

PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA
DOUTORADO EM MEDICINA/PEDIATRIA

TIAGO FAZOLO

**VACINAÇÃO COM PEPTÍDEO M₂₀₉₋₂₂₃ DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO
(VSR) PROMOVE UMA RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA INFECÇÃO E
REDUZ A INFLAMAÇÃO NO PULMÃO**

Porto Alegre

2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

TIAGO FAZOLO

**VACINAÇÃO COM PEPTÍDEO M₂₀₉₋₂₂₃ DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO
(VSR) PROMOVE UMA RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA INFECÇÃO E
REDUZ A INFLAMAÇÃO NO PULMÃO**

Tese apresentada como requisito para
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de
Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da
Criança da escola de Medicina da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristina Bonorino

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Duarte de Souza

Porto Alegre

2017

Ficha Catalográfica

F287v Fazolo, Tiago

Vacinação com peptídeo M209-223 do vírus sincicial respiratório (VSR) promove uma resposta imune protetora contra infecção e reduz a inflamação no pulmão / Tiago Fazolo . – 2017.

82 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Bonorino.

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Duarte de Souza.

1. vírus sincicial respiratório. 2. peptídeo M209-223. 3. células T CD4+. 4. Células T regulatórias. 5. resposta Th2. I. Bonorino, Cristina. II. de Souza, Ana Paula Duarte. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável: Marcelo Votto Texeira CRB-10/1974

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA
DOUTORADO EM MEDICINA/PEDIATRIA

TIAGO FAZOLO

**VACINAÇÃO COM PEPTÍDEO M₂₀₉₋₂₂₃ DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO
(VSR) PROMOVE UMA RESPOSTA IMUNE PROTETORA CONTRA INFECÇÃO E
REDUZ A INFLAMAÇÃO NO PULMÃO**

Tese apresentada como requisito para
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de
Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da
Criança da escola de Medicina da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Aprovada em: _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Juliano Bordignon – ICC/Fiocruz-PR

Prof. Dr. Luiz Rodrigues – UFCSPA

Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez – PUCRS

Porto Alegre

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pelo ensino de qualidade e a CAPES, a qual tive todo o suporte financeiro. Também agradeço ao Programa de Pós-graduação em Pediatria e Saúde da Criança da PUCRS e ao Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB), pela estrutura física e auxílio acadêmico.

À minha orientadora, Dra. Cristina Bonorino por ter acreditado no meu potencial e aceitado o desafio de ser minha orientadora. Por sempre me incentivar na busca do conhecimento e ter paciência nas horas de dificuldade. Também a seus conhecimentos repassados durante todo desenvolvimento do trabalho, além da grande amizade formada e que perdurará para o resto da vida.

À minha co-orientadora, Dra. Ana Paula Duarte de Souza por sempre ter me dado suporte necessário sempre que precisei. Pelos esclarecimentos e ensinamentos que tive sobre os trabalhos realizados. Pela amizade construída que com certeza ficará eternizada.

Aos Drs. André Báfica e Daniel Mendes por terem disponibilizado a estrutura da UFSC e ensinamentos durante trabalho realizado na Instituição. E também pela amizade que construímos ao longo da jornada.

Ao Dr. Fabio Luiz Dal Moro Maito pela estrutura disponibilizada da Faculdade de odontologia no Laboratório de patologia geral e buco dental. Também agradeço à técnica Janaína Pasetti Nunes do Laboratório de patologia geral e buco dental pela dedicação, paciência e todo auxílio prestado na confecção das lâminas histológicas.

Aos colegas e ex-colegas do IPB e principalmente aos do Laboratório de Imunologia Celular e Imunologia Clínica da PUCRS, pela amizade, paciência, colaboração e troca de experiências ao longo desses anos. Sem a colaboração de todos esse trabalho não seria possível. Quero agradecer em especial ao Rodrigo Benedetti Gassen, Thiago de Jesus Borges, José Eduardo Vargas, Rodrigo Dorneles, Maurício Rigo, Christian Viezzer, Deise do Nascimento Freitas, Ingrid Petroni Ewald e Krist Antunes que de alguma forma fizeram parte da minha vida e levarei comigo estes amigos para sempre.

A minha família, Lydia Onghero Fazolo, Alberto Fazolo e Verena Fazolo, que sempre me deram o suporte e o apoio necessário.

A minha namorada, Juliana Pereto, pelo apoio, dedicação e incentivo para realização desta etapa em minha vida. Pela presença, força e parceria nas horas que mais precisei. Agradeço por você existir em minha vida e fazer dela mais feliz.

Aos meus amigos de Passo Fundo e que fiz em Porto Alegre ao longo desta jornada, que sempre estiveram presentes e dando o apoio necessário nessa caminhada. Agradeço por vocês sempre estarem ao meu lado e saberem que minha ausência e o pouco tempo que estive presente não foi por falta da amizade e sim porque queria alcançar mais um dos meus objetivos. Agradeço por ter a amizade de vocês para sempre.

Quero agradecer em especial Rafael Fernandes Zanin e Samanta Loureiro, dois grandes amigos, que foram os principais responsáveis pela minha vinda a Porto Alegre e concluir esta importante etapa em minha vida. Agradeço muito por vocês existirem em minha vida.

RESUMO

O vírus sincicial respiratório (VSR) é o agente etiológico mais comum nas infecções graves do trato respiratório inferior (TRI) em crianças. As infecções do TRI associada com o VSR são a principal causa de bronquiolite, pneumonia e exacerbação da asma. As TRI causadas pelo VSR são responsáveis pelas altas taxas das hospitalizações relacionadas às doenças respiratórias em todo o mundo, principalmente em crianças menores de dois anos. Atualmente a taxa de mortalidade anual mundial devido às infecções pelo VSR é preocupante e é estimada em aproximadamente duzentas mil crianças. As estratégias de tratamento contra o VSR utilizadas são limitadas. A ribavirina é um fármaco aprovado no uso para infecções pelo VSR, porém sua utilização é limitada devido aos efeitos secundários adversos e aos riscos que representam para os profissionais da saúde que o manipulam. O palivizumabe é um anticorpo monoclonal dirigido contra a glicoproteína F do vírus e sua utilização é apenas como medida profilática. Este tratamento já é aceito em vários países nos grupos de crianças de alto risco (crianças prematuras, com doença pulmonar crônica e com cardiopatia congênita). Entretanto o palivizumabe tem um alto custo para saúde pública, não sendo disponibilizado em todos os países. O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o VSR pode ser a melhor alternativa, pois ao gerar resposta de memória duradoura que previne a infecção e reduz, desta forma, os altos gastos com a saúde pública, com os fármacos antivirais e com os anticorpos monoclonais. A primeira tentativa na busca de uma vacina contra o VSR foi na década de 60. A vacina produzida estimulou níveis moderadamente elevados de anticorpos no soro, mas não conseguiu proteger contra à infecção. As crianças que foram vacinadas desenvolveram uma doença mais grave quando mais tarde infectados com o vírus. Até o presente momento não existe nenhuma vacina licenciada para o VSR. Desta forma, a busca de vacinas eficazes constitui um importante foco de pesquisa em todo mundo. As infecções naturais pelo VSR não induzem memória protetora duradoura, ocorrendo múltiplas reinfecções ao longo da vida. Em crianças infectadas, observou-se um número reduzido de células T CD4⁺ regulatórias (Treg) no sangue periférico, um aumento na produção de interleucina 4 (IL-4) e uma resposta T helper do tipo 2 (Th2) nas secreções nasais. As células Treg são importantes para controlar um aumento exagerado da resposta imunológica. Por este fato acredita-se que quando há uma redução das Tregs causada pela infecção do VSR ocorre uma exacerbação da doença pulmonar devido uma resposta Th2. Foi identificado que o peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ do VSR aumenta a produção de IFN- γ nas células T CD4⁺ após o desafio

com VSR. O tratamento com este mesmo peptídeo também apresentou um aumento na frequência de células Treg após infecção primária pelo VSR. Recentemente também foi demonstrado que as Tregs auxiliam no desenvolvimento de uma resposta efetora T CD8⁺, que é crucial para o controle da carga viral do VSR. Nossa hipótese é que o peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ do VSR influencia na diferenciação das células T CD4⁺, aumentando a população de células T efetoras e regulatórias específicas, reduzindo a inflamação pulmonar e modulando a resposta imune. Os nossos resultados sugerem que a vacinação com peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ resulta na diferenciação de células T CD4⁺ específicas em efectoras convencionais, que produzem mais IFN- γ e em células Treg. A vacinação com este peptídeo diminuiu a expansão de uma resposta Th2 nos animais infectados com o VSR, protegendo da inflamação exacerbada tanto no local da infecção como sistemicamente. Acreditamos que esta abordagem pode constituir um componente importante nas estratégias de vacinação contra este vírus.

Palavras-chave: Vírus sincicial respiratório, peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃, células T CD4⁺, Células T regulatórias, resposta Th2.

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is the most common etiologic agent in severe lower respiratory tract infections (LRTI) in children. RSV-associated LRTI is the main cause of bronchiolitis, pneumonia and exacerbation of asthma. This infection is responsible for the high rates of hospitalizations related to respiratory diseases worldwide, especially in children younger than 2 years. Currently, annual mortality rate due to RSV infections is worrying worldwide and is estimated at approximately two hundred thousand cases. The treatment strategies to RSV infections are limited. Ribavirin is an approved drug for use in RSV infections, but its use is limited due to adverse side-effects and risks posed to health professionals who handle it. Palivizumab is a monoclonal antibody which targets RSV F glycoprotein and its use is only indicated as a prophylactic measure. This treatment is already accepted in several countries for groups of high risk children (premature children, with chronic lung disease and with congenital heart disease). However, palivizumab has a high cost for public health and is not available in all countries. The development of an effective RSV vaccine to generate a long-lasting immunological memory response that prevents infection may be the best alternative because it will reduce high public health expenditures with antiviral drugs and monoclonal antibodies. The first attempt in the search for a vaccine against RSV was in the 1960s. This vaccine produced high levels of serum antibodies but could not protect against infection. Children who were vaccinated developed a more serious disease when later infected with the same virus. To date, there is no licensed vaccine for RSV, so the search for effective vaccines is an important focus of research. Natural RSV infections do not induce lasting protective memory, and multiple reinfections can occur lifetime. Nasal secretions from infected infants presented a small number of regulatory CD4 T cells (Treg) in peripheral blood, an increase in interleukin 4 (IL-4) production and T helper type 2 (Th2) response. Treg cells are important for controlling an exacerbated increase in immune responses. A reduction of the Tregs caused by the RSV infection generates an exacerbation of the pulmonary disease due to a Th2 response. The M₂₀₉₋₂₂₃ RSV peptide was identified to increase IFN- γ production by peptide-specific CD4 T cells after challenge with the virus. The treatment with this peptide also induced an increase in pulmonary Treg frequency in infected mice. Recently, it has also been shown that Tregs aid in the development of a T CD8⁺ effector response, which is crucial for the control of RSV viral load. Our hypothesis is that the RSV M₂₀₉₋₂₂₃ peptide impacts in the differentiation of CD4 T cells, increasing the population of

specific Treg, reducing lung inflammation and modulating the anti-RSV immune response. This peptide in animal model induces the differentiation of specific Treg. Our findings suggest that vaccination with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide results in the differentiation of specific CD4 T cells into conventional effectors and Treg cells. Vaccination with this peptide decreased the expansion of a Th2 response in animals infected with RSV, protecting both the infection site and systemically. We believe that this approach could be an important component in vaccination strategies against this virus.

Keywords: Respiratory syncytial virus, M₂₀₉₋₂₂₃ peptide, CD4⁺ T cells, regulatory T cells, Th2 response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura e organização do VSR.....	16
Figura 2. Desenho experimental das estratégias de vacinações.....	27

ARTIGO ORIGINAL

Figure 1. Immunization schedule of mice and total CD4 ⁺ T cell responses to RSV M ₂₀₉₋₂₂₃ peptide and UV-RSV before challenge with RSV.....	53
Figure 2. Phenotype of lung CD4 ⁺ T cells before challenge with RSV.....	55
Figure 3. Immunization schedule of mice and total CD4 ⁺ T cell responses to RSV M ₂₀₉₋₂₂₃ peptide and UV-RSV after challenge with live virus.....	57
Figure 4. Viral load and weight loss after RSV challenge following immunization and boost.....	58
Figure 5. Histological analyses of the lung in vaccinated mice five days after challenge with RSV.....	60
Figure 6. Characterization of cytokines produced by lung CD4 ⁺ T cells upon infection.....	62
Supplementary Fig. 1. Secondary lymphoid organs and Lung T cells gating strategy.....	74
Supplementary Fig. 2. M ₂₀₉₋₂₂₃ -specific central memory CD4 ⁺ T cells from mice immunized with PBS+Poly-IC (white bars), peptide+Poly-IC (gray bars) or UV-RSV+Poly-IC (black bars).....	74
Supplementary Fig. 3. Immunization schedule of mice and total CD4 ⁺ T cell responses to RSV M ₂₀₉₋₂₂₃ peptide and UV-RSV after challenge with live virus.....	75
Supplementary Fig. 4. M ₂₀₉₋₂₂₃ -specific central memory CD4 ⁺ T cells from mice immunized with PBS+Poly-IC (white bars), peptide+Poly-IC (gray bars) or UV-RSV+Poly-IC (black bars).....	76
Supplementary Fig. 5. Characterization of lung cytokines from CD4 ⁺ T cells 5 days after RSV challenge from mice immunized with PBS+Poly-IC (white bars), peptide+Poly-IC (gray bars) or UV-RSV+Poly-IC (black bars).....	77
Supplementary Fig. 6. Frequency of CD8 ⁺ T cells secreting IFN- γ and IL-10 of cytokines produced by lung.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. M ₂₀₉₋₂₂₃ -MHC-II binding prediction calculated with T cell epitope prediction tools from IEDB.....	73
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	<i>Antigen-presenting cell</i> ; Célula apresentadora de antígenos
Treg	<i>Regulatory T cell</i> ; Células T regulatórias
VSR	Vírus Sincicial Respiratório
M₂₀₉₋₂₂₃	Peptídeo da proteína M do Vírus sincicial respiratório
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> ; Grupo de diferenciação 4
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i> ; Grupo de Diferenciação 8
Foxp3	<i>Factor forkhead Box P3</i>
IFN-γ	<i>Interferon gamma</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; Ácido ribonucleico
G	<i>Attachment glycoprotein</i> ; glicoproteína de ligação
F	<i>Fusion glycoprotein</i> ; glicoproteína de fusão
SH	<i>Small hydrophobic protein</i> ; pequena proteína hidrofóbica
M	<i>Matrix protein</i> ; proteína de matriz
N	<i>nucleoprotein</i> ; nucleoproteína
P	<i>phosphoprotein</i> ; fosfoproteína
Th2	<i>Type 2 T helper</i> ; Célula T helper 2
IL-4	<i>Interleukin-4</i> ; Interleucina 4
IL-5	<i>Interleukin-5</i> ; Interleucina 5
IL-10	<i>Interleukin-10</i> ; Interleucina 10
IL-13	<i>Interleukin-13</i> ; Interleucina 13
Th1	<i>Type 1 T helper</i> ; Células T helper 1
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> ; Complexo principal de histocompatibilidade
CTLs	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i> ; Linfócitos T citotóxicos
pMHC	Complexo peptídeo:MHC
CD44	<i>Cluster of differentiation 44</i> ; Grupo de diferenciação 44
CD62L	<i>Cluster of differentiation 62L</i> ; Grupo de diferenciação 62L
TCR	<i>T cell receptor</i> ; Receptor da célula T
MHCII	<i>Major histocompatibility complex class II</i> ; Complexo principal de histocompatibilidade de classe II

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 O VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO.....	15
2.2 ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO CONTRA O VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO	17
2.3 CÉLULAS T CD4 ⁺	19
2.4 CÉLULAS T CD8 ⁺	20
2.5 CÉLULAS T DE MEMÓRIA.....	21
2.6 ESPECIFICIDADE DAS CÉLULAS T	22
2.7 PEPTÍDEO M ₂₀₉₋₂₂₃	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 HIPÓTESE.....	25
5 METODOLOGIA.....	26
5.1 VÍRUS.....	26
5.2 ANIMAIS	26
5.3 VACINAÇÃO E INFECÇÃO COM VSR	27
5.4 PEPTÍDEOS E TETRÂMEROS	28
5.5 ENRIQUECIMENTO DAS CÉLULAS T CD4 ⁺ IA ^B VSRM ₂₀₉₋₂₂₃ E MARCAÇÃO CELULAR.....	28
5.6 ANÁLISE DAS CÉLULAS T DOS PULMÕES	28
5.7 PCR EM TEMPO REAL	29
5.8 HISTOPATOLOGIA.....	29
5.9 CITOMETRIA DE FLUXO	30
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
6 CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXO.....	39

ANEXO A - APROVAÇÃO DO CEUA.....	40
APÊNDICES.....	41
APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL - VACCINATION WITH RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (RSV) M ₂₀₉₋₂₂₃ PEPTIDE PROMOTES A PROTECTIVE IMMUNE RESPONSE AGAINST INFECTION AND REDUCES LUNG INFLAMMATION.....	42
APÊNDICE B – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO – <i>RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INDUCES PHOSPHORYLATION OF MTOR AT SER2448 IN CD8 T CELLS FROM NASAL WASHES OF INFECTED INFANTS.....</i>	79
APÊNDICE C – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO – <i>IMMUNOMODULATOR PLASMID PROJECTED BY SYSTEMS BIOLOGY AS A CANDIDATE FOR THE DEVELOPMENT OF ADJUNCTIVE THERAPY FOR RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTION.....</i>	80
APÊNDICE D – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO – <i>RAPAMYCIN INCREASES RSV RNA LEVELS AND SURVIVAL OF RSV-INFECTED DENDRITIC CELL DEPENDING ON T CELL CONTACT.....</i>	81

1 INTRODUÇÃO

O vírus sincicial respiratório (VSR), foi isolado pela primeira vez em 1956 em chipanzés e em 1957 identificado como o agente etiológico mais comum nas infecções severas no trato respiratório inferior em crianças (1). A presença do VSR está associada como a principal causa das hospitalizações por doenças respiratórias em todo o mundo, sendo um grande problema nos sistemas de saúde pública (2,3). Estima-se que o VSR é responsável por causar aproximadamente 190.000 mortes por ano em todo o mundo. A infecção por VSR está em terceiro lugar nos índices de mortalidade infantil decorrente das infecções respiratórias, ficando atrás apenas de pneumonia e infecções por influenza (4).

Atualmente, para a prevenção do VSR é recomendado a utilização do anticorpo monoclonal anti-proteína F do VSR (palivizumabe), entretanto este tipo de tratamento possui um alto custo e não está disponível para maioria dos que necessitam (5). Até o presente momento não existe vacina licenciada para o VSR, no entanto 60 candidatos a vacina contra o VSR encontram-se em etapa pré-clínica ou clínica (6).

As infecções naturais pelo VSR não induzem memória protetora duradoura, e acredita-se que isto resulte em múltiplas reinfecções ao longo da vida, muitas vezes acompanhadas por doença pulmonar grave caracterizada por uma resposta Th2 exacerbada (7–9), que ocorre principalmente em crianças, mulheres grávidas, idosos e indivíduos imunossuprimidos. As crianças infectadas pelo VSR apresentam um número reduzido de células T CD4⁺ regulatórias (Treg) no sangue periférico e um aumento na produção da interleucina 4 (IL-4), caracterizando uma resposta Th2 nas secreções nasais (10). As células Treg são importantes para modular a inflamação pulmonar causada pela infecção do VSR (11). Mais recentemente, demonstrou-se que as Tregs auxiliam no desenvolvimento de uma resposta efetora CD8, que é crucial para o controle da carga viral do VSR (12,13), dengue (14), HIV (15), e influenza (16).

Liu *et al.* demonstraram que células T CD4⁺ específicas para o peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ possuem uma capacidade importante de se diferenciarem em células Treg específicas para o VSR (17). Nossa hipótese é que o desenvolvimento de uma vacina contra VSR necessite de indução e expansão de células Treg e que a vacinação com o peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ possa contribuir para geração desta resposta.

Para testar esta hipótese, foram vacinados camundongos da linhagem C57Bl/6 com o peptídeo ou com o vírus inativado, e mais tarde desafiados com vírus vivo. Analisamos a diferenciação e expansão de células T CD4⁺ específicas para o peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ nos órgãos

linfóides e nos pulmões, utilizando tetrâmeros para realizar um enriquecimento celular específico através de colunas magnéticas (*pulldown*). Também analisamos a proteção e a inflamação pulmonar.

Os nossos resultados sugerem que a vacinação com peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ resulta na diferenciação de células T CD4⁺ específicas em efectoras convencionais e em células Treg. A vacinação com este peptídeo diminuiu a expansão de uma resposta Th2 nos animais infectados com o VSR, protegendo tanto no local da infecção como sistemicamente. Acreditamos que esta abordagem pode constituir um componente importante nas estratégias de vacinação contra este vírus.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O vírus sincicial respiratório

O vírus sincicial respiratório (VSR) foi isolado pela primeira vez em 1957 do trato respiratório inferior (TRI) em crianças infectadas pelo VSR (18). O VSR desde então foi reconhecido como o agente etiológico mais comum nas infecções severas no trato respiratório inferior (TRI) em crianças (19). A transmissão pelo VSR pode ocorrer pelo contato direto das células do trato respiratório, olhos, com secreções ou gotículas contendo vírus e presentes no ar (20). A maior parte das crianças é infectada durante o primeiro ano de vida, e reinfecções ocorrem ao longo da vida, sendo que a maioria das infecções graves no TRI ocorre entre dois e quatro meses de idade (19,21). Crianças prematuras com doença pulmonar crônica ou com cardiopatia congênita são as que apresentam um maior risco quando infectadas pelo VSR, embora as crianças previamente saudáveis possuam um maior índice das hospitalizações. Crianças infectadas com o VSR geram altos custos aos sistemas de saúde devido às altas taxa de hospitalizações. Um estudo realizado no Canadá indicou que o custo anual no tratamento de crianças infectadas pelo VSR é estimado em 18 milhões de dólares e que nos Estados Unidos o custo anual para tratar as crianças e idosos infectados pelo VSR é mais de 600 milhões de dólares. Em análise individual, estima-se que o custo por criança com menos de 5 anos é aproximadamente 4.584 dólares (22–24). Estimativas recentes de mortalidade global sugerem que aproximadamente duzentas mil crianças morrem todos os anos devido à infecções pelo VSR (4). Esses fatos aumentam a preocupação com a saúde pública relacionada ao VSR em todo o mundo.

O VSR pertence à família *Pneumoviridae*, do gênero *Pneumovirus*. O VSR é um vírus envelopado que contém um genoma de RNA fita simples negativa de 15,2 kb. A parte externa do vírion é constituído por glicoproteínas de ligação (G), glicoproteína de fusão (F) e uma pequena proteína hidrofóbica (SH). As glicoproteínas G e F estão intimamente relacionadas com a proteína de matriz (M), localizadas no interior do envelope. As proteínas N, P e L são proteínas do nucleocapsídeo, responsáveis pela replicação do RNA viral (Figura 1) (25).

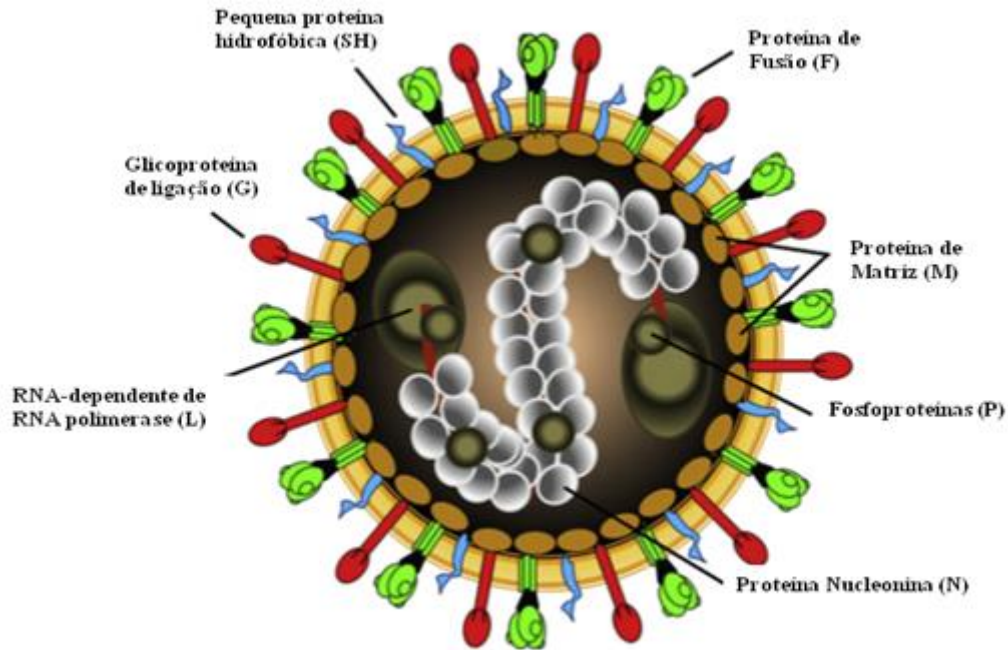


Figura 1. *Estrutura e organização do VSR.* O virion é envelopado e apresenta um genoma de RNA fita simples não segmentado de polaridade negativa. Possui um tamanho médio de 120 a 300nm e é composto por proteínas localizadas no interior do envelope, nucleoproteína (N); fosfoproteína (P); RNA-dependente de RNA polimerase (L); proteína de matrix; e proteínas localizadas na superfície do envelope, glicoproteína de ligação (G); proteína de fusão (F) e pequena proteína hidrofóbica (SH). Adaptado de Lay, M.K., et al., 2013 (25).

A proteína F medeia à entrada do vírus, sendo responsável pela fusão do envelope do vírion com a membrana plasmática da célula do hospedeiro e subsequentemente provoca a formação dos sincícios, responsáveis pelo efeito citopático (26,27). Esta proteína é um dos principais alvos no desenvolvimento de vacinas e medicamentos antivirais devido a sua estrutura e sequência conservada, a sua localização no vírion e sua forte imunogenicidade (28).

A glicoproteína (G) é responsável por modular o sistema imunológico adaptativo, atuando como um ligante entre o vírus e a célula do hospedeiro (2,29). Esta proteína vinha sendo utilizada como um alvo para produção de vacinas. No entanto, estudos realizados por Tan e colaboradores verificaram que a proteína G possui alto grau de variabilidade, causada pela extensa glicosilação, sendo descartada a possibilidade de ser um alvo para realização de vacinas eficazes (30).

A proteína SH também já foi alvo de estudos para um possível candidato a vacina. Em um estudo realizado por Bukreyev et. al., foi retirado o gene responsável pela formação da proteína SH por deleção e inocularam o vírus intranasal nos camundongos. Neste estudo verificaram que houve uma menor eficiência na sua replicação, gerando uma proteção ao desafio viral (31). Abordagens de vacinas que usam vírus recombinantes como a citada acima, que apesar de atenuados mantem sua capacidade de replicar, não é indicado para o grupo de maior risco de infecção grave como crianças prematuras e imunossuprimidos, pois a vacina pode gerar a progressão da doença nestes indivíduos (31).

Nos processos relacionados com a replicação viral também foi observado que as proteínas L, P, N e M estão envolvidas (32). A proteína M, além de ser uma das responsáveis na formação de novas partículas virais, também faz a interação com a proteína F ocasionando a formação de víriões filamentosos. Estes estão predominantemente associado com a infectividade do VSR (33,34).

A nucleolina, presente na superfície das células do hospedeiro é o receptor responsável pela mediação da infecção pelo VSR. Estudos utilizando RNA de interferência para diminuir a expressão da nucleolina nos pulmões de camundongos, demonstraram que houve uma redução na carga viral em aproximadamente 67%, sugerindo que a nucleolina atuaria como um receptor celular funcional para o VSR (35).

Conhecer as funções e propriedades das proteínas presentes tanto no VSR como nas células do hospedeiro, podem ajudar a entender melhor as estratégias utilizadas pelo vírus para infectar a célula hospedeira.

2.2 Estratégias de tratamento contra o vírus sincicial respiratório

Até o momento, nenhum fármaco antiviral específico é utilizado rotineiramente para o tratamento nas infecções pelo VSR. Embora exista um medicamento antiviral (Ribavirina) aprovado no uso para infecções pelo VSR, seu uso é limitado devido aos efeitos secundários adversos e aos riscos que representam para os profissionais da saúde que o manipulam (36).

Um tratamento profilático existente contra a infecção pelo VSR é um anticorpo monoclonal (Palivizumabe) dirigido contra a glicoproteína F do vírus. Este anticorpo demonstrou eficácia na prevenção de hospitalizações causadas pelo VSR em crianças com menos de 2 anos de idade, com doença pulmonar crônica ou doença cardíaca congênita e em crianças com menos de 6 meses de idade nascidas antes das 36 semanas de gestação (37,38).

O uso profilático do palivizumabe já é aceito em vários países nos grupos de crianças de alto risco (crianças prematuras, com doença pulmonar crônica e com cardiopatia congênita). O uso do palivizumabe é indicado para crianças nascidas com uma idade gestacional inferior a 34 semanas e que estão próximo aos meses de maior prevalência das infecções pelo VSR. O palivizumabe é administrado em 5 doses por via intramuscular, sendo que cada dose de 15 mg/kg deve ser administrada a cada 30 dias. Deve-se manter a conformidade com a administração mensal para ter a eficácia esperada, não sendo indicado a administração de doses adicionais em crianças que tiverem reação alérgica grave após uma dose anterior. O palivizumabe não é eficaz no tratamento das infecções pelos VSR e não é aprovado ou recomendado para esta indicação, sendo apenas de uso profilático. O uso profilático do palivizumabe em crianças prematuras resultou em uma diminuição global de 55% nas taxas de hospitalizações relacionadas com o VSR. No entanto, o palivizumabe tem um alto custo para saúde pública, não sendo disponibilizado em todos os países. Também outro problema encontrado é o número das administrações do medicamento podendo não ser eficiente o tratamento se houver o atraso da dose. (38,39).

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o VSR pode ser a melhor alternativa, pois ao gerar resposta de memória duradoura que previne a infecção, reduz, desta forma, os altos gastos com a saúde pública com os fármacos antivirais e com os anticorpos monoclonais.

A primeira tentativa na busca de uma vacina contra o VSR foi na década de 60 (40). Para o desenvolvimento desta vacina, a estirpe Bennett do VSR foi inicialmente propagada em células embrionárias de rim humano e, após, cultivadas em células de rim de macaco Vervet. As células infectadas foram inativadas com formalina (FI-VSR) e concentradas por ultracentrifugação. A administração das doses foi realizada em crianças soronegativas entre 3 meses e 9 anos, sendo que cada criança recebeu entre 1 a 3 imunizações. As infecções pelo VSR ocorreram de maneira semelhante nas crianças vacinadas e não vacinadas. No entanto nas crianças que foram vacinadas a progressão da doença e a inflamação no pulmão foi mais grave quando comparada com os grupos que não receberam as vacinações (6). As taxas de hospitalizações foram de 80% nos grupos que receberam a vacina contra 5% nos grupos que não receberam a vacina. Duas crianças que receberam a vacina morreram após a infecção pelo VSR, uma de 14 meses e outra de 16 meses de idade (41).

Até o presente momento, não existe vacina disponível aprovada para o VSR. O desenvolvimento de uma vacina eficaz é complexo, uma vez que as principais populações alvo são crianças e adultos imunocomprometidos. Para não repetir os erros cometidos como

na vacina do vírus inativado por formalina, a eficácia e segurança para o desenvolvimento de uma vacina contra o VSR são aspectos fundamentais. Novas ferramentas foram desenvolvidas para o estudo na resposta imunológica a infecções virais. Tendo em vista estas melhorias, não só em equipamentos, mas também nos materiais utilizados, a pesquisa nos últimos anos conta com vários grupos de pesquisadores que vem buscando estratégias para o desenvolvimento de uma vacina contra o VSR. Até o final do ano de 2015, foram 60 vacinas contra o VSR que estavam em desenvolvimento pré-clínico ou clínico e abrangem cinco grandes estratégias (6). As estratégias com vírus vivo ou atenuado tem sido desenvolvido há décadas, sendo os principais candidatos em testes clínicos por muitos anos (42). Recentemente houve um aumento significativo nos candidatos a vacina contra o VSR usando outras estratégias. Vários destes candidatos utilizam a proteína F do VSR como estratégia (6). Embora a maioria dos candidatos a vacina estão na fase pré-clínica, 16 candidatos estão em desenvolvimento clínico.

2.3 Células T CD4⁺

O VSR infecta o epitélio pulmonar, induzindo uma infecção pulmonar localizada (43). Esta infecção resulta em uma resposta inflamatória do hospedeiro que promove o recrutamento de células imunológicas necessárias para a eliminação viral (44). Sabe-se que a resposta inflamatória do hospedeiro é necessária, mas também provoca danos para o tecido pulmonar (12). Uma diminuição no número das células Treg foi observado em crianças infectadas com o VSR. A redução no número de células Treg está associado ao aumento da resposta Th2, podendo contribuir para gravidade da doença induzida pelo VSR (10). Estudos anteriores demonstraram que a depleção das células T CD4⁺ contribuíram para a progressão da doença em camundongos infectados pelo VSR (45). Em crianças infectadas com VSR, a resposta Th2 foi aumentada em relação a resposta Th1. Além disso houve um aumento de IL-4 e IgE, sintomas associados com a resposta Th2(46). Estes sintomas ocorrem devido a resposta acentuada e persistente de neutrófilos nas via aéreas (11).

A resposta Th2 é comumente aumentada em crianças infectadas pelo VSR com doença respiratória severa (47). As principais características da resposta Th2 são que as células T CD4⁺ começam a expressar o fator de transcrição GATA3 e secretar citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. A presença do VSR nas infecções primárias no trato respiratório inferior em crianças, também é responsável por promover uma redução nas taxas de interferon-gama (IFN- γ),

citocina importante na formação de células T CD4⁺ helper 1 (Th1), que tem um papel na eliminação do vírus (48). Portanto, a infecção por VSR está pode estar associada com um desequilíbrio no sistema imunológico, provocando um aumento na resposta Th2 e diminuindo a resposta Th1 (46).

O controle da inflamação no local da infecção é importante para reduzir os sintomas e a exacerbação de doenças respiratórias (49). Neste contexto, verificou-se que a presença das células T CD4⁺ regulatória (Treg) podem diminuir a inflamação nos pulmões de camundongos infectados pelo VSR, provocados pelos níveis elevados de infiltrados celulares, predominantemente eosinófilos e neutrófilos (11). O aumento nos infiltrados celulares no pulmão está relacionado com um aumento no perfil Th2 das células T CD4⁺. Estudos realizados em camundongos mimetizaram o efeito da vacina FI-VSR após a infecção, mostrando que houve um aumento na produção de citocinas IL-4 (7). Em outro estudo, também foi observado que o aumento de IL-4 pode suprimir a produção de IFN- γ , promovendo o aumento de infiltrados celulares (8). Esses dados sugerem que o controle das respostas Th1 e Th2 são fundamentais na regulação da inflamação alérgica das vias aéreas.

As Treg são responsáveis pela regulação da resposta imunológica e são caracterizadas pela presença do fator de transcrição Foxp3. O equilíbrio realizado pelas Treg deriva da citocina secretada por elas, a IL-10, responsável pela regulação das células T presentes no pulmão durante a infecção pelo VSR (50). A interação das células T efectoras com células Treg resulta em uma prevenção da exacerbação da resposta inflamatória na infecção primária. As células T efectoras são responsáveis pela eliminação viral no local da infecção, e as células Treg inibem a exacerbação da imunopatologia que acompanha a atividade das células T ativadas. Na infecção secundária, quando já há uma resposta T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória estabelecida, o controle da replicação viral pode ocorrer rapidamente, limitando, desta maneira, o acúmulo de antígenos virais, e tornando menos frequente a exacerbação (51).

2.4 Células T CD8⁺

As células T CD8⁺ são responsáveis por reconhecer antígenos processados e apresentados pelo MHC de classe I. Os peptídeos reconhecidos podem fazer parte das proteínas internas do vírus, sendo menos propensas a sofrer pressão evolutiva e, assim, devem ser mais conservadas que as proteínas externas do vírus (52). A ativação das células T CD8⁺ virgens também requerem o reconhecimento do antígeno e sinais co-estimulatórios. Após a

ativação, as células denominadas linfócitos T citotóxicos (CTLs) expandem e eliminam as células infectadas. A eliminação pode ocorrer por diversas maneiras. Se célula infectada expressar os peptídeos derivados do patógeno, as células T CD8⁺ podem mediar a morte através da expressão de granzimas e perforinas e a secreção de citocinas como IFN- γ (52). A morte também pode ocorrer pelo reconhecimento específico da célula alvo, sendo necessária que ocorra a sinapse imunológica. Outra via de morte da célula alvo é mediada por interações moleculares entre ligante FasL, presente na superfície dos CTLs e o Fas, presente nas células alvo. Esta interação resulta na ativação de caspases levando a apoptose da células alvo (53).

As células T CD8⁺ apresentam um papel fundamental na inibição da eosinofilia e na redução do número de células Th2 no pulmão de camundongos infectados pelo VSR (54). Em um estudo realizado em modelo animal, verificou-se que animais imunizados com uma vacina “Trivax” apresentavam um aumento na expansão das células T CD8⁺ específica ao VSR (55). Após 6 dias da imunização os animais foram desafiados com o VSR e após 4 dias foi analisado a produção de IFN- γ . No grupo dos animais imunizados, a produção de IFN- γ pelas células T CD8⁺ específicas foi 2 vezes maior em relação ao grupo não imunizado. Também foi observado que no grupo dos animais imunizados houve uma maior proteção e uma diminuição da inflamação. Estes dados sugerem que as células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ são responsáveis pela proteção e diminuição da inflamação (55). Além disso, estes dados indicam que o aumento de IFN- γ pode modular o microambiente e regular a resposta Th2 (56).

Em um estudo utilizando modelo animal, foi possível observar que, após a depleção de células Treg seguido da infecção pelo VSR, ocorreu um aumento significativo no número das células T CD8⁺ quando comparado com animais que foram apenas infectados. Também foi possível observar uma perda de peso considerável no grupo que tiveram as Treg depletadas. Uma expansão rápida de células T CD8⁺ contribuem na eliminação viral mas também pode levar a progressão da doença (11).

2.5 Células T de Memória

A expansão clonal das células T ocorre quando há o encontro e o reconhecimento específico entre o antígeno e a células T nos órgãos linfóides secundários. Após a proliferação, as células diferenciam-se em células efetoras, migrando para os tecidos periféricos para realizar a resposta imune. Após a resolução da resposta imunológica, cerca de

90% das células efetoras morrem, sendo que o restante das células remanescentes apresentam fenótipo de memória. A maioria destas células de memória estão quiescentes, mas possuem a capacidade de auto-renovação e sobreviver por um grande período, mesmo na ausência de interação com o complexo MHC-peptídeo (pMHCII) para o qual são específicas (57).

As células de memória podem ser divididas em duas classes: células de memória efetora - possuem um aumento na expressão do marcador CD44 ($CD44^{high}$) e uma redução na expressão do marcador L-selectina, também conhecido como CD62L ($CD62L^{low}$). A ausência do marcador CD62L diminui a adesão na vênula endotelial alta dos órgãos linfoides secundários, permitindo a migração para os tecidos periféricos; e células de memória central - expressam células com marcador $CD44^{high}$ e $CD62L^{high}$, que estão envolvidos com processos de migração para os órgão linfoides secundário (58).

2.6 Especificidade das células T

A maioria das células T expressam várias cópias idênticas do receptor de células T (TCR) em sua superfície. Cada célula T formada possui apenas um único TCR específico. Os TCRs são formados por duas proteínas, denominadas cadeia α e β , geradas durante o desenvolvimento das células T. A cadeia α é composta por segmentos genéticos de três famílias, sendo 42 segmentos V, 61 J e 1 C. A cadeia β é composta por 47 segmentos V, dois D, 13 J e 1 C (59). No desenvolvimento das células T, os genes do TCR são responsáveis pelas diversas combinações, processo denominado de recombinação somática. A variabilidade do TCR pode gerar aproximadamente 3 milhões de diferentes TCRs. Esta diversidade resulta da adição de pares de bases randomizados entre os segmentos V e J da cadeia α com os segmentos V, D e J da cadeia β (60). Portanto, o número total de diferentes TCRs formados pode chegar a aproximadamente 10^{18} . No entanto um indivíduo possui um número total de 10^{14} células, sendo que apenas 10^{11} são células T. Desta forma seria impossível um único indivíduo ter todas as combinações possíveis do TCR (61).

A expansão clonal específica para um determinado peptídeo ocorre quando a APC apresenta o peptídeo, que está ligado ao seu MHC, para o TCR e há o reconhecimento dos mesmos. Esta interação constitui o sinal para o início da imunidade adaptativa na defesa contra patógenos (62). Durante uma infecção, as APCs exibem uma variedade de peptídeos derivados do patógeno invasor. A expansão das células T pode atingir diferentes magnitudes e isso é dependente do número da frequência precursora (número de células virgens específicas

para um antígeno) das células T existentes no organismo para cada peptídeo (63,64). O tamanho da população de células T está associado com a diversidade de TCRs e com a resposta primária a uma infecção. Desta forma, a variação da frequência precursora pode explicar porque as respostas imunes podem variar de acordo com o peptídeo utilizado (64). Para identificar e medir o tamanho da população de células T específicas ao determinado peptídeo é necessário a utilização de uma ferramenta conhecida como tetrâmero.

2.7 Peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃

O peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ possui 15 aminoácidos e é específico para o alelo M₂₀₉₋₂₂₃ IA^b do MHCII. Um estudo realizado por Liu e colaboradores utilizando camundongos da linhagem C57BL/6, observaram uma maior produção de IFN- γ nas células T CD4⁺ do baço quando estimulado com M₂₀₉₋₂₂₃ após 7 e 10 dias do desafio com VSR. No mesmo trabalho também foi observado que as células específicas ao peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ nos pulmões que responderam à infecção primária pelo VSR apresentavam uma alta frequência de células Treg (17). Estes dados sugerem que este peptídeo torna-se importante por gerar uma resposta de células T regulatórias, diminuindo a inflamação pulmonar causada pela infecção do VSR, e induz uma resposta T produtora de IFN- γ , que auxilia na eliminação do vírus frente a infecção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a resposta imune celular *in vivo* após a vacinação com o peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ e sua capacidade de proteção contra infecção.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar o uso de tetrâmeros para a identificação das células T CD4⁺ específicas para o peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃;
- Avaliar a frequência precursora das células específicas ao M₂₀₉₋₂₂₃;
- Verificar se as imunizações (peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ + Poly-IC ou UV-VSR + Poly-IC) são capazes de aumentar o número de células T específicas para M₂₀₉₋₂₂₃;
- Quantificar as frequências de cada subtipo de célula T CD4⁺;
- Testar o efeito do peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ + Poly-IC como indutor de resposta T regulatória nesse sistema;
- Avaliar o fenótipo das células T de memória específicas para M₂₀₉₋₂₂₃;
- Quantificar as frequências das células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ após a vacinação *in vivo* e reestímulo *in vitro* com peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃;
- Testar o efeito do peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ + Poly-IC na diminuição da inflamação pulmonar;
- Testar o efeito do peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ + Poly-IC no controle da viremia pulmonar;

4 HIPÓTESE

A utilização do peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ do VSR como estratégia para vacinação influencia na diferenciação das células T CD4⁺, aumentando a população de células T regulatórias específicas, reduzindo a inflamação pulmonar e modulando a resposta imune com aumento da produção de IFN- γ .

5 METODOLOGIA

5.1 Vírus

O subtipo A do VSR (linhagem A2) foi fornecido pelo Prof. Fernando Polack da Fundación Infant, Argentina. Os vírus foram cultivados em células Vero, obtidas da ATCC (Rockville, MD, USA). Para a quantificação das unidades formadoras de placas (PFU), foi utilizado um anticorpo específico para proteína F do VSR (Millipore, Billerica, MA).

5.2 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) C57Bl/6, com 6 a 8 semanas de idade, provenientes do centro de modelos biológicos experimentais (CeMBE) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), localizado na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Os camundongos foram mantidos no biotério do IPB-PUCRS em condições estéreis, com água e comida *ad libitum*. A manutenção das caixas para trocas de água, ração e limpeza foram realizadas duas vezes por semana. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 22-23°C e ciclos de claro-escuro de 12 horas.

Os procedimentos realizados nos camundongos foram a vacinação com peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ do VSR + Poly-IC ou com UV-VSR + Poly-IC. Para a análise das células T, os camundongos foram eutanaziados e após foram retirados todos os órgãos linfóides secundários e o pulmão. O procedimento de eutanásia foi seguido conforme resolução normativa nº 13, de setembro de 2013. O cálculo do tamanho amostral foi estimado com o objetivo de determinar o tamanho mínimo necessário para que fossem detectadas diferenças com significância de 0,05 e um limite de confiança de 95%. O número de amostra foi de 5 animais por grupo, totalizando 15 animais distribuídos em 3 grupos experimentais. No primeiro desenho experimental os animais foram apenas vacinados para posterior análise. No segundo desenho experimental os animais foram vacinados e desafiados com o VSR. O trabalho deste modelo experimental foi executado na Universidade Federal de Santa Catarina em parceria com o laboratório de Imunologia do Professor André Báfica. Os experimentos foram sempre realizados em triplicatas em tempos independentes para garantir a reprodutibilidade dos resultados, tendo sido utilizados 90 animais para realização deste projeto. O projeto foi

submetido ao CEUA-PUCRS (Comitê de Ética para o Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul) e aprovado sob número de registro CEUA 14/00392.

5.3 Vacinação e infecção com VSR

Para a vacinação foram utilizados camundongos (C57Bl/6) entre 6 a 8 semanas de vida. A vacinação foi dividida em três grupos. O primeiro, o grupo controle, cada animal foi imunizado com 95µL de PBS e 5µg Poly-IC. No segundo, cada animal foi imunizado com 100µg do peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ e 5µg Poly-IC. No último, cada animal foi imunizado com 10⁶ PFU VSR inativado por luz ultravioleta e 5µg Poly-IC. As vacinações foram realizadas no dia 0 e 7 e administrada pela via subcutânea (s.c.). Os animais foram desafiados via intranasal com 1x10⁷ PFU do VSR da linhagem A2. No grupo experimental em que os animais foram apenas submetidos as imunizações a análise ocorreu 14 dias após a primeira imunização (Figura 2A). Enquanto que no grupo experimental dos animais que foram desafiados com o vírus a análise foi realizada 19 dias após a primeira imunização (Figura 2B).

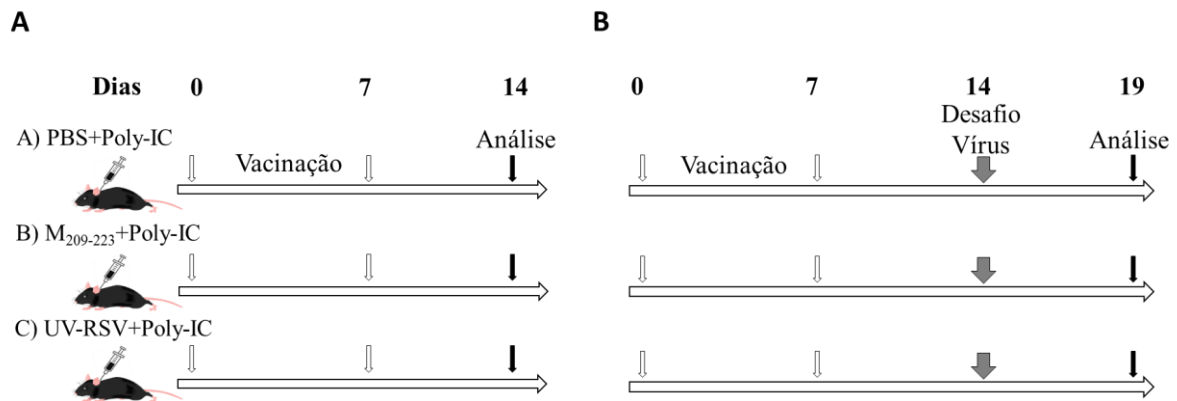


Figura 2. Desenho experimental das estratégias de vacinações. A) Estratégias de vacinações sem infecção. B) Estratégias de vacinações com desafio do VSR.

5.4 Peptídeos e tetrâmeros

O peptídeo do RVS M₂₀₉₋₂₂₃ é composto por 15 aminoácidos (NKGAFKYIKPQSQFI), foi adquirido da empresa Biomatik, USA. O tetrâmero PE- IA^bVSRM₂₀₉₋₂₂₃ foi cedido pelo National Institutes of Health (NIH).

5.5 Enriquecimento das células T CD4⁺ IA^bVSRM₂₀₉₋₂₂₃ e marcação celular.

Após a retirada de todos os órgãos linfóides secundários, os linfócitos foram isolados e marcados com o tetrâmero IA^bVSRM₂₀₉₋₂₂₃. O enriquecimento da população das células T específicas foi realizado conforme método realizado por Moon *et al.* (65). Para seleção das células específicas foram utilizadas esferas magnéticas (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemanha). Após o processo de enriquecimento, as células foram marcadas com anticorpos, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-CD19, anti-CD4, anti-CD44 e anti-62L, para marcação de superfície. Para análise dos fatores de transcrição foram utilizados anticorpos anti-Foxp3 e anti-GATA3, e para citocinas foram utilizados anti-IFN- γ e anti-IL-10. As análises foram realizadas utilizando citometria de fluxo FACSCanto II (Bekton Dickinson) com o software FACSDiva. Os dados obtidos foram analisados com o programa FlowJo (versão 7.5, Tree Star Inc., Ashland, US).

5.6 Análise das células T dos pulmões

Para a análise dos linfócitos dos pulmões, os linfócitos foram isolados do tecido pulmonar utilizando colagenase D por 1 hora a 37°C. Foram adicionados 5.10⁵ células em cada poço de placas de 96 poços (fundo "U") e marcadas com o tetrâmero IA^bVSRM₂₀₉₋₂₂₃, que foi incubado por 30 minutos a 37°C. Após as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD44 e anti-CD62L.

Também analisamos a secreção de citocinas. Para realizar esta análise, as células foram estimuladas com o peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ e com CD28⁺CD49d conforme protocolo descrito por Liu e colaboradores (17). As células foram estimuladas por 6 horas a 37°C na presença de GolgiStop (BD Pharmingen). Após, as células foram marcadas para o tetrâmero IA^bVSRM₂₀₉₋₂₂₃ por 30 minutos a 37°C. Em seguida as células foram marcadas para os anticorpos anti-CD4

e anti-CD8. Logo após a marcação de superfície, as células foram fixadas e permeabilizadas com o Foxp3 Permeabilization Buffer da eBioscience e marcadas com anti-IFN- γ e anti-IL-10. Para análise das células nos utilizamos a citometria de fluxo (BD FACS canto II).

5.7 PCR em tempo real

O RNA total foi extraído dos pulmões dos animais infectados utilizando o Kit de extração RNA Mini Kit (PureLink™ - life technologies) seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando o Kit Sensiscript Reverse Transcription (QIAGEN). A qualidade do cDNA para cada amostra foi testada por amplificação do gene endógeno β -actina utilizando primers específicos da TaqMan Assay (Applied Biosystems). As amostras que não amplificam para β -actina foram excluídas. O PCR em tempo real foi realizada para a amplificação do gene da proteína F do RSV utilizando os primers e sondas específicas (forward-5'-AACAGATGTAAGCAGCTCCGTTATC-3',reverse-5'-GATTTTTATTGGATGCTGTACATTT-3' e sonda 5'-FAM/TGCCATAGCATGACACAATGGCTCCT-TAMRA/-3'). Para a curva padrão, foi realizado uma diluição seriada (1:10) de 6×10^7 cópias de um plasmídeo com a proteína F do VSR, que foram adicionados em duplicata na mesma placa das amostras. Os resultados foram para quantificar a carga viral das amostras.

5.8 Histopatologia

Após 5 dias do desafio pelo VSR os animais foram eutanasiados. Antes de retirar os pulmões, foi realizado a perfusão pulmonar com formalina 10%. Após foram retirados e fixados em formalina 10%. A inclusão dos tecidos foi em parafina e os pulmões foram seccionados a $4 \mu\text{m}$ de espessura. Para visualizar os infiltrados celulares foi realizado a coloração com hematoxilina e eosina (HE) e para identificação do muco secretado foi realizado a coloração Alcian Blue. Todas as amostras foram examinadas em microscopia óptica.

5.9 Citometria de fluxo

As células dos órgãos linfóides secundários foram incubadas com FcBlock (sobrenadante das células 2.4G2 + 2% soro de rato + 2% soro de camundongo e 0.1% NaN₃) por 20 minutos. Foram utilizados os anticorpos, para marcação de superfície, anti-CD11b (APC-Cy7, M1/70 clone), anti-CD11c (APC-Cy7, HL3 clone), anti-CD11c (FITC, HL3 clone) anti-CD19 (APC-Cy7, 1D3 clone), anti-B220 (FITC, RA3-6B2 clone), anti-CD4 (PE-Cy7, RM4-5 clone), anti-CD4 (APC, RM4-5 clone), CD4 (APC-Cy7, GK1.5 clone), anti-CD8 (PE-Cy7, 53-6.7 clone), anti-CD44 (PerCP, IM7 clone) and anti-62L (FITC, MEL-14) da D Biosciences. Para marcação intracelular foram utilizados os anticorpos anti-Foxp3 (Alexa fluor 647, MF23 clone), anti-GATA3 (Alexa Fluor 647, L50-823 clone), anti-IFN- γ (FITC, XMG1.2 clone) and anti-IL-10 (APC, JES5-16E3 clone).

Para análise das células do pulmão, as células isoladas foram incubadas com FcBlock por 20 minutos e marcadas com os anticorpos de superfície anti-CD4 (APC, RM4-5 clone), anti-CD4 (APC-Cy7, GK1.5 clone), anti-CD8 (PE-Cy7, 53-6.7 clone), anti-CD19 (APC-Cy7, 1D3 clone), anti-CD44 (PerCP, IM7 clone) e anti-CD62L (FITC, MEL-14) da BD Biosciences e para marcação das citocinas foram utilizados os anticorpos anti-IFN- γ (FITC, XMG1.2) clone e anti-IL-10 (APC, JES5-16E3 clone). As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences). Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo (versão 7.5, Tree Star Inc., Ashland, US).

5.10 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov Smirnov para avaliar a normalidade. Após o teste os dados foram submetidos a análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey, comparando as diferenças entre os grupos. Foi utilizado o software GraphPad Prism (San Diego, CA, EUA). Um limite de confiança de 95% foi estabelecido para significância dos resultados. Os resultados analisados foram considerados significantes quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

6 CONCLUSÕES

Os mecanismos subjacentes à geração de memória protetora em resposta a vacinação ainda não foram completamente elucidados, contudo é inegável que a única maneira de erradicar uma infecção é a vacinação. Cada microrganismo infeccioso apresenta uma dinâmica particular de interação com o sistema imunológico de seu hospedeiro, resultado de um longo processo co-evolutivo. Assim, em cada infecção, é fundamental investigar as características dessa dinâmica patógeno-hospedeiro, de modo a desenvolver a melhor vacina possível. Entendemos como melhor vacina o processo mais seguro, econômico e abrangente de gerar memória imunológica protetora no hospedeiro.

No caso do VSR, a maioria dos dados disponível atualmente aponta para um papel deletério de respostas do tipo Th2 durante a infecção, a reinfeção, ou ainda, em resposta a vacinação utilizando componentes virais. Uma vez que esse tipo de resposta está associado a uma exacerbação da inflamação, principalmente nas vias respiratórias inferiores, que pode ser severo em bebês, é necessário idealizar estratégias de imunização que evitem a geração de células Th2, bem como as interleucinas características dessa resposta. Atualmente, além de pensar na geração de uma resposta Th1, que deve inibir a resposta Th2, e estimular a memória T citotóxica, é importante pensar em abordagens vacinais que contemplem a geração de células T regulatórias, fundamentais na manutenção da homeostase imunológica. Além disso, dados recentes apontam para o papel dessas células como estimuladoras de respostas T citotóxicas de memória, que são fundamentais para a eliminação do vírus e prevenção de doença quando ocorrem reinfeções.

No presente estudo, a vacinação com um peptídeo imunodominante para células T CD4⁺, M₂₀₉₋₂₂₃, não apenas promoveu uma expansão das células T CD4⁺ reativas ao peptídeo, mas expandiu especificamente células com o perfil Th1 e regulatório nos órgãos linfoides secundários. Por outro lado, o grupo vacinado com o UV-VSR apresentou um aumento significativo na resposta Th2 para o mesmo peptídeo, que foi expandida quando os animais foram desafiados com o vírus. A resposta gerada pelo peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ correlacionou com uma diminuição na progressão da doença, e o vírus não foi detectado no tecido pulmonar desses animais. Estes resultados sugerem que imunizar com um peptídeo capaz de gerar uma resposta robusta Th1 e Treg pode ser uma abordagem importante para desenvolver memória não apenas protetora, mas que também previne inflamação exacerbada. Foi interessante verificar como a expansão de células de uma única especificidade pode ter um papel importante no controle da infecção viral. Enquanto as visões tradicionais de vacinação

focaram por décadas em abordagens que utilizassem a mais variada gama possível de epítomos antigênicos para imunização, evidências recentes indicam que alguns clones de linfócitos muitas vezes podem dominar uma resposta, com efeito muito robusto. Especialmente para células T regulatórias, mais de um grupo observou que linfócitos com uma única especificidade podem ter um profundo impacto no controle de uma resposta inflamatória dirigida contra múltiplos epítomos antigênicos. Tais observações nos estimulam a rever as abordagens tradicionais, ampliando nossas opções de desenho vacinal. Especificamente, tais estudos nos incentivam a aprofundar nossa compreensão dos complexos mecanismos de geração de respostas T *in vivo*. Para tal, o uso de tetrâmeros, e especificamente a técnica de enriquecimento combinando esferas magnéticas e tetrâmeros utilizada aqui (o “*pulldown*”) constituem ferramentas potentes, com um excelente poder de resolução.

Neste estudo, podemos acompanhar o destino das células de uma única especificidade, do repertório natural dos animais, a partir dos seus precursores nos indivíduos não imunes, e sua diferenciação *in vivo* em resposta a imunização e ao desafio. O papel inegável da resposta inata aos componentes imunoestimulatórios com papel adjuvante em cada imunização que realizamos, seja o ligante de TLR 3 poly-IC, ou os múltiplos ligantes de receptores inatos contidos no vírus inativado, foi evidenciado neste trabalho. Células com a mesma especificidade podem diferenciar-se em efetores com propriedades diferentes, desde que sinais inatos sejam fornecidos em abundância para isso. Enquanto o poly-IC tende a estimular uma diferenciação Th1, certamente componentes virais existentes no vírus inativado conseguem se sobrepor aos sinais do poly-IC e converter uma porcentagem significativa das células específicas para o peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ no tipo Th2. Análises posteriores, de sequenciamento dos CDRs das cadeias V beta dos TCRs destas células nos fornecerão informações sobre a clonalidade (ou ausência desta) neste fenômeno.

Finalmente, este sistema experimental animal apresentou uma similaridade grande com o que é observado por infecções por VSR em humanos. A resposta Th2 gerada na vacinação com o vírus inativado mimetizou o que já foi observado em humanos, e o desafio nos animais imunizados com o UV-VSR gerou inflamação pulmonar e doença também muito semelhante ao que já foi documentado em crianças. Será interessante, portanto, expandir os estudos da contribuição da geração de uma memória Th1 e Treg em seres humanos e correlacionar a presença de tais células e proteção, incluindo a utilização do peptídeo M₂₀₉₋₂₂₃ e outros que gerem respostas similares, visando otimizar o desenho vacinal para infecções com o VSR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morris JA, Blount RE, Savage RE. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza. *Exp Biol Med*. 1956 Jul 1;92(3):544–9.
2. Rudraraju R, Jones B, Sealy R, Surman S, Hurwitz J. Respiratory Syncytial Virus: Current Progress in Vaccine Development. *Viruses*. 2013 Feb 5;5(2):577–94.
3. Monto AS. Epidemiology of viral respiratory infections. *Am J Med*. 2002 Apr;112(6):4–12.
4. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi S a, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010 May 1;375(9725):1545–55.
5. Fernández P, Trenholme A, Abarca K, Griffin MP, Hultquist M, Harris B, et al. A phase 2, randomized, double-blind safety and pharmacokinetic assessment of respiratory syncytial virus (RSV) prophylaxis with motavizumab and palivizumab administered in the same season. *BMC Pediatr*. 2010 Dec 3;10(1):38.
6. Higgins D, Trujillo C, Keech C. Advances in RSV vaccine research and development – A global agenda. *Vaccine*. 2016 Jun;34(26):2870–5.
7. Waris ME, Tsou C, Erdman DD, Zaki SR, Anderson LJ. Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. *J Virol*. 1996 May;70(5):2852–60.
8. Cohn L, Herrick C, Niu N, Homer RJ, Bottomly K. IL-4 Promotes Airway Eosinophilia by Suppressing IFN- γ Production: Defining a Novel Role for IFN- γ in the Regulation of Allergic Airway Inflammation. *J Immunol*. 2001 Feb 15;166(4):2760–7.
9. Anderson LJ, Dormitzer PR, Nokes DJ, Rappuoli R, Roca A, Graham BS. Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development. *Vaccine*. 2013 Apr 18;31 Suppl 2(2013):B209-15.
10. Christiaansen AF, Syed M a, Ten Eyck PP, Hartwig SM, Durairaj L, Kamath SS, et al. Altered Treg and cytokine responses in RSV-infected infants. *Pediatr Res*. 2016 Nov 21;80(5):702–9.
11. Durant LR, Makris S, Voorburg CM, Loebbermann J, Johansson C, Openshaw PJM. Regulatory T Cells Prevent Th2 Immune Responses and Pulmonary Eosinophilia during Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice. *J Virol*. 2013 Oct

- 15;87(20):10946–54.
12. Fulton RB, Meyerholz DK, Varga SM. Foxp3+ CD4 Regulatory T Cells Limit Pulmonary Immunopathology by Modulating the CD8 T Cell Response during Respiratory Syncytial Virus Infection. *J Immunol*. 2010 Aug 15;185(4):2382–92.
 13. Liu J, Ruckwardt TJ, Chen M, Nicewonger JD, Johnson TR, Graham BS. Epitope-Specific Regulatory CD4 T Cells Reduce Virus-Induced Illness while Preserving CD8 T-Cell Effector Function at the Site of Infection. *J Virol*. 2010 Oct 15;84(20):10501–9.
 14. Chandele A, Sewatanon J, Gunisetty S, Singla M, Onlamoon N, Akondy RS, et al. Characterization of human CD8 T cell responses in dengue virus infected patients from India. *J Virol*. 2016;90(24):11259–78.
 15. Gulzar N, Copeland KFT. CD8+ T-Cells: Function and Response to HIV Infection. *Curr HIV Res*. 2004;2:23–37.
 16. Ingulli E, Funatake C, Jacovetty EL, Zanetti M. Cutting edge: antigen presentation to CD8 T cells after influenza A virus infection. *J Immunol*. 2009;182(1):29–33.
 17. Liu J, Ruckwardt TJ, Chen M, Johnson TR, Graham BS. Characterization of respiratory syncytial virus M- and M2-specific CD4 T cells in a murine model. *J Virol*. 2009;83(10):4934–41.
 18. Schwartz R. Respiratory syncytial virus in infants and children. *Nurse Pract*. 1995 Sep;20(9):24–9.
 19. Hall CB. Respiratory syncytial virus in young children. *Lancet*. 2010 May;375(9725):1500–2.
 20. Hall CB, Douglas RG, Schnabel KC, Geiman JM. Infectivity of respiratory syncytial virus by various routes of inoculation. *Infect Immun*. 1981 Sep;33(3):779–83.
 21. Monto AS, Sullivan KM. Acute respiratory illness in the community. Frequency of illness and the agents involved. *Epidemiol Infect*. 1993 Feb 15;110(1):145–60.
 22. Langley JM, Wang EEL, Law BJ, Stephens D, Boucher FD, Dobson S, et al. Economic evaluation of respiratory syncytial virus infection in Canadian children: A Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study. *J Pediatr*. 1997;131(1 D):113–7.
 23. Paramore LC, Ciuryla V, Ciesla G, Liu L. Economic Impact of Respiratory Syncytial Virus-Related Illness in the US. *Pharmacoeconomics*. 2004;22(5):275–84.
 24. Díez-Domingo J, Pérez-Yarza EG, Melero JA, Sánchez-Luna M, Aguilar MD, Blasco AJ, et al. Social, economic, and health impact of the respiratory syncytial virus: a systematic search. *BMC Infect Dis*. 2014;14:544.

25. Lay MK, González P a, León M a, Céspedes PF, Bueno SM, Riedel C a, et al. Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. *Microbes Infect.* 2013 Mar;15(3):230–42.
26. Kurt-Jones EA, Jones LP, Anderson LJ, Finberg RW, Walsh EE, Tripp RA, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol.* 2000;1(5):398–401.
27. Crim RL, Audet SA, Feldman SA, Mostowski HS, Beeler JA. Identification of Linear Heparin-Binding Peptides Derived from Human Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein That Inhibit Infectivity. *J Virol.* 2007 Jan 1;81(1):261–71.
28. Zhao X, Singh M, Malashkevich VN, Kim PS. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc Natl Acad Sci.* 2000 Dec 19;97(26):14172–7.
29. Feldman SA, Audet S, Beeler JA. The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. *J Virol.* 2000 Jul;74(14):6442–7.
30. Tan L, Coenjaerts FEJ, Houspie L, Viveen MC, van Bleek GM, Wiertz EJHJ, et al. The Comparative Genomics of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroups A and B: Genetic Variability and Molecular Evolutionary Dynamics. *J Virol.* 2013 Jul 15;87(14):8213–26.
31. Bukreyev a, Whitehead SS, Murphy BR, Collins PL. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *J Virol.* 1997;71(12):8973–82.
32. Tiong-Yip C-L, Aschenbrenner L, Johnson KD, McLaughlin RE, Fan J, Challa S, et al. Characterization of a Respiratory Syncytial Virus L Protein Inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Jul 1;58(7):3867–73.
33. Meshram CD, Baviskar PS, Ognibene CM, Oomens AGP. The Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein, Matrix Protein, and Fusion Protein Carboxy-Terminal Domain Drive Efficient Filamentous Virus-Like Particle Formation. García-Sastre A, editor. *J Virol.* 2016 Dec 1;90(23):10612–28.
34. Utley TJ, Ducharme NA, Varthakavi V, Shepherd BE, Santangelo PJ, Lindquist ME, et al. Respiratory syncytial virus uses a Vps4-independent budding mechanism controlled by Rab11-FIP2. *Proc Natl Acad Sci.* 2008 Jul 22;105(29):10209–14.

35. Tayyari F, Marchant D, Moraes TJ, Duan W, Mastrangelo P, Hegele RG. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat Med*. 2011 Aug 14;17(9):1132–5.
36. Vandini S, Faldella G, Lanari M. Latest options for treatment of bronchiolitis in infants. *Expert Rev Respir Med*. 2016;10(4):453–61.
37. Chimenti C. Prevalence of Fabry Disease in Female Patients With Late-Onset Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation*. 2004 Aug 23;110(9):1047–53.
38. Hu J, Robinson JL. Treatment of respiratory syncytial virus with palivizumab: a systematic review. *World J Pediatr*. 2010 Nov 16;6(4):296–300.
39. Committee on Infectious Diseases. Modified Recommendations for Use of Palivizumab for Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infections. *Pediatrics*. 2009 Dec 1;124(6):1694–701.
40. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol*. 1969 Apr;89(4):422–34.
41. Dudas RA, Karron RA. Respiratory syncytial virus vaccines. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(3):430–9.
42. Kim JY, Chang J. In hot pursuit of the first vaccine against respiratory syncytial virus. *Yonsei Med J*. 2016;57(4):809–16.
43. Grieves JL, Yin Z, Durbin RK, Durbin JE. Acute and Chronic Airway Disease After Human Respiratory Syncytial Virus Infection in Cotton Rats (*Sigmodon hispidus*). *Comp Med*. 2015 Aug 21;65(4):315–26.
44. Rossey I, Sedeyn K, De Baets S, Schepens B, Saelens X. CD8+ T cell immunity against human respiratory syncytial virus. *Vaccine*. 2014 Oct;32(46):6130–7.
45. Graham BS, Bunton LA, Wright PF, Karzon DT. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *J Clin Invest*. 1991 Sep 1;88(3):1026–33.
46. Gut W, Pancer K, Abramczuk E, Cześćik A, Dunal-Szczepaniak M, Lipka B, et al. RSV respiratory infection in children under 5 y.o.--dynamics of the immune response Th1/Th2 and IgE. *Przegl Epidemiol*. 2013;67(1):17–22.
47. Caballero MT, Serra ME, Acosta PL, Marzec J, Gibbons L, Salim M, et al. TLR4 genotype and environmental LPS mediate RSV bronchiolitis through Th2 polarization. *J Clin Invest*. 2015 Feb 2;125(2):571–82.
48. ABERLE JH, ABERLE SW, REBHANDL W, PRACHER E, KUNDI M, POPOW-

- KRAUPP T. Decreased interferon-gamma response in respiratory syncytial virus compared to other respiratory viral infections in infants. *Clin Exp Immunol*. 2004 Jun 8;137(1):146–50.
49. Ray A, Khare A, Krishnamoorthy N, Qi Z, Ray P. Regulatory T cells in many flavors control asthma. *Mucosal Immunol*. 2010 May 17;3(3):216–29.
 50. Christiaansen AF, Knudson CJ, Weiss K a, Varga SM. The CD4 T cell response to respiratory syncytial virus infection. *Immunol Res*. 2014 Aug 17;59(1–3):109–17.
 51. Liu J, Cao S, Peppers G, Kim S-H, Graham BS. Clonotype-specific avidity influences the dynamics and hierarchy of virus-specific regulatory and effector CD4 + T-cell responses. *Eur J Immunol*. 2014 Apr;44(4):1058–68.
 52. Demers KR, Reuter MA, Betts MR. CD8 + T-cell effector function and transcriptional regulation during HIV pathogenesis. *Immunol Rev*. 2013 Jul;254(1):190–206.
 53. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. *Immunity*. 2009 Feb;30(2):180–92.
 54. Olson MR, Varga SM. CD8 T Cells Inhibit Respiratory Syncytial Virus (RSV) Vaccine-Enhanced Disease. *J Immunol*. 2007 Oct 15;179(8):5415–24.
 55. Lee S, Stokes KL, Currier MG, Sakamoto K, Lukacs NW, Celis E, et al. Vaccine-Elicited CD8+ T Cells Protect against Respiratory Syncytial Virus Strain A2-Line19F-Induced Pathogenesis in BALB/c Mice. *J Virol*. 2012 Dec 1;86(23):13016–24.
 56. Mohr E, Cunningham AF, Toellner K-M, Bobat S, Coughlan RE, Bird R a, et al. IFN- γ produced by CD8 T cells induces T-bet-dependent and -independent class switching in B cells in responses to alum-precipitated protein vaccine. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Oct 5;107(40):17292–7.
 57. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol*. 2003 Sep;4(9):835–42.
 58. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004 Apr;22(1):745–63.
 59. Arden B, Clark S, Kabelitz D, Mak T. Mouse T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics*. 1995 Oct;42(6):501–30.
 60. Roth DB. Restraining the V(D)J recombinase. *Nat Rev Immunol*. 2003 Aug;3(8):656–66.
 61. Storek J, Lalovic BB, Rupert K, Dawson M a, Shen DD, Maloney DG. Kinetics of B, CD4 T, and CD8 T Cells Infused into Humans: Estimates of

- Intravascular:Extravascular Ratios and Total Body Counts. *Clin Immunol.* 2002 Mar;102(3):249–57.
62. Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, et al. Ligand recognition by $\alpha\beta$ T cell receptors. *Annu Rev Immunol.* 1998 Apr;16(1):523–44.
 63. Yewdell JW. Confronting Complexity: Real-World Immunodominance in Antiviral CD8+ T Cell Responses. *Immunity.* 2006 Oct;25(4):533–43.
 64. Moon JJ, Chu HH, Pepper M, McSorley SJ, Jameson SC, Kedl RM, et al. Naive CD4+ T Cell Frequency Varies for Different Epitopes and Predicts Repertoire Diversity and Response Magnitude. *Immunity.* 2007 Aug;27(2):203–13.
 65. Moon JJ, Chu HH, Hataye J, Pagán AJ, Pepper M, McLachlan JB, et al. Tracking epitope-specific T cells. *Nat Protoc.* 2009 Apr;4(4):565–81.

ANEXO

ANEXO A - APROVAÇÃO DO CEUA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 38/2014 - CEUA

Porto Alegre, 03 de junho de 2014.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

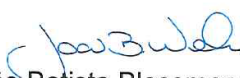
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 14/00392, intitulado **“Avaliação da diferenciação de células T após a infecção pelo vírus sincicial respiratório em associação com peptídeo 2W de Listeria monocytogenes”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
60	Mus musculus	06/2014 – 03/2017

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Cristina Bonorino

FAMED

Nesta Universidade

APÊNDICES

APÊNDICE A - ARTIGO ORIGINAL

Vaccination with respiratory syncytial virus (RSV) M₂₀₉₋₂₂₃ peptide promotes a protective immune response against infection and reduces lung inflammation

Tiago Fazolo^{1,2}; Rodrigo Benedetti Gassen^{1,2}; Deise Nascimento de Freitas²; Thiago J. Borges¹; Maurício Menegatti Rigo¹; Rodrigo Dornelles da Silva¹; Fábio Maito³; Aline Cunha⁴; Daniel Augusto Gasparin Bueno Mendes⁵; André Báfica⁵; José Eduardo Vargas⁶; Ana Paula Duarte de Souza²; Cristina Bonorino¹.

¹ Laboratory of Cellular and Molecular Immunology - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Laboratory of Clinical and Experimental Immunology - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³ Laboratory of Oral Pathology - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁴ Laboratory of Pediatric Respiriology - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁵ Laboratory of Immunobiology - Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

⁶ Laboratory of Cytogenetics - University of Passo Fundo, Passo Fundo, Brazil

Abstract

Respiratory syncytial virus (RSV) is the most common etiologic agent in severe infections of the lower respiratory tract in children, resulting in death of nearly 200,000 children under 5 years old every year. There are still no licensed vaccines for RSV, and vaccination with formalin inactivated virus generates a Th2 response that exacerbates inflammation upon infection. In an animal model, the RSV peptide M₂₀₉₋₂₂₃ was previously shown to induce regulatory T cells (Treg), reducing pulmonary inflammation upon infection. In this study, we investigated the mechanisms by which vaccination with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide could protect from RSV infection. Mice vaccinated with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide expanded M₂₀₉₋₂₂₃-specific effector CD4⁺ T cells upon infection, not only of Treg phenotype, but also Th1, and very few Th2 cells. Vaccination with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide, but not with UV-RSV, protected mice from infection and prevented lung inflammation, leading to increased IL-10 and IFN- γ production by lung CD4⁺ T cells. Our results support vaccination with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide as an important strategy to generate protection, both systemic and local, by memory RSV-specific CD4⁺ T cells. Contrarily to UV-RSV, M₂₀₉₋₂₂₃ peptide vaccination is capable of not only promoting viral clearance, but also priming against the expansion of a harmful, Th2 population, upon infection.

Keywords: Respiratory syncytial virus, M₂₀₉₋₂₂₃ peptide, CD4⁺ T cells, regulatory T cells, Th2 response.

Introduction

The respiratory syncytial virus (RSV) is the most common etiologic agent in severe infections of the lower respiratory tract in children. RSV infection is the main cause of hospitalizations for respiratory diseases worldwide, constituting a major problem in public health systems (1,2). RSV is responsible for approximately 190,000 deaths per year, and the third cause of infant mortality due to respiratory infections, only behind pneumonia and influenza infections (3,4).

Prevention of RSV complications in premature children is managed with the use of an anti-RSV F protein monoclonal antibody (palivizumab), however this type of treatment is expensive, and not available for most people who need it (5). Currently, there is no licensed vaccine for RSV, however 60 vaccine candidates are in pre-clinical or clinical development (6). Natural infections by RSV do not induce long-lasting protective memory, and this is believed to result in multiple reinfections throughout life. RSV reinfections are often accompanied by severe lung disease characterized by an exacerbated Th2 profile (7–9), which occurs mostly in children, pregnant women, elderly people and immunosuppressed individuals. Children infected with RSV present an increased production of IL-4 cytokines in nasal secretions, and a decreased number of Treg in peripheral blood (10). These findings argue a Th2 response as harmful rather than helpful, for RSV infections, suggesting that the induction of Treg cells during RSV immunization might be beneficial.

Liu et al have previously shown that CD4⁺ T cells specific for the M₂₀₉₋₂₂₃ peptide differentiate into RSV-specific Treg (11). We hypothesized that the development of a vaccine against RSV would benefit from the induction and expansion of CD8⁺ T-supporting Treg, and that vaccination with the M₂₀₉₋₂₂₃ peptide could constitute a

promising approach. To test our hypothesis, we vaccinated mice with the peptide or inactivated RSV and challenged with live virus. We followed the differentiation and expansion of M₂₀₉₋₂₂₃ specific CD4⁺ T cells in lymphoid organs and lungs, using tetramers for magnetic enrichment (pulldown). Our results suggest that vaccination with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide results in differentiation of the specific CD4⁺ T cells into conventional effectors and Tregs. Moreover, vaccination with this peptide decreased the expansion of a Th2 response in infected mice, differently from vaccination with UV-inactivated virus, and protected locally and systemically against the disease, aside from preventing alveolar inflammation upon infection. We believe vaccination with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide can constitute a promising and important component of vaccine strategies design against this virus.

Materials and methods

Mice

C57BL/6 mice were obtained from a colony maintained at Centro de Modelos Biológicos e Experimentais (CEMBE) - PUCRS. Six to eight-week-old female animals weighed between 15-20g were used for experiments and were housed at the CEMBE animal facility with water and food ad libitum. All animal procedures were performed in accordance to protocols approved by the University Ethics Committee (CEUA, Protocol number 14/00392).

Cells and Viruses

Vero cells (ATCC CCL81) were cultured in Dulbeccol's modified Eagle's medium (DMEM - Gibco, USA), containing 10% fetal bovine serum (FBS - Gibco, USA), and gentamicin (0.08 mg/ml, NOVAFARMA) at 37°C with 5% of CO₂. RSV A strain (line A2) was kindly provided by Prof. Fernando Polack, from Fundación Infant (Buenos Aires, Argentina). RSV was propagated in Vero cells using DMEM, with 2% FBS. Viral titration was performed using Vero cells staining the virus plaque with a mouse anti-RSV monoclonal antibody (MAB858-4, EMD-Millipore).

Peptides and tetramers

The RSV peptide M₂₀₉₋₂₂₃ is composed of 15 amino acids (NKGAFKYIKPQSQFI) and was purchased from Biomatik, USA. The PE-I-A^bRSVM₂₀₉₋₂₂₃ tetramer was provided by the National Institutes of Health (NIH Tetramer Core Facility, Atlanta, GA).

Vaccination and RSV infection

Three groups of mice (n = 5) were vaccinated and boosted on day 7 by subcutaneous (s.c.) injections. PBS was applied in a control (group 1), 100µg of M₂₀₉₋₂₂₃ peptide (group 2), or 10⁶ PFU UV-RSV (group 3), all containing 5µg of Poly-IC (InvivoGen, USA). In groups that were infected, the mice were anesthetized on day 14 intraperitoneally with ketamine (Cristalia, Brazil) (100 mg/kg) and xylazine (Syntec, Brazil) (10 mg/kg) and were inoculated intranasally with 10⁷ PFU of live RSV in 30µL of PBS. At day 14 post-immunization (uninfected groups), or day 5 post-challenge (infected groups), mice were euthanized for lung and secondary lymphoid organs harvest.

Enrichment and staining of RSV M₂₀₉₋₂₂₃-specific CD4⁺ T cells

Enrichment of specific T cell populations by tetramer pulldown was performed according to Moon et al. (12). Spleen and cervical, axillary, brachial, mesenteric, inguinal and periaortic lymph nodes were harvested from each mouse. A single cell suspension from all organs was prepared in 0.2 ml of Fc block (supernatant of 2.4G2 cells with 2% mouse serum, 2% rat serum and 0.1% sodium azide). I-A^bM₂₀₉₋₂₂₃ PE-conjugated tetramer was added at a concentration of 10nM, and cells were incubated at room temperature for

1 h, followed by a wash with 15 ml of ice-cold staining buffer (PBS 1x + 2% FBS, 0.1% sodium azide). Cells were then resuspended in a volume of 0.2 ml of staining buffer, mixed with 25 μ L of anti-PE antibody conjugated magnetic microbeads (Miltenyi Biotec, USA) and incubated on ice for 30 min, followed by two washes with 10 ml of staining buffer. The cells were then resuspended in 3 ml of staining buffer and passed over a magnetized LS column (Miltenyi Biotec). Column was washed with sorter buffer, and then removed from the magnetic field. Bound cells were obtained by pushing 5 ml of sorter buffer through the column with a plunger. After the enrichment process, cells were labeled for flow cytometry.

Lung cells isolation and in vitro stimulation

Lymphocytes were isolated from lung tissue using collagenase D (0,1mg/ml) for 1 hour at 37°C. For the cytokine analysis, cells were stimulated with the M₂₀₉₋₂₂₃ peptide at 2 μ g/ml for 6 hours at 37°C in the presence of GolgiStop (BD Pharmingen, USA) at 1 μ g/ml, together with 1 μ g/ml of costimulatory antibodies and with anti-CD28 and anti-CD49d (BD Biosciences), as previously described (11) and then stained as described below.

Flow cytometry

Lymph nodes cells were incubated with Fc Block for 20 min. Three panels were performed using surface antibodies for staining, anti-CD11b (APC-Cy7, M1/70 clone), anti-CD11c (APC-Cy7, HL3 clone), anti-CD11c (FITC, HL3 clone) anti-CD19 (APC-Cy7, 1D3 clone), anti-B220 (FITC, RA3-6B2 clone), anti-CD4 (PE-Cy7, RM4-5 clone),

anti-CD4 (APC, RM4-5 clone), CD4 (APC-Cy7, GK1.5 clone), anti-CD8 (PE-Cy7, 53-6.7 clone), anti-CD44 (PerCP, IM7 clone) and anti-62L (FITC, MEL-14) (BD Biosciences, USA). We used the following antibodies for intracellular staining: anti-Foxp3 (Alexa fluor 647, MF23 clone), anti-GATA3 (Alexa Fluor 647, L50-823 clone), anti-IFN- γ (FITC, XMG1.2 clone) and anti-IL-10 (APC, JES5-16E3 clone). Lung cells were incubated with Fc Block for 20 min. Cells were seeded at 5×10^5 cells per well in a 96 well-plate and stained with the I-A^bM₂₀₉₋₂₂₃ tetramer, which was incubated for 30 minutes at 37°C. After that, cells were stained and labeled with anti-CD4 (APC, RM4-5 clone), anti-CD4 (APC-Cy7, GK1.5 clone), anti-CD8 (PE-Cy7, 53-6.7 clone), anti-CD19 (APC-Cy7, 1D3 clone), anti-CD44 (PerCP, IM7 clone) and anti-CD62L (FITC, MEL-14) antibodies (BD Biosciences, USA) for surface staining. Anti-IFN- γ (FITC, XMG1.2) clone and anti-IL-10 (APC, JES5-16E3 clone) were used for cytokines. Samples were acquired on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, USA). Data were analyzed using FlowJo software (version 7.5, Tree Star Inc., Ashland, US). After surface labeling, cells were fixed and permeabilized with the Foxp3 Permeabilization Buffer (eBioscience) and labeled with intracellular antibodies. All gate strategies are specified in the Supplementary Fig. 1.

Real-time PCR

Total RNA was extracted from the lungs of infected animals, using viral RNA/DNA Mini Kit (PureLink® - Invitrogen), following the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized with random primers using Sensiscript® Reverse Transcription kit (QIAGEN®). The quality of cDNA for each sample was tested by amplification of the endogenous β -actin gene, using specific primers from TaqMan Assay (Applied

Biosystems). Samples that did not amplify for β -actin were excluded. Real-time PCR was performed for the amplification of the RSV F protein gene using the primers and specific probes (forward-5'-AACAGATGTAAGCAGCTCCGTTATC-3', reverse-5'-GATTTTTATTGGATGCTGTACATTT-3' and probe 5'-FAM/TGCCATAGCATGACACAATGGCTCCT-TAMRA/-3'). For the standard curve, a ten-fold serial dilutions of 6×10^7 copies of a plasmid with RSV F protein sequence were added to the same plate of qPCR in duplicate. The results were used for further quantification of viral load.

Histopathologic analysis

Lungs were perfused with 10% buffered formalin on a gravity column (20 mmHg). The specimens were embedded in paraffin blocks, cut into 4- μ m sections, stained with hematoxylin and eosin (HE) in order to assess inflammation. Identification of mucus-secreting goblet cells we performed using Alcian blue staining. All samples were examined by light microscopy (Olympus, BX51).

In silico binding prediction

M₂₀₉₋₂₂₃ peptide passed through scrutiny of prediction programs to assess its binding capacity with a reference set of 27 HLA-II alleles (99% of the population HLA class II coverage) (13). The analysis was performed using T cell epitope prediction tools from IEDB (14,15). We know from literature that M₂₀₉₋₂₂₃ triggers a T cell response in murine carrying the MHC class II H2-IA^b (11,16–18) thus, as a positive control, we also performed a peptide binding prediction with this allele.

Statistical analysis

Data were tested for normal distribution by Kolmogorov-Smirnov test. Data were submitted to analysis of variance ANOVA, followed by the Tukey test, comparing the differences between the groups, using GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). A confidence limit of 95% was established for significance of the results. Results were considered significant when p value less than 0.05 ($p < 0.05$).

Results

Vaccination with the UV-RSV or M₂₀₉₋₂₂₃ peptide generates specific memory CD4⁺ T cell precursors in lymphoid organs.

We characterized the phenotype and evaluated the expansion of I-A^bM₂₀₉₋₂₂₃ tetramer-positive effector CD4⁺ T cells following three different vaccination strategies. In the first group, animals received only PBS and Poly-IC. In the second, animals were vaccinated with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide and Poly-IC, and in the third group, C57BL/6 mice were vaccinated with UV-RSV and Poly-IC. All groups received a boost 7 day after the first vaccination (Figure 1A). Vaccination with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide and with UV-RSV showed an increase in the frequency of effector CD4⁺ T cells specific for M₂₀₉₋₂₂₃ peptide in the secondary lymphoid organs (Figure 1 B and C). Both groups also presented a significant increase in the populations of I-A^bM₂₀₉₋₂₂₃ tetramer-positive Tregs and IFN- γ -producing CD4⁺ T cells comparing to control (Figure 1 D and E). Upon immunization, peptide-specific central memory precursors expanded approximately 21- and 25-fold higher than the control in the groups vaccinated with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide and UV-RSV, respectively (Supplementary Fig. 2).

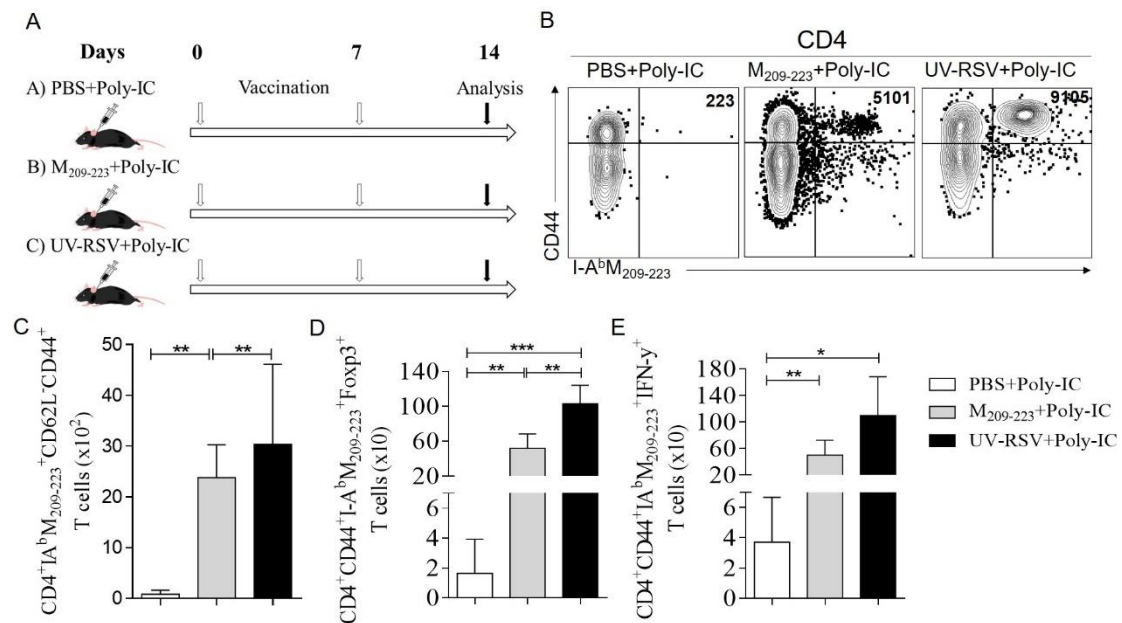


Figure 1. Immunization schedule of mice and total CD4⁺ T cell responses to RSV M₂₀₉₋₂₂₃ peptide and UV-RSV before challenge with RSV. Immunization schedule of mice: Three groups of mice (5 animals in each group) were subcutaneously injected with either PBS plus Poly-IC, 100µg of M209-223 peptide mixed with Poly-IC or 106 PFU RSV with Poly-IC previously inactivated by ultraviolet light (UV-RSV) on day 0 and boost on day 7. All groups received 5µg of Poly-IC. Secondary lymphoid organs were harvested 14 days post-immunization for analysis (A). All secondary lymphoid organs were isolated at day 14 post-immunization and stained for tetramers and phenotyping antibodies to identify specific CD4⁺CD44⁺ T cells (B), effector memory specific CD4⁺ T cells (C), Treg-specific CD4⁺CD44⁺ T cells (D) and specific CD4⁺CD44⁺ T cells producing IFN- γ (E). Data (mean \pm SD, n= 5/group) are represented as bars from different colors: PBS+Poly-IC (white bars), M209-223 peptide+Poly-IC (gray bars) and UV-RSV (black bars). Data are representative of three independent experiments and compared by using the One-way ANOVA test with Tukey post-test. The significance of the differences between groups are shown as *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001.

Vaccination with the UV-RSV or M₂₀₉₋₂₂₃ peptide generates specific effector CD4⁺ T cells in the lung.

To analyze the expansion of peptide-specific T cells in the lungs, lymphocytes were also isolated on day 14 from the lungs of previously vaccinated mice and were re-stimulated *in vitro* with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide. Animals vaccinated with the M₂₀₉₋₂₂₃ peptide showed a significant increase in the frequency of M₂₀₉₋₂₂₃ peptide-specific CD4⁺ T cells (approximately 5-fold higher than the control and UV-RSV vaccinated groups) (Figure 2A). When these cells were analyzed for cytokine production, ~11-fold increase in frequency of M₂₀₉₋₂₂₃ peptide-specific IL-10-producing CD4⁺ T cells in animals vaccinated with the M₂₀₉₋₂₂₃ peptide was observed (Figure 2B). The frequency of IFN- γ ⁺ T cells specific to the M₂₀₉₋₂₂₃ peptide, was approximately 4.3-fold higher (Figure 2C), when compared to the control group and vaccinated with UV-RSV. Interestingly, we observed that, upon re-stimulation with the peptide, the frequency of CD8⁺ T cells secreting IFN- γ was significantly higher in the group vaccinated with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide (~4.6-fold) when compared to control and UV-RSV vaccinated (Supplementary Fig. 3). Thus, as expected, vaccination with the peptide induces a more robust population of specific CD4⁺ T cells than vaccination with UV-RSV at the site of infection. However, unexpectedly, expansion of CD8⁺ T cells was apparently stimulated by this increase of peptide specific CD4⁺ T cells in the lung.

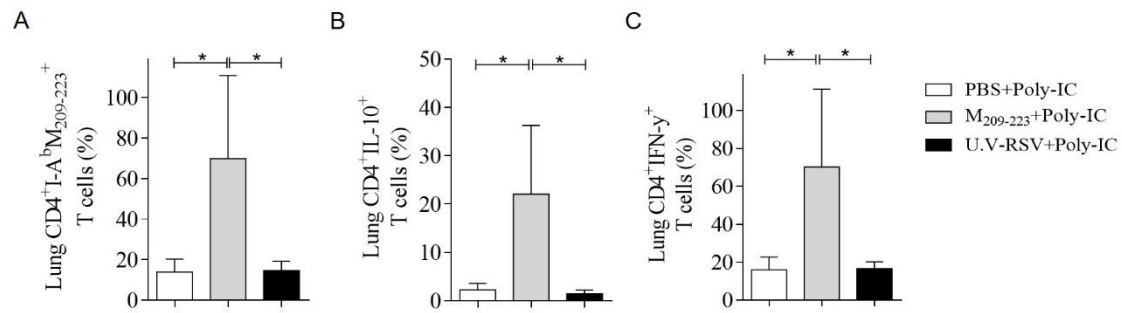


Figure 2. Phenotype of lung CD4⁺ T cells before challenge with RSV. Cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies for CD4 and tetramer I-A^bM₂₀₉₋₂₂₃ (A). Mice lung lymphocytes were cultured with the M₂₀₉₋₂₂₃ peptides for 6 hours at 37 °C. Cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies for anti-CD4 and anti-IL-10 (B), anti-CD4 and anti-IFN-γ (C). Treatments' data (mean ± SD, n= 5/group) are represented as bars from different colors: PBS+Poly-IC (white bars), M₂₀₉₋₂₂₃ peptide+Poly-IC (gray bars) and UV-RSV (black bars). Data are representative of three independent experiments and compared by using the One-way ANOVA test with Tukey post-test. The significance of the differences between groups are shown as *p < 0.05.

Mice vaccinated with UV-RSV, but not with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide, expand a large population of Th2 specific T cells in the lymphoid organs upon challenge with live virus.

We next verified the CD4⁺ T cell-mediated cellular response of each vaccinated group upon challenge, infecting them with live virus, and enumerating total specific T cells by pulldown with tetramer. We observed that total numbers of peptide-specific T cells in each group was not greatly expanded upon challenge when compared to what was previously observed after vaccination alone (Figures 3B and 1B, respectively). M₂₀₉₋₂₂₃ vaccinated group presented a ~6.3-fold increase in polyclonal effector memory (CD62L⁻

CD44⁺) tetramer positive cells compared to controls (Figure 3C), while UV-RSV vaccinated mice showed a 22-fold expansion. Central memory cells (CD44⁺CD62L⁺) were also expanded in M₂₀₉₋₂₂₃ (6-fold) and UV-RSV (12-fold) groups (Supplementary Fig. 4B).

When we analyzed the different phenotypes of these cells, a 27.5-fold expression of I-A^bM₂₀₉₋₂₂₃ Tregs was observed in mice primed with the peptide, versus 39.8-fold in mice primed with UV-RSV, compared to the control group (Figure 3D). In memory M₂₀₉₋₂₂₃-specific CD4⁺ T cells producing IFN- γ , we observed an expansion of 6.3 and 10.5 fold when compared to the control group, in the animals vaccinated with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide and with UV-RSV, respectively (Figure 3E). Upon challenge, the number of effector memory, Foxp3⁺ and IFN- γ ⁺ M₂₀₉₋₂₂₃-specific CD4⁺ T cell memory precursors was not different between the mice vaccinated with peptide or inactivated virus. An early study from Graham and collaborators reported that immunization with inactivated RSV induced a predominantly Th2 pattern of cytokines in the lung upon challenge, as analyzed by total mRNA expression (19). When we analyzed the peptide-specific Th2 cells, we verified that while mice primed with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide showed a modest (3-fold) increase in GATA3⁺ peptide-specific cells compared to controls, mice primed with UV-RSV showed a much greater expansion of these cells: a 42.2- fold increase in relation to the unvaccinated controls, 15 times greater than what was observed for M₂₀₉₋₂₂₃ immunized mice (Figure 3F).

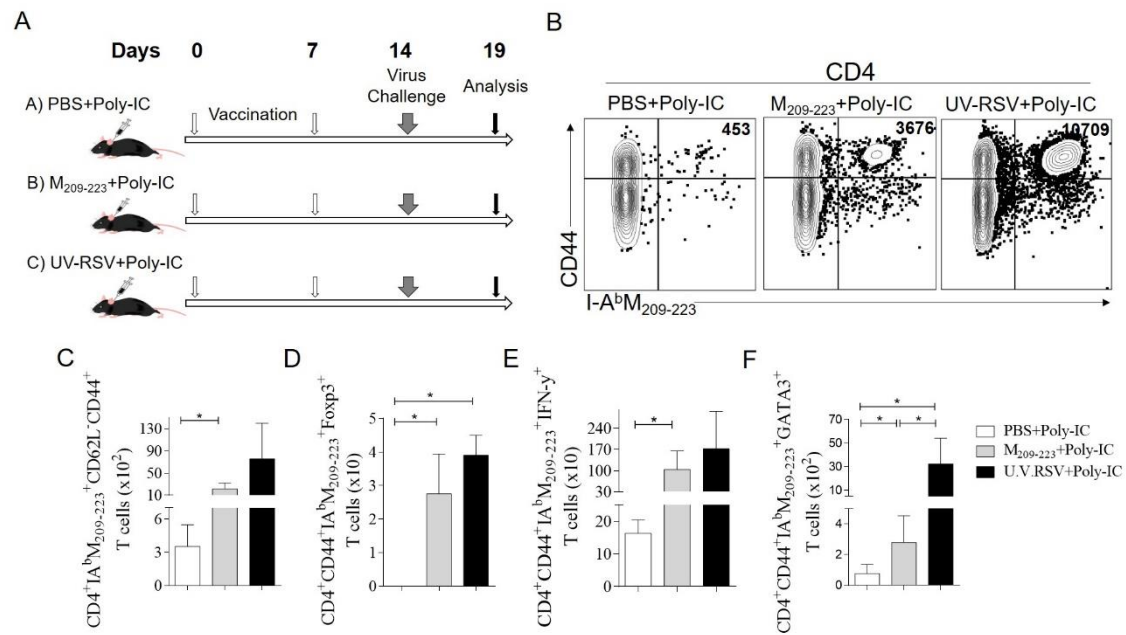


Figure 3. Immunization schedule of mice and total CD4⁺ T cell responses to RSV M₂₀₉₋₂₂₃ peptide and UV-RSV after challenge with live virus. Three groups of mice (5 animals in each group) were subcutaneously injected with PBS, 100μg of M₂₀₉₋₂₂₃ peptide or 10⁶ PFU RSV previously inactivated by ultraviolet light (UV-RSV) on day 0 and boost on day 7. All groups received 5μg of Poly-IC as adjuvant. Mice were challenged with RSV at day 14 post-immunization. (A). All secondary lymphoid organs were isolated at day 5 post-challenge (day 19) and stained with tetramers and phenotyping antibodies to identify specific CD4⁺CD44⁺ T cells (B), effector memory specific CD4⁺ T Cells (C), Treg-specific CD4⁺CD44⁺ T Cells (D), specific CD4⁺CD44⁺ T cells producing IFN-γ (E) and specific GATA3⁺CD4⁺CD44⁺ T Cells (F). Data (mean ± SD, n= 5/group) are represented as bars from different colors: PBS+Poly-IC (white bars), M₂₀₉₋₂₂₃ peptide+Poly-IC (gray bars) and UV-RSV (black bars). Data are representative of three independent experiments and compared by using the One-way ANOVA test with Tukey post-test. The significance of the differences between groups are shown as *p < 0.05.

Vaccination with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide protects animals from RSV infection.

To evaluate the protective effect of each immunization, we first quantified virus particles in lungs, five days after infection - which is when viral load is typically peaking in lungs of infected animals (20). While RSV particles could be abundantly detected in lungs of unimmunized mice, they were undetectable in mice vaccinated with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide. Viral particles could still be detected in lungs of mice primed with inactivated virus, although in significantly reduced amounts compared to controls (Figure 4A). Another good indicator of disease progression is weight loss. Interestingly, only mice vaccinated with the peptide gained or maintained their weight after challenge (Figure 4B), while both unimmunized and UV-RSV immunized mice lost weight significantly, compared to peptide vaccinated mice.

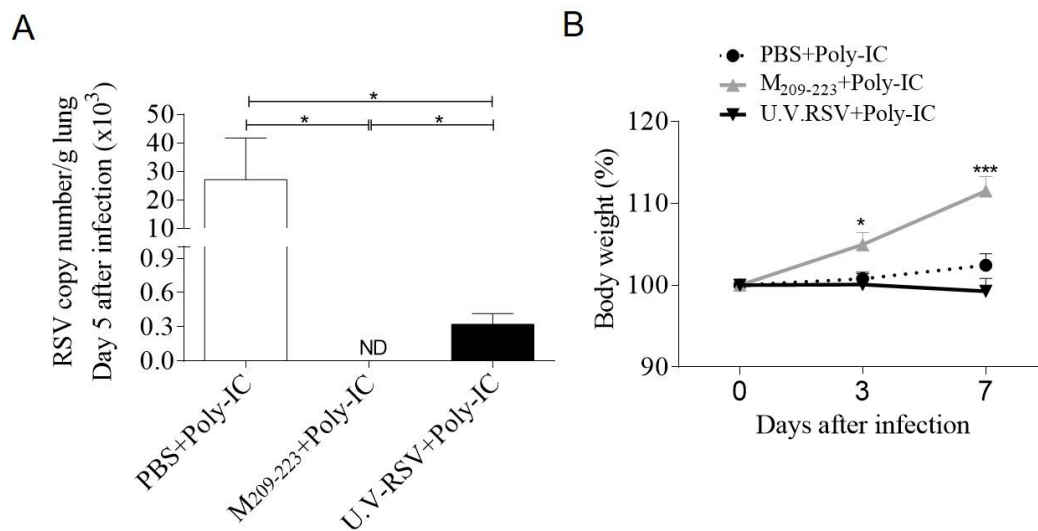


Figure 4. *Viral load and weight loss after RSV challenge following immunization and boost.* Viral load in lung after 5 days of virus challenge (A). Mice were weighed on days 0, 3 and 7 after virus inoculation (challenge day = day 0). Shown are the percentages of baseline weight (B). The data (mean \pm the SD, n=5/group) are representative of three

independent experiments and compared by using the One-way ANOVA test with Tukey post-test. The significance of the differences between groups is shown as * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

Vaccination of M₂₀₉₋₂₂₃ peptide protects lung tissue from inflammation caused by RSV infection.

To further investigate differences in disease progression that could explain the marked weight loss in animals vaccinated with UV-RSV compared to the ones immunized with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide, we evaluated by histology the lungs of animals infected with RSV after five days, analyzing the presence and/or composition of inflammatory infiltrates. No cell infiltrates could be detected in the lung of no challenged animals that received only PBS plus Poly-IC (Figure 5 -A1). However, in animals that received only PBS plus poly-IC, and were later infected with RSV, infiltrates were present in a large part of the lung tissue (Figure 5 - A2). Lungs of mice vaccinated with UV-RSV also had infiltrating cells in the lungs (Figure 5 –A4). Remarkably, animals vaccinated with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide presented lungs with minimal cell infiltration, very similar to uninfected controls (Figure 5 – A3). An additional measurement of lung inflammation is the presence of mucus in bronchi epithelial cells. Results of these analyses mirrored the ones from infiltrating cells. No mucus was observed in uninfected animals, and the presence of mucus (stained in blue) can be clearly visualized in mice that were not immunized, but were infected with RSV, respectively (Figures 5 - B1 and B2). Comparing the presence of mucus between the animals vaccinated with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide and with UV-RSV, a higher mucus production was observed in animals vaccinated with UV-RSV, respectively (Figures 5 - B3 and B4). Our results indicated that, although the UV-RSV immunization

could expand a larger number of effector cells in lymphoid organs, not only it failed to generate adequate protection, but also induced lung inflammation.

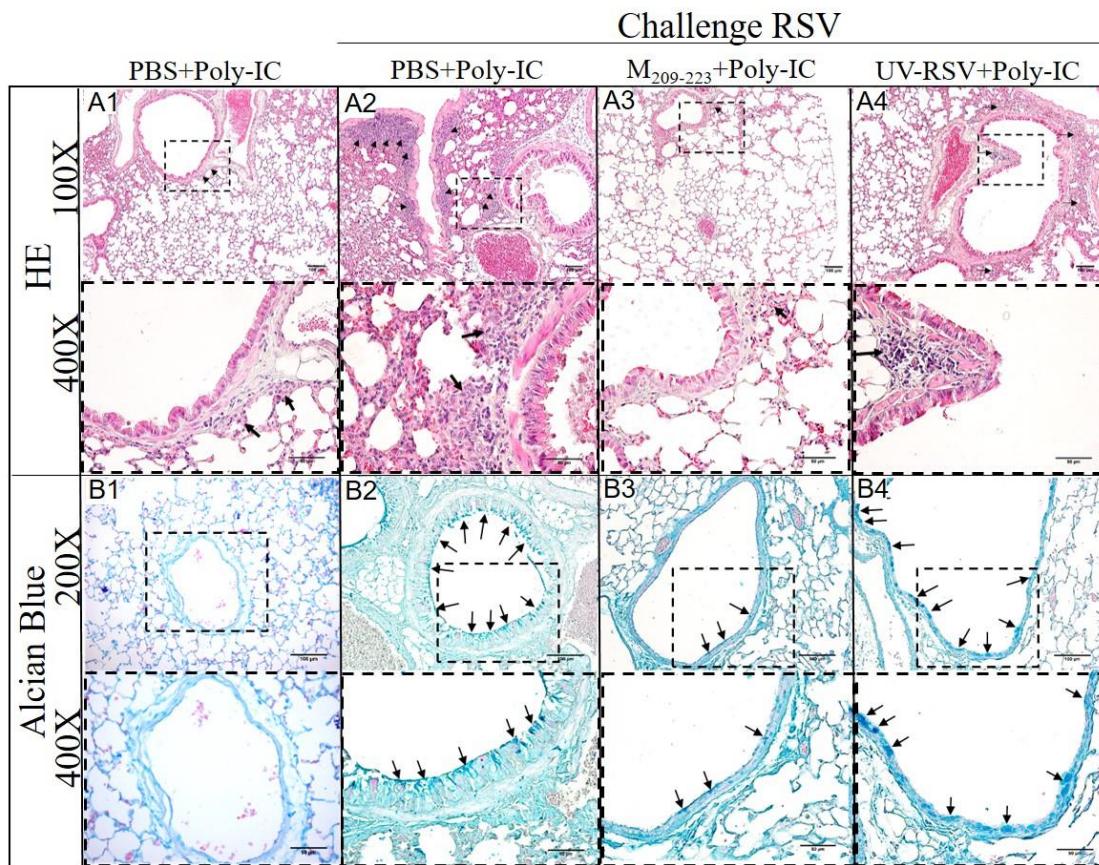


Figure 5. Histological analyses of the lung in vaccinated mice five days after challenge with RSV. Lung tissue histological sections stained with haematoxylin and eosin (HE). Arrows indicate the presence of inflammatory cell infiltration (A). Mucus-producing cells (arrows) in airways were identified by Alcian Blue staining in RSV infected and control mice (B).

Vaccination with the M₂₀₉₋₂₂₃ peptide expands the peptide-specific Th1 cells populations and decrease Th2 response in the lung after 5 days of challenge by RSV.

We next hypothesized that differences in the type of effector cells generated by each immunization could be responsible for the differences in protection observed, and that

would impact inflammation in the lungs of infected animals. To investigate that, we first compared the production of cytokines in the lungs after *in vitro* re-stimulation with the M₂₀₉₋₂₂₃ peptide of the vaccinated groups.

Remarkably, five days after infection, expansion of lung peptide-specific T effector cells was significantly greater upon infection in mice previously immunized with the peptide and poly-IC, compared to UV-RSV (Figure 6A). After *in vitro* re-stimulation with the M₂₀₉₋₂₂₃ peptide, M₂₀₉₋₂₂₃ vaccinated group had a 2-fold higher frequency of IL-10 and IFN- γ -producing CD4⁺ T cells as compared to control and UV-RSV vaccinated groups, respectively (Fig. 6B and C). The percentage of lung regulatory CD4⁺ T cells in the non-immunized animals was significantly higher compared to UV-RSV group (Figure 6D). Animals vaccinated with UV-RSV had a 2-fold higher frequency of GATA3⁺ cells compared to the non-immunized group and the vaccinated with the M₂₀₉₋₂₂₃ peptide (Figure 6E). Moreover, the percentage of IL-4 producing CD4⁺ T cells (including peptide specific and non-specific) in lungs of UV-RSV vaccinated mice was significantly higher than in the other two groups (Supplementary Fig. 5A), while INF- γ and IL-10 cells were higher in the M₂₀₉₋₂₂₃ vaccinated group (Supplementary Fig. 5B and C, respectively).

Treg cells are often found to respond to infection, inflammation and more recently it has been that these cells increase influx of CD8⁺ T Cells in the lungs of RSV infected animals. (21–23). Interestingly, we also observed an increase in the frequency of CD8⁺ T cells producing IFN- γ in the vaccination and IL-10 in the challenge, which could help decrease viral load and inflammation, respectively (Supplementary Fig. 3 and Supplementary Fig. 6B).

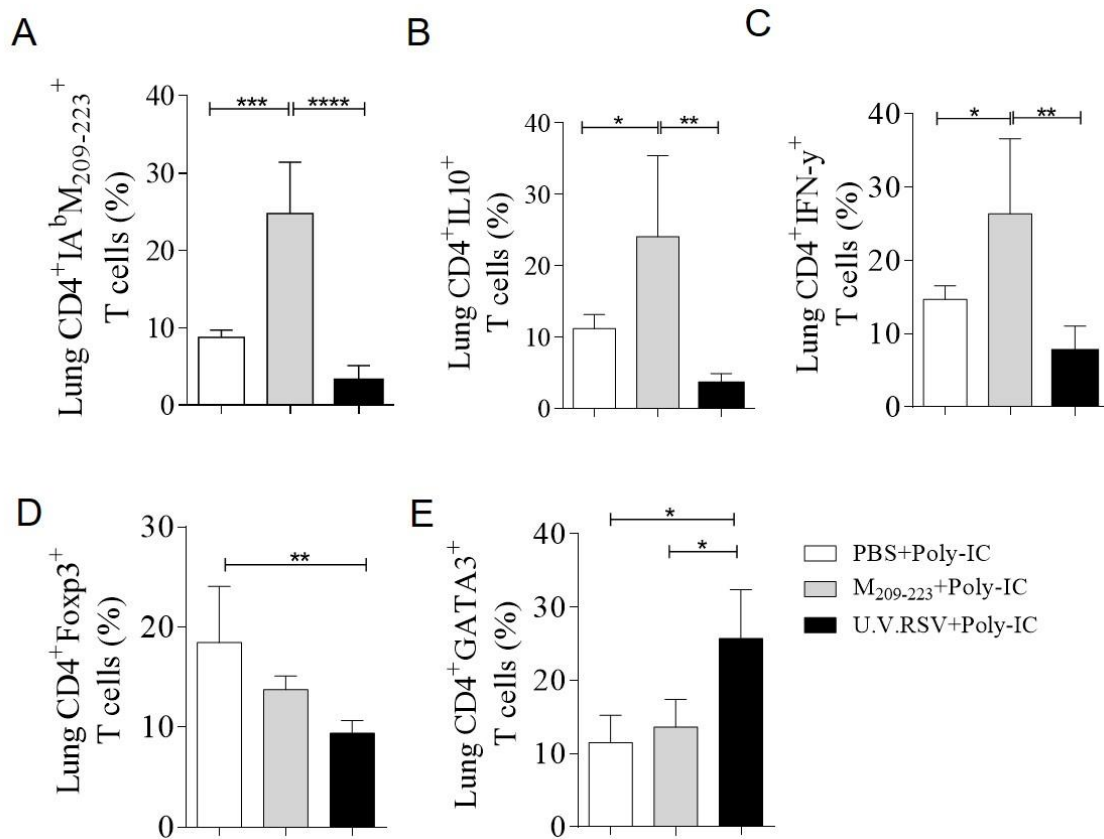


Figure 6. Characterization of cytokines produced by lung CD4⁺ T cells upon infection. Mice immunized with PBS+Poly-IC (white bars), M₂₀₉₋₂₂₃ peptide+Poly-IC (gray bars), or UV-RSV (black bars) and challenged with RSV for 5 days. Lymphocytes from the lung of infected mice were isolated and cultured with the M₂₀₉₋₂₂₃ peptides for 6 hours at 37 °C. Cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies for anti-CD4 and tetramer I-A^bM₂₀₉₋₂₂₃ (A); anti-CD4 and anti-IL-10 (B), anti-CD4 and anti-IFN-γ (C), anti-CD4 and anti-Foxp3 (D), anti-CD4 and anti-GATA3 (E). Treatments are represented as bars with mean ± the SD (n= 5/group). Representative of three independent experiments. Statistics using the One-way ANOVA test with Tukey post-test. The significance of the differences between groups are shown as *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 and ****p < 0.0001.

In silico prediction shows that M₂₀₉₋₂₂₃ peptide is able to bind human HLA class II alleles.

Based on our results, which were performed using a murine model, we decided to analyze the binding capacity of M₂₀₉₋₂₂₃ peptide against a reference set of 27 HLAs class II alleles (99% population coverage) and against the murine MHC class II allele H2-IA^b. The prediction values are expressed as a percentile rank, where lower values indicate good binders. Compared to murine MHC class II, M₂₀₉₋₂₂₃ presented better binding values for HLA class II, indicating the possible peptide binding with these alleles (Table 1). Also, our results indicate a specific binding to DRB1, DRB3 and DRB5 alleles, with a predominance of DRB1.

Discussion

Disease progression in RSV infection is commonly associated with severe lung inflammation, which is interpreted as a result of an exacerbation of the anti-viral immune response. It is believed that lung injury is the price paid to eliminate the pathogen (18). However, it is still unclear if and how the exacerbated lung inflammation affects the development of an efficient immune response that leads to viral clearance.

CD4⁺ T cell help is needed by B cells to produce neutralizing antibodies that are protective in RSV infection (24), and also can produce cytokines that both enhance (18) or regulate (23) CD8⁺ T cell responses, which are important for cytotoxicity-mediated clearance of the virus. However, polarization to a Th2 response has been associated with chronification of inflammatory symptoms in different models, including RSV infection (7,25,26). The similarities in cytokine production and symptoms of lung inflammation with allergic bronchiolitis, which is characteristic of RSV infection, led to the hypothesis that this damaging inflammatory response to virus is of the Th2 type. This predominant response promotes airway eosinophilia by suppressing the production of IFN- γ , thus affecting T cells responses against RSV (8). An early study by Graham (19) observed that mice primed with inactivated RSV or protein F would expand a Th2 response upon challenge with live RSV. In a more recent study, RSV infection induced GATA3⁺ and IL-4 expression, even in Foxp3⁺ (regulatory) cells, increasing susceptibility in a murine allergic asthma model (27). In infants, RSV induced bronchiolitis was accompanied by a greater IL-4/IFN- γ ratio in respiratory secretions, indicating a Th2 polarization (28). Thus, vaccination strategies that induce Th2 responses would not be ideal to prevent the inflammatory damage that ensues during infection by RSV.

Liu et al. (11) had previously observed that while protein M from RSV contained immunodominant epitopes for CD8⁺ T cells, it also contains epitopes for CD4⁺ T cells, for example, the M₂₆₋₃₉ and M₂₀₉₋₂₂₃ peptides, respectively. In that study, upon RSV infection, M₂₀₉₋₂₂₃-specific T cells differentiated into effector Th1 cells or Foxp3⁺ (Tregs), with different expansion dynamics and functional properties (18). Our results support those findings. Also, in our study, animals vaccinated with UV-RSV and poly-IC showed higher frequencies of GATA3⁺ and IL4⁺ were found, both before and after challenge with RSV. This Th2 response correlated with an increased infiltration of the lungs by inflammatory cells, mucus production and weight loss in the infected mice. In addition, our study showed that these mice had fewer IL-4 producing CD4⁺ T cells, and more IFN- γ and IL-10 producing CD4⁺ T cells, and did not present inflammatory infiltration or mucus production in lungs. Our results indicate that vaccination with M₂₀₉₋₂₂₃ RSV peptide concomitantly expands RSV-specific Th1 and Treg cells, and can result in a response that is not only protective, but also prevent exacerbated inflammation. That might be the key to a successful immunization against RSV.

One possible explanation for our findings is that the inactivated virus vaccination primes a larger number of epitopes, as well as provides abundant adjuvant molecules that stimulate antigen presenting cells (APCs) function. Thus, during virus challenge, the overall immune response is more robust, and that might contribute to immunopathology. The M₂₀₉₋₂₂₃-specific response is also greater in these mice, probably due to the overall higher level of stimulation of the APCs. However, while there is a general tendency to consider that vaccination with a broad and comprehensive range of epitopes is the best way to confer protection, it is possible that, due to the mechanisms that cooperate to induce effector T cell differentiation, this might not always be the best choice. In particular for RSV, it seems that priming with the inactivated virus might lead to an

expansion of M₂₀₉₋₂₂₃-reactive clones that favor Th2 differentiation, due to innate signals provided by adjuvant molecules intrinsic to the virus. Upon infection with live virus, a recall of these pre-expanded clones would be detrimental rather than beneficial, creating an inflammatory environment in the lungs that characterizes common symptoms of the infection. Priming with the M₂₀₉₋₂₂₃ peptide and poly-IC, nevertheless, would preferentially favor expansion clones differentiating into Th1 and Tregs, and those would provide the necessary help for successful clearance of the virus upon infection. Poly-IC is known to stimulate innate signals that skew T cell differentiation to the Th1 type (29,30).

The differentiation of a significant proportion of M₂₀₉₋₂₂₃ reactive T cells into Tregs might also be extremely relevant for adequate protection, provided it is not overpowered by a Th2 response. Previous studies have found that depletion of Tregs in mice increases the number of CD8⁺ T cells after RSV infection, suggesting a rapid expansion of antigen-specific CD8⁺ T cells that contribute to effective viral clearance, but may also lead to tissue pathology (31). Treg are important to modulate lung inflammation caused by RSV infection (31). More recently, Treg have been demonstrated to aid in the development of a CD8⁺ T effector response, which is crucial for viral control of RSV (18,32), dengue (33), HIV (34) and influenza (35). Besides, it has been shown by different groups that a Treg population with a single specificity can down modulate autoimmune disease (36,37) and it is possible that a similar phenomenon is occurring here. Priming with the peptide and poly-IC did not affect the percentage of IFN- γ ⁺ CD8⁺ T cells in the lung of infected mice (Supplementary Fig. 6A), confirming previous observations (18). However, it did result in a higher frequency of IL-10⁺ CD8⁺ T cells (Supplementary Fig. 6B), compared to UV-RSV primed mice. A recent study has linked IL-10 producing effector CD8⁺ T cells to protection from influenza (38). The enhanced regulatory response induced by the

M₂₀₉₋₂₂₃ peptide might also enhance the viral clearance capacity of CD8⁺ T cells during infection, as observed in M₂₀₉₋₂₂₃ immunized mice had significantly less peak weight loss than UV-RSV or controls-immunized mice. This findings suggests that the I-A^b M₂₀₉₋₂₂₃-specific CD4⁺ T cells influenced the overall CD8⁺ T-cell response to focus its effector functions at the site of virus infection in order to more efficiently clear virus and minimize immunopathology (18). The mechanisms underlying the relative contribution of the M₂₀₉₋₂₂₃ specific Th1 versus Treg populations for effective clearance of the infection as well as prevention of inflammation need to be further characterized.

Currently, there is no *in vitro/in vivo* data indicating if M₂₀₉₋₂₂₃ is capable to bind HLA class II alleles. Our *in silico* analysis highlighted this possibility, showing that M₂₀₉₋₂₂₃ has essential features to bind DRB1, DRB3 and DRB5 alleles. HLA-DRB1 alleles were the most frequent in our analysis. In fact, a correlation between HLA-DR1 alleles and protection from autoimmune disorders triggered by T regulatory cells was already observed by Ooi et al. (39). Also, the first ranked allele of our analysis (HLA-DRB5) was shown by Caillier et al. important to attenuate the severity of multiple sclerosis (MS), an autoimmune disorder that can take place when T regulatory cells fail to respond (40). The idea that T regulatory cells could be primed in humans from interaction with HLA-DR alleles is also pushed forward from a study published by de Wolf et al., where they found that a Hsp70 peptide (called B29) is able to bind and elicit a immunosuppressive response via T regulatory cells in individuals HLA-DR4⁺ (41).

The differentiation of effector T cells, previously understood mainly as a product of the cytokine milieu, is currently thought to be a result of a combination of forces of interaction between the existing naïve cells TCRs and their cognate MHC:peptide complexes (42), together with the innate signals provided in the environment. Although the mechanisms favoring Th2 differentiation of M₂₀₉₋₂₂₃ upon immunization with whole

virus, over immunization with peptide alone, are still unclear, expansion of these Th2 cells could be actively preventing the consolidation of a protective response. A recent paper has linked GATA3 expression in playing a role in T cell lineage development, controlling CD8⁺ T cell proliferation and in regulatory T cell function. In the latter context, the role of GATA3 in CD8⁺ T cell dysfunction may reflect aspects of its role in promoting regulatory functions in T cells (43). Based on our findings, we believe they will be most relevant to understanding the precise mechanisms of protection necessary to prevent RSV bronchiolitis. In addition, vaccination with M₂₀₉₋₂₂₃ peptide can contribute to perform future vaccine strategies design against this virus.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

References

1. Monto AS. Epidemiology of viral respiratory infections. *Am J Med.* abril de 2002;112(6):4–12.
2. Rudraraju R, Jones B, Sealy R, Surman S, Hurwitz J. Respiratory Syncytial Virus: Current Progress in Vaccine Development. *Viruses.* 5 de fevereiro de 2013;5(2):577–94.
3. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi S a, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 1 de maio de 2010;375(9725):1545–55.
4. Stein RT, Bont LJ, Zar H, Polack FP, Park C, Claxton A, et al. Respiratory syncytial virus hospitalization and mortality: Systematic review and meta-analysis. *Pediatr Pulmonol.* 2016.
5. Fernández P, Trenholme A, Abarca K, Griffin MP, Hultquist M, Harris B, et al. A phase 2, randomized, double-blind safety and pharmacokinetic assessment of respiratory syncytial virus (RSV) prophylaxis with motavizumab and palivizumab administered in the same season. *BMC Pediatr.* 3 de dezembro de 2010;10(1):38.
6. Higgins D, Trujillo C, Keech C. Advances in RSV vaccine research and development – A global agenda. *Vaccine.* junho de 2016;34(26):2870–5.
7. Waris ME, Tsou C, Erdman DD, Zaki SR, Anderson LJ. Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. *J Virol.* maio de 1996;70(5):2852–60.
8. Cohn L, Herrick C, Niu N, Homer RJ, Bottomly K. IL-4 Promotes Airway Eosinophilia by Suppressing IFN- γ Production: Defining a Novel Role for IFN- γ in the Regulation of Allergic Airway Inflammation. *J Immunol.* 15 de fevereiro de 2001;166(4):2760–7.
9. Anderson LJ, Dormitzer PR, Nokes DJ, Rappuoli R, Roca A, Graham BS. Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development. *Vaccine.* 18 de abril de 2013;31 Suppl 2(2013):B209-15.
10. Christiaansen AF, Syed M a, Ten Eyck PP, Hartwig SM, Durairaj L, Kamath SS, et al. Altered Treg and cytokine responses in RSV-infected infants. *Pediatr Res.* 21 de novembro de 2016;80(5):702–9.
11. Liu J, Ruckwardt TJ, Chen M, Johnson TR, Graham BS. Characterization of respiratory syncytial virus M- and M2-specific CD4 T cells in a murine model. *J Virol.* 2009;83(10):4934–41.
12. Moon JJ, Chu HH, Hataye J, Pagán AJ, Pepper M, McLachlan JB, et al. Tracking epitope-specific T cells. *Nat Protoc.* abril de 2009;4(4):565–81.
13. Greenbaum J, Sidney J, Chung J, Brander C, Peters B, Sette A. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics.* 2011;63(6):325–35.

14. Wang, P., Sidney, J., Dow, C., Mothé, B., Sette, A., Peters B. A Systematic Assessment of MHC Class II Peptide Binding Predictions and Evaluation of a Consensus Approach. *Plos Comput Biol.* 2008;4(4).
15. Wang P, Sidney J, Kim Y, Sette A, Lund O, Nielsen M, et al. Peptide binding predictions for HLA DR , DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics.* 2010;11(1):568.
16. Rutigliano JA, Rock MT, Johnson AK, Crowe JE, Graham BS. Identification of an H-2D b -restricted CD8 + cytotoxic T lymphocyte epitope in the matrix protein of respiratory syncytial virus. 2005;337:335–43.
17. Liu J, Cao S, Peppers G, Kim S-H, Graham BS. Clonotype-specific avidity influences the dynamics and hierarchy of virus-specific regulatory and effector CD4 + T-cell responses. *Eur J Immunol.* abril de 2014;44(4):1058–68.
18. Liu J, Ruckwardt TJ, Chen M, Nicewonger JD, Johnson TR, Graham BS. Epitope-Specific Regulatory CD4 T Cells Reduce Virus-Induced Illness while Preserving CD8 T-Cell Effector Function at the Site of Infection. *J Virol.* 15 de outubro de 2010;84(20):10501–9.
19. Graham BS, Henderson GS, Tang YW, Lu X, Neuzil KM, Colley DG. Priming immunization determines T helper cytokine mRNA expression patterns in lungs of mice challenged with respiratory syncytial virus. *J Immunol.* 15 de agosto de 1993;151(4):2032–40.
20. Chavez-Bueno S, Mejias A, Gomez AM, Olsen KD, Rios AM, Fonseca-Aten M, et al. Respiratory syncytial virus-induced acute and chronic airway disease is independent of genetic background: an experimental murine model. *Virol J.* 2005;2:46.
21. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol.* 2005;6(4):353–60.
22. Veiga-Parga T, Sehrawat S, Rouse BT. Role of Regulatory T Cells during Virus Infection. *NIH Public Access.* 2013;255(1):182–96.
23. Ruckwardt TJ, Bonaparte KL, Nason MC, Graham BS. Regulatory T Cells Promote Early Influx of CD8+ T Cells in the Lungs of Respiratory Syncytial Virus-Infected Mice and Diminish Immunodominance Disparities. *J Virol.* 1 de abril de 2009;83(7):3019–28.
24. Ngwuta JO, Chen M, Modjarrad K, Joyce MG, Kanekiyo M, Kumar A, et al. Prefusion F-specific antibodies determine the magnitude of RSV neutralizing activity in human sera. *Sci Transl Med.* 14 de outubro de 2015;7(309):309ra162-309ra162.
25. Jiminez JA, Uwiera TC, Inglis GD, Uwiera RRE. Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals. *Gut Pathog.* 2015;1–31.
26. Christiaansen AF, Knudson CJ, Weiss K a, Varga SM. The CD4 T cell response to respiratory syncytial virus infection. *Immunol Res.* 17 de agosto de 2014;59(1–3):109–17.
27. Krishnamoorthy N, Khare A, Oriss TB, Raundhal M, Morse C, Yarlagadda M, et al. Early infection with respiratory syncytial virus impairs regulatory T cell

- function and increases susceptibility to allergic asthma. *Nat Med.* 9 de setembro de 2012;18(10):1525–30.
28. Caballero MT, Serra ME, Acosta PL, Marzec J, Gibbons L, Salim M, et al. TLR4 genotype and environmental LPS mediate RSV bronchiolitis through Th2 polarization. *J Clin Invest.* 2 de fevereiro de 2015;125(2):571–82.
 29. Longhi MP, Trumpfheller C, Idoyaga J, Caskey M, Matos I, Kluger C, et al. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4 + Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J Exp Med.* 6 de julho de 2009;206(7):1589–602.
 30. Coffman R. L., Sher A. SRA. Vaccine Adjuvants : Putting Innate Immunity to Work. *Immunity.* 2012;33(4):492–503.
 31. Durant LR, Makris S, Voorburg CM, Loebbermann J, Johansson C, Openshaw PJM. Regulatory T Cells Prevent Th2 Immune Responses and Pulmonary Eosinophilia during Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice. *J Virol.* 15 de outubro de 2013;87(20):10946–54.
 32. Fulton RB, Meyerholz DK, Varga SM. Foxp3+ CD4 Regulatory T Cells Limit Pulmonary Immunopathology by Modulating the CD8 T Cell Response during Respiratory Syncytial Virus Infection. *J Immunol.* 15 de agosto de 2010;185(4):2382–92.
 33. Chandele A, Sewatanon J, Gunisetty S, Singla M, Onlamoon N, Akondy RS, et al. Characterization of human CD8 T cell responses in dengue virus infected patients from India. *J Virol.* 2016;90(24):11259–78.
 34. Gulzar N, Copeland KFT. CD8+ T-Cells: Function and Response to HIV Infection. *Curr HIV Res.* 2004;2:23–37.
 35. Ingulli E, Funatake C, Jacovetty EL, Zanetti M. Cutting edge: antigen presentation to CD8 T cells after influenza A virus infection. *J Immunol.* 2009;182(1):29–33.
 36. van Herwijnen MJC, Wieten L, van der Zee R, van Kooten PJ, Wagenaar-Hilbers JP, Hoek A, et al. Regulatory T cells that recognize a ubiquitous stress-inducible self-antigen are long-lived suppressors of autoimmune arthritis. *Proc Natl Acad Sci.* 28 de agosto de 2012;109(35):14134–9.
 37. Levine AG, Hemmers S, Baptista AP, Schizas M, Faire MB, Moltedo B, et al. Suppression of lethal autoimmunity by regulatory T cells with a single TCR specificity. Intergovernmental Panel on Climate Change, organizador. *J Exp Med.* 27 de janeiro de 2017;58(12):jem.20161318.
 38. Sun J, Madan R, Karp CL, Braciale TJ. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med.* 22 de março de 2009;15(3):277–84.
 39. Ooi JD, Petersen J, Tan YH, Huynh M, Willett ZJ, Ramarathinam SH, et al. Dominant protection from HLA-linked autoimmunity by antigen-specific regulatory T cells. *Nature.* 2017;545(7653):243–7.
 40. Stacy J. Caillier, Briggs F, Cree BAC, Baranzini SE, Ramsay MF-VPP, Omar Khan WRISLH, et al. Uncoupling the Roles of HLA-DRB1 and HLA-DRB5 Genes in Multiple Sclerosis. *J Immunol.* 2008;181(8):5473–80.

41. De Wolf C, Van Der Zee R, Den Braber I, Glant T, Maillère B, Favry E, et al. An Arthritis-Suppressive and Treg Cell-Inducing CD4+ T Cell Epitope is Functional in the Context of HLA-Restricted T Cell Responses. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(3):639–47.
42. Tubo NJ, Pagán AJ, Taylor JJ, Nelson RW, Linehan JL, Ertelt JM, et al. Single Naive CD4+ T Cells from a Diverse Repertoire Produce Different Effector Cell Types during Infection. *Cell.* maio de 2013;153(4):785–96.
43. Singer M, Wang C, Cong L, Marjanovic ND, Kowalczyk MS, Zhang H, et al. A Distinct Gene Module for Dysfunction Uncoupled from Activation in Tumor-Infiltrating T Cells. *Cell.* setembro de 2016;166(6):1500–1511.e9.

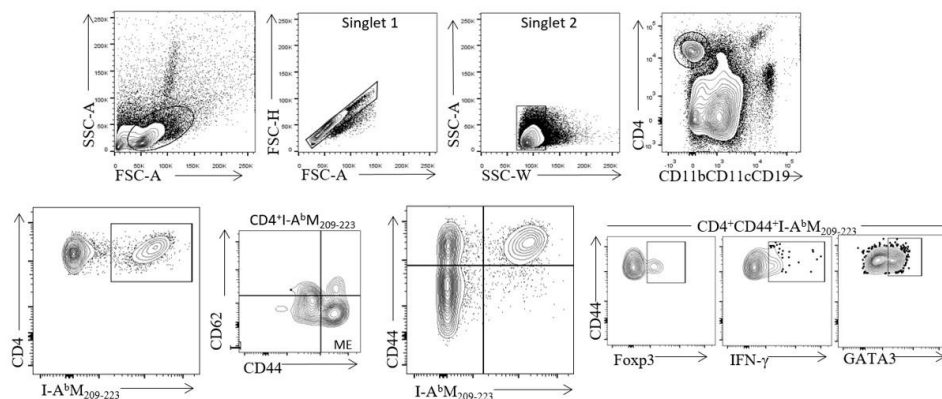
Tables

Table 1. M₂₀₉₋₂₂₃-MHC-II binding prediction calculated with T cell epitope prediction tools from IEDB.

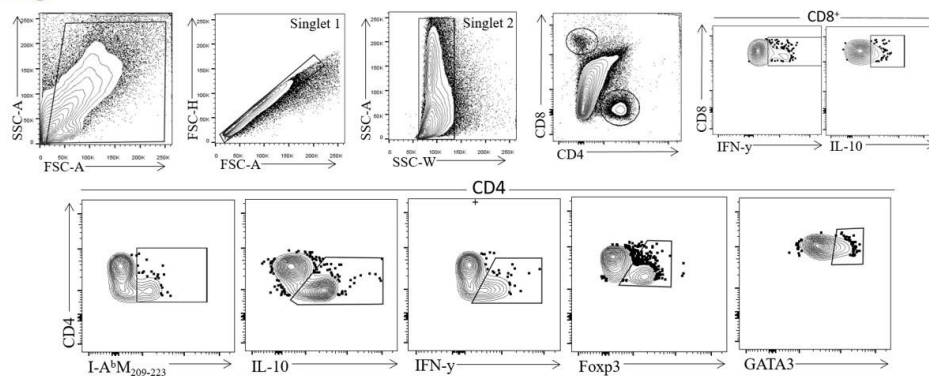
Organism	MHC-II allele	Method used	Percentile Rank
Murine	H2-IAb	Consensus (smm/nn)	5.8
Human	HLA-DRB5*01:01	Consensus (smm/nn/sturniolo)	0.24
	HLA-DRB1*04:05	Consensus (smm/nn/sturniolo)	0.6
	HLA-DRB1*07:01	Consensus (comb.lib./smm/nn)	0.68
	HLA-DRB1*11:01	Consensus (smm/nn/sturniolo)	0.89
	HLA-DRB1*08:02	Consensus (smm/nn/sturniolo)	1.43
	HLA-DRB1*04:01	Consensus (smm/nn/sturniolo)	1.89
	HLA-DRB3*02:02	NetMHCIIpan	2.88
	HLA-DRB1*01:01	Consensus (comb.lib./smm/nn)	3.02

Supplementary Figure

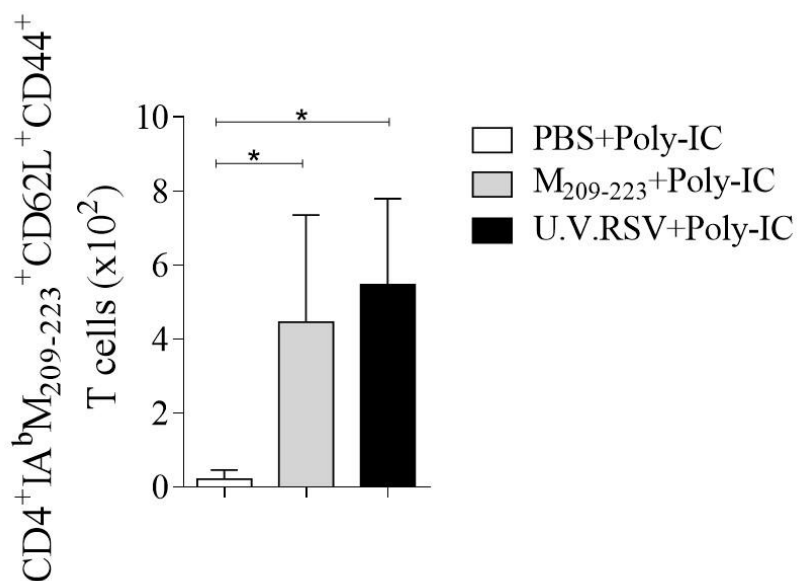
Gate strategy Pulldown



Gate strategy Lung

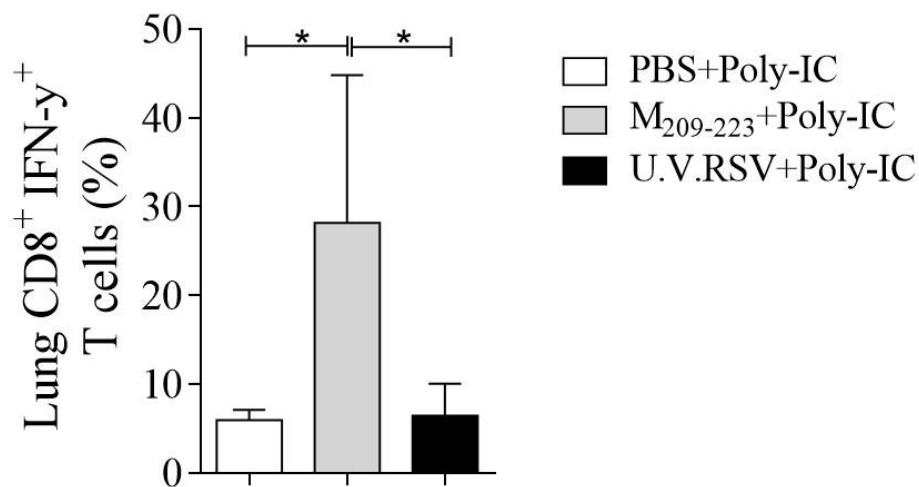


Supplementary Fig. 1. Secondary lymphoid organs and Lung T cells gating strategy.



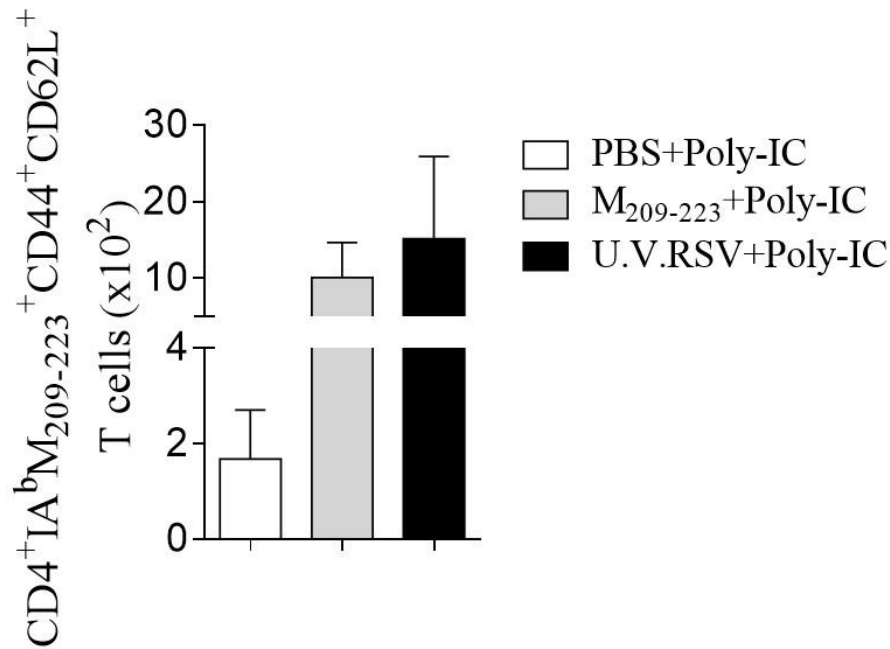
Supplementary Fig. 2. *M*₂₀₉₋₂₂₃-specific central memory CD4⁺ T cells from mice immunized with PBS+Poly-IC (white bars), peptide+Poly-IC (gray bars) or UV-

RSV+Poly-IC (black bars). Cells were harvested 14 days post-immunization and stained with tetramers and phenotyping antibodies to identify specific CD4⁺CD44⁺CD62L⁺. Treatments are represented as bars with mean \pm the SD (n= 5/group). Representative of three independent experiments. Statistic using the One-way ANOVA test with Tukey post-test. The significance of the differences between groups is shown as *p < 0.05.

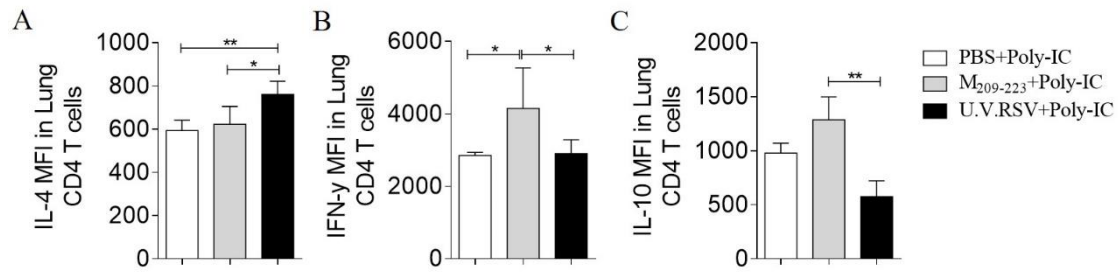


Supplementary Fig. 3. *Immunization schedule of mice and total CD4⁺ T cell responses to RSV M₂₀₉₋₂₂₃ peptide and UV-RSV after challenge with live virus.* Three groups of mice (5 animals in each group) were subcutaneously injected with PBS, 100 μ g of M₂₀₉₋₂₂₃ peptide or 10⁶ PFU RSV previously inactivated by ultraviolet light (UV-RSV) on day 0 and boost on day 7. All groups received 5 μ g of Poly-IC as adjuvant. Mice were challenged with RSV at day 14 post-immunization. (A). All secondary lymphoid organs were isolated at day 5 post-challenge (day 19) and stained with tetramers and phenotyping antibodies to identify specific CD4⁺CD44⁺ T cells (B), effector memory specific CD4⁺ T Cells (C), Treg-specific CD4⁺CD44⁺ T Cells (D), specific CD4⁺CD44⁺ T cells producing IFN- γ (E) and specific GATA3⁺CD4⁺CD44⁺ T Cells (F). Data (mean \pm SD, n= 5/group) are represented as bars from different colors: PBS+Poly-IC (white bars),

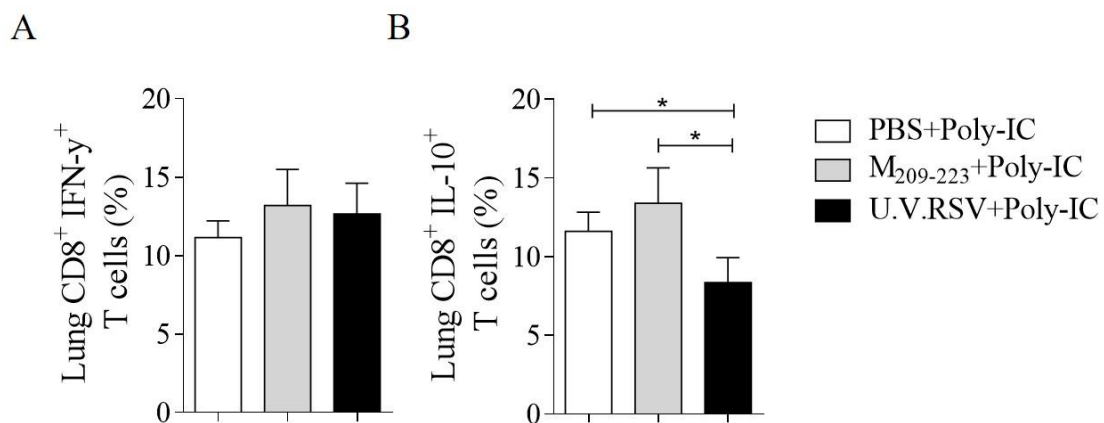
$M_{209-223}$ peptide+Poly-IC (gray bars) and UV-RSV (black bars). Data are representative of three independent experiments and compared by using the One-way ANOVA test with Tukey post-test. The significance of the differences between groups are shown as * $p < 0.05$.



Supplementary Fig. 4. $M_{209-223}$ -specific central memory $CD4^+$ T cells from mice immunized with PBS+Poly-IC (white bars), peptide+Poly-IC (gray bars) or UV-RSV+Poly-IC (black bars). Cells were harvested 5 days post-challenge and stained with tetramers and phenotyping antibodies to identify specific $CD4^+CD44^+CD62L^+$. Treatments are represented as bars with mean \pm the SD ($n = 5$ /group). Representative of three independent experiments. Statistic using the One-way ANOVA test with Tukey post-test.



Supplementary Fig. 5. Characterization of lung cytokines from CD4⁺ T cells 5 days after RSV challenge from mice immunized with PBS+Poly-IC (white bars), peptide+Poly-IC (gray bars) or UV-RSV+Poly-IC (black bars). Lymphocytes from the lung of infected mice were isolated and cultured with the M₂₀₉₋₂₂₃ peptides for 6 hours at 37 °C. Cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies for anti-CD4 and anti-IL-4 (A), anti-CD4 and anti-IFN-γ (B), anti-CD4 and anti-IL-10 (C). Treatments are represented as bars with mean ± the SD (n= 5/group). Representative of three independent experiments. Statistics using the One-way ANOVA test with Tukey post-test. The significance of the differences between groups are shown as *p < 0.05 and **p < 0.01.



Supplementary Fig. 6. Frequency of CD8⁺ T cells secreting IFN-γ and IL-10 of cytokines produced by lung. Mice immunized with PBS+Poly-IC (white bars), M₂₀₉₋₂₂₃ peptide+Poly-IC (gray bars), or UV-RSV+Poly-IC (black bars) and challenged with RSV

for 5 days. Lymphocytes from the lung of infected mice were isolated and cultured with the M₂₀₉₋₂₂₃ peptides for 6 hours at 37 °C. Cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies for anti-CD8, anti-IFN- γ and anti-IL-10. Treatments are represented as bars with mean \pm the SD (n= 5/group). Representative of three independent experiments. Statistics using the One-way ANOVA test with Tukey post-test. The significance of the differences between groups are shown as *p < 0.05.

APÊNDICE B – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO

Clinical & Experimental Immunology
The Journal of Translational Immunology



Clinical and Experimental Immunology

ORIGINAL ARTICLE

doi:10.1111/cei.12720

Respiratory syncytial virus induces phosphorylation of mTOR at ser2448 in CD8 T cells from nasal washes of infected infants

A. P. Duarte de Souza,^{*,5§}
D. Nascimento de Freitas,^{*,5§}
K. E. Antunes Fernandes,^{*,5§}
M. D'Avila da Cunha,^{*,5§}
J. L. Antunes Fernandes,^{*,5§}
R. Benetti Gassen,^{*,5§} T. Fazolo,^{*,5§}
L. A. Pinto,^{1,5§} M. Scotta,^{1,5§}
R. Mattiello,^{1,5§} P. M. Pitrez,^{1,5§}
C. Bonorino^{2,5} and R. T. Stein^{1,5§}

^{*}Laboratório De Imunologia Clínica E Experimental, Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul (PUCRS), ¹Laboratório De Respirologia Pediátrica, Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul (PUCRS), ²Laboratório De Imunologia Celular E Molecular, Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul (PUCRS), ³Centro Infantil, Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul (PUCRS), and ⁵Instituto De Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil

Accepted for publication 25 September 2015
Correspondence: A. P. D. Souza, Av. Ipiranga, 6690, 2º andar, Sala 31, Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil.
E-mail: ana.duarte@pucrs.br

Summary

Respiratory syncytial virus (RSV)-specific CD8⁺ T cell responses do not protect against reinfection. Activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) impairs memory CD8⁺ T cell differentiation. Our hypothesis was that RSV inhibits the formation of CD8⁺ T cells memory responses through mTOR activation. To explore this, human and mouse T cells were used. RSV induced mTOR phosphorylation at Ser2448 in CD8 T cells. mTOR activation by RSV was completely inhibited using rapamycin. RSV-infected children presented higher mTOR gene expression on nasal washes comparing to children infected with metapneumovirus and rhinovirus. In addition, RSV-infected infants presented a higher frequency of CD8⁺ pmTORser2448⁺ T cells in nasal washes compared to RSV-negative infants. Rapamycin treatment increased the frequency of mouse CD8 RSV-M₂₈₂₋₉₀ pentamer-positive T cells and the frequency of RSV-specific memory T cells precursors. These data demonstrate that RSV is activating mTOR directly in CD8 T cells, indicating a role for mTOR during the course of RSV infection.

Keywords: CD8⁺ T cells, mTOR, nasal washes, RSV, RSV-infected infants

APÊNDICE C – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO

Medical Hypotheses 88 (2016) 86–90



Contents lists available at ScienceDirect

Medical Hypotheses

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

Immunomodulator plasmid projected by systems biology as a candidate for the development of adjunctive therapy for respiratory syncytial virus infection



José Eduardo Vargas^{a,*}, Ana Paula Duarte de Souza^a, Bárbara Nery Porto^a, Tiago Fazolo^b, Fabiana Quoos Mayer^c, Paulo Márcio Pitrez^a, Renato Tetelbom Stein^a

^aCentro Infantil – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6690 2º andar, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^bDepartamento de Biologia Celular e Molecular, FABIIO, Instituto de Pesquisas Biomédicas, PUCRS, Av. Ipiranga, 6690 2º andar, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^cLaboratório de Biologia Molecular, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Hnamor, Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Estrada do Condé, 6000, Eldorado do Sul, RS 92990-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 January 2015

Accepted 8 November 2015

ABSTRACT

An imbalance in Th1/Th2 cytokine immune response has been described to influence the pathogenesis of respiratory syncytial virus (RSV) acute bronchiolitis and the severity of infection. Th2-driven response has been well described under first RSV vaccine (formalin-inactivated RSV vaccine antigens) and replicated in some conditions for RSV-infected mice, in which a Th2-dependent lung eosinophilia increases illness severity, accompanied of tissue damage. Currently, several prototypes of RSV vaccine are being tested, but there is no vaccine available so far. The advance of bioinformatics can help to solve this issue. Systems biology approaches based on network topological analysis may help to identify new genes in order to direct Th1 immune response during RSV challenge. For this purpose, network centrality analyses from high-throughput experiments were performed in order to select major genes enrolled in each T-helper immune response. Thus, genes termed Hub (H) and bottlenecks (B), which control the flow of biological information (Th1 or Th2 immune response, in this case) within the network, would be identified. As these genes possess high potential to promote Th1 immune response, they could be cloned under regulation of specific promoters in a plasmid, which will be available as a gene-transfer adjunctive to vaccines. Th1 immune response potentiated by our strategy may contribute to accelerate Th1/Th2 shift from neonatal immune system, which might favor protective immunity against RSV infection and reduce lung damage.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

APÊNDICE D – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO

Toxicology in Vitro 36 (2016) 114–119



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

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

Rapamycin increases RSV RNA levels and survival of RSV-infected dendritic cell depending on T cell contact



Deise do Nascimento de Freitas^a, Rodrigo Benedetti Gassen^{a,b}, Tiago Fazolo^{a,b}, Ana Paula Duarte de Souza^{a,c,*}

^a Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental; Centro Infantil, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil

^b Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, PUCRS, Brazil

^c Faculdade de Farmácia, PUCRS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 March 2016

Received in revised form 19 June 2016

Accepted 22 July 2016

Available online 25 July 2016

Keywords:

Respiratory syncytial virus

Rapamycin

Dendritic cells

CD8 T cells

ABSTRACT

The macrolide rapamycin inhibits mTOR (mechanist target of rapamycin) function and has been broadly used to unveil the role of mTOR in immune responses. Inhibition of mTOR on dendritic cells (DC) can influence cellular immune response and the survival of DC. RSV is the most common cause of hospitalization in infants and is a high priority candidate to vaccine development. In this study we showed that rapamycin treatment on RSV-infected murine bone marrow-derived DC (BMDC) decreases the frequency of CD8⁺ CD44^{hi} T cells. However, inhibition of mTOR on RSV-infected BMDC did not modify the activation phenotype of these cells. RSV-RNA levels increase when infected BMDC were treated with rapamycin. Moreover, we observed that rapamycin diminishes apoptosis cell death of RSV-infected BMDC co-culture with T cells and this effect was abolished when the cells were co-cultured in a transwell system that prevents cell-to-cell contact or migration. Taken together, these data indicate that rapamycin treatment present a toxic effect on RSV-infected BMDC increasing RSV-RNA levels, affecting partially CD8 T cell differentiation and also increasing BMDC survival in a mechanism dependent on T cell contact.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria Acadêmica
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3ª. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: proacad@pucrs.br
Site: www.pucrs.br/proacad