animais imunizados com [Cap + Alum/Ag/BK], como observamos na figura 6B do Anexo I.



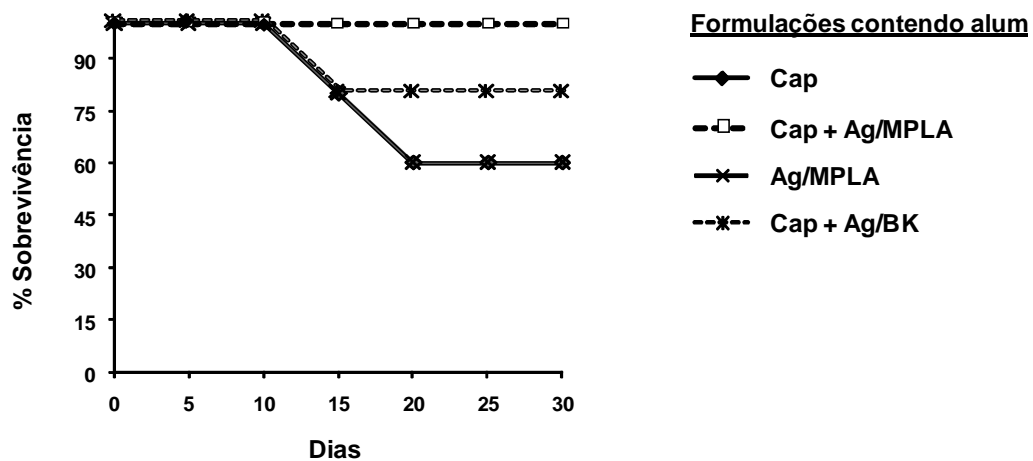
**Figura 6: Células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  isoladas de camundongos protegidos expressam o receptor de quimiocina CCR5.** Análises da expressão dos receptores de quimiocinas CCR5 e CCR7 por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , retiradas do LD de animais imunizados, 4 dias após a infecção. As células foram marcadas com anti-CD4, anti-CD8, anti-IFN- $\gamma$ , anti-CCR5 e anti-CCR7, e foram então analisadas no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences). Os valores indicam a porcentagem de células CCR5<sup>+</sup> (painel à esquerda) ou CCR7<sup>+</sup> (painel à direita), dentro da população de células T CD4<sup>+</sup> (painel superior) ou CD8<sup>+</sup> (painel inferior) produtoras de IFN- $\gamma$ . Os dados são representativos de dois experimentos independentes (n=5/grupo).

#### 4.2.5 Perda de autenticidade genética da linhagem de camundongos BALB/c

Conforme discutido anteriormente, a adição de captopril na formulação vacinal não é capaz de gerar respostas protetoras nos animais imunizados/infectados, em contraste com a administração de Cap sistêmico (i.p). Com base nesses resultados, acreditamos que a administração sistêmica de Cap antes da imunização/reforço possa modular a ativação de DCs em dois contextos diferentes: (i) ativação de DCs periféricas da pele, através do aumento da meia-vida da BK sintética incluída na formulação vacinal; e/ou (ii) ativação de DCs residentes do LD, através do aumento dos níveis de cininas endógenas. As duas hipóteses não são mutuamente excludentes, e, por isso, decidimos considerar a segunda hipótese como princípio para o desenvolvimento do próximo desenho experimental.

Uma das desvantagens de usar a BK sintética como adjuvante vacinal consiste na indução de efeitos hiperalgésicos da BK (CALIXTO *et al.*, 2004; CUNHA *et al.*, 2007), que inviabilizariam a tentativa de aplicação desta formulação vacinal em testes clínicos para humanos. Com o objetivo de excluir o componente de indução de hiperalgesia do esquema vacinal, investigamos a possibilidade de substituir a BK por um adjuvante alternativo. O adjuvante escolhido foi o monofosforil lipídeo A (MPLA), que, conforme descrito na Introdução, é capaz de direcionar respostas  $T_H1$  a partir da sinalização via TLR4/TRIF (MATA-HARO *et al.*, 2007). Nesse novo esquema de imunização, o MPLA poderia agir como um primeiro sinal de perigo para as DCs periféricas, sinalizando via TLR4, enquanto as cininas endógenas agiriam com um segundo estímulo, induzindo a maturação das DCs residentes e/ou recém recrutadas para o LD. Desta forma, decidimos manter o pré-tratamento dos animais com captopril, com o intuito de manter altos os níveis de cininas endógenas. Seguindo o esquema vacinal descrito, os camundongos BALB/c foram, então, pré-tratados ou não com Cap e imunizados com formulações contendo alum, MPLA e antígeno. Como controle, além de um grupo de animais não-imunizados, havia um grupo de animais

imunizado com esquema completo, ou seja, [Cap + Alum/Ag/BK]. O primeiro parâmetro avaliado foi a mortalidade e observamos que os animais imunizados com [Cap + Alum/MPLA/Ag] foram capazes de resistir ao desafio letal (Fig. 7). No entanto, ao analisar o índice sobrevivência dos outros grupos de animais, observamos resultados incompatíveis com aqueles obtidos durante a primeira fase deste projeto. Como detalhado em diversas figuras do Anexo I, o inóculo de parasitas utilizado para infectar os camundongos no decorrer de todos os experimentos causou letalidade de 100% nos animais não-imunizados. Porém, podemos observar na figura 7 que apenas 40% dos animais não-imunizados sucumbiu ao desafio, enquanto os animais imunizados com [Cap + Alum/Ag/BK] apresentaram taxa de mortalidade de cerca de 20% após 30 dias de infecção.



**Figura 7: Índice de sobrevivência de camundongos imunizados com MPLA e infectados.** Camundongos BALB/c machos foram pré-tratados ou não com uma dose única de inibidor da ECA (captopril, 10 mg/kg i.p.) 1 h antes da imunização. A imunização consistiu na injeção de 100 µl de formulações baseadas em alum, contendo Ag-Epi (50 µg), na presença ou ausência de BK (10 µg) ou MPLA (20 µg), por via subcutânea na base da cauda. Os camundongos receberam um reforço 14 dias depois, exatamente como feito na primeira imunização. No dia 28, os camundongos controle e imunizados foram desafiados com uma dose letal de TCT Dm28c ( $2,5 \times 10^6$ , i.p.). A letalidade da infecção foi monitorada diariamente, durante 40 dias após a infecção. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (n=5/grupo).

Este resultado inconsistente nos levou a realizar uma série de outros experimentos para investigar as possíveis variáveis que estariam influenciando o fenótipo de suscetibilidade dos camundongos à infecção pelo *T. cruzi*. Dentre estas variáveis, investigamos principalmente a virulência dos parasitas e a autenticidade genética dos camundongos. Mesmo após a padronização da obtenção de parasitas altamente infectivos, não conseguimos restabelecer o panorama de mortalidade nos animais infectados. Solicitamos, então, um teste para a comprovação de autenticidade genética de linhagens isogênicas de camundongos ao Serviço de Controle da Qualidade Animal (SCQA), da Fundação Oswaldo Cruz/RJ. Foram analisadas amostras de tecidos de 11 camundongos BALB/c, entre machos e fêmeas, de origem do Biotério que atende ao Laboratório de Imunologia Molecular (IBCCF, UFRJ). Incluímos, ainda, a análise genética de um camundongo BALB/c de origem do Biotério de Criação e Experimentação do Instituto Biomédico da UFF, como controle positivo. Os genótipos dos animais foram identificados e registrados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) de locos de microssatélites previamente selecionados (BENAVIDES *et al.*, 2002) e descritos em pares de bases de acordo com amostras padrão de genótipos conhecidos (controle interno BALB/cJ - The Jackson Laboratory). Como podemos observar na tabela 2, houve ausência do produto esperado em ao menos dois dos sete locos analisados em todos os animais provenientes do Biotério que atende ao Laboratório de Imunologia Molecular, demonstrando que os animais testados estavam com os padrões genéticos diferentes do esperado. Por sua vez, o animal proveniente do Biotério da UFF apresentou todos os produtos correspondentes aos genes analisados. Esses resultados confirmam a ocorrência de uma contaminação genética da linhagem de camundongos testada, como resultado de um conjunto de variáveis que devem ser investigadas. É importante ressaltar que a existência de variações genéticas pode interferir seriamente na exatidão e reprodutibilidade dos resultados,

dificultando sua interpretação e até mesmo tornado-a absolutamente inadequada. Este assunto será abordado com maiores detalhes no capítulo final da presente dissertação (Discussão).

**	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B1	B2	C1	C2	BALB/c
Cromossomo 1												
D1MIT 165	151 pb	151pb	APE	APE	APE	APE	APE	APE	APE	APE	151 pb	<b>151 pb</b>
D1MIT 356	112 pb	112pb	APE	APE	112 pb	112 pb	112 pb	112 pb	APE	APE	APE	<b>112 pb</b>
Cromossomo 4												
D1MIT 199	APE	APE	APE	196 pb	APE	APE	APE	APE	196 pb	196 pb	196 pb	<b>196 pb</b>
D4MIT 190	APE	145 pb	APE	145 pb	145 pb	APE	APE	145 pb	145 pb	145 pb	APE	<b>145 pb</b>
Cromossomo 9												
D9MIT 26	224 pb	224 pb	224 pb	224 pb	224 pb	224 pb	APE	APE	APE	APE	APE	<b>224 pb</b>
Cromossomo 11												
D11MIT 260	APE	98 pb	98 pb	98 pb	98 pb	98 pb	98 pb	98 pb	98 pb	98 pb	APE	<b>98 pb</b>
Cromossomo 19												
D19MIT 32	152 pb	APE	APE	APE	APE	APE	APE	APE	APE	APE	APE	<b>152 pb</b>

**Tabela 2 : Monitoramento genético de camundongos BALB/c. Origem: Biotério que atende ao Laboratório de Imunologia Molecular (IBCCF - UFRJ).**

APE: Ausência do produto esperado; pb: pares de bases.

BALB/c: Origem Biotério de Criação e Experimentação do Instituto Biomédico da UFF, usado como controle.

\* Ensaio realizado entre 22 de fevereiro a 01 de abril de 2010, pelo Serviço de Controle da Qualidade Animal (SCQA) da Fundação Oswaldo Cruz.

\*\* Foram retiradas amostras de animais de 3 diferentes gaiolas de cruzamento (A, B e C).

Na tentativa de contornar este problema, começamos a utilizar animais provenientes de outras instituições, principalmente do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB – UNICAMP). Testes preliminares indicaram que estes animais eram altamente suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi*, apresentando índices de mortalidade de 100% aproximadamente 10 dias após a infecção (dados não mostrados). Acreditamos que essa discrepância se deva ao fato de que, antes de chegarem ao IBCCF, a criação e manutenção destes animais seja feita com tecnologia de barreira biológica, utilizando gaiolas que os mantêm em ambientes previamente definidos e livres de doenças. Isso significa que quando estes animais chegam ao nosso Biotério, encontram condições de infra-estrutura totalmente incompatíveis com aquelas em que foram criados, estando, assim, expostos a possíveis contaminações carregadas pelo ar e, conseqüentemente, mais suscetíveis à infecção concomitante pelo *T. cruzi* (VERINAUD *et al.*, 1998; TORRECILHAS *et al.*, 1999).



#### 4.2.6 Análise da atividade citotóxica de células T CD8<sup>+</sup> no modelo de imunização C57BL/6- cepa CL-Brener

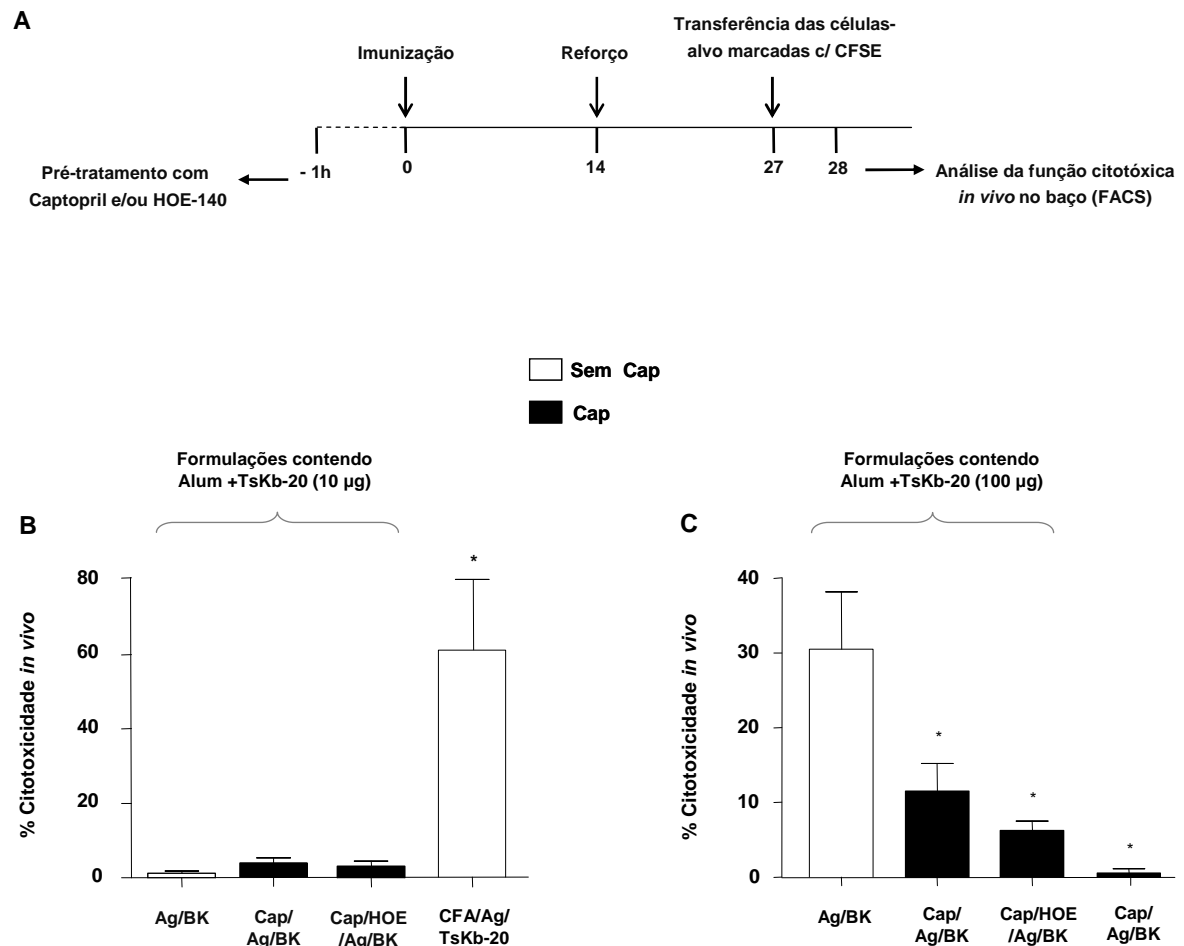
Devido às dificuldades descritas anteriormente, decidimos fazer algumas modificações no nosso modelo de estudo da eficácia vacinal. Uma vez que a análise da mortalidade se tornou um parâmetro pouco confiável, escolhemos a linhagem de camundongos C57BL/6, por se tratar de uma linhagem de animais resistentes à infecção pelo *T. cruzi*. Uma vantagem adicional de utilizar camundongos C57BL/6 seria a possibilidade de investigar a geração de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas antígeno-específicas *in vivo*, utilizando, ainda, parasitas da cepa CL-Brener.

Conforme citado na Introdução, as células T CD8<sup>+</sup> são importantes mediadores da resposta imune adaptativa contra patógenos intracelulares. No caso da infecção pelo *T. cruzi*, de modo geral, as células T CD8<sup>+</sup> reconhecem preferencialmente epítomos expressos por membros da superfamília das trans-sialidases (TS), apresentado por moléculas de MHC na superfície de células infectadas (MARTIN *et al.*, 2006; TZELEPIS *et al.*, 2008). Um dos epítomos de TS imunodominantes é o TsKb-20 (ANYDFTLV), restrito ao reconhecimento por MHC I de células de camundongos C57BL/6 (mas não de BALB/c). O TsKb-20 foi descrito em diversos modelos de infecção pelo *T. cruzi*, utilizando, por exemplo, as cepas Brazil, CL-Brener e Y, e especificamente no pico da infecção pela cepa Brazil, cerca de 30% de todas as células T CD8<sup>+</sup> são específicas para este peptídeo (MARTIN *et al.*, 2006).

Com base nos estudos descritos acima, nossa primeira iniciativa foi tentar padronizar a formulação vacinal para subsequente análise da geração de células T citotóxicas anti-TsKb-20 *in vivo*. Com este propósito, camundongos C57BL/6 foram imunizados com formulações vacinais contendo alum, BK, extrato de epimastigotas de CL-Brener e doses distintas do peptídeo TsKb-20, seguindo o esquema de vacinação da figura 8A. Conforme descrito, 13 dias após o reforço, células de baço de animais *naive* foram divididas em 2 populações

(pulsadas ou não com peptídeo *in vitro*) e marcadas com diferentes concentrações de CFSE (CFSE-*high* e CFSE-*low*, respectivamente). Os animais imunizados receberam as células-alvo por via intra-venosa e a análise da lise específica das células-alvo foi realizada 20 h após a transferência. Os resultados preliminares mostram que formulações vacinais baseadas em alum contendo 10 µg de TsKb-20 não são capazes de induzir a geração de células T citotóxicas, uma vez que nenhum dos grupos de animais imunizados apresentou atividade citotóxica significativa, independentemente do pré-tratamento com captopril ou HOE-140 (Fig. 8B). Juntamente com essas análises, incluímos como controle positivo um grupo de animais imunizados com Adjuvante de Freund completo (CFA/Ag-Epi/TsKb-20), um adjuvante que conhecidamente estimula a indução de respostas imunes do tipo-1. Conforme esperado, a imunização com CFA/Ag-Epi/TsKb-20 induziu a geração de células citotóxicas, alcançando um nível significativamente maior de citotoxicidade antígeno-específica (60%, Fig. 8B). Na tentativa de detectar níveis semelhantes de citotoxicidade em animais imunizados com formulações baseadas em alum, decidimos aumentar 10 vezes a concentração do peptídeo utilizado na formulação vacinal (concentração final TsKb-20 = 100 µg). A imunização/reforço dos animais e a transferência de células-alvo foram realizadas seguindo o mesmo esquema anteriormente descrito (Fig. 8A). Observamos que essa estratégia funcionou da maneira esperada, uma vez que os animais imunizados com Alum/Ag-Epi/TsKb-20/BK apresentaram atividade citotóxica de cerca de 30% (Fig. 8C). Surpreendentemente, o pré-tratamento com captopril induziu uma redução parcial da citotoxicidade nos animais imunizados com Alum/Ag-Epi/TsKb-20/BK, chegando a 12%, enquanto o pré-tratamento com HOE-140 não alterou significativamente esses níveis (Fig. 8C). Paralelamente, não detectamos a presença de células citotóxicas nos animais imunizados na ausência de TsKb-20, confirmando a especificidade da atividade destas células sobre as células-alvo (Fig. 8C). Em conjunto esses resultados preliminares sugerem que a imunização

com Alum/TsKb-20/Ag-Epi/BK induz a geração de células citotóxicas anti-TsKb-20, de maneira dose-TsKb-20-dependente, e que essa citotoxicidade parece ser parcialmente inibida pelo pré-tratamento dos animais com captopril e independente da ativação do receptor B<sub>2</sub>R.



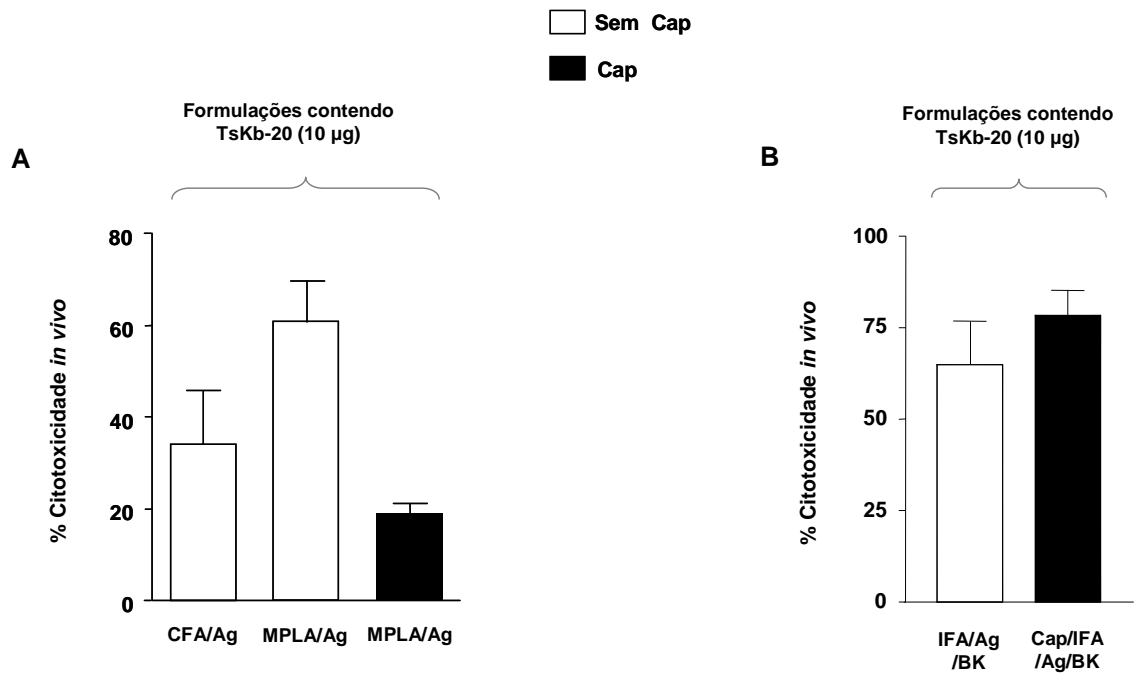
**Figura 8: Análise da geração de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas em camundongos C57BL/6 imunizados com formulações contendo Alum.** (A) Esquema de imunização: Camundongos C57BL/6 machos foram pré-tratados ou não com uma dose única de captopril (10 mg/kg i.p.) e/ou antagonista de B<sub>2</sub>R (HOE-140, 100 µg/kg s.c.) 1 h antes da imunização. A imunização consistiu na injeção subcutânea de 100 µl de formulações baseadas em alum (5 mg), contendo TsKb-20 ((B) 10 µg ou (C) 100 µg), Ag (extrato de epimastigotas de CL-Brener, 50 µg), e BK (10 µg). Os camundongos receberam um reforço 14 dias depois, exatamente como feito na primeira imunização. No dia 27, esplenócitos de C57BL/6 *naïve* foram pulsados com TsKb-20 e marcados com CFSE como descrito na seção Materiais e Métodos. As células foram recuperadas dos animais imunizados 20 h depois da transferência (dia 28) para análise no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences), e a porcentagem de lise específica das células-alvo pulsadas com peptídeo foi calculada como descrito na seção Materiais e Métodos. Os resultados preliminares representam apenas um experimento, realizado com 5 animais/grupo. As estatísticas foram feitas por ANOVA e as comparações de pares foram feitas pelo teste de Turkey.

Embora tenhamos obtido êxito na geração de células citotóxicas em camundongos imunizados com 100 µg de TsKb-20, continuamos investigando a possibilidade de utilizar uma dose sub-ótima do peptídeo (10 µg) em combinação com outros adjuvantes. Um dos adjuvantes testados foi o MPLA, na tentativa de substituir o uso da BK na formulação vacinal, assim como havíamos testado no modelo de imunização/infecção utilizando camundongos BALB/c e parasitas da cepa Dm28c (Fig. 7). Desta forma, com o objetivo de avaliar se a imunização com MPLA poderia aumentar a atividade citotóxica das células T CD8<sup>+</sup> anti-TsKb-20, camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com captopril 1 h antes da imunização/reforço com MPLA/Ag-Epi/TsKb-20. O protocolo de imunização e de transferência de células-alvo foi seguido conforme descrito anteriormente (vide seção Materiais e Métodos, Seções 3.4.1 e 3.4.2). Como controle, utilizamos novamente um grupo de animais imunizados com CFA/Ag-Epi/TsKb-20. Constatamos que a imunização com MPLA/Ag-Epi/TsKb-20 foi eficiente em induzir uma alta porcentagem de citotoxicidade antígeno-específica *in vivo*, em nível ainda maior do que o observado no grupo de animais imunizados com CFA/Ag-Epi/TsKb-20 (Fig. 9A). No entanto, mais uma vez nos deparamos com o efeito parcialmente inibitório do pré-tratamento dos animais com captopril (Fig. 9A), assim como observado no experimento de imunização com formulações baseadas em alum (Fig. 8C). Esses resultados surpreenderam-nos, visto que nossa hipótese de trabalho se baseia no papel do captopril como potencializador dos efeitos adjuvantes das cininas (BK sintética e/ou cininas endógenas) nos esquemas vacinais.

Em seguida, decidimos verificar se o efeito adjuvante da BK poderia ser potencializado através de sua associação com o adjuvante de Freund incompleto, que classicamente é utilizado apenas na fase de reforço em esquemas vacinais que usam o adjuvante de Freund completo na primeira imunização. É importante ressaltar que a única diferença entre as formas incompleta (IFA) e completa (CFA) do adjuvante de Freund se

encontra nos componentes bacterianos (1 mg de *Mycobacterium tuberculosis* inativada pelo calor para cada 1 ml de solução) presentes no CFA. Com exceção do componente bacteriano, ambas as formas são constituídas de óleo mineral e substância surfactante. Os modelos vacinais que utilizam adjuvante de Freund induzem respostas de longa duração, que podem ser atribuídas ao efeito de liberação lenta do antígeno causado pela composição da emulsão (água-em-óleo). Com base nos conceitos acima descritos, consideramos que a inclusão de BK e antígenos na emulsão com IFA poderia induzir uma liberação lenta dos componentes imunogênicos no tecido subcutâneo, otimizando assim a maturação de APCs e a ativação/expansão de linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos. Com o intuito de testar essa hipótese, camundongos C57BL/6 foram pré-tratados ou não com captopril e imunizados com IFA/Ag-Epi/TsKb-20. O reforço foi realizado 14 dias depois, seguindo as mesmas condições da imunização inicial, e as células-alvo foram transferidas para os animais imunizados 13 dias após o reforço, seguindo o protocolo descrito em detalhes no capítulo Materiais e Métodos (Seções 3.4.1 e 3.4.2). Observamos que a imunização com IFA/Ag-Epi/TsKb-20 foi capaz de induzir altos níveis de citotoxicidade, de maneira independente da administração prévia de captopril (Fig. 9B). No entanto, ainda não podemos afirmar que este efeito é causado pela liberação lenta de BK/antígenos incluídos em IFA. Para chegarmos a uma conclusão precisa são necessárias novas análises incluindo grupos controle adicionais.

Os dados preliminares obtidos nesta série experimental sugerem que a geração de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas em animais imunizados com uma concentração sub-ótima de antígeno pode ser potencializada com o uso de adjuvantes exógenos, como o MPLA, ou adjuvantes endógenos, como a BK em emulsão com IFA. Nos esquemas vacinais citados devemos, ainda, investigar mais detalhadamente o fato de a função citotóxica não ser modulada (IFA/BK) ou até mesmo ser inibida (MPLA) pelo pré-tratamento dos animais com captopril.



**Figura 9: Análise da geração de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas induzida por diferentes adjuvantes vacinais.** Camundongos C57BL/6 machos foram pré-tratados ou não com uma dose única de captopril (10 mg/kg i.p.) e imunizados com formulações vacinais distintas: em **(A)** formulações contendo Adjuvante de Freund completo (CFA) ou Monofosforil lipídeo A (MPLA, 20 µg), adicionado a TsKb-20 (10 µg) e Ag (extrato de epimastigotas de CL-Brener, 50 µg); em **(B)** formulações contendo Adjuvante de Freund incompleto (IFA) adicionado a TsKb-20 (10 µg), Ag (Epi- CL-Brener, 50 µg) e bradicinina (BK, 10 µg). Os camundongos receberam um reforço 14 dias depois, exatamente como feito na primeira imunização. No dia 27, esplenócitos de C57BL/6 *naïve* foram pulsados com TsKb-20 e marcados com CFSE como descrito em Materiais e Métodos. As células foram recuperadas dos animais imunizados 20 h depois da transferência (dia 28) para análise da fluorescência por CFSE, e a porcentagem de lise específica das células-alvo pulsadas com peptídeo foi calculada como descrito na seção Materiais e Métodos. Os resultados preliminares representam apenas um experimento, realizado com 5 animais/grupo. As estatísticas foram feitas por ANOVA e as comparações de pares foram feitas pelo teste de Turkey.

## 5 DISCUSSÃO

Nesta dissertação foram utilizadas diversas abordagens para investigar as funções adjuvantes da bradicinina em modelos vacinais contra infecção pelo *T. cruzi*. Para facilitar a discussão, os assuntos aqui abordados serão tratados separadamente. A primeira parte envolverá a discussão de resultados obtidos no modelo de vacinação contra *T. cruzi* estabelecido em camundongos BALB/c. Na segunda parte da discussão, farei considerações sobre o possível papel adjuvante da BK na geração de células T citotóxicas no modelo de imunização de camundongos C57BL/6.

### 5.1 O efeito potencializador do captopril no modelo de vacinação contra infecção por *T. cruzi*

O conjunto de resultados obtidos na Fase I deste projeto (Anexo I) evidenciou que a inclusão da BK em formulações vacinais contendo alum e Ag-Epi não era capaz de proteger os camundongos BALB/c do desafio agudo, ainda que a imunização/reforço fosse capaz de induzir (i) mudança do isotipo de imunoglobulinas (IgG1 → IgG2a) e (ii) forte polarização da resposta T<sub>H</sub>1 anti-*T. cruzi*. Em contrapartida, observou-se que a injeção de uma única dose sistêmica (i.p.) de captopril antes da imunização/reforço conferia um fenótipo resistente nestes animais, sendo o efeito protetor anulado pela injeção prévia de uma dose única de HOE-140.

A capacidade de apresentar antígenos solúveis para linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTLs) mobilizando a via endógena (“apresentação cruzada”) não é igualmente compartilhada por todos os subtipos de DCs (CARBONE *et al.*, 1998). A noção clássica de que as DCs residentes no tecido (migratórias) são capazes de promover apresentação cruzada de epítopos restritos às células T CD8<sup>+</sup> via MHC I tem sido questionada por evidências recentes de que essa função é mais eficientemente desempenhada por DCs CD8α<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> residentes no tecido linfóide (revisado por HEATH *et al.*, 2004). Realizados na Fase I (Fig. 9,

Anexo I), os estudos de transferência adotiva de linfócitos T CD4<sup>+</sup> versus T CD8<sup>+</sup> apontaram os linfócitos T CD8<sup>+</sup> como um componente chave da resposta protetora observada em BALB/c imunizados/re-imunizados com antígenos solúveis de Epi Dm28c. De modo semelhante, os resultados da imunização de BALB/c com DCs pulsadas com Ag-Epi e estimuladas *in vitro* com Cap/BK também sugerem que este procedimento possibilita apresentação cruzada de antígenos de epimastigotas pelas DCs para linfócitos T CD8<sup>+</sup> anti-*T. cruzi* (Fig. 2).

Uma das dificuldades na interpretação dos resultados de vacinação obtidos com o esquema completo é que ainda não sabemos identificar se o principal alvo dos efeitos imunopotencializadores do Cap/BK são as DCs residentes na periferia (DCs migratórias) ou se seriam as CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> residentes no tecido linfóide. Sabendo que as CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> residentes de tecido linfóide são mais capacitadas para induzir/expandir CTLs anti-Epi Ag, resolvemos avaliar esta questão imunizando camundongos BALB/c com CD11c<sup>+</sup> DCs isoladas do baço de BALB/c normal, na premissa de que estas preparações contêm as CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>. Antes de empregá-las como imunógenos, confirmamos que as DCs (pulsadas com antígeno de Epi) estimuladas *in vitro* com Cap/BK adquiriram um fenótipo “maduro”, manifestado pelo aumento na frequência de CD11c<sup>+</sup> DCs produtoras de IL-12. Finalmente, evidenciamos que BALB/c imunizados/re-imunizados com estas DCs pulsadas/ativadas pela via B<sub>2</sub>R foram plenamente capazes de induzir imunidade protetora, sendo o efeito vacinal correlacionado com aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$ , tanto nos linfonodos drenantes quanto no coração dos animais vacinados com DCs (Fig. 1, 2 e 3). Esses resultados sugerem que as DCs de baço pulsadas e ativadas por Cap/BK promovem apresentação cruzada de epítomos (ainda desconhecidos) presentes nas proteínas solúveis de Epi Dm28c para células T CD8<sup>+</sup> (i.e., células T virgens, na etapa de imunização primária e células T CD8<sup>+</sup> de memória, na etapa de reforço). Não obstante a natureza destes resultados,



deve-se admitir que o nosso modelo possui artificialidades, uma vez que as DCs residentes no linfonodo drenante podem ter diferenças importantes em relação às CD11c<sup>+</sup> DCs isoladas do baço (revisado por SHORTMAN & NAIK, 2007; PULENDRAN *et al.*, 2008). Ainda neste mesmo contexto, devemos admitir que é precoce descartar um papel chave para os subtipos de DCs presentes nos sítios periféricos de vacinação, ainda que estes não sejam capacitados para realizar apresentação cruzada de modo direto ao alcançarem o estroma de linfonodos drenantes. Por exemplo, estas DCs migratórias (carreando Epi Ags) podem sofrer apoptose ao alcançar o parênquima de LD drenantes, sendo em seguida fagocitadas pelas CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> residentes, conforme documentado em outros sistemas (INABA *et al.*, 1998).

Estudos realizados no modelo de infecção aguda com a cepa Y de *T. cruzi*, demonstraram que a ativação da via TLR4/MYD88 é dispensável para indução de CTLs anti-*T. cruzi* em órgãos linfóides secundários (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Os autores argumentam que o recrutamento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> efetores para a periferia (por exemplo, o coração) pode depender da produção local de quimiocinas, secundariamente produzidas em resposta à inflamação induzida por T<sub>H</sub>1 (que segundo os autores, pode estar subordinada à ativação pela via TLR4/MYD88). Considerando esses achados, a importância da ativação de B<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> DCs na indução de células CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 merece ser explorada, tendo em vista evidências obtidas na Fase I deste projeto, indicando que esta via de ativação endógena estimula fortemente o eixo T<sub>H</sub>1 da resposta adaptativa. Portanto, a eficácia vacinal (controle da carga parasitária no coração) induzida pelo esquema completo pode depender da convergência de pelo menos dois mecanismos diferentes, ambos orquestrados por B<sub>2</sub>R<sup>+/+</sup> DCs: (i) otimização da apresentação cruzada de Ag-Epi; e (ii) indução de linfócitos T<sub>H</sub>1 capacitados a migrar para o coração infectado/inflamado, tal como sugerido para a via TLR/MYD88 (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Um aspecto complementar do nosso trabalho envolveu a realização de estudos sobre o papel de óxido nítrico no mecanismo de vacinação induzida pela imunização com DCs (Fig.

4). Consistente com um efeito crítico de NO sobre a função de DCs, observamos que DCs pulsadas e estimuladas com Cap/BK e tratadas com 7-Nitroindazol (inibidor de NO sintases) tornaram-se incapazes de induzir proteção em animais BALB/c. Estes resultados indicam que o bloqueio da produção de NO anula funções imunoestimulatórias que estão de outro modo presentes em DCs ativadas por Cap/BK (Fig. 4). Entre outras possibilidades a serem investigadas, é possível que a maturação completa das DCs ativadas por Cap/BK dependa dos efeitos autócrinos do NO produzido pelas próprias DCs ao longo do cultivo *in vitro* (18 h). Esta dependência foi recentemente descrita em estudos sobre a maturação/ativação de DCs humanas, tendo sido identificada uma participação central da enzima NO sintase neuronal (ADLER *et al.*, 2010). Além destes efeitos, trabalhos recentes demonstraram que o NO coordena o tráfico da molécula de MHC II durante a maturação de DCs, inibindo a função da caspases que degradam a cadeia invariante associada ao MHC (CD74) (HUANG *et al.*, 2008).

Obviamente, uma das fraquezas do nosso modelo experimental é o estado de pureza variável das CD11c<sup>+</sup> DCs empregadas nas experiências de imunização. Ao final do processo de purificação, a população de DCs apresenta pureza em média de 80%. Os contaminantes celulares, mesmo em proporção reduzida, podem exercer efeitos ainda não explorados neste sistema. Por exemplo, estudos recentes demonstram que DCs são licenciadas para executar apresentação cruzada de epítomos para linfócitos T CD8<sup>+</sup> através de interações que envolvem a participação conjunta de células NKT (*natural killer T cells*) e T CD8<sup>+</sup>. Este licenciamento exercido pelas células NKT estimula a secreção da quimiocina CCL17 por DCs CD8<sup>+</sup>, atraindo CTLs *naive* que expressam o receptor CCR4 (SEMMLING *et al.*, 2010).

Retomando a discussão sobre o modelo de imunização em animais BALB/c, cabe ressaltar que observamos um aumento na porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  no LD de camundongos imunizados com [Cap + Alum/Ag/BK], em relação aos animais imunizados não-tratados com Cap (Fig. 5). Essa observação aparentemente contradiz

alguns dos resultados obtidos durante a realização da primeira fase do projeto, descritos no Anexo I desta dissertação (Fig. 4A, 6A e 8, Anexo I). Nestes ensaios, a produção de IFN- $\gamma$  não foi discernível entre esses dois grupos de animais. Porém, essa discrepância pode ser explicada por duas diferenças na metodologia usada nesses experimentos:

- a) As análises descritas no Anexo I foram feitas 7 dias após a infecção dos animais, enquanto a análise descrita na seção de Resultados desta tese foi feita 4 dias após a infecção. É possível que durante o curso da infecção as diferenças na produção de IFN- $\gamma$  observadas 4 dias pós-infecção (d.p.i.) desapareçam, chegando a níveis similares conforme a infecção se estabelece.
- b) As técnicas utilizadas para mensurar a produção de IFN- $\gamma$  são diferentes entre as duas fases dos experimentos. É possível que a análise de FACS (usada na análise do último experimento) seja mais sensível a ponto de detectar diferenças sutis, que não são detectadas pela técnica de ELISA (usada na análise dos primeiro experimentos).

Está bem estabelecido que a ativação e a subsequente migração de linfócitos T entre tecidos linfóides e periféricos é finamente regulada por quimiocinas (BROMLEY *et al.*, 2008). Especificamente no caso da diferenciação de linfócitos virgens em células T CD8<sup>+</sup> efetoras/memória (T<sub>EM</sub>), é necessário que ocorra uma série de interações cognatas, entre DCs, células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, no estroma do tecido linfóide. Essas interações também são governadas por quimiocinas e seus receptores (BROMLEY *et al.*, 2008). Já foi demonstrado, por exemplo, que a interação entre células T *helper* e DCs estimuladas por ligantes de TLR induz a produção de ligantes de CCR5, que atraem os linfócitos T CD8<sup>+</sup> *naive*, aumentando a possibilidade de encontro entre essas células (CASTELLINO *et al.*, 2006).

Retomando a discussão dos nossos dados no modelo de imunização em animais BALB/c, um dos resultados mais intrigantes deste estudo foi o aumento na expressão de

CCR5 pelas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> isoladas do LD dos animais imunizados com [Cap + Alum/Ag/BK], em relação aos animais imunizados não-tratados com Cap (Fig. 6). Adicionalmente, vimos uma diminuição na expressão de CCR7 pelos linfócitos dos animais imunizados com [Cap + Alum/Ag/BK], em relação aos animais imunizados que não receberam Cap (Fig. 6). Curiosamente, observamos que o aumento na expressão de CCR5 é B<sub>2</sub>R-dependente, enquanto a diminuição na expressão de CCR7 é B<sub>2</sub>R-independente (Fig. 6). Esses resultados subsidiam a nossa hipótese de que as células T de animais imunizados com [Cap + Alum/Ag/BK] possuem maior capacidade migratória para tecidos periféricos nos estágios iniciais da infecção. O mecanismo de regulação-negativa de CCR7 nos linfócitos T não foi investigado, entretanto, suspeita-se que possa ser decorrente da inibição (por parte de captopril) da sinalização de receptores de angiotensina.

Estes estudos, somados àqueles já comentados, sobre a importância do receptor CCR5 no recrutamento de células T<sub>EM</sub> para o coração de animais infectados com *T. cruzi* (MACHADO *et al.*, 2005; HARDISON *et al.*, 2006), devem ser levados em conta na reflexão sobre a interpretação dos resultados apresentados na figura 6. Em síntese, cabe esclarecer se o recrutamento de células T efetoras do tecido linfóide para o coração é potencializado nos grupos de animais imunizados com [Cap + Alum/Ag/BK] (Fig. 6B, Anexo I), devido à modulação na expressão de CCR5 e CCR7 nestes linfócitos, induzida pelo pré-tratamento dos animais com captopril.

## 5.2 Perda de autenticidade genética da linhagem de camundongos BALB/c efeito

Experimentos de imunização com o adjuvante MPLA utilizando camundongos BALB/c demonstraram que os animais *naive* infectados adquiriram resistência à infecção letal pelo *T. cruzi* (Fig. 7). Após realizar um grande número de experiências, a possibilidade de perda de virulência de *T. cruzi* (cepa Dm28c) foi descartada. Este resultado nos colocou

diante de um dilema: talvez a linhagem empregada pela nossa equipe tivesse sofrido variações genéticas (Tabela 2). As suspeitas iniciais, levantadas pela análise de alótipos de IgG (dados não mostrados), foram confirmadas, forçando a interrupção de estudos no modelo BALB/c. Concluimos que não existem condições adequadas de infra-estrutura e treinamento de pessoal especializado para a manutenção dos animais no Biotério que atende ao Laboratório de Imunologia Molecular. Infelizmente, as variações genéticas apresentadas ameaçam a confiabilidade dos resultados obtidos na primeira etapa do desenvolvimento deste projeto (2 anos, dados não publicados), uma vez que é impossível saber a partir de quando essa contaminação se estabeleceu na colônia de animais criados no nosso Biotério.

Apesar da já citada falta de condições adequadas, sabemos que este tipo de contaminação pode ocorrer na grande maioria dos biotérios, mesmo com a adoção de rigorosos procedimentos de controle. As contaminações genéticas atingem em torno de 60% dos grandes centros de criação no mundo todo, podendo ser causada por cruzamentos errôneos, mutações espontâneas, aquisição de animais sem histórico e sem certificação genética, e etc (site do *Jackson Laboratory*, [www.jax.org](http://www.jax.org)). Para tentarmos controlar os riscos de contaminações, devemos adotar alguns procedimentos básicos de controle, como:

- a) As matrizes dos camundongos devem ser mantidas em sistemas fechados, isolados de outras linhagens isogênicas (preferencialmente em micro-isoladores), sendo manipulada sempre em cabines de segurança.
- b) Deve-se evitar a entrada de muitos profissionais na área, havendo controle rígido para circulação de materiais e pessoas nos biotérios.
- c) Os animais devem ser identificados de forma clara e rastreável.
- d) A equipe deve ser treinada para a manipulação dos animais, assim como para o registro e o controle fenotípico dos mesmos. O ideal é que haja registro de mapa genético e das características dos animais tais como: sistemas de acasalamento,

possíveis mudanças na cor de pelagem, geração da prole, alteração do peso dos animais, distúrbios neurológicos e etc.

- e) Realização do monitoramento genético das colônias a cada 5 gerações.
- f) Realização do monitoramento sanitário das colônias a cada 3 meses.
- g) Para diminuir ocorrência de deriva genética (mutações) três metodologias devem ser adotadas:

- Criopreservação de embriões para resgatar a linhagem após contaminação.
- Sistema de acasalamento com registro de mapas genéticos,
- Monitoramento periódico de alguns genes (recomendados por BENAVIDES *et al.*, 2002) que diferenciem as linhagens mantidas no biotério.

As linhagens de camundongos comumente usadas na pesquisa biomédica apresentam variações genéticas geradas por uma combinação de fatores, como a evolução natural e a reprodução direcionada pelo homem (revisado por WADE & DALY, 2005). No entanto, esta diversidade genética pode influenciar a susceptibilidade a doenças infecciosas. A relação entre variações genéticas e a suscetibilidade a infecções está bem documentada em modelos de infecção por diversos patógenos, entre eles a *Leishmania major* (MOLL & ROLLINGHOFF, 1990; SCOTT, 1991), o vírus da Influenza A (H1N1) (BOON *et al.*, 2009) e o próprio *T. cruzi* (TRISCHMANN, 1986; HOFT *et al.*, 1993).

Estes estudos mostram que a patologia induzida por diferentes patógenos é controlada por fatores multigênicos do hospedeiro. Portanto, a existência de variações genéticas nas linhagens BALB/c mantidas em nosso biotério pode introduzir variáveis desconhecidas nos resultados experimentais, dificultando sua interpretação, conforme ocorreu em nossos últimos experimentos com a linhagem “BALB/c”.

Na tentativa de contornar o problema acima relatado, repetimos diversas vezes as experiências programadas utilizando animais BALB/c provenientes do CEMIB (UNICAMP). Desta vez, nos deparamos com outro problema: em poucos dias, estes animais apresentaram sinais de infecção. Uma vez infectados, os animais mostraram-se altamente suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi*, não sendo capazes de montar respostas  $T_H1$  mesmo depois de submetidos à imunização com o esquema completo (dados não mostrados). Acreditamos que esse aumento da suscetibilidade se deva à ocorrência de infecções naturais concomitantes, provavelmente virais, muito comuns em biotérios que não possuem infra-estrutura adequada de criação e manutenção de animais experimentais (GILIOLI *et al.*, 1996). Trabalhos antigos demonstraram que essas infecções virais alteram a resposta do hospederio através de seus múltiplos efeitos imunomodulatórios (DEMPSEY *et al.*, 1986; DINDZANS *et al.*, 1987). No caso específico de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, a infecção concomitante com o vírus da hepatite murina (*mouse hepatitis virus*, MHV) induz atrofia do timo, depleção de células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , associados à maior parasitemia e mortalidade acelerada dos animais infectados (VERINAUD *et al.*, 1998; TORRECILHAS *et al.*, 1999). Em contraste com os animais recém-infectados pelo MHV, observou-se que o perfil de suscetibilidade não se repete quando a infecção pelo *T. cruzi* é feita em animais cronicamente infectados pelo MHV (TORRECILHAS *et al.*, 1999). Esses achados reforçam nossa hipótese de que os camundongos de fontes externas sofrem contaminações virais quando chegam ao nosso Biotério, onde são mantidos sem a tecnologia de barreira biológica.

### 5.3 Indução de CTLs em camundongos C57BL/6 imunizados com TsKb-20/BK

Diante da impossibilidade de continuar os estudos de vacinação no modelo BALB/c –cepa Dm28c, resolvemos estudar os efeitos adjuvantes de BK empregando animais C57BL/6 imunizados com a cepa CL. As

formulações vacinais testadas inicialmente continham alum, BK, extrato solúvel de epimastigotas da cepa CL-Brener e o peptídeo sintético TsKb-20, derivado da família TS. Trabalhos recentes com a cepa Brazil demonstram que TsKb-20 é um epítipo dominante na resposta T CD8<sup>+</sup> anti-*T. cruzi* em camundongos C57BL/6 (ROSENBERG *et al.*, 2010). Apesar da natureza preliminar dos resultados aqui descritos, esta foi a primeira vez que conseguimos induzir células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas anti-TsKb-20 em camundongos C57BL/6 imunizados na presença de BK. Os principais achados serão comentados a seguir.

A geração de CTL em camundongos imunizados com formulações contendo Alum, TsKb-20, Ag-Epi (CL Brener) e BK ocorreu de modo dose-dependente para o peptídeo sintético (Fig. 8). Testes realizados com TsKb-20 (100 µg) revelaram que o grupo de animais imunizado com [Cap/HOE-140 + Alum/TsKb-20/Ag-Epi/BK] apresentou atividade citotóxica semelhante ao grupo imunizado com [Cap + Alum/TsKb-20/Ag-Epi/BK] (Fig.8C). No entanto, ambos apresentaram níveis de citotoxicidade significativamente menores em relação ao grupo imunizado sem Cap [Alum/TsKb-20/Ag-Epi/BK] (Fig.8C). Este resultado inesperado será discutido mais adiante.

Embora tenhamos observado indução de CTL anti-TsKb-20 nos animais imunizados com Alum e 100 µg de TsKb-20, o emprego de altas doses deste peptídeo neste esquema de imunização tornou-se oneroso demais. Para viabilizar um gasto menor deste reagente, resolvemos substituir o alum por adjuvantes que promovem uma lenta liberação de TsKb-20, Ag-Epi e BK. Sabemos que adjuvante de Freund permite a formação de uma emulsão água-em-óleo, capaz de promover a liberação gradual de antígenos nos tecidos periféricos. No entanto, devido ao seu efeito tóxico, a aplicação do adjuvante de Freund completo (CFA) é proibida em humanos. Mesmo em estudos com animais experimentais, aconselha-se que o CFA seja substituído sempre que possível, devido às reações de dor e ao potencial de dano tecidual (CLASSEN *et al.*, 1992). Por este motivo, decidimos substituir o alum pelo adjuvante



de Freund incompleto (IFA). Nestas condições, animais C57BL/6 imunizados com IFA/Ag-Epi/TsKb-20/BK geraram fortes níveis de CTLs *in vivo* (Fig. 9B). Este procedimento permitiu o emprego de quantidade 10 vezes menor de TsKb-20 (10 µg) na imunização/reforço em relação ao esquema vacinal inicial, concebido com alum. Trabalhos em andamento poderão esclarecer se a liberação lenta de BK e/ou TsKb-20 permite um engajamento contínuo de DCs migratórias provenientes da corrente sanguínea. Alternativamente, é possível que uma fração deste depósito de antígenos/BK seja drenada para os linfonodos drenantes (LD), liberando a BK no interior do estroma linfóide. Neste último caso, é possível que a BK exerça efeitos imunoestimulatórios ativando B<sub>2</sub>R expressos pelas células DCs CD8α<sup>+</sup> integrantes das redes endógenas de DCs presentes no LD. Considerando que a meia vida do captopril na corrente sanguínea é de cerca de 2 horas, é possível que tenhamos subestimado o tempo de duração de seus efeitos nos esquemas de vacinação estabelecidos em BALB/c. Esta constatação nos parece sensata, tendo em vista que a diferenciação de linfócitos virgens em células T CD8<sup>+</sup> efetoras/memória (T<sub>EM</sub>) depende de interações cognatas (DCs, células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) que podem se estender até 3 dias (BOUSSO & ROBEY, 2003; MILLER *et al.*, 2004). Além disso, cogitamos empregar vesículas carregadas com derivados de bradicinina resistentes a degradação pela ECA, já disponíveis em nosso laboratório.

Cabe observar que ainda não sabemos se as CTLs detectadas no baço de animais imunizados com IFA/Ag-Epi/TsKb-20/BK assim como aqueles imunizados com Alum/TsKb-20/Ag-Epi/BK, possuem capacidade de migrar para tecidos periféricos (por exemplo, o coração). Isso não foi esclarecido porque o baço é o órgão sistematicamente utilizado para avaliar os níveis de função CTL em animais imunizados por diversas formulações vacinais. Na primeira parte deste projeto, observamos que uma das diferenças mais marcantes entre as respostas dos animais BALB/c imunizados/re-imunizados na presença ou ausência da dose única de captopril foi a ocorrência, apenas nos primeiros, de modulação negativa da expressão

CCR7 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e inversamente, modulação positiva de CCR5 (por mecanismos B<sub>2</sub>R-dependentes) (Fig. 6). Estes resultados sugeriram que o fenótipo de capacitação migratória dos linfócitos efetores induzidos pelo esquema vacinal completo [Cap + Alum/Ag/BK] poderia ser um fator determinante no controle da infecção chagásica na periferia, i.e., no coração. Neste momento, ainda não sabemos se os esquemas de imunização que induzem forte citotoxicidade mediada por CTLs no baço se correlacionam positivamente (ou negativamente) com competência migratória para os tecidos cardíacos. Nesse contexto, é curioso observar que os animais imunizados com as formulações contendo MPLA (Fig. 9A) tiveram atividade CTL mais reduzida justamente nos grupos que foram pré-tratados com uma dose única sistêmica de captopril, tal como previsto pelos estudos realizados em BALB/c imunizados com [Cap + Alum/Ag/BK] (Fig. 6). Naquele sistema, o captopril induziu modulação negativa de CCR7 nas células T efectoras do linfonodo drenante por vias independentes de B<sub>2</sub>R. Cabe determinar se os animais C57BL/6 imunizados com o adjuvante MPLA reagem da mesma forma ao pré-tratamento sistêmico com captopril: ou seja, será importante determinar se houve redução na expressão de CCR7 em linfócitos T efectoras isolados do baço. Caso isto seja de fato observado, é possível que a redução da atividade citotóxica observada no baço dos animais tratados com captopril antes da imunização com MPLA seja reflexo de conversão de células T<sub>CM</sub> em T<sub>EM</sub>. Esta hipótese também pode ser aplicada na interpretação dos resultados de geração de CTLs nos camundongos C57BL/6 pré-tratados com Cap e imunizados com Alum/TsKb-20/Ag-Epi/BK. Apesar de especulativas, estas considerações ilustram as perspectivas de desdobramento deste projeto.

Finalizando a discussão, pretendemos avaliar se alguns adjuvantes possuem a capacidade de estimular a ativação do sistema cinina no interior de órgãos linfóides secundários (por exemplo, no linfonodo drenante de sítios de imunização). Esta questão poderá ser abordada graças à disponibilidade de camundongos deficientes de cininogênio

(*kng-1*<sup>-/-</sup>) produzidos pelo grupo do Dr. Keith McCrae (Cleveland Clinics). Esses animais não sintetizam o gene da isoforma *kng-1* no fígado, sendo por isso completamente deficientes de cininogênios no plasma (MERKULOV *et al.*, 2008). Primeiramente, verificaremos se os animais *kng-1*<sup>-/-</sup> infectados por *T. cruzi* ou pela bactéria gram-negativa *P. gingivalis* apresentarão deficiências nos mecanismos de integração entre inflamação e a resposta imune adaptativa, tal como observado em camundongos *B<sub>2</sub>R*<sup>-/-</sup> infectados por estes patógenos intracelulares (MONTEIRO *et al.*, 2007; 2009). Caso os animais *kng-1*<sup>-/-</sup> de fato apresentem disfunções imunológicas (por exemplo, supressão de respostas *T<sub>H</sub>1* pela via *B<sub>2</sub>R*-dependente), será tecnicamente possível avaliar se algumas das nossas manobras de imunização resultam na ativação do sistema calicreína-cinina exclusivamente no interior de LD de animais C57BL/6 selvagens (*kng1*<sup>+/+</sup>), mas não nos mutantes *kng1*<sup>-/-</sup>. Esta hipótese de trabalho merece ser investigada, uma vez que estudos recentes indicam que o sistema de ativação de contato da coagulação (FXII dependente) pode ser inteiramente “montado” na superfície de macrófagos (BARBASZ & KOZIK, 2009).

Conforme já mencionado, sabemos que a aplicação da BK exógena como adjuvante vacinal não é uma opção válida para testes clínicos em humanos, devido a seus efeitos hiperalgésicos. No entanto, eventuais avanços no desenvolvimento deste projeto poderão ser relevantes para área de vacinação veterinária, quiça protegendo animais de pequeno e grande porte contra as infecções causadas por vírus e outros patógenos intracelulares. Essa estratégia pode ser comercialmente interessante, principalmente porque atingem animais de importância econômica, como por exemplo, o gado. O baixo custo de produção da formulação vacinal, composta por constituintes simples e de baixo custo, seria certamente uma vantagem econômica interessante. Cientes deste potencial, a nossa equipe submeteu um registro de preferência para obtenção de patente ao INPI, propondo o emprego da bradicinina sintética como adjuvante em formulações vacinais (Notificação do pedido de patente, por

SCHARFSTEIN & VIOLA, 2003). A demonstração de que CTLs anti-*T. cruzi* podem ser induzidas por formulações vacinais contendo BK/IFA e TsKb-20 poderão reforçar o interesse no desenvolvimento de vacinas anti-virais para o gado (por exemplo, febre aftosa).

## 6 REFERÊNCIAS

- ABLASSER, A.; BAUERNFEIND, F.; HARTMANN, G.; LATZ, E.; FITZGERALD, K. A.; HORNUNG, V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. **Nat Immunol.** 10(10):1065-1072, 2009.
- ADLER, H. S.; SIMON, A.; GRAULICH, E.; HABERMEIER, A.; BACHER, N.; FRIEBE, A.; CLOSS, E. I.; STEINBRINK, K. Neuronal nitric oxide synthase modulates maturation of human dendritic cells. **J Immunol.** 11(184):6025-6034, 2010.
- AGOSTINI, L.; MARTINON, F.; BURNS, K.; MCDERMOTT, M. F.; HAWKINS, P. N.; TSCHOPP, J. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. **Immunity** 3(20):319-325, 2004.
- AKIRA, S. & TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol.** 7(4):499-511, 2004.
- ALIBERTI, J.; VIOLA, J. P.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; BOZZA, P. T.; SHER, A.; SCHARFSTEIN, J. Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. **J Immunol.** 11(170):5349-5353, 2003.
- ALMEIDA, I. C. & GAZZINELLI, R. T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. **J Leukoc Biol.** 4(70):467-477, 2001.
- ALVAREZ, M. G.; POSTAN, M.; WEATHERLY, D. B.; ALBAREDA, M. C.; SIDNEY, J.; SETTE, A.; OLIVERA, C.; ARMENTI, A. H.; TARLETON, R. L.; LAUCELLA, S. A. HLA Class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8<sup>+</sup> T cells in chronic Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis.** 9(2):e288, 2008.
- ANDREAKOS, E.; WILLIAMS, R. O.; WALES, J.; FOXWELL, B. M.; FELDMANN, M. Activation of NF-kappaB by the intracellular expression of NF-kappaB-inducing kinase acts as a powerful vaccine adjuvant. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 39(103):14459-14464, 2006.
- ANSEL, K. M.; DJURETIC, I.; TANASA, B.; RAO, A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. **Annu Rev Immunol.** (24):607-656, 2006.
- BAFICA, A.; SANTIAGO, H. C.; GOLDSZMID, R.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol.** 6(177):3515-3519, 2006.
- BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature** 6673(392):245-252, 1998.
- BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol.** (18):767-811, 2000.
- BARBASZ, A. & KOZIK, A. The assembly and activation of kinin-forming systems on the surface of human U-937 macrophage-like cells. **Biol Chem.** 3(390):269-275, 2009.
- BASU, S.; BINDER, R. J.; SUTO, R.; ANDERSON, K. M.; SRIVASTAVA, P. K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. **Int Immunol.** 11(12):1539-1546, 2000.

- BENAVIDES, F.; ZAMISCH, M.; FLORES, M.; CAMPBELL, M. R.; ANDREW, S. E.; ANGEL, J. M.; LICCHESI, J.; STERNIK, G.; RICHIE, E. R.; CONTI, C. J. Application of inter-simple sequence repeat PCR to mouse models: assessment of genetic alterations in carcinogenesis. **Genes Chromosomes Cancer** 4(35):299-310, 2002.
- BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nat Immunol.** 4(8):345-350, 2007.
- BEVAN, M. J. Helping the CD8(+) T-cell response. **Nat Rev Immunol.** 8(4):595-602, 2004.
- BHoola, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol Rev.** 1(44):1-80, 1992.
- BINDER, R. J.; ANDERSON, K. M.; BASU, S.; SRIVASTAVA, P. K. Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c<sup>+</sup> cells in vivo. **J Immunol.** 11(165):6029-6035, 2000.
- BLAIS, C., JR.; MARCEAU, F.; ROULEAU, J. L.; ADAM, A. The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. **Peptides** 12(21):1903-1940, 2000.
- BLAUKAT, A. Structure and signalling pathways of kinin receptors. **Andrologia** 1(35):17-23, 2003.
- BLAUKAT, A.; DIKIC, I. Activation of sphingosine kinase by the bradykinin B2 receptor and its implication in regulation of the ERK/MAP kinase pathway. **Biol Chem.** 1(382):135-139, 2001.
- BLAUKAT, A.; PIZARD, A.; BREIT, A.; NWERNSTEDT, C.; ALHENC-GELAS, F.; MULLER-ESTERL, W.; DIKIC, I. Determination of bradykinin B2 receptor in vivo phosphorylation sites and their role in receptor function. **J Biol Chem.** 44(276):40431-40440, 2001.
- BOON, A. C.; DEBEAUCHAMP, J.; HOLLMANN, A.; LUKE, J.; KOTB, M.; ROWE, S.; FINKELSTEIN, D.; NEALE, G.; LU, L.; WILLIAMS, R. W.; WEBBY, R. J. Host genetic variation affects resistance to infection with a highly pathogenic H5N1 influenza A virus in mice. **J Virol.** 20(83):10417-10426, 2009.
- BOUSSO, P.; ROBEY, E. Dynamics of CD8<sup>+</sup> T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. **Nat Immunol.** 6(4):579-585, 2003.
- BREWER, J. M. (How) do aluminium adjuvants work? **Immunol Lett.** 1(102):10-15, 2006.
- BROMLEY, S. K.; MEMPEL, T. R.; LUSTER, A. D. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. **Nat Immunol.** 9(9):970-980, 2008.
- BROWN, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nat Rev Immunol.** 1(6):33-43, 2006.
- BURCH, R. M.; AXELROD, J. Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A2. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 18(84):6374-6378, 1987.
- CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, R.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; CABRINI, D. A.; CAMPOS, M. M. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br J Pharmacol.** 7(143):803-818, 2004.

- CARBONE, F. R.; KURTS, C.; BENNETT, S. R.; MILLER, J. F.; HEATH, W. R. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. **Immunol Today** 8(19):368-373, 1998.
- CASTELLINO, F. & GERMAIN, R. N. Cooperation between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells: when, where, and how. **Annu Rev Immunol.** (24):519-540, 2006.
- CASTELLINO, F.; HUANG, A. Y.; ALTAN-BONNET, G.; STOLL, S.; SCHEINECKER, C.; GERMAIN, R. N. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8<sup>+</sup> T cells to sites of CD4<sup>+</sup> T cell-dendritic cell interaction. **Nature** 7086(440):890-895, 2006.
- CHAVEZ-GALAN, L.; ARENAS-DEL ANGEL, M. C.; ZENTENO, E.; CHAVEZ, R.; LASCURAIN, R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. **Cell Mol Immunol.** 1(6):15-25, 2009.
- CHIU, Y. H.; MACMILLAN, J. B.; CHEN, Z. J. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. **Cell** 3(138):576-591, 2009.
- CLAASSEN, E.; DE LEEUW, W.; DE GREEVE, P.; HENDRIKSEN, C.; BOERSMA, W. Freund's complete adjuvant: an effective but disagreeable formula. **Res Immunol.** 5(143):478-483, 1992.
- COIMBRA, T. L.; SANTOS, R. N.; PETRELLA, S.; NAGASSE-SUGAHARA, T. K.; CASTRIGNANO, S. B.; SANTOS, C. L. Molecular characterization of two Rocio flavivirus strains isolated during the encephalitis epidemic in Sao Paulo State, Brazil and the development of a one-step RT-PCR assay for diagnosis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 2(50):89-94, 2008.
- CUNHA, T. M.; VERRI, W. A., JR.; FUKADA, S. Y.; GUERRERO, A. T.; SANTODOMINGO-GARZON, T.; POOLE, S.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. **Eur J Pharmacol.** 1-3(573):221-229, 2007.
- DANILOV, S. M.; SADOVNIKOVA, E.; SCHARENBERG, N.; BALLYASNIKOVA, I. V.; SVINAREVA, D. A.; SEMIKINA, E. L.; PAROVICHNIKOVA, E. N.; SAVCHENKO, V. G.; ADEMA, G. J. Angiotensin-converting enzyme (CD143) is abundantly expressed by dendritic cells and discriminates human monocyte-derived dendritic cells from acute myeloid leukemia-derived dendritic cells. **Exp Hematol.** 12(31):1301-1309, 2003.
- DE BECKER, G.; MOULIN, V.; PAJAK, B.; BRUCK, C.; FRANCOIS, M.; THIRIART, C.; URBAIN, J.; MOSER, M. The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells. **Int Immunol.** 6(12):807-815, 2000.
- DE GREGORIO, E.; D'ORO, U.; WACK, A. Immunology of TLR-independent vaccine adjuvants. **Curr Opin Immunol.** 3(21):339-345, 2009.
- DE WEERD, W. F. & LEEB-LUNDBERG, L. M. Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. **J Biol Chem.** 28(272):17858-17866, 1997.
- DEDDISH, P. A.; MARCIC, B.; JACKMAN, H. L.; WANG, H. Z.; SKIDGEL, R. A.; ERDOS, E. G. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. **Hypertension** 4(31):912-917, 1998.
- DEL NERY, E.; JULIANO, M. A.; LIMA, A. P.; SCHARFSTEIN, J.; JULIANO, L. Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem.** 41(272):25713-25718, 1997.

- DEMPSEY, W. L.; SMITH, A. L.; MORAHAN, P. S. Effect of inapparent murine hepatitis virus infections on macrophages and host resistance. **J Leukoc Biol.** 5(39):559-565, 1986.
- DIEZ, H.; LOPEZ, M. C.; DEL CARMEN THOMAS, M.; GUZMAN, F.; ROSAS, F.; VELAZCO, V.; GONZALEZ, J. M.; PUERTA, C. Evaluation of IFN-gamma production by CD8 T lymphocytes in response to the K1 peptide from KMP-11 protein in patients infected with *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** 3(28):101-105, 2006.
- DINDZANS, V. J.; ZIMMERMAN, B.; SHERKER, A.; LEVY, G. A. Susceptibility to mouse hepatitis virus strain 3 in BALB/cJ mice: failure of immune cell proliferation and interleukin 2 production. **Adv Exp Med Biol.** (218):411-420, 1987.
- DREXLER, S. K.; WALES, J.; ANDREAKOS, E.; KONG, P.; DAVIS, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A.; HUSSELL, T.; FELDMANN, M.; FOXWELL, B. M. Evidence for a DC-specific inhibitory mechanism that depends on MyD88 and SIGIRR. **Scand J Immunol.** 6(71):393-402, 2010.
- EISENBARTH, S. C.; COLEGIO, O. R.; O'CONNOR, W.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. **Nature** 7198(453):1122-1126, 2008.
- FEUERER, M.; HILL, J. A.; MATHIS, D.; BENOIST, C. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. **Nat Immunol.** 7(10):689-695, 2009.
- FRITZ, J. H.; FERRERO, R. L.; PHILPOTT, D. J.; GIRARDIN, S. E. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. **Nat Immunol.** 12(7):1250-1257, 2006.
- GERMAIN, R. N. An innately interesting decade of research in immunology. **Nat Med.** 12(10):1307-1320, 2004.
- GILIOLI, R.; SAKURADA, J. K.; ANDRADE, L. A.; KRAFT, V.; MEYER, B.; RANGEL, H. A. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. **Lab Anim Sci.** 5(46):582-584, 1996.
- GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell** 7(111):927-930, 2002.
- HARDISON, J. L.; WRIGHTSMAN, R. A.; CARPENTER, P. M.; KUZIEL, W. A.; LANE, T. E.; MANNING, J. E. The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.** 1(74):135-143, 2006.
- HAYASHI, R.; YAMASHITA, N.; MATSUI, S.; FUJITA, T.; ARAYA, J.; SASSA, K.; ARAI, N.; YOSHIDA, Y.; KASHII, T.; MARUYAMA, M.; SUGIYAMA, E.; KOBAYASHI, M. Bradykinin stimulates IL-6 and IL-8 production by human lung fibroblasts through ERK- and p38 MAPK-dependent mechanisms. **Eur Respir J.** 3(16):452-458, 2000.
- HEATH, W. R.; BELZ, G. T.; BEHRENS, G. M.; SMITH, C. M.; FOREHAN, S. P.; PARISH, I. A.; DAVEY, G. M.; WILSON, N. S.; CARBONE, F. R.; VILLADANGOS, J. A. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. **Immunol Rev.** (199):9-26, 2004.
- HEM, S. L.; JOHNSTON, C. T.; HOGENESCH, H. Imject Alum is not aluminum hydroxide adjuvant or aluminum phosphate adjuvant. **Vaccine** 27(25):4985-4986, 2007.



- HOFT, D. F.; LYNCH, R. G.; KIRCHHOFF, L. V. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.** 12(151):7038-7047, 1993.
- HUANG, D.; CAI, D. T.; CHUA, R. Y.; KEMENY, D. M.; WONG, S. H. Nitric-oxide synthase 2 interacts with CD74 and inhibits its cleavage by caspase during dendritic cell development. **J Biol Chem.** 3(283):1713-1722, 2008.
- IGIC, R. & BEHNIA, R. Properties and distribution of angiotensin I converting enzyme. **Curr Pharm Des.** 9(9):697-706, 2003.
- IMAMURA, T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. **J Periodontol.** 1(74):111-118, 2003.
- INABA, K.; TURLEY, S.; YAMAIDE, F.; IYODA, T.; MAHNKE, K.; INABA, M.; PACK, M.; SUBKLEWE, M.; SAUTER, B.; SHEFF, D.; ALBERT, M.; BHARDWAJ, N.; MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. **J Exp Med.** 11(188):2163-2173, 1998.
- JASPARD, E.; WEI, L.; ALHENC-GELAS, F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. **J Biol Chem.** 13(268):9496-9503, 1993.
- JIANG, D.; LIANG, J.; FAN, J.; YU, S.; CHEN, S.; LUO, Y.; PRESTWICH, G. D.; MASCARENHAS, M. M.; GARG, H. G.; QUINN, D. A.; HOMER, R. J.; GOLDSTEIN, D. R.; BUCALA, R.; LEE, P. J.; MEDZHITOV, R.; NOBLE, P. W. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. **Nat Med.** 11(11):1173-1179, 2005.
- JOFFRE, O.; NOLTE, M. A.; SPORRI, R.; REIS E SOUSA, C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. **Immunol Rev.** 1(227):234-247, 2009.
- JOHNSON, G. B.; BRUNN, G. J.; KODAIRA, Y.; PLATT, J. L. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. **J Immunol.** 10(168):5233-5239, 2002.
- JOHNSON, L. A.; CLASPER, S.; HOLT, A. P.; LALOR, P. F.; BABAN, D.; JACKSON, D. G. An inflammation-induced mechanism for leukocyte transmigration across lymphatic vessel endothelium. **J Exp Med.** 12(203):2763-2777, 2006.
- JORDAN, M. B.; MILLS, D. M.; KAPPLER, J.; MARRACK, P.; CAMBIER, J. C. Promotion of B cell immune responses via an alum-induced myeloid cell population. **Science** 5678(304):1808-1810, 2004.
- KAECH, S. M.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. **Nat Rev Immunol.** 4(2):251-262, 2002.
- KLINMAN, D. M.; KLASCHIK, S.; SATO, T.; TROSS, D. CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. **Adv Drug Deliv Rev.** 3(61):248-255, 2009.
- KOOL, M.; PETRILLI, V.; DE SMEDT, T.; ROLAZ, A.; HAMMAD, H.; VAN NIMWEGEN, M.; BERGEN, I. M.; CASTILLO, R.; LAMBRECHT, B. N.; TSCHOPP, J. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. **J Immunol.** 6(181):3755-3759, 2008.

- LA SALA, A.; FERRARI, D.; CORINTI, S.; CAVANI, A.; DI VIRGILIO, F.; GIROLOMONI, G. Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. **J Immunol.** 3(166):1611-1617, 2001.
- LEEB-LUNDBERG, L. M.; MARCEAU, F.; MULLER-ESTERL, W.; PETTIBONE, D. J.; ZURAW, B. L. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol Rev.** 1(57):27-77, 2005.
- LEVIN, Y.; SKIDGEL, R. A.; ERDOS, E. G. Isolation and characterization of the subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase 1). **Proc Natl Acad Sci U S A.** 15(79):4618-4622, 1982.
- LI, H.; WILLINGHAM, S. B.; TING, J. P.; RE, F. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. **J Immunol.** 1(181):17-21, 2008.
- LIMA, A. P.; DOS REIS, F. C.; SERVEAU, C.; LALMANACH, G.; JULIANO, L.; MENARD, R.; VERNET, T.; THOMAS, D. Y.; STORER, A. C.; SCHARFSTEIN, J. Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. **Mol Biochem Parasitol.** 1(114):41-52, 2001.
- LO, J.; PENG, R. H.; BARKER, T.; XIA, C. Q.; CLARE-SALZLER, M. J. Peptide-pulsed immature dendritic cells reduce response to beta cell target antigens and protect NOD recipients from type I diabetes. **Ann N Y Acad Sci.** (1079):153-156, 2006.
- LOW, H. P.; SANTOS, M. A.; WIZEL, B.; TARLETON, R. L. Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8<sup>+</sup> CTL. **J Immunol.** 4(160):1817-1823, 1998.
- MACHADO, F. S.; KOYAMA, N. S.; CARREGARO, V.; FERREIRA, B. R.; MILANEZI, C. M.; TEIXEIRA, M. M.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Infect Dis.** 4(191):627-636, 2005.
- MANNHALTER, J. W.; NEYCHEV, H. O.; ZLABINGER, G. J.; AHMAD, R.; EIBL, M. M. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. **Clin Exp Immunol.** 1(61):143-151, 1985.
- MARCEAU, F. & BACHVAROV, D. R. Kinin receptors. **Clin Rev Allergy Immunol.** 4(16):385-401, 1998.
- MARCEAU, F.; HESS, J. F.; BACHVAROV, D. R. The B1 receptors for kinins. **Pharmacol Rev.** 3(50):357-386, 1998.
- MARTIN, D. L.; WEATHERLY, D. B.; LAUCELLA, S. A.; CABINIAN, M. A.; CRIM, M. T.; SULLIVAN, S.; HEIGES, M.; CRAVEN, S. H.; ROSENBERG, C. S.; COLLINS, M. H.; SETTE, A.; POSTAN, M.; TARLETON, R. L. CD8<sup>+</sup> T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. **PLoS Pathog.** 8(2):e77, 2006.
- MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu Rev Immunol.** (27):229-265, 2009.
- MARTINON, F.; PETRILLI, V.; MAYOR, A.; TARDIVEL, A.; TSCHOPP, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature** 7081(440):237-241, 2006.

- MATA-HARO, V.; CEKIC, C.; MARTIN, M.; CHILTON, P. M.; CASELLA, C. R.; MITCHELL, T. C. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. **Science** 5831(316):1628-1632, 2007.
- MATZINGER, P. Tolerance, danger, and the extended family. **Annu Rev Immunol.** (12):991-1045, 1994.
- MATZINGER, P. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? **Nat Immunol.** 1(8):11-13, 2007.
- MERCADO, R.; VIJH, S.; ALLEN, S. E.; KERKSIEK, K.; PILIP, I. M.; PAMER, E. G. Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. **J Immunol.** 12(165):6833-6839, 2000.
- MERKULOV, S.; ZHANG, W. M.; KOMAR, A. A.; SCHMAIER, A. H.; BARNES, E.; ZHOU, Y.; LU, X.; IWAKI, T.; CASTELLINO, F. J.; LUO, G.; MCCRAE, K. R. Deletion of murine kininogen gene 1 (mKng1) causes loss of plasma kininogen and delays thrombosis. **Blood** 3(111):1274-1281, 2008.
- MILLER, M. J.; HEJAZI, A. S.; WEI, S. H.; CAHALAN, M. D.; 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 U S A.** 4(101):998-1003, 2004.
- MOLL, H. & ROLLINGHOFF, M. Resistance to murine cutaneous leishmaniasis is mediated by TH1 cells, but disease-promoting CD4<sup>+</sup> cells are different from TH2 cells. **Eur J Immunol.** 9(20):2067-2074, 1990.
- MONTEIRO, A. C.; SCHMITZ, V.; SVENSJO, E.; GAZZINELLI, R. T.; ALMEIDA, I. C.; TODOROV, A.; DE ARRUDA, L. B.; TORRECILHAS, A. C.; PESQUERO, J. B.; MORROT, A.; BOUSKELA, E.; BONOMO, A.; LIMA, A. P.; MULLER-ESTERL, W.; SCHARFSTEIN, J. Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.** 9(177):6325-6335, 2006.
- MONTEIRO, A. C.; SCHMITZ, V.; MORROT, A.; DE ARRUDA, L. B.; NAGAJYOTHI, F.; GRANATO, A.; PESQUERO, J. B.; MULLER-ESTERL, W.; TANOWITZ, H. B.; SCHARFSTEIN, J. Bradykinin B2 Receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by *Trypanosoma cruzi*, are critical for the development of protective type-1 responses. **PLoS Pathog.** 11(3):e185, 2007.
- MONTEIRO, A. C.; SCOVINO, A.; RAPOSO, S.; GAZE, V. M.; CRUZ, C.; SVENSJO, E.; NARCISO, M. S.; COLOMBO, A. P.; PESQUERO, J. B.; FERES-FILHO, E.; NGUYEN, K. A.; SROKA, A.; POTEPA, J.; SCHARFSTEIN, J. Kinin danger signals proteolytically released by gingipain induce Fimbriae-specific IFN-gamma- and IL-17-producing T cells in mice infected intramucosally with *Porphyromonas gingivalis*. **J Immunol.** 6(183):3700-3711, 2009.
- MOSCA, F.; TRITTO, E.; MUZZI, A.; MONACI, E.; BAGNOLI, F.; IAVARONE, C.; O'HAGAN, D.; RAPPUOLI, R.; DE GREGORIO, E. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 30(105):10501-10506, 2008.
- MURPHY, K. M. & REINER, S. L. The lineage decisions of helper T cells. **Nat Rev Immunol.** 12(2):933-944, 2002.
- NAIM, J. O.; VAN OSS, C. J.; WU, W.; GIESE, R. F.; NICKERSON, P. A. Mechanisms of adjuvancy: I-Metal oxides as adjuvants. **Vaccine** 11(15):1183-1193, 1997.

NISHIZUKA, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. **Science** 5082(258):607-614, 1992.

Notificação do Depósito do Pedido de Patente PI 0303510-7 depositada em 15/09/2003, em nome da UFRJ (inventores JULIO SCHARFSTEIN - UFRJ e JOÃO VIOLA - INCA). “Composições imunogênicas e método para estimular uma resposta imune.” INPI - RPI 1720 de 23/12/2003.

OHL, L.; MOHAUPT, M.; CZELOTH, N.; HINTZEN, G.; KIAFARD, Z.; ZWIRNER, J.; BLANKENSTEIN, T.; HENNING, G.; FORSTER, R. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. **Immunity** 2(21):279-288, 2004.

OLIVEIRA, A. C.; DE ALENCAR, B. C.; TZELEPIS, F.; KLEZEWSKY, W.; DA SILVA, R. N.; NEVES, F. S.; CAVALCANTI, G. S.; BOSCARDIN, S.; NUNES, M. P.; SANTIAGO, M. F.; NOBREGA, A.; RODRIGUES, M. M.; BELLIO, M. Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8<sup>+</sup> T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice. **PLoS Pathog.** 4(6):e1000870, 2010.

PAN, Z. K.; ZURAW, B. L.; LUNG, C. C.; PROSSNITZ, E. R.; BROWNING, D. D.; YE, R. D. Bradykinin stimulates NF-kappaB activation and interleukin 1beta gene expression in cultured human fibroblasts. **J Clin Invest.** 9(98):2042-2049, 1996.

PAOLUCCI, C.; BURASTERO, S. E.; ROVERE-QUERINI, P.; DE PALMA, C.; FALCONE, S.; PERROTTA, C.; CAPOBIANCO, A.; MANFREDI, A. A.; CLEMENTI, E. Synergism of nitric oxide and maturation signals on human dendritic cells occurs through a cyclic GMP-dependent pathway. **J Leukoc Biol.** 2(73):253-262, 2003.

PERRIGOU, J. G.; SAENZ, S. A.; SIRACUSA, M. C.; ALLENSPACH, E. J.; TAYLOR, B. C.; GIACOMIN, P. R.; NAIR, M. G.; DU, Y.; ZAPH, C.; VAN ROOIJEN, N.; COMEAU, M. R.; PEARCE, E. J.; LAUFER, T. M.; ARTIS, D. MHC class II-dependent basophil-CD4<sup>+</sup> T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. **Nat Immunol.** 7(10):697-705, 2009.

PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; HEPPENSTALL, P. A.; STUCKY, C. L.; SILVA, J. A., JR.; WALTHER, T.; OLIVEIRA, S. M.; PESQUERO, J. L.; PAIVA, A. C.; CALIXTO, J. B.; LEWIN, G. R.; BADER, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 14(97):8140-8145, 2000.

PHAGOO, S. B.; POOLE, S.; LEEB-LUNDBERG, L. M. Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. **Mol Pharmacol.** 2(56):325-333, 1999.

PRLIC, M.; HERNANDEZ-HOYOS, G.; BEVAN, M. J. Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8<sup>+</sup> T cell response. **J Exp Med.** 9(203):2135-2143, 2006.

PRLIC, M.; WILLIAMS, M. A.; BEVAN, M. J. Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. **Curr Opin Immunol.** 3(19):315-319, 2007.

PULENDRAN, B.; TANG, H.; DENNING, T. L. Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. **Curr Opin Immunol.** 1(20):61-67, 2008.

REIS E SOUSA, C. Dendritic cells in a mature age. **Nat Rev Immunol.** 6(6):476-483, 2006.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat Immunol.** 9(11):785-797, 2010.

- ROBINSON, M. J.; OSORIO, F.; ROSAS, M.; FREITAS, R. P.; SCHWEIGHOFFER, E.; GROSS, O.; VERBEEK, J. S.; RULAND, J.; TYBULEWICZ, V.; BROWN, G. D.; MOITA, L. F.; TAYLOR, P. R.; REIS E SOUSA, C. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. **J Exp Med.** 9(206):2037-2051, 2009.
- ROCHA, E. S. M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am J Physiol.** 2(156):261-273, 1949.
- ROSENBERG, C. S.; MARTIN, D. L.; TARLETON, R. L. CD8<sup>+</sup> T cells specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of *Trypanosoma cruzi* infection but are not required for resistance. **J Immunol.** 1(185):560-568, 2010.
- SAITO, T.; HIRAI, R.; LOO, Y. M.; OWEN, D.; JOHNSON, C. L.; SINHA, S. C.; AKIRA, S.; FUJITA, T.; GALE, M., JR. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2(104):582-587, 2007.
- SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ONO, M. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell** 5(133):775-787, 2008.
- SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Annu Rev Immunol.** (22):745-763, 2004.
- SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; SVENSJO, E.; GRANATO, A.; MONTEIRO, A. C. Kininogens coordinate adaptive immunity through the proteolytic release of bradykinin, an endogenous danger signal driving dendritic cell maturation. **Scand J Immunol.** 2-3(66):128-136, 2007.
- SCHMITZ, V.; SVENSJO, E.; SERRA, R. R.; TEIXEIRA, M. M.; SCHARFSTEIN, J. Proteolytic generation of kinins in tissues infected by *Trypanosoma cruzi* depends on CXC chemokine secretion by macrophages activated via Toll-like 2 receptors. **J Leukoc Biol.** 6(85):1005-1014, 2009.
- SCHNURR, M.; THEN, F.; GALAMBOS, P.; SCHOLZ, C.; SIEGMUND, B.; ENDRES, S.; EIGLER, A. Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. **J Immunol.** 8(165):4704-4709, 2000.
- SCOTT, P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **J Immunol.** 9(147):3149-3155, 1991.
- SEMMLING, V.; LUKACS-KORNEK, V.; THAISS, C. A.; QUAST, T.; HOCHHEISER, K.; PANZER, U.; ROSSJOHN, J.; PERLMUTTER, P.; CAO, J.; GODFREY, D. I.; SAVAGE, P. B.; KNOLLE, P. A.; KOLANUS, W.; FORSTER, I.; KURTS, C. Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. **Nat Immunol.** 4(11):313-320, 2010.
- SEUBERT, A.; MONACI, E.; PIZZA, M.; O'HAGAN, D. T.; WACK, A. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. **J Immunol.** 8(180):5402-5412, 2008.
- SHAH, J. A.; DARRAH, P. A.; AMBROZAK, D. R.; TURON, T. N.; MENDEZ, S.; KIRMAN, J.; WU, C. Y.; GLAICHENHAUS, N.; SEDER, R. A. Dendritic cells are responsible for the capacity of CpG oligodeoxynucleotides to act as an adjuvant for protective vaccine immunity against *Leishmania major* in mice. **J Exp Med.** 2(198):281-291, 2003.
- SHI, Y.; EVANS, J. E.; ROCK, K. L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. **Nature** 6957(425):516-521, 2003.

SHORTMAN, K. & NAIK, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. **Nat Rev Immunol.** 1(7):19-30, 2007.

Site do Jackson Laboratory: [www.jax.org](http://www.jax.org)

SOKOL, C. L.; CHU, N. Q.; YU, S.; NISH, S. A.; LAUFER, T. M.; MEDZHITOV, R. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. **Nat Immunol.** 7(10):713-720, 2009.

SOKOLOVSKA, A.; HEM, S. L.; HOGENESCH, H. Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. **Vaccine** 23(25):4575-4585, 2007.

SWARTZ, M. A.; HUBBELL, J. A.; REDDY, S. T. Lymphatic drainage function and its immunological implications: from dendritic cell homing to vaccine design. **Semin Immunol.** 2(20):147-156, 2008.

THIEU, V. T.; YU, Q.; CHANG, H. C.; YEH, N.; NGUYEN, E. T.; SEHRA, S.; KAPLAN, M. H. Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. **Immunity** 5(29):679-690, 2008.

TORRECILHAS, A. C.; FAQUIM-MAURO, E.; DA SILVA, A. V.; ABRAHAMSOHN, I. A. Interference of natural mouse hepatitis virus infection with cytokine production and susceptibility to *Trypanosoma cruzi*. **Immunology** 3(96):381-388, 1999.

TRISCHMANN, T. M. *Trypanosoma cruzi*: early parasite proliferation and host resistance in inbred strains of mice. **Exp Parasitol.** 2(62):194-201, 1986.

TZELEPIS, F.; DE ALENCAR, B. C.; PENIDO, M. L.; CLASER, C.; MACHADO, A. V.; BRUNA-ROMERO, O.; GAZZINELLI, R. T.; RODRIGUES, M. M. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8<sup>+</sup> T cells leading to immunodominance. **J Immunol.** 3(180):1737-1748, 2008.

ULRICH, J. T. & MYERS, K. R. Monophosphoryl lipid A as an adjuvant. Past experiences and new directions. **Pharm Biotechnol.** (6):495-524, 1995.

VERINAUD, L.; DA CRUZ-HOFLING, M. A.; SAKURADA, J. K.; RANGEL, H. A.; VASSALLO, J.; WAKELIN, D.; SEWELL, H. F.; CAMARGO, I. J. Immunodepression induced by *Trypanosoma cruzi* and mouse hepatitis virus type 3 is associated with thymus apoptosis. **Clin Diagn Lab Immunol.** 2(5):186-191, 1998.

VILLADANGOS, J. A. & HEATH, W. R. Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm. **Semin Immunol.** 4(17):262-272, 2005.

WADE, C. M. & DALY, M. J. Genetic variation in laboratory mice. **Nat Genet.** 11(37):1175-1180, 2005.

WALES, J.; FOXWELL, B.; FELDMANN, M. Targeting intracellular signaling: a novel approach to vaccination. **Expert Rev Vaccines** 6(6):971-980, 2007.

## 7 ANEXO

### Fase I

Nosso grupo descreveu recentemente que o desenvolvimento de células T CD8<sup>+</sup> efetoras do tipo-1 em camundongos resistentes à infecção pelo *T. cruzi* é dependente da maturação de células dendríticas (DCs) pela bradicinina (BK) (MONTEIRO *et al.*, 2007). A partir desses resultados, começamos a investigar a possibilidade de empregar a BK sintética como adjuvante na vacinação contra a infecção pelo *T. cruzi*, suplementando formulações vacinais baseadas em alum. Para isso, camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea com formulações contendo alum, BK sintética e extrato solúvel de epimastigotas como fonte de antígeno (Fig. 1A, Anexo I). Os animais imunizados receberam um reforço 14 dias depois, seguindo as mesmas condições da imunização inicial. Quando indicado, os animais foram pré-tratados com uma dose única de inibidor da ECA (captopril) e/ou antagonista de B<sub>2</sub>R (HOE-140) 1 h antes da imunização/reforço, e 14 dias após o reforço foram desafiados com uma dose letal de TCTs (cepa Dm28c) por via intraperitoneal. Os resultados iniciais demonstraram que os animais imunizados/re-imunizados com [Alum/Ag/BK] são suscetíveis à infecção letal pelo parasita (Fig. 1B, Anexo I). Por sua vez, os animais pré-tratados com captopril e imunizados com [Alum/Ag/BK] foram capazes de resistir à infecção (Fig. 1B, Anexo I). Valorizando os resultados de vacinação obtidos no modelo de infecção pelo *T. cruzi*, experimentos realizados independentemente no Departamento de Virologia da USP (Nível 3 de Biossegurança - P3) mostraram resultados muito semelhantes no modelo de infecção pelo vírus Rocio, causador da encefalite aguda (COIMBRA *et al.*, 2008). Os dados preliminares, obtidos em colaboração com o Prof. Benedito da Fonseca e Rafael França, mostram que a imunização de camundongos BALB/c com esquema completo Cap + [Alum/Ag/BK] confere proteção a cerca de 80% dos animais

imunizados, em contraste com o índice de sobrevivência de 50% no grupo de animais que não foi pré-tratado com captopril (Fig. 2B, Anexo I). Além disso, acreditamos que o mecanismo de proteção neste caso seja parcialmente dependente de B<sub>2</sub>R, já que o pré-tratamento com HOE-140 não abole completamente os efeitos protetores do esquema vacinal (Fig. 2B, Anexo I). Esses resultados indicam que o pré-tratamento com captopril é essencial para sobrevivência dos animais imunizados/infectados, em ambos os modelos de estudo.

Apesar da suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi* observada nos camundongos imunizados com [Alum/Ag/BK], eles apresentaram mudança do isotipo de imunoglobulinas (IgG1 → IgG2a) de maneira dependente de B<sub>2</sub>R (Fig. 3, Anexo I), além da alta produção de IFN- $\gamma$  pelas células do baço e do linfonodo, mediante estímulo com Ag *in vitro* (Fig. 4A, Anexo I). É importante ressaltar que não há diferenças estatísticas nos níveis de anticorpos e IFN- $\gamma$  avaliados entre os animais imunizados e pré-tratados ou não com captopril. Em contraste com o perfil de secreção de IFN- $\gamma$ , os esquemas de imunização não modularam os níveis de secreção de citocinas do tipo-2, uma vez que os níveis de IL-13 produzidos pelas células de animais imunizados foram similares aos dos controles (Fig. 4B, Anexo I), enquanto a produção de IL-4 não foi detectada nestas condições (dados não mostrados).

Em seguida, analisamos a contribuição relativa de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> derivadas do baço de animais imunizados/infectados, conforme descrito anteriormente, para a produção de IFN- $\gamma$  após estímulo *in vitro*. Observamos que os animais imunizados com [Alum/Ag/BK], pré-tratados ou não com captopril, foram capazes de gerar altas frequências de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , embora a proporção de células T CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> tenha sido um pouco menor no grupo imunizado que não recebeu Cap (Fig. 5, Anexo I). Observamos ainda que linfócios de linfonodo drenante (LD) provenientes de animais imunizados com [Alum/Ag/BK], pré-tratados ou não com Cap, produziram níveis semelhantes de IFN- $\gamma$ , mobilizando em ambos os casos a via B<sub>2</sub>R-dependente (Fig. 6A, Anexo I). Em síntese,



concluimos que o esquema de imunização/reforço com [Alum/Ag/BK] foi suficiente para direcionar a resposta  $T_H$  para o perfil tipo-1, ainda que isso não se traduzisse em proteção contra o desafio letal.

Uma observação importante surgiu quando passamos a analisar o perfil de resposta no tecido cardíaco dos animais imunizados e desafiados. Os resultados mostrados na figura 6B mostram que apenas as células T  $CD8^+$  derivadas de animais imunizados com esquema completo [Cap + Alum/Ag/BK] são capazes de produzir IFN- $\gamma$  (Fig. 6B, Anexo I), apresentando também maior expressão de marcadores de ativação/memória (CD44 e CD69 – Fig. 6C, Anexo I). Observamos, ainda, que células T isoladas de LD de camundongos imunizados com esquema completo [Cap + Alum/Ag/BK] tem expressão aumentada de CD44 e CD69, mesmo antes da infecção (Fig. 7, Anexo I). É importante ressaltar que o único fenótipo discrepante encontrado entre os grupos imunizados/infectados, com ou sem administração prévia de Cap, foi a presença de células IFN- $\gamma^+$  no coração.

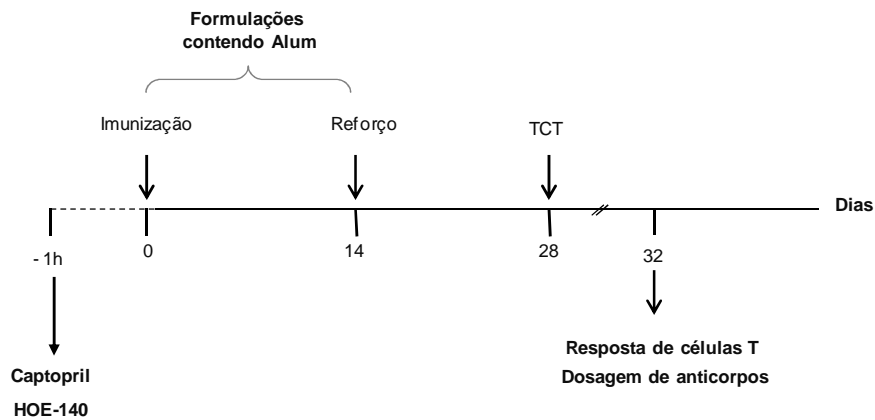
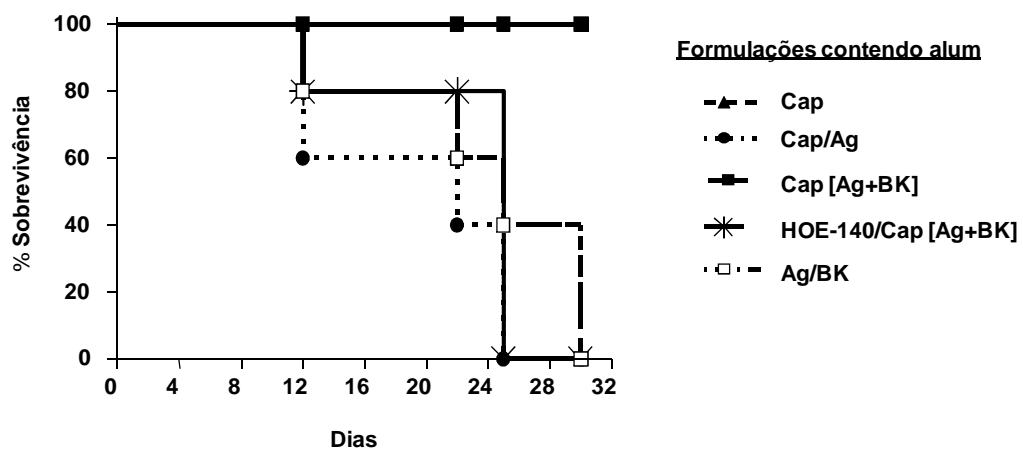
Um dos achados mais interessantes desta fase do projeto foi a observação de que a proteção dos animais imunizados requer obrigatoriamente a administração prévia de captopril tanto na fase de imunização quanto na de reforço. Na figura 8 observa-se que a omissão de Cap em qualquer uma destas etapas acarreta na morte dos animais desafiados (Fig. 8, Anexo I). Além disso, observam-se altos níveis de produção de IFN- $\gamma$  por células T Ag-específicas do LD (Fig. 8, Anexo I). Uma vez que a administração de Cap se mostrou indispensável para a proteção dos animais imunizados, realizamos experimentos adicionais na tentativa de incluir o Cap na formulação vacinal, dispensando a injeção sistêmica deste inibidor 1 h antes da imunização. Surpreendentemente, a administração de captopril local, aplicada por via subcutânea em solução com a formulação [Alum/Ag/BK], não foi capaz de proteger os camundongos imunizados/re-imunizados do desafio letal, e isso se refletiu na menor produção de IFN- $\gamma$  por células de LD isoladas destes animais (dados não mostrados).

Experimentos de transferência adotiva de células T confirmaram que a proteção de animais vacinados com [Cap + Alum/Ag/BK] é dependente de linfócitos T CD8<sup>+</sup> efetores/memória. A transferência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> provenientes de animais imunizados com esquema completo não foi capaz de proteger os camundongos *naive* contra o desafio (Fig. 9, Anexo I). Em contraste, os animais que receberam células T CD8, ou T CD8/T CD4, de animais imunizados com [Cap + Alum/Ag/BK] geraram células T antígeno-específicas produtoras de IFN- $\gamma$  e foram capazes de resistir à infecção (Fig. 9, Anexo I). Concluímos que esta proteção ocorre de maneira B<sub>2</sub>R-dependente, já que as células provenientes de doadores imunizados com esquema completo e pré-tratados com HOE-140 não protegem os animais recipientes (Fig. 9, Anexo I).

A seguir, investigamos o papel da enzima óxido nítrico (NO) sintase nos mecanismos de imunização de camundongos BALB/c. Para isso, os animais foram imunizados/re-imunizados com esquema completo [Cap + Alum/Ag/BK] e, apenas na fase de reforço, foram pré-tratados com um inibidor de NO sintase (7-Nitroindazol) (Fig. 10, Anexo I). Nossos dados apontam uma importante participação desta enzima na proteção induzida pelo esquema vacinal otimizado, uma vez que esse grupo de animais apresentou menor produção de IFN- $\gamma$  por células T de LD e suscetibilidade à infecção letal (Fig. 10, Anexo I). De maneira semelhante, observamos que os animais imunizados com esquema completo e tratados com indometacina – um inibidor não-seletivo de ciclooxigenase (COX) 1 e 2 – se tornaram suscetíveis ao desafio letal, sugerindo que as prostaglandinas sintetizadas por essas enzimas podem ter uma função ainda não explorada nos mecanismos de proteção induzido pelo esquema vacinal otimizado (dados não mostrados).

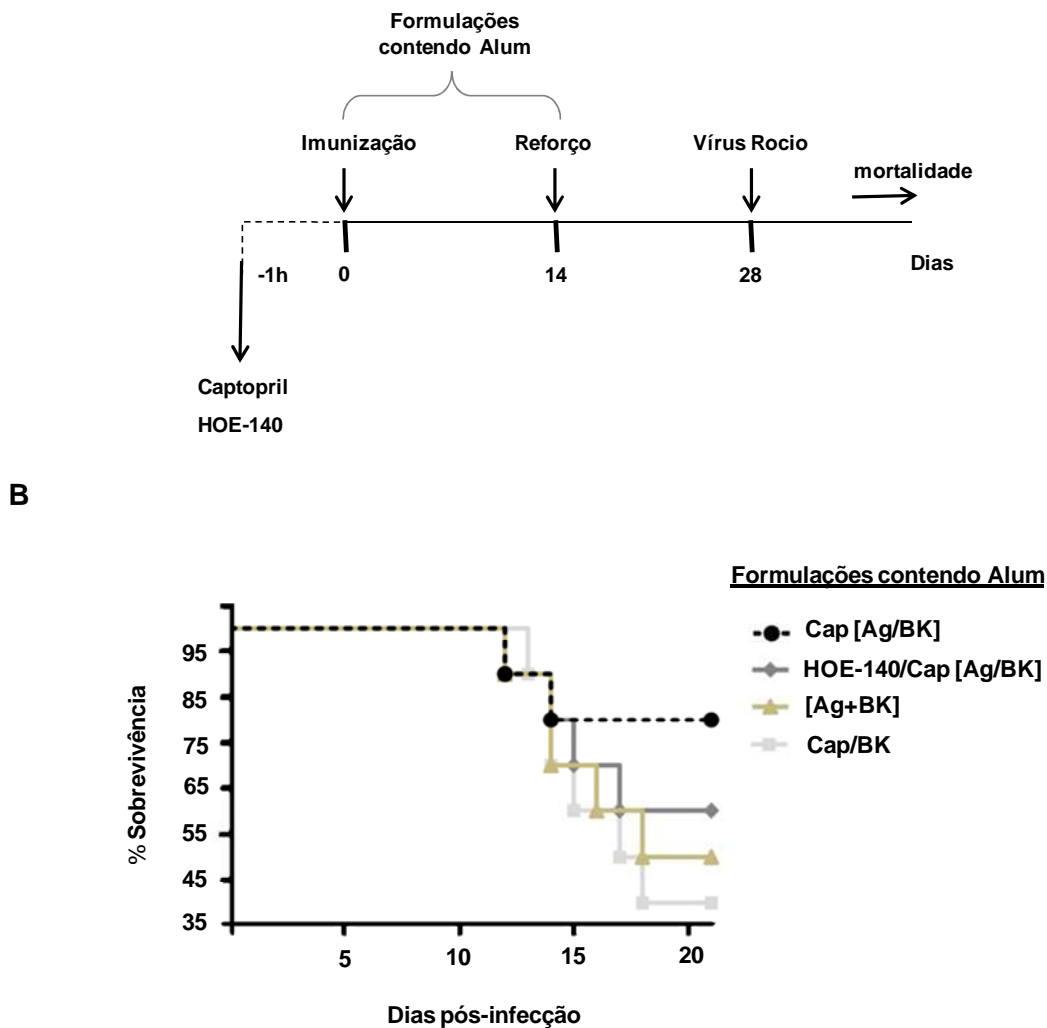
Em conjunto, os resultados da primeira fase deste projeto sugerem que a BK sintética pode ser utilizada como adjuvante vacinal contra infecções por patógenos intracelulares, e

que o uso de inibidores da ECA aumenta de maneira significativa a proteção induzida pelo esquema de imunização, dependente de células T CD8 produtoras de IFN-  $\gamma$ .

**Figura 1****A****B**

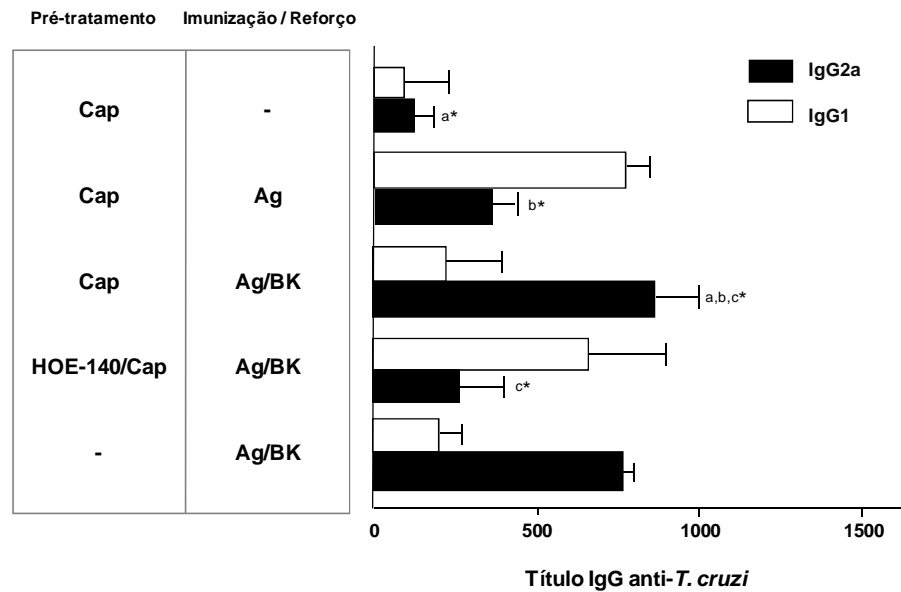
**Figura 1: Captopril aumenta a eficácia vacinal protegendo os camundongos imunizados do desafio letal com *T. cruzi*.** (A) Esquema vacinal: Camundongos BALB/c machos foram pré-tratados ou não com uma dose única de inibidor da ECA (captopril, 10 mg/kg i.p.) 1 h antes da imunização. Quando indicado, os animais foram pré-tratados 1 h antes da imunização com antagonista de B<sub>2</sub>R (HOE-140, 100 µg/kg s.c.). A imunização consistiu na injeção de 100 µl de formulações baseadas em alum, contendo Ag-Epi (50 µg) e BK (10 µg), por via subcutânea na base da cauda. Os camundongos receberam um reforço 14 dias depois, exatamente como feito na primeira imunização. No dia 28, os camundongos controle e imunizados foram desafiados com uma dose letal de TCT Dm28c (2,5 x 10<sup>6</sup>, i.p.). (B) Índice de sobrevivência em camundongos controle e imunizados. A letalidade da infecção foi monitorada diariamente. Todos os camundongos dos grupos suscetíveis estavam mortos dentro de 30 dias de infecção, enquanto 100% dos animais imunizados/re-imunizados com esquema vacinal otimizado sobreviveram pelo menos 4 meses. Os resultados são representativos de 6 experimentos independentes (n=5/grupo).

**Figura 2****A**



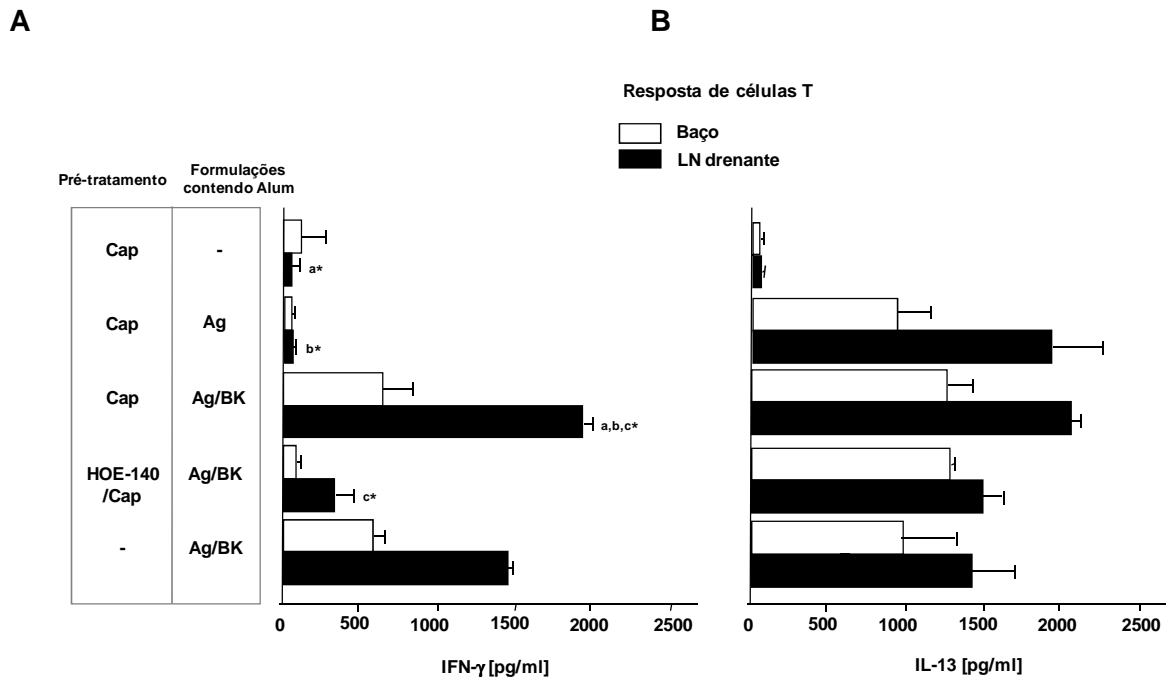
**Figura 2: Pré-tratamento com captopril aumenta a eficácia vacinal protegendo os camundongos imunizados do desafio letal com vírus Rocio.** (A) Esquema vacinal: Camundongos BALB/c machos foram pré-tratados ou não com uma dose única de inibidor da ECA (captopril, 10 mg/kg i.p.) 1 h antes da imunização. Quando indicado, os animais foram pré-tratados 1 h antes da imunização com antagonista de B<sub>2</sub>R (HOE-140, 100 µg/kg s.c.). A imunização consistiu na injeção de 100 µl de formulações baseadas em alum, contendo Ag (extrato fervido de cérebro de camundongos infectados, 100 µg) e BK (10 µg), por via subcutânea na base da cauda. Os camundongos receberam um reforço 14 dias depois, exatamente como feito na primeira imunização. No dia 28, os camundongos controle e imunizados foram desafiados com uma dose letal de vírus Rocio (30LD<sub>50</sub>, i.p.). (B) Índice de sobrevivência em camundongos controle e imunizados. A letalidade da infecção foi monitorada diariamente. Como controle, animais imunizados/re-imunizados com extrato de cérebro de camundongos normais não resistem ao desafio letal (dados não mostrados). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (n=5/grupo).

Figura 3



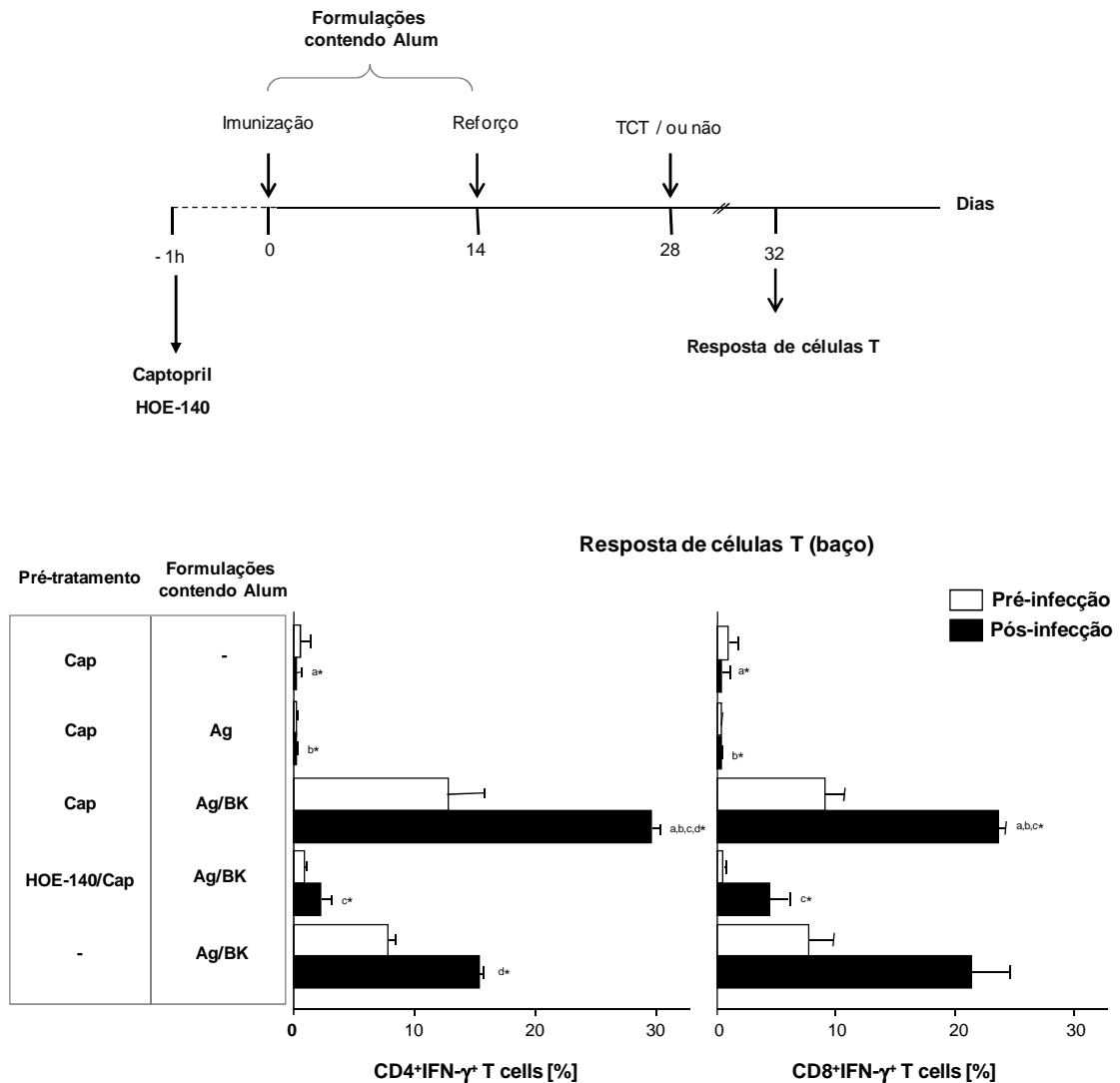
**Figura 3: Mudança de isotipo de anticorpos *T. cruzi*-específicos no soro de camundongos imunizados.** Os níveis de imunoglobulinas (IgG1 e IgG2a) no soro de camundongos imunizados/infectados foram determinados por ELISA, uma semana após a infecção. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes com resultados semelhantes (n=5/grupo). As estatísticas foram feitas por ANOVA e as comparações de pares foram feitas pelo teste de Turkey.

Figura 4



**Figura 4: Produção de citocinas do tipo-1 e tipo-2 por camundongos imunizados.** A análise da produção de citocinas por células T foi realizada uma semana após a infecção, utilizando células de baço ou linfonodo drenante (aórtico). Os ensaios foram realizados através do estímulo de células T por 72 h a 37 °C, na presença ou ausência de Ag-Epi (25  $\mu$ g/ml). Os níveis de IFN- $\gamma$  (**A**) e IL-13 (**B**) secretados no sobrenadante foram determinados por ELISA. Os valores expressam a média  $\pm$  desvio padrão de um experimento representativo com células T de 5 animais/grupo. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. As estatísticas foram feitas por ANOVA e as comparações de pares foram feitas pelo teste de Turkey.

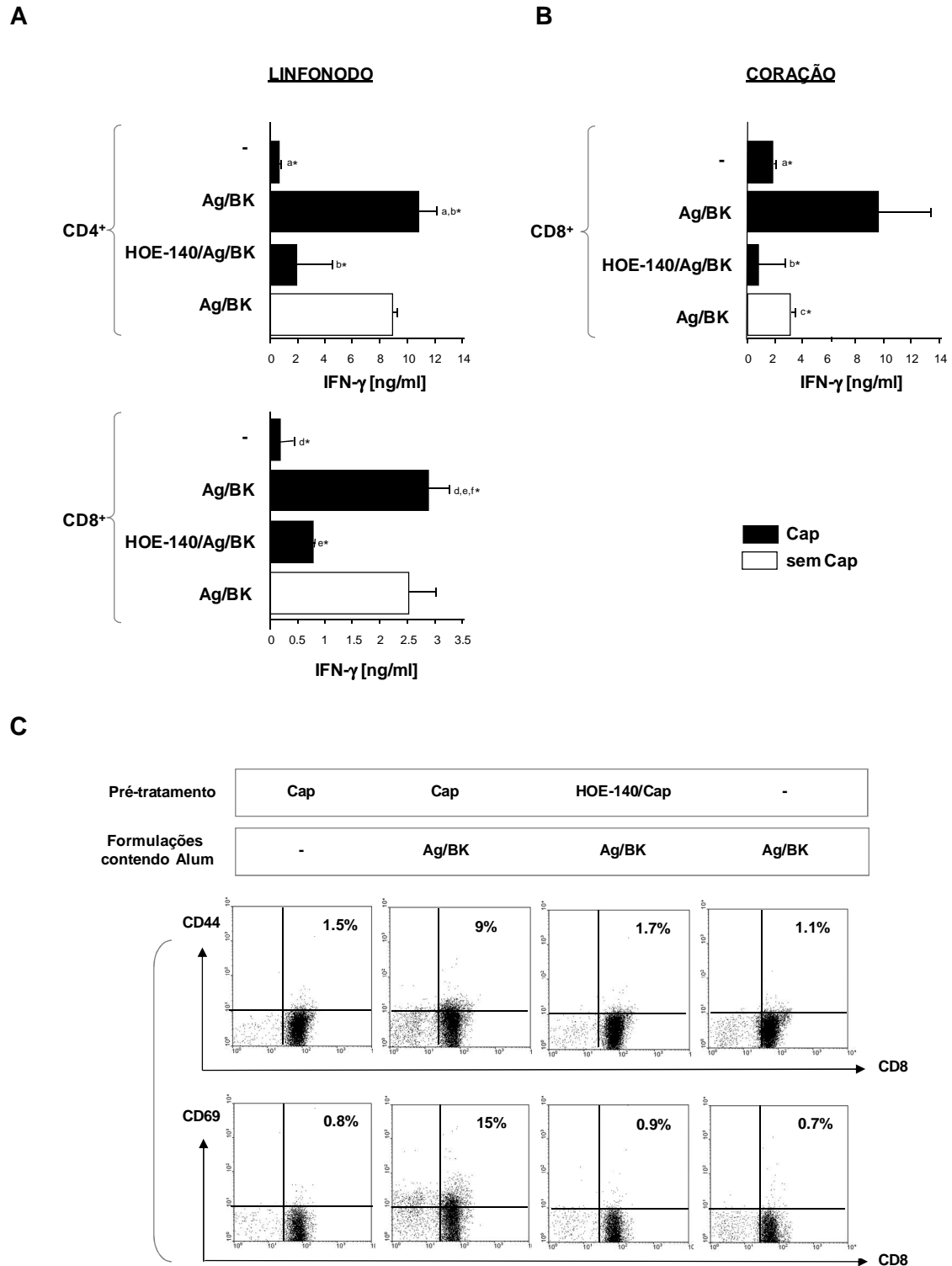
Figura 5



**Figura 5: Aumento da frequência de células T CD4 e CD8 produtoras de IFN- $\gamma$  nos camundongos imunizados.** Células de baço foram retiradas de animais antes ou depois da infecção (7 dias pós-infecção), e estimuladas *in vitro* com PMA e ionomicina por 4h a 37°C. Brefeldina A foi adicionada para bloquear a secreção de proteínas, e as células foram marcadas com anti-CD8, anti-CD4, e anti-IFN- $\gamma$ , e então analisadas utilizando um citômetro FACSCalibur (BD Biosciences). Os valores representam a porcentagem de células T CD4 ou CD8 produtoras de IFN- $\gamma$ . Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes (n=5/grupo).



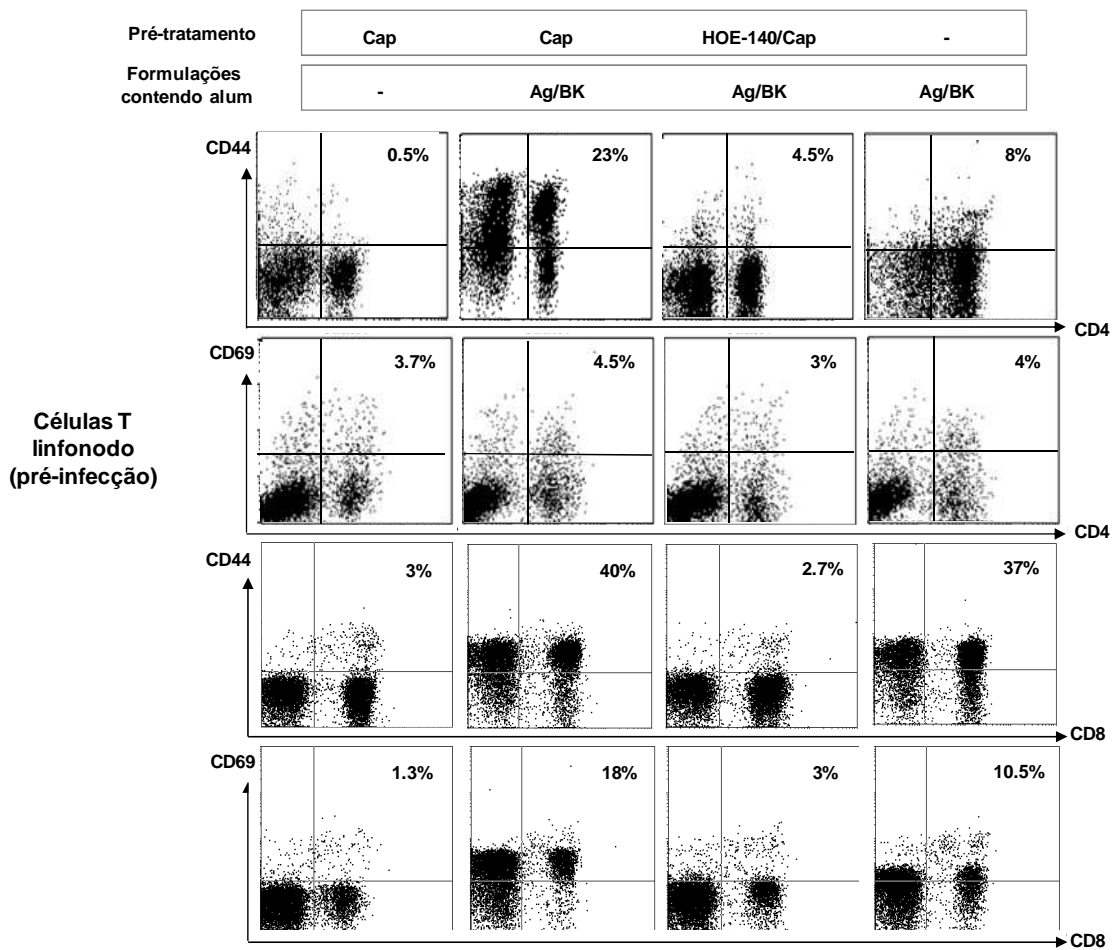
Figura 6



**Figura 6: Presença de células T CD8 antígeno-específicas produtoras de IFN- $\gamma$  no coração de camundongos imunizados com esquema vacinal completo.** Células T CD4 e CD8 foram purificadas de linfonodo drenante (A) ou coração (B) de camundongos BALB/c imunizados/infectados (7 dias pós-infecção) e foram co-cultivados com DCs CD11c<sup>+</sup> pulsadas com Ag-Epi (25  $\mu$ g/ml) por 72h a 37°C. Os sobrenadantes de cultura foram coletados e os níveis de IFN- $\gamma$  foram determinados por

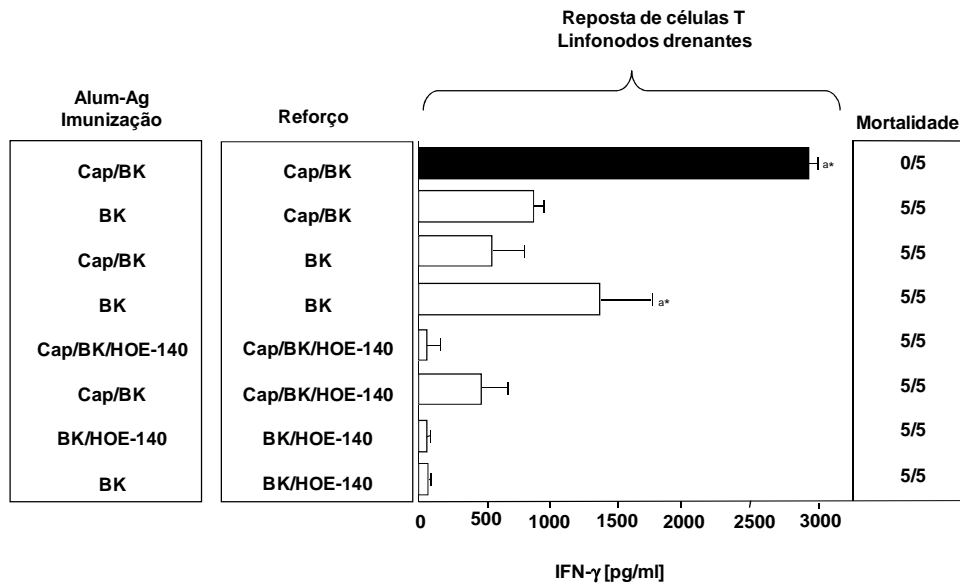
ELISA. Os valores são a média  $\pm$  desvio padrão de um experimento com células individuais de 8 animais/grupo. (C) Análise da expressão de marcadores de ativação na superfície de células T CD8 isoladas do coração de animais imunizados/infectados. As células foram marcadas com anti-CD8, anti-CD44 e anti-CD69, e então analisadas usando um citômetro FACSCalibur (BD Biosciences). Os dados são representativos de dois experimentos independentes (n=8/grupo). Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

**Figura 7**



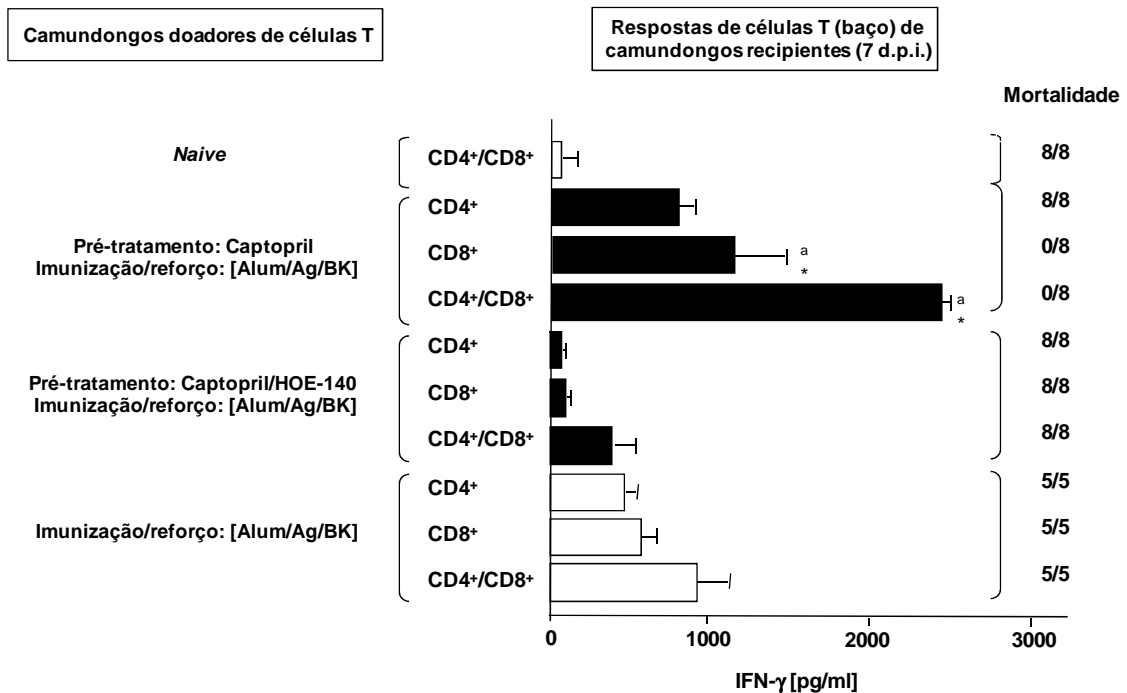
**Figura 7: Células T CD8 do linfonodo de animais imunizados exibem fenótipo ativado.** Análise da expressão de marcadores de ativação na superfície de células T CD4 e CD8 de linfonodo de camundongos BALB/c imunizados e não infectados. As células foram marcadas com anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44 e anti-CD69, e então analisadas usando um citômetro FACSCalibur (BD Biosciences). Os dados são representativos de dois experimentos independentes (n=8/grupo).

Figura 8



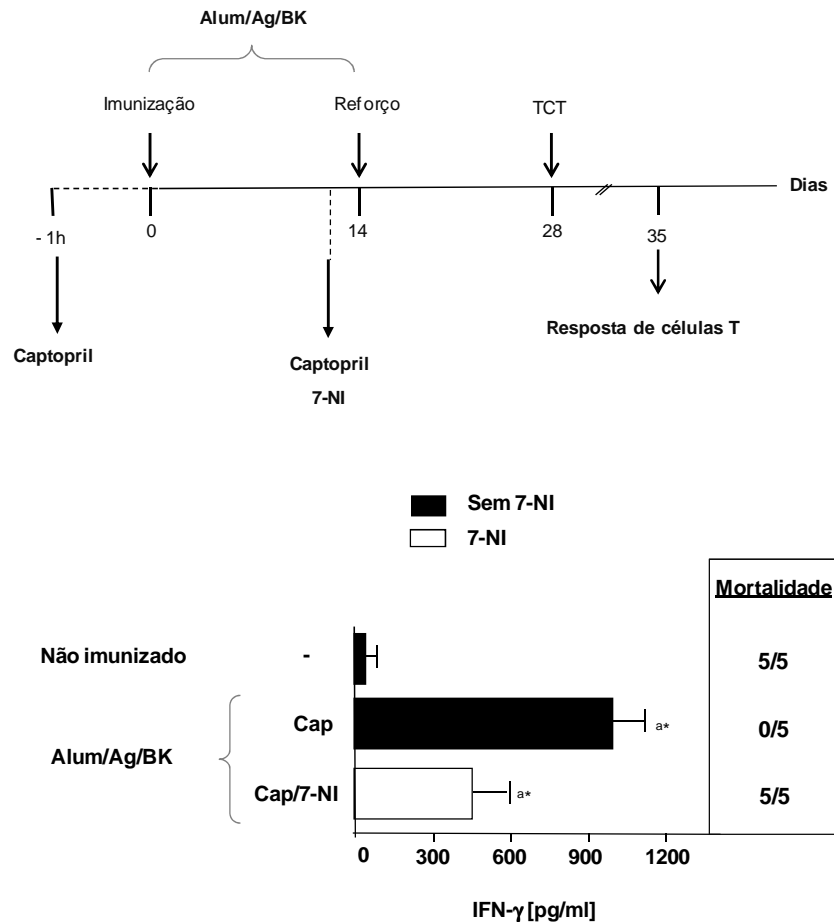
**Figura 8: A eficácia do esquema vacinal otimizado depende do pré-tratamento com captopril antes da segunda imunização.** Diferentes grupos de camundongos BALB/c foram imunizados e re-imunizados, como previamente descrito, com ou sem o pré-tratamento com captopril e/ou HOE-140. Uma semana depois do desafio com *T. cruzi*, os linfonodo aórticos foram retirados e as células foram estimuladas ou não com Ag-Epi (25 µg/ml) por 72 h a 37 °C. Os níveis de IFN-γ nos sobrenadantes de cultura foram determinados por ELISA. Os valores são a média ± desvio padrão de um experimento representativo com células individuais de 5 animais/grupo. As estatísticas foram feitas por ANOVA e as comparações de pares foram feitas pelo teste de Turkey. A sobrevivência dos animais infectados foi monitorada diariamente. Todas as mortes ocorreram até 30 dias pós-infecção. Resultados similares foram obtidos em dois experimentos independentes.

Figura 9



**Figura 9: A transferência adotiva de células T CD8 de animais imunizados confere proteção aos animais recipientes.** Camundongos BALB/c *naive* receberam injeção intravenosa de  $5 \times 10^7$  células T CD8, CD4 ou totais (CD4 e CD8) purificadas de camundongos imunizados com esquema vacinal otimizado. Como controles, os camundongos receberam células T isoladas de (i) camundongos pré-tratados com HOE-140 antes da imunização com esquema completo ou (ii) camundongos que não foram pré-tratados com captopril antes da imunização com esquema completo. Um terceiro grupo de camundongos recipientes recebeu o mesmo número de esplenócitos isolados de BALB/c *naive*. Um dia depois da transferência adotiva de células, os camundongos recipientes foram infectados com  $2,5 \times 10^6$  TCT (i.p.). A avaliação da produção de citocinas por células T do baço dos animais recipientes foi realizada uma semana após a infecção. As células T foram estimuladas ou não com Ag-Epi ( $25 \mu\text{g/ml}$ ) por 72h a  $37^\circ\text{C}$ . Os níveis de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes de cultura foram determinados por ELISA. Os valores são a média  $\pm$  desvio padrão de um experimento representativo com células de 8 animais/grupo. As estatísticas foram feitas por ANOVA e as comparações de pares foram feitas pelo teste de Turkey. A sobrevivência dos animais infectados foi monitorada diariamente. Todas as mortes ocorreram até 30 dias pós-infecção. Resultados similares foram obtidos em dois experimentos independentes.

Figura 10



**Figura 10: Camundongos pré-tratados com inibidor de NO sintase se tornam suscetíveis à infecção letal pelo *T. cruzi*.** Camundongos foram pré-tratados com captopril e imunizados com esquema vacinal completo [Alum/Ag/BK]. Apenas antes do reforço, um dos grupos de animais foi pré-tratado com captopril e com inibidor da NO sintase (7-Nitroindazol [7-NI], 500 µg/kg i.v.) antes da imunização com esquema completo. Uma semana após a infecção, células T do linfonodo drenante foram retiradas e estimuladas ou não com Ag (25 µg/ml) por 72 h a 37 °C. Os níveis de IFN-γ nos sobrenadantes de cultura foram determinados por ELISA. Os valores são a média ± desvio padrão de um experimento representativo com células individuais de 5 animais/grupo. As estatísticas foram feitas por ANOVA e as comparações de pares foram feitas pelo teste de Turkey. A sobrevivência dos animais infectados foi monitorada diariamente. Todas as mortes ocorreram até 30 dias pós-infecção. Resultados similares foram obtidos em dois experimentos independentes.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)