

---

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

**DEISE DO NASCIMENTO DE FREITAS**

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS RELACIONADOS COM A  
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS T CD8 DE MEMÓRIA DURANTE A  
INFECÇÃO PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO.**

**PORTO ALEGRE  
2015**

---

---

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

DEISE DO NASCIMENTO DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS RELACIONADOS COM A DIFERENCIAÇÃO DE  
CÉLULAS T CD8 DE MEMÓRIA DURANTE A INFECÇÃO PELO VÍRUS  
SINCICIAL RESPIRATÓRIO.**

Porto Alegre, 2015

---

---

DEISE DO NASCIMENTO DE FREITAS

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS RELACIONADOS COM A DIFERENCIAÇÃO DE  
CÉLULAS T CD8 DE MEMÓRIA DURANTE A INFECÇÃO PELO VIRUS SINCICIAL  
RESPIRATÓRIO.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina /Pediatría e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Duarte de Souza  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Bueno Morrone

Porto Alegre, 2015

---

---

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F866a Freitas, Deise do Nascimento de

Avaliação de mecanismos relacionados com a diferenciação de Células T CD8 de memória durante a infecção pelo vírus sincicial respiratório / Deise do Nascimento de Freitas. – Porto Alegre, 2015. 63 f. : il.

Diss. (Mestrado em Pediatria) – Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança, Faculdade de Medicina, PUCRS.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Duarte de Souza.  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Bueno Morrone.

1. Medicina. 2. Pediatria. 3. Infecções Respiratórias. 4. Linfócitos T. 5. Células Dendríticas. I. Souza, Ana Paula Duarte de. II. Morrone, Fernanda Bueno. III. Título.

CDD 618.9223  
CDU 616.2-053  
NLM WS 280

**Ficha Catalográfica elaborada por Vanessa Pinent  
CRB 10/1297**

---

---

*“Just because something doesn't do what you planned it to do doesn't mean it's useless.”*

*Thomas Edison*

---

---

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus e aos meus mentores espirituais por me conduzir nessa trajetória de formação.

A minha família, em especial aos meus pais Eliane do Nascimento de Freitas e Clay Gonçalves de Freitas sempre me apoiaram nas minhas escolhas. Muito Obrigada!

Aos meus queridos padrinhos Rosane do Nascimento Bertoldo e Luis Alberto Bertoldo pelos conselhos, amizade e carinho.

A minha orientadora, Ana Paula Duarte de Souza pela oportunidade e confiança que depositou em mim. Muito Obrigada!

A minha co-orientadora Fernanda Bueno Borrone pela ajuda que me passou durante a realização deste trabalho.

Ao colega de profissão e amigo Luiz Carlos Rodrigues Jr pelo incentivo e ajuda durante a minha jornada acadêmica.

As minhas amigas Maiquideli Dal Berto, Carine Reis, Aline Diedrich e Bárbara Bertoldo pela amizade, aos conselhos e companheirismo neste período.

A todos os colegas dos laboratórios que de maneira ou outra me auxiliaram para a conclusão deste trabalho.

A secretária do programa de Pós-Graduação, Carla Carmo de Melo Rothmann, pelas orientações e auxílios durante todo o mestrado.

A CAPES, pela bolsa de incentivo a pesquisa concedido.

---

---

## RESUMO

**Introdução:** O Vírus Sincicial Respiratório (VSR) é um dos principais causadores de infecção viral do trato respiratório inferior em crianças menores de dois anos de idade. A resposta de células T CD8 de memória para VSR não apresenta uma resposta imune eficiente e duradoura, por isso são recorrentes as infecções durante a vida. Até o momento não se tem o conhecimento sobre o envolvimento do mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e do receptor purinérgico P2X7 na resposta de células T CD8 de memória durante a infecção de VSR.

**Objetivos:** Investigar o efeito da rapamicina nas células dendríticas (DCs) durante a infecção viral, bem como, avaliar o efeito do receptor purinérgico P2X7 nas células dendríticas (DCs) infectadas com o vírus VSR na resposta de células T CD8 de memória.

**Metodologia:** Células dendríticas diferenciadas de medula óssea (BMDCs) de camundongos C57BL/6 P2X7<sup>-/-</sup> e C57BL/6 infectadas com VSR foram utilizadas para ativar células T purificadas de camundongos C57BL/6 P2X7<sup>-/-</sup> e C57BL/6 durante 96 horas. Além disso, um grupo de BMDCs de camundongos C57BL/6 recebeu 20ng/mL de rapamicina durante 1h antes da infecção. As DCs foram marcadas para investigação de morte celular por apoptose, as células T marcadas para análise células de memória e a quantificação do RNA viral foi realizada através de PCR em tempo real.

**Resultados:** O tratamento com o inibidor de mTOR nas BMDCs infectadas pelo VSR diminuiu a geração de células T CD8<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> e aumentou os níveis de RNA viral nas DCs, porém a rapamicina não influenciou a viabilidade das células dendríticas infectadas. Quando as BMDCs foram tratadas com rapamicina, houve um aumento de sobrevivência das células, dependente do contato com as células T. Na ausência do receptor purinérgico P2X7 nas células T, ocorreu uma diminuição na frequência das células T CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>KLRG1<sup>-</sup>, entretanto a ausência do receptor purinérgico nas BMDCs infectadas aumentou a frequência destas células T CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>KLRG1<sup>-</sup>.

**Conclusão:** Nosso estudo sugere que o receptor P2X7 está envolvido na resposta de células T CD8 de memória durante a infecção pelo VSR. Além disso, sugere-se

---

---

que as células dendríticas tratadas com rapamicina durante a infecção com VSR prejudica a diferenciação de células T CD8.

---



---

## ABSTRACT

**Introduction:** Respiratory Syncytial Virus (RSV) is a major cause of viral lower respiratory tract infection in children under two years of age. Memory CD8 T cell response to VSR does not provide an efficient and long-lasting immune response, so there are recurrent infections throughout life. The role of mTOR (*mammalian target of rapamycin*) and the purinergic receptor P2X7 in the memory CD8 T cell response during RSV infection has not been investigated.

**Objectives:** To analyze the effect of rapamycin on dendritic cells (DCs) during RSV infection, as well as to evaluate the role of P2X7 purinergic receptor in CD8 memory T cells response during RSV infection.

**Methodology:** Bone marrow derived dendritic cells (BMDCs) differentiated from C57BL/6 P2X7<sup>-/-</sup> and C57BL/6 mice were infected with VSR virus and used to activate T cells purified from C57BL/6 P2X7<sup>-/-</sup> and C57BL/6 mice in vitro for 96 hours. In addition, BMDCs differentiated from C57BL/6 mice received 20ng/ml rapamycin during 1h prior infection. The following parameters were evaluated: BMDC cell death by apoptosis, memory cells markers by flow cytometry and RNA viral quantitation was performed by real time PCR.

**Results:** Rapamycin treatment in RSV infected BMDCs decreases the frequency of CD8<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> cells and increases the level of viral RNA in DCs, but the rapamycin does not affect the viability of the infected dendritic cells. Furthermore, when BMDCs were treated with rapamycin, an increase of BMDC survival occurred, depending on the contact with the T cells. The absence of purinergic receptor P2X7 in T cells leads to a decrease in the frequency of CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>KLRG1<sup>-</sup>, however the absence of purinergic receptor in infected BMDCs increases the frequency of CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>KLRG1<sup>-</sup> T cells.

**Conclusion:** Our study suggests that P2X7 receptor is involved in memory CD8 T cell response. In addition our data indicated that mTOR inhibition increases the survival of BMDCs in a mechanism dependent on T-cell contact and also suggests that rapamycin treatment on dendritic cells during VSR infection affect CD8 T cell differentiation.

---

---

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

- Figura 1: Inibição de mTOR pela rapamicina em células dendríticas infectadas por RSV diminuem as células T CD8<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> .....36
- Figura 2: Análise de níveis de RNA de VSR em BMDCs infectadas por PCR em tempo real.....37
- Figura 3: Viabilidade de BMDCs tratadas com rapamicina e infectadas por VSR.....38
- Figura 4: Apoptose de BMDCs infectadas por VSR e tratadas com rapamicina e co-cultivadas com células T purificadas.....40

### CAPÍTULO III

- Figura 1: Desenho experimental das BMDCs C57BL/6 wt infectadas com VSR e co-cultivadas com células T C57BL/6 P2X7<sup>-/-</sup> .....52
- Figura 2: A ausência do receptor P2X7 nas células T diminui a frequência de células T CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>KLRG1<sup>-</sup> .....52
- Figura 3: Desenho experimental das BMDCs C57BL/6<sup>P2X7<sup>-/-</sup></sup> infectadas com VSR e co-cultivadas com células T C57BL/6 wt.....53
- Figura 4: Ausência do receptor P2X7 nas BMDCs infectadas aumenta a frequência de células T CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>KLRG1<sup>-</sup> .....53
- Figura 5: Resposta de células T CD8 após tratamento de apirase nas células dendríticas.....54
-

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	Células apresentadoras de antígeno
Anti-CD122	Anticorpo contra cadeia $\beta$ do receptor do receptor IL-2
AIM-V	Meio de cultura AIM-V
AKT	<i>Protein kinase B</i>
Anti-CD127	Anticorpo contra a cadeia $\alpha$ do receptor de IL-7
Anti-KLRG1	Anticorpo contra de receptor de NK similar a lectina subfamília G membro 1
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
CEMBE	Centro de Modelos Biológicos Experimentais
CEUA	Centro de Ética no Uso de Animais
Células VERO	Células do rim de macaco verde
CD40	<i>Cluster of differentiation 40</i>
CD86	<i>Cluster of differentiation CD86</i>
CD80	<i>Cluster of differentiation CD80</i>
DCs	Células dendríticas
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
FKBP12	FK506 binding protein
Foxp3	<i>Forkhead Box P3</i>
HCMV	Citomegalovírus humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IPB	Instituto de Pesquisas Biomédicas
IL-4	Interleucina 4
IL-12	Interleucina 12
IFN- $\gamma$	Interferon-gama

---

---

LPS	Lipopolissacarídeo
MHC I	Molécula de Histocompatibilidade principal de classe I
MHC II	Molécula de Histocompatibilidade principal de classe II
mLST8	<i>mTOR associated protein, LST8 homolog</i>
MPECs	Precusores de células de memória
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	Complexo mTOR 1
mTORC2	Complexo mTOR 2
NF-kB	<i>Nuclear factor Kappa B</i>
OVA	Ovalbumina
P1	Subtipo de receptor purinérgico
P2	Subtipo de receptor purinérgico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDK1	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1</i>
PFU	Unidade formadoras de placas
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PPR	Receptores de reconhecimento a patógenos
PRAS40	<i>Proline-rich Akt/PKB substrate 40 kDa</i>
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
P2X	Subfamília de receptor purinérgico P2
P2Y	Subfamília de receptor purinérgico P2
P2X7	Receptor purinérgico P2X7
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	<i>Roswall Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro Fetal Bovino

---

---

SPLECs	Células de vida curta
S6K1	<i>p70 ribosomal protein S6 kinase 1</i>
Ser473	<i>Serina 473</i>
T CD8	Célula T CD8
TCR	Receptor de células T
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
VSR	Vírus Sincicial Respiratório
4E-BP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>

---

---

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	14
1.1 APRESENTAÇÃO.....	15
1.2 JUSTIFICATIVA.....	20
1.3 OBJETIVOS.....	21
1.3.1 Objetivo geral.....	21
1.3.1.2 Objetivos específicos.....	21
1.3.2 Objetivo geral.....	21
1.3.2.1 Objetivos específicos.....	22
1.4 REFERÊNCIAS.....	15
CAPÍTULO II .....	28
2.1 ARTIGO ORIGINAL .....	29
CAPÍTULO III .....	45
3.1 ARTIGO ORIGINAL .....	46
CAPÍTULO IV.....	60
4.1 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	61

---

---

**CAPÍTULO I**

**APRESENTAÇÃO**

**JUSTIFICATIVA**

**OBJETIVOS**

**REFERÊNCIAS**

---

## 1.1 APRESENTAÇÃO

O vírus sincicial respiratório (VSR) é um dos principais causadores de infecção do trato respiratório inferior, que ocasiona doenças como pneumonia e principalmente bronquiolite em crianças e idosos (1). Devido à infecção ocorrida por este vírus, tem aumentado o número de hospitalizações e a taxa de mortalidade por ano, em crianças menores de dois anos de idade (2). Atualmente, ainda não se conseguiu desenvolver uma vacina eficiente contra esse vírus. Em 1960, houve uma tentativa de desenvolver uma vacina contra VSR utilizando o vírus inativado com formalina, ao invés de proteger as crianças, a vacina aumentou a doença e conseqüentemente ocorreu elevado número de óbitos (3, 4). Até o momento, existe somente tratamento profilático para infecção pelo VSR, indicado apenas em casos de doença grave, como o uso do anticorpo monoclonal humanizado, Palivizumab, que apresenta uma atividade neutralizante do vírus (5).

O vírus VSR pertence ao gênero *Pneumovirus* e a família *Paramyxoviridae*. Este é um vírus envelopado que apresenta simetria helicoidal e morfologia esférica. O seu genoma é de RNA de fita simples com polaridade negativa que codifica 10 proteínas, incluindo 4 proteínas de nucleocapsídeo N, P, L e M2, que são necessárias na replicação do RNA e as proteínas de envelope transmembrana G, F e SH, sendo responsáveis pela fusão do vírus na membrana e na formação de sincício (6). Já as NS1 e NS2 são proteínas não-estruturais. As proteínas F e G induzem a produção de anticorpos neutralizantes frente ao VSR. A proteína F inicia a penetração do vírus fusionando a membrana celular que facilita a entrada do vírus mediante a união das células infectadas e não infectadas. Enquanto que a proteína G glicosilada medeia a união do vírus com a célula hospedeira (7). Estão descritos dois subtipos de VSR: A e o B, sendo o VSR A o que causa a maior gravidade (8).

Algumas proteínas do vírus VSR modulam a resposta imunológica, incluindo as proteínas F, G, NS, M2 e SH. As proteínas não-estruturais NS1 e NS2 inibem a via do interferon através do mecanismo de evasão viral, diminuindo a ativação e a proliferação das células T CD8 (9). Essas proteínas virais têm a capacidade de suprimir a maturação das DCs podendo romper o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (16, 17). Embora não se tenha o conhecimento da função da estrutura SH, sabe-se que a proteína SH pode inibir apoptose através da redução da

---



sinalização de TNF- $\alpha$ , impedindo que ocorra a formação da resposta imune (10). Recentemente, foi mostrado que uma vacina recombinante experimental de VSR com depleção dos genes da proteína SH induz um aumento da secreção IL-1 $\beta$ . Esta estratégia leva à diminuição da infecção *in vivo*, podendo ser um forte candidato para usar na produção de uma vacina contra o vírus (11). Estudos anteriores demonstraram que a infecção causada por VSR ativava o NF-kB, mas se desconhecia qual proteína era responsável por isso. Alguns anos depois, foi descoberto que a proteína M2 era responsável pela ativação do NF-kB na resposta inflamatória (12-14). A proteína F do VSR induz a secreção de citocinas inflamatórias, como IL-6, devido à ligação com o receptor TLR4 (15). Sabe-se que o vírus VSR interage especificamente com o receptor de nucleolina das células do hospedeiro através da fusão da glicoproteína do envelope viral. Com o bloqueio do receptor de nucleolina nas células ocorre uma redução significativa da infecção por VSR, concluindo que a nucleolina é um receptor funcional do vírus (18).

As células T CD8 de memória específicas para o VSR e as células dendríticas (DCs) são de extrema importância, pois estão envolvidas na resposta imune e no controle da infecção por este vírus. Entretanto, ocorrem re-infecções pelo vírus VSR durante a vida, inclusive com a mesma cepa viral da infecção prévia e em indivíduos que possuem anticorpos neutralizantes (19, 20). Estes dados sugerem que infecções primárias não geram uma resposta imune eficiente e duradoura de células T CD8 de memória específicas (21, 22). Isso ocorre, pois o vírus apresenta uma capacidade de inibir a geração de células T CD8 específicas, especialmente no trato respiratório inferior (23), impedindo que ocorra uma diminuição da infecção nos pulmões (24, 25).

As células dendríticas são importantes células apresentadoras de antígenos (APCs) que possuem funções de reconhecer, processar e apresentar o antígeno para células T efectoras e regular a resposta imune (26, 27). Durante o processo de maturação as DCs expressam em sua superfície MHC II (complexo principal de histocompatibilidade de classe II) e moléculas co-estimulatórias, como CD40, CD80 e CD86 e secretam citocinas com IL-12 e interferon tipo I e III (26, 28). O VSR é capaz de infectar e se replicar dentro das células dendríticas e induzir uma diminuição da expressão de molécula co-estimulatórias CD86 e de MCH II (29). O VSR pode potencializar a sua virulência e modular as funções das DCs por reduzir a

---

capacidade de secreção de citocinas e a resposta antiviral de células T (30-32). Além disso, induz a uma inadequada sinapse imunológica que prejudica o desenvolvimento da resposta imune e comprometendo a função das células T CD8 específicas para o vírus (33-35).

Apesar de alguns mecanismos relacionados com as células dendríticas em resposta de células T CD8 já terem sido elucidados durante a infecção pelo VSR, pouco tem-se focado na diferenciação das células T CD8 de memória específicas para este vírus. As células T CD8 diferenciam-se em precursores de células de memória (MPECs- memory precursor effector cells) e células de vida curta (SPLECs- short lived effector cells). Em resposta à infecção aguda, as MPECs podem apresentar alta expressão do receptor de IL-7 (CD127<sup>high</sup>) e baixa expressão do receptor G1 similar a lectina (KLRG1<sup>low</sup>), enquanto que as SLECs expressam CD127<sup>low</sup> e KLRG1<sup>high</sup> (36). Existem vários fatores envolvidos com a diferenciação e ativação das células T CD8 de memória, principalmente estímulos inflamatórios iniciais durante a resposta imune inata com a ativação das DCs (37,38). Esses estímulos iniciais como receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e regulação de citocinas, quimiocinas estão envolvidos neste processo (39). Atualmente tem sido descrito fatores intracelulares como reguladores da resposta de memória, como a proteína quinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) por ser responsável na diferenciação e na ativação das DCs. Quando esta proteína é ativada nas células dendríticas através de diferentes estímulos inatos, pode então influenciar na resposta imune, inclusive na diferenciação das células T CD8 de memória (40).

A proteína quinase mTOR é importante regulador da função central do metabolismo, síntese proteica, balanço energético, autofagia, proliferação e sobrevivência das células e também está relacionada em muitas alterações fisiológicas associadas como câncer, envelhecimento e várias síndromes metabólicas (41, 42). O mTOR é composto por 2 complexos multiprotéicos diferentes: o complexo mTOR 1 (mTORC1) e o complexo mTOR 2 (mTORC2). O complexo mTORC1 contém as proteínas, Raptor, mLST8 (*mTOR associated protein, LST8 homolog*), PRAS40 (*proline-rich Akt/PKB substrate 40 kDa*) e sua ativação ocorre através da fosforilação das fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K), piruvato desidrogenase quinase (PDK1) e AKT. Este complexo promove a fosforilação dos

---

reguladores de transcrição S6K1 (*p70 ribosomal protein S6 kinase 1*), 4E-BP1 (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) que regula crescimento, proliferação e a sobrevivência celular. O complexo mTORC2 é composto pelas proteínas mLST8, Rictor, mSIN1 e Protor. Ele está abaixo da sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e sua ativação pode levar a fosforilação AKT (Ser473) (43). Existe o mTORC3 que é o mais recente descrito e bem menos estudado. A rapamicina é o inibidor específico de mTOR e, além disso, um potente imunossupressor utilizado em indivíduos transplantados e um inibidor de proliferação celular. O complexo mTORC1 é altamente sensível à rapamicina, enquanto o complexo mTORC2 é resistente ao fármaco (44). Este imunossupressor inibe a sinalização da proteína mTOR ao formar um complexo intracelular com FKBP12 e apresenta vários efeitos sobre o sistema imune, como a inibição da produção de interferon tipo I por DCs plasmocitóides, regulação da expressão Foxp3 em células T regulatórias (Treg) e a modulação do tráfico celular (45-47). O bloqueio de mTOR pela rapamicina prejudica a função e a maturação das células dendríticas e também inibe a proliferação de células T, isso faz com que diminua ou impeça o desenvolvimento da resposta imune (48). Recentemente, estudos vem demonstrando que a rapamicina apresenta grande efeito imunoestimulatório principalmente na geração precursoras de células T CD8 de memória e favorece a qualidade e a quantidade de células específicas para o antígeno e na sobrevivência das células T (49, 50). Além disso, este imunossupressor influencia as células dendríticas no prolongamento do tempo de vida útil e o efeito proliferativo das células T CD8 específica *in vivo* (51). Até o presente momento não foi estudado o papel do mTOR nas células dendríticas durante a infecção pelo VSR.

O ATP (adenosina trifosfato) pode atuar como um importante mensageiro extracelular que participa do processo de diferenciação, proliferação, apoptose, inflamação, metabolismo e na transmissão sináptica (52). Essas funções ocorrem através da ativação dos receptores purinérgicos, como P1 e P2. Os receptores purinérgicos P2 são encontrados em todos os tipos celulares e eles estão divididos em 2 famílias: P2Y onde os receptores são acoplados à proteína G heterotrimérica e o P2X que são ionotrópicos e ativado pelo ATP extracelular (53, 54). O receptor purinérgico P2X7 pertence a essa família e está expresso em células do sistema imune, como macrófagos, linfócitos e células dendríticas. Além disso, o P2X7 está

---

envolvido em vias de sinalização que regulam a inflamação (55). Este receptor ativado por ATP extracelular nas células apresentadoras de antígeno (APCs), como as células dendríticas, diminui os níveis de MHC I na superfície celular, consequentemente prejudicando a apresentação do epítopo e ativação de células T CD8 com MHC I. A estimulação do P2X7 nas DCs é capaz impedir a resposta imune adaptativa (56). Atualmente não existe nenhum estudo que demonstrou o papel do receptor purinérgico P2X7 durante a infecção pelo VSR e a sua geração de células T de memória.

Deste modo, nesta dissertação avaliamos dois pontos importantes em relação a diferenciação de células T CD8 de memória durante a infecção do VSR: o papel do mTOR nas células dendríticas e a função do receptor P2X7. Por tanto, a presente dissertação será composta por dois artigos originais, sendo que o primeiro artigo original encontra-se no CAPÍTULO II intitulado em “EFEITOS DO TRATAMENTO COM RAPAMICINA EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS COM O VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO”. E no CAPÍTULO III apresenta-se o segundo artigo original cujo título é “AUSÊNCIA DA SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7 NAS CÉLULAS DENDRÍTICAS AUMENTA OS MARCADORES DE CÉLULAS T CD8 DE MEMÓRIA DURANTE A INFECÇÃO PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO”.

---

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Até o momento não foi possível desenvolver uma vacina eficiente contra o vírus VSR, somente existindo o tratamento profilático com o uso do anticorpo monoclonal Palivizumab. Este tratamento é indicado apenas para crianças em casos crônicas da doença, pois seu custo é muito elevado. Sabendo que este vírus induz uma resposta de células T CD8 de memória deficiente e não duradoura e a elevada ocorrência de reinfecções com o mesmo vírus durante a vida, então é necessário estudar o mecanismo de geração da resposta imune de células T CD8 de memória para o vírus VSR. É também importante investigar o papel das células dendríticas (DCs) durante a infecção pelo fato delas apresentarem tamanha importância na geração de precursores de células de memória. Portanto, o entendimento desse mecanismo pode contribuir para o desenvolvimento de uma vacina e a utilização de novas imunoterapias para o vírus VSR.

---

### 1.3 OBJETIVOS

#### ARTIGO ORIGINAL I

##### **1.3.1 Objetivo geral**

- Avaliar o efeito da rapamicina sobre as células dendríticas (DCs) durante a infecção do vírus VSR.

##### **1.3.1.2 Objetivos específicos**

- Analisar a sobrevivência das células dendríticas tratadas com a rapamicina e infectadas com VSR;
- Observar a expressão do RNA do vírus em células tratadas com a rapamicina e infectadas;
- Investigar se as células dendríticas tratadas com rapamicina alteram a geração de células precursoras de memória específicas para o VSR.

#### ARTIGO ORIGINAL II

##### **1.3.2 Objetivo geral**

- Avaliar o papel do receptor purinérgico P2X7 na resposta da geração de células T CD8 de memória para o vírus VSR.
-

**1.3.2.1 Objetivos específicos**

- Verificar se as células T deficientes em receptores P2X7 são capazes de gerar células T CD8 de memória para o vírus;
  - Avaliar se a função do receptor P2X7 em células dendríticas durante a geração de células T CD8 de memória;
  - Investigar o efeito da apirase (enzima que degrada ATP) nas células.
-

---

## 1.4 REFERÊNCIAS

1. Malhotra A, Krilov LR. Influenzae and respirator syncytial virus. Update on infection, management, and prevention. *Pediatric Clinic North American*. 2002;47(2):353-72.
  2. Shann F. Etiology of severe pneumonia in children in developing countries. *The Pediatric Infectious Disease*. 1986;5(2):247-52.
  3. Fulginiti VA, Eller JJ, Joyner JW, Minamitani M, Meiklejohn G. Respiratory virus immunization I: a field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum precipitated respiratory syncytial virus vaccine. *American Journal Epidemiology*. 1969;89:435-48.
  4. Kim HW, Canchola J G, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, Parrott RH. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American Journal Epidemiology*. 1969;89:422-34.
  5. McIntosh K. Community-acquired pneumonia in children. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(6):429-37.
  6. Collins PL, Fearn R, Grahman BS. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. Challenges and opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines: Current Topics in Microbiology and Immunology. 2013;372:3-38.
  7. Langedijk JPM, de Groot BL, Berendsen HJC, van Oirschot JT. Structural homology of the central conserved region of the attachment protein G of respiratory syncytial virus with the fourth subdomain of 55k Da tumor necrosis factor receptor. *Virology*. 1998;243:293-302.
  8. Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Reviews in Medical Virology*. 2001;11:103-16.
  9. Ramaswamy M, et. al. Respiratory syncytial virus nonstructural protein 2 specifically inhibits type I interferon signal transduction. *Virology*. 2006;144(2):328-39.
  10. Fuentes S, Tran K C, Luthra P, Teng MN, He B. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *Journal of Virology*. 2007;81(15):8361-6.
  11. Russel RF, McDonald JU, Ivanova M, Zhong Z, Bukreyev A, Tregoning JS. The partial attenuation of Small Hydrophobic (SH) gene deleted RSV is associated with elevated IL- 2 1 $\beta$  responses. *Journal of Virology*. 2015;89(14).
  12. Bitko V, Velazquez A, Yang L, Yang Y, Barik S. Transcriptional induction of multiple cytokines by human respiratory syncytial virus requires activation of NF- $\kappa$ B and is inhibited by sodium salicylate and aspirin. *Virology*. 1997;232(2):369-78.
-



- 
13. Garofalo R, Sabry M, Jamaluddin M, Yu RK, Casola A., Ogra PL, Brasier AR. Transcriptional activation of the interleukin-8-gene by respiratory syncytial virus infection in alveolar epithelial cells: nuclear translocation of the Rel A transcription factor as a mechanism producing airway mucosal inflammation. *Journal of Virology*. 1996;70(12):8773-81.
  14. Reimers K, Buchholz K, Werchau H. Respiratory syncytial M2-1 protein induces the activation of nuclear factor kappa B. *Virology*. 2005;331(2):260-8.
  15. Kurt-Jones EA, et. al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunology*. 2000;1(15):398-401.
  16. Munir S, Le Nouen C, Luongo C, Buchholz UJ, Collins PL, Bukreyev A. Nonstructural proteins 1 and 2 of respiratory syncytial virus suppress maturation of human dendritic cells. *Journal of Virology*. 2008;82(17):8780-96.
  17. Spann KM, Tran, KC, Collins, PL. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kB, and proinflammatory cytokines. *Journal of Virology*. 2005;79:5353-62.
  18. Tayyari F, Marchant D, Moraes TJ, Duan W, Mastrangelo P, Hegele R. G. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nature Medicine*. 2011;17(9):1132-5.
  19. Glezen WP, TLH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *American Journal of Diseases of Children*. 1986;140(6):543-6.
  20. Hall CB, Walsh EE, Long CE, Schnabel K. C. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *The Journal of Infectious diseases*. 1991;163(4):693-8.
  21. Openshaw PJ, Wertz GW, Askonas BA. The 22,000-kilodalton protein of respiratory syncytial virus is a major target for Kd-restricted cytotoxic T lymphocytes from mice primed by infection. *Journal of Virology*. 1990;64(4):1683-9.
  22. Ogilvie MMV, Vathenen AS, Radford M, Codd J, Key S. Maternal antibody and respiratory syncytial virus infection in infancy. *Journal Medical Virology*. 1981;7:26371.
  23. Bree GJ, Heidema J, van Leeuwen EMM, van Bleek GM, Jonkers RE, Jansen HM, et al. Respiratory Syncytial Virus - Specific CD8+Memory T Cell Responses in Elderly Persons. *The Journal of Infectious Diseases*. 2004;191:1710-8.
  24. Kawasaki Y, Hosoya M, Katayose M, Suzuki H. Role of serum neutralizing antibody in reinfection of respiratory syncytial virus. *Pediatric International*. 2007;46(2):126-9.
-

- 
25. McGill A, Greensill J, Marsh R, Craft AW, Toms GL. Detection of human respiratory syncytial virus genotype specific antibody responses in infants. *Journal of Medical Virology*. 2004;74(3):492-8.
  26. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 2000;18:767-811.
  27. Condon TV, Sawyer RT, Fenton MJ, Riches DW. Lung dendritic cells at the innate-adaptive immune interface. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011;90(5):883-95.
  28. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
  29. Wang H, Peters N, Laza-Stanca V, Nawroly N, Jonhston SL, Schwarse J. Local CD11c+ MHC class II- precursors generate lung dendritic cells during respiratory viral infection, but are depleted in the process. *The Journal of Immunology*. 2006;177(4):2536-42.
  30. Rossey I, Sedeyn K. , De Baets S. , Schepens B. , Saelens X. CD8+ T cells immunity against human respiratory syncytial virus. *Vaccine*. 2014;32:6130-7.
  31. de Graaff PM, de Jong EC, van Capel TM, van Dijk ME, Roholl PJ, Boes J, et al. Respiratory syncytial virus infection of monocyte-derived dendritic cells decreases their capacity to activate CD4 T cells. *Journal of Immunology*. 2005;9:5904-15.
  32. Bueno SM, González PA, Pacheco R, Leiva ED, Cautivo KM, Tobar HE, et al. Host immunity during RSV pathogenesis. *International Immunopharmacology*. 2008;8(10):1320-9.
  33. González PA, Prado CE, Leiva ED, Carreño LJ, Bueno SM, Riedel CA, et al. Respiratory syncytial virus impairs T cell activation by preventing synapse assembly with dendritic cells. *PNAS*. 2008;105(39):14999-5004.
  34. Chang J, Braciale TJ. Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8+ T-cell effector activity and peripheral CD8+ T-cell memory in the respiratory tract. *Nature medicine*. 2002;8(1):54-60.
  35. Chang J, Srikiatkachorn A, Braciale TJ. Visualization and characterization of respiratory syncytial virus F-specific CD8(+) T cells during experimental virus infection. *The Journal of Immunology*. 2001;167(8):4254-60.
  36. Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, et al. Inflammation directs memory precursors and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet. *Immunity*. 2007;27(2):281-95.
  37. Haech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2(4):251-62.
-

- 
38. Badovinac VP, Harty JT. Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T - cell memory. *Immunological Reviews*. 2006;211:67-80.
  39. Kolli D, Velayutham TS, Casola A. Host-viral interactions: role of pattern recognition receptors (PRRs) in human pneumovirus infections. *Pathogens*. 2013;2:232-63.
  40. Inoki K, Li Y, Zhu T, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology*. 2002;4(9):648-57.
  41. Wullschleger S, Loewith R, Hall, MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;124(3):471-84.
  42. Soliman GA. The Role of Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) Complexes Signaling in the Immune Responses . *Nutrients*. 2013;5(6):2231-57.
  43. Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB, Horton MR. Regulation of Immune Responses by mTOR Annual Review of Immunology. 2012;30:39-68.
  44. Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney International*. 2001;59(1):3-16.
  45. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clinical Biochemistry*. 1998;31(5):335-40.
  46. Cao W, Manicassay S, Tang H, Kasturi SP, Pirani A, Muthy N, et al. Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)-mTOR-p70S6K pathway. *Nature immunology*. 2008;9(10):1157-64.
  47. Sinclair LV, Finlay D, Feijoo C, Cornish GH, Gray A, Ager A, et al. Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. *Nature Immunology*. 2008;9(5):513-21.
  48. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(5):324-37.
  49. Rao RR, Li Q, Shrikant PA. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and eomesodermin. *Immunity*. 2010;32:67-78.
  50. Araki K, Turner AP, Shaffer VO, Gangappa S, Keller SA, Bachmann M. F. et al. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*. 2009;460(7251):108-12.
  51. Amiel E, Everts B, Fritz D, Beauchamp S, Ge B, Pearce EL, et al. Mechanistic Target of Rapamycin Inhibition Extends Cellular Lifespan in Dendritic Cells by preserving Mitochondrial function. *The Journal of Immunology*. 2014;193(6):2821-30.
-

52. Deaglio S, Robson SC. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Advances Pharmacology*. 2011;61:301-32.
53. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences*. 2009;32(1):19-29.
54. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and Molecular life sciences*. 2007;64(12):1471-83.
55. Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, et al. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *The Journal of Immunology*. 2002;68:6436-45.
56. Marzo AB, Cremades, MB, Pelegrin P. P2X7 Receptor Activation Impairs Exogenous MHC Class I Oligopeptides Presentation in Antigen Presenting Cells. . *PloSOne*. 2013;8(8).
-