

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Programa de Pós-Graduação em

BIOTECNOLOGIA
mestrado & doutorado

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS DA IMUNIDADE INATA DO TRATO
GENITAL DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS POR VIA
INTRAVAGINAL COM UMA VACINA DE ADENOVÍRUS
RECOMBINANTE**

FLORIANÓPOLIS

2009

SILVIA REGINA LANZA

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS DA IMUNIDADE INATA DO TRATO
GENITAL DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS POR VIA
INTRAVAGINAL COM UMA VACINA DE ADENOVÍRUS
RECOMBINANTE**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, como
requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Biotecnologia. Área de
concentração: Saúde**

**Orientadores: Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto
Prof. Dr. André Báfica**

FLORIANÓPOLIS

2009

LANZA, Silvia Regina

Avaliação de células da imunidade inata do trato genital de camundongos imunizados por via intravaginal com uma vacina de adenovírus recombinante / Silvia Regina Lanza. Florianópolis, 2009. 82 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

1. Vacinas.
2. Adenovírus recombinante.
3. Células T γ/δ .
4. Células NK.
5. Trato genital feminino

Este trabalho foi realizado no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, com auxílios financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e Programa Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde.

**Ao meu amado noivo Ricardo, pelo
privilégio de tê-lo como companheiro, por
todo amor e carinho.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo incentivo nos momentos difíceis e principalmente pela amizade e confiança durante estes anos de convívio.

Ao Prof. Dr. André Báfica, pela valiosa orientação e ajuda em muitos momentos, pelo incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos R. Zanetti, pelas sugestões nas apresentações realizadas e agradável convivência durante estes anos.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade.

Ao Laboratório de Protozoologia, pelo uso dos equipamentos.

Ao Laboratório de Análises Clínicas da UFSC, especialmente a Samira Cardoso Ferreira, pelo auxílio inicial nas aquisições.

Ao Laboratório de Farmacologia Experimental, especialmente ao Prof. Dr. João Batista Calixto por ceder, para uso, o equipamento de PCR em tempo real.

À Prof. Dra Rozangela Curi Pedrosa pelos camundongos cedidos.

À Larissa H. Haut pelo auxílio inicial no manejo dos camundongos e obtenção de células.

Às alunas de iniciação científica Mariana Duz e Elis Amaral Rosa, pelo auxílio, companheirismo e agradável convivência.

Ao Ddo. Lucas Nogueira e ao Dr. Juliano Bordignon, pela contribuição nos experimentos de PCR em tempo real.

A Deus, pelo dom da vida e por tornar possível tudo que necessitamos.

Aos meus pais, Cleuza e Mário, pela vida, por acreditarem e estimularem os meus objetivos e pelo amor incondicional.

Ao meu noivo Ricardo, pelo apoio e encorajamento constante, pela compreensão e paciência nos momentos difíceis e por compartilhar suas alegrias ao longo destes anos.

Aos meus irmãos Rosi, Ronaldo e Elisângela, pela convivência que me tornou a pessoa que sou hoje, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos.

À minha amada avó Carmem (in memorium), pelos ensinamentos que levarei para sempre e por mostrar-me que a felicidade está nas pequenas coisas da vida.

À minha amada sobrinha e afilhada Isabela, simplesmente pela sua existência que transformou o modo como vejo o mundo.

Às minhas queridas amigas Roza D. Puntigam Travnik e Mônica Martins, pelo apoio, incentivo e amizade verdadeira.

À querida amiga Mônica E. Guilda Buttow, pelo encorajamento, pelas longas conversas sobre os mais variados assuntos, pelas risadas e lágrimas, pelos momentos de descontração, pela amizade e imenso carinho.

À doce amiga Caroline Heidrich Seibert, pelas sugestões e contribuições, pela amizade ímpar, por todos os valiosos momentos de descontração e pelo imenso carinho.

À querida amiga e companheira de trabalho Camila Zanluca, pelas sugestões e contribuições, especialmente pela companhia nos momentos de descontração.

Aos amigos de laboratório, Álvaro J. Celmer, Douglas Bardini, Fernando M. Freire, Gisele Pasetti, Jonatan Ersching, Mariana Borsa, Patrícia Bräunig, Tiago Gräf, pelo companheirismo, amizade e pela agradável convivência durante esses anos.

Aos colegas do LIDI, Tatiany Faria, Milene Dalmina e Pedro Dahlstrom Gama, pelo agradável convívio e amizade.

Ao CNPq, FAPESC e Programa Nacional DST/AIDS, pelo financiamento.

Muito obrigada!

**“Se as coisas são inatingíveis... Ora!
Não é motivo para não desejá-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”**

Mário Quintana

Embora adenovírus (Ad) humano do sorotipo 5 tenha sido utilizado como vetor vacinal contra inúmeras doenças infecciosas, a população humana apresenta imunidade pré-existente contra estes vírus. Para transpor este problema, Ad de outras espécies animais, tal como o Ad isolado de chimpanzés do sorotipo 6, denominado AdC6, tem sido utilizado. No entanto, existem poucos estudos sobre a resposta imune induzida por AdC6 em tecidos de mucosas. Este estudo avaliou células T γ/δ e células NK das mucosas do trato genital de camundongos BALB/c após imunização intravaginal com o vetor AdC6 expressando a proteína Gag do HIV-1 (AdC6gag37). Análises de citometria de fluxo demonstraram que imunização com 10^{10} partículas virais de AdC6gag37 aumentou a frequência e o número de células T γ/δ nas mucosas do trato genital. O número de células T γ/δ atingiu seu pico três dias após a imunização, uma resposta que decresceu no sétimo dia. Além disso, detectou-se aumento relevante da expressão do marcador de ativação CD69 em células T γ/δ do trato genital. Entretanto, não houve alteração na expressão da molécula CD25. Adicionalmente, para investigar o perfil de expressão gênica após exposição ao vetor adenoviral, células T γ/δ do trato genital de camundongos imunizados foram isoladas magneticamente e avaliadas através de PCR em tempo real. Observou-se que AdC6gag37 foi capaz de aumentar a expressão de genes (1) relacionados com mecanismos de citotoxicidade mediado por células, tais como perforina e granzima B, (2) citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e IL-12 e (3) quimiocinas CXCL-10, CCL5, CCL3 e CCL4. Demonstrou-se também que imunização com AdC6gag37 (10^5 e 10^7 partículas virais) foi capaz de induzir aumento expressivo na frequência e no número de células NK do trato genital. Estes resultados indicam que AdC6gag37 modula a frequência e o número de células T γ/δ e células NK nas mucosas do trato genital e sugerem que estas células podem influenciar a resposta imune durante a imunização.

Palavras chave: Vacinas, adenovírus recombinante, células T γ/δ , células NK, trato genital feminino.

ABSTRACT

Although human adenovirus (Ad) serotype 5 has been used as a vaccine vector against several infectious diseases, human populations display pre-existent immunity against these viruses. To overcome this problem, adenovirus from other species such as the chimpanzee's isolated Ad serotype 6 (AdC6) has been utilized. Nevertheless, data on immune responses regulated by AdC6 in mucosal immune system is lacking. This study evaluated γ/δ T cells and NK cells from genital tract's mucosa following BALB/c mice's intravaginal immunization with an AdC6 vector expressing the HIV-1 Gag protein (AdC6gag37). Flow cytometry analyses demonstrated that the inoculum of 10^{10} AdC6gag37 particles augmented both frequency and number of γ/δ T cells in vaginal mucosa. The number of γ/δ T cells reached its peak on day 3 following immunization, a response that decreased by day 7. In addition, intravaginal immunization with AdC6gag37 significantly increased the activation marker CD69, but not CD25, expression in γ/δ T cells from the genital tract. Furthermore, to investigate the gene expression profile after adC6gag37 exposure, we have magnetically-isolated these cells from immunized mice and performed real time PCR. We found that adC6gag37 enhanced gene expression related to 1) cytotoxic mechanisms such as perforin and granzyme B, 2) proinflammatory cytokines IL-6 and IL-12 and 3) chemokines CXCL-10, CCL5, CCL3 and CCL4. We also observed that adC6gag37 (10^5 or 10^7 viral particles) immunization led to a significant increase in both frequency and number of NK cells in the genital tract. These data indicate that adC6gag37 modulate frequency and numbers of γ/δ T cells and NK cells in vaginal mucosal and suggest that these cells can influence immune response during immunization.

Keywords: Vaccines, recombinant adenovirus, γ/δ T cells, NK cells, feminine genital tract.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Padonização da concentração dos iniciadores utilizados na PCR em tempo real.....	30
Figura 2: Avaliação da frequência de células T γ/δ do trato genital após imunização intravaginal com diferentes doses de AdC6gag37.....	33
Figura 3: Avaliação da frequência de células T γ/δ presentes no baço após imunização intravaginal com diferentes doses de AdC6gag37.....	34
Figura 4: Avaliação da frequência de células T γ/δ presentes nos linfonodos ilíacos após imunização intravaginal com diferentes doses de AdC6gag37.....	35
Figura 5: Cinética da frequência e do número absoluto de células T γ/δ do trato genital de camundongos BALB/c em diferentes dias após imunização com AdC6gag37.....	37
Figura 6: Expressão de CD69 e CD25 em células T γ/δ do trato genital após imunização intravaginal com AdC6gag37.....	39
Figura 7: Perfil de expressão gênica de células T γ/δ do trato genital após a imunização com AdC6gag37.....	41
Figura 8: Frequência de células NK do trato genital após a imunização com diferentes doses de AdC6gag37.....	42
Figura 9: Número absoluto de células NK do trato genital após imunização intravaginal com diferentes doses de AdC6gag37.....	43
Figura 10: Frequência de células NK esplênicas após a imunização com diferentes doses de AdC6gag37.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos pré-clínicos realizados utilizando Ad como vetor vacinal.....	08
Tabela 2. Sequências dos iniciadores específicos utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad – Adenovírus

AdC6gag – Adenovírus de chimpanzé sorotipo 6 recombinante, expressando o gene gag do HIV

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FMDV – Vírus da febre aftosa

FSC – Dispersão de luz frontal

GM-CSF – Fator de estimulação de colônia granulócito-macrófago

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HPV – Vírus do papiloma humano

HVS – Vírus Herpes Simples

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-12p40 – Subunidade p40 da interleucina 12

IFN- α – Interferon alfa

IFN- β – Interferon beta

INF- γ – Interferon gama

IP-10 – Proteína induzida por interferon – 10 kDa

MALT – Tecido linfóide associado a mucosas

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MIP-1 α – Proteína inflamatória de macrófago 1 alfa

MIP-1 β – Proteína inflamatória de macrófago 1 beta

MVA – Vírus Vaccinia Ankara modificado

NK – Célula *Natural Killer*

PBS – Tampão fosfato salino

PE – Ficoeritrina

PerCP – Clorofifa-Peridinina

PSA – Penicilina, Streptomina e Anfotericina B

SBF – Soro bovino fetal

SSC – Dispersão de luz lateral

RANTES – Fator regulado em ativação de células T – expressado e secretado

RSV – Vírus Sincicial Respiratório

TCR – Receptor de células T

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

VEEV – Vírus da Encefalomielite Eqüina Venezuelana

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais sobre vacinologia.....	1
1.2 Vetores Adenovirais.....	5
1.3 Imunidade de mucosas, células T γ/δ e células <i>natural killer</i> (NK).....	11
2. OBJETIVOS	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos.....	16
3. METODOLOGIA	17
3.1 Considerações éticas.....	17
3.2 Modelo animal.....	17
3.3 Adenovírus recombinante.....	17
3.4 Imunização de camundongos.....	18
3.5 Coleta das amostras e obtenção de células.....	18
3.6 Obtenção de células T γ/δ da mucosa do trato genital.....	20
3.7 Marcação de superfície celular.....	21
3.8 Padronização de parâmetros de detecção e estratégia de <i>gates</i>	22
3.9 Avaliação da expressão de citocinas e quimiocinas do trato genital de camundongos BALB/c através de PCR em tempo real.....	24
3.9.1 Extração e isolamento de RNA total.....	24
3.9.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) através da reação de transcrição reversa (RT).....	25
3.9.3 Sequências dos pares de iniciadores específicos.....	25
3.9.4 Padronização da concentração ideal dos iniciadores específicos.....	28
3.9.5 Amplificação do segmento gênico através da PCR em tempo real.....	30
3.10 Análise estatística.....	31

4. RESULTADOS	32
4.1 Avaliação da frequência de células T γ/δ do trato genital e órgãos linfóides secundários após imunização com o vetor AdC6gag37.....	32
4.2 Cinética da resposta imune de células T $\gamma\delta$	36
4.3 Avaliação da ativação de células T γ/δ	38
4.4 Perfil de expressão gênica de células T γ/δ do trato genital após imunização com AdC6gag37.....	40
4.5 Avaliação da frequência de células NK do trato genital e órgãos linfóides secundários após imunização com o vetor AdC6gag37.....	41
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	58
7. PERSPECTIVAS	60
REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais sobre vacinologia

As doenças infecciosas têm sido uma das principais causas de morbidade e mortalidade humana e o método de prevenção mais eficiente e de melhor custo benefício existente contra essas doenças é a vacinação, prática que consiste na administração de material antigênico para induzir imunidade, através de mecanismos imunológicos como especificidade e memória, contra uma determinada patologia (WHO, 2004).

A prática da vacinação provavelmente originou-se em crenças homeopáticas sobre pequenas “doses de doença” protegendo contra doença severa, confirmada empiricamente pela ingestão de pequenas doses de veneno para evitar envenenamento intencional (FENNER et al., 1988). Entretanto, relatos na literatura sobre a prática da vacinação datam do século XI, quando chineses e indianos realizavam a “variolação”, técnica que consistia em inocular material biológico proveniente de lesões em fase de cicatrização ou de pústulas de pessoas acometidas por varíola através da administração por diferentes vias, cutânea ou nasal (FENNER et al., 1988). A origem das vacinas modernas é usualmente atribuída a Edward Jenner, médico inglês que mostrou através de experimentação, no final do século XVIII, que a inoculação com vírus heterólogo, oriundo de bovinos, conferia proteção contra a varíola humana (FENNER et al, 1988; SILVERS; STEPTOE, 2001; PLOTKIN, 2005b). Anos mais tarde, Robert Koch mostrou que as doenças infecciosas são causadas por microorganismos patogênicos e que cada microorganismo é responsável por determinada enfermidade

(SILVERS; STEPTOE, 2001). As descobertas de Robert Koch e de outros microbiologistas do século XIX promoveram a expansão da estratégia da vacinação de Edward Jenner para outras doenças infecciosas.

Em 1881, trabalhando com o agente etiológico da cólera aviária em cultura, Louis Pasteur desenvolveu uma vacina a partir do microorganismo atenuado e criou a hipótese de que patógenos podem ser atenuados por exposição a alterações ambientais (SILVERS; STEPTOE, 2001; PLOTKIN, 2005b). As descobertas de Edward Jenner e Louis Pasteur não levaram somente à erradicação da varíola no século XX e ao desenvolvimento de uma vacina atenuada contra cólera aviária, respectivamente, essas estratégias foram subseqüentemente usadas com sucesso para o desenvolvimento de outras vacinas contra agentes patogênicos que acometem os seres humanos (ADA, 2001; SILVERS; STEPTOE, 2001; PLOTKIN, 2005b).

Na metade do século XX, a técnica de cultura de células foi adaptada para crescimento de vírus (WELLER; ROBBINS; ENDERS, 1949) e desde então, vacinas virais atenuadas podem ser obtidas através de repetidas passagens do agente infeccioso em cultura de células para selecionar mutações adaptativas que reduzem a patogenicidade e a competência de replicação do microorganismo sem que este perca a imunogenicidade (ADA, 2001; PLOTKIN, 2005b; VIGNUZZI; WENDT; ANDINO, 2008). Embora esta abordagem induza resposta imune protetora para toda a vida, vírus atenuados podem reverter ao fenótipo patogênico resultando no desenvolvimento da enfermidade em vez de proteção (VIGNUZZI; WENDT; ANDINO, 2008). Além disso, vacinas utilizando vírus atenuados são contra-indicadas para pessoas imunocomprometidas.

Outra estratégia de imunização desenvolvida no final do século XIX foram as vacinas inativadas. Inicialmente, o agente patogênico era inteiramente inativado utilizando-se produtos químicos, tais como formalina, para inativar a infecciosidade do patógeno (ADA,

2001). Com o avanço tecnológico, foi possível separar e usar subunidades do antígeno na forma de polissacarídeos capsulares, proteínas, polissacarídeos conjugados com proteínas e peptídeos. Estas abordagens são capazes de induzir resposta imune na ausência de infecção sendo, portanto, uma opção segura contra uma gama de agentes patogênicos. No entanto, essa estratégia é frequentemente menos eficaz que vacinas atenuadas e exigem reforços para induzir uma resposta imune protetora e sustentável ou ainda necessidade do uso de adjuvantes (PLOTKIN, 2005b). Além disso, vacinas inativadas são menos efetivas em gerar resposta imune celular (ZINKERNAGEL, 2003; PLOTKIN, 2005b; VIGNUZZI; WENDT; ANDINO, 2008).

No início do desenvolvimento desses métodos de imunização, particularmente as estratégias utilizando microorganismos atenuados ou inteiramente inativados, não conhecia-se os mecanismos da resposta imune, exceto a mensuração de anticorpos (PLOTKIN, 1999). O controle da infecção era suficiente para determinar a eficácia obtida pela vacinação. Nestes casos, o sucesso dessas estratégias de imunização foi alcançado principalmente pela resposta imune humoral, através da indução de anticorpos (DELVES; ROITT, 2000b, 2000a; SEDER; HILL, 2000; PLOTKIN, 2001; ZINKERNAGEL, 2003; PLOTKIN, 2005a). No entanto, para algumas doenças infecciosas que causam atualmente uma proporção substancial de mortes em todo mundo, como AIDS, malária e tuberculose, dentre outras, não existe uma vacina eficaz. Embora atualmente se tenha conhecimento da importância da resposta imune humoral na prevenção da infecção pelo HIV e em certos estágios da infecção por malária, sabe-se que a resposta imune celular adquirida desempenha papel central na mediação da proteção contra essas doenças (SEDER; HILL, 2000; PLOTKIN, 2002, 2005b).

Recentemente, o advento da biologia molecular e da engenharia genética alterou o desenvolvimento de vacinas, fornecendo novas técnicas e ferramentas para estratégias de

imunização. A primeira vacina disponível utilizando esta tecnologia moderna foi a vacina humana contra hepatite B. Nesta abordagem, proteína recombinante para imunização foi obtida através da clonagem do gene de uma proteína do vírus da hepatite B em *Saccharomyces cerevisiae* (MCALEER et al., 1984). Subseqüentemente, uma variedade de proteínas recombinantes para imunização contra outras doenças foram desenvolvidas utilizando essa estratégia (PLOTKIN, 2005b). Entretanto, não existe nenhuma outra vacina disponível utilizando proteína recombinante.

Atualmente, duas categorias de vetores vacinais têm sido extensivamente estudadas para o desenvolvimento de vacinas contra doenças infecciosas: vetores virais e vetores não-virais (VERMA; WEITZMAN, 2005). Nesta estratégia vacinal, vírus ou plasmídeos bacterianos servem como vetores para inserção de genes de outro agente infeccioso. Além de infectar células, um vetor ideal deve ainda ser capaz de expressar o produto proveniente do transgene de forma sustentada e não causar patogenicidade ou resposta imune indesejável ao hospedeiro. Vetores não-virais consistem de plasmídeos bacterianos geneticamente modificados para infectar células eucariotes. Nesta abordagem, referida como vacinas de DNA, pode-se facilmente produzir grandes quantidades de plasmídeos recombinantes. Ao mesmo tempo, vacinas de DNA apresentam mínima citotoxicidade e problemas imunológicos. No entanto, atualmente esta estratégia é considerada ineficiente para transferência gênica (VERMA; WEITZMAN, 2005; BRAVE et al., 2007). Além disso, a expressão do inserto tende a ser transiente.

Vírus são estruturas altamente eficientes em infectar células e utilizar o metabolismo celular para produção de proteínas virais. Por esta razão, diversos vírus tem sido exaustivamente estudados para serem utilizados como vetores na administração de genes exógenos com a finalidade de obtenção de resposta imune contra doenças infecciosas (ELLIS,

1999; KOOTSTRA; VERMA, 2003). Vetores virais são derivados de vírus com genoma composto por RNA ou DNA que podem se integrar ou não ao genoma do hospedeiro. Cada vetor viral apresenta características únicas, como o tamanho do inserto que podem transportar, os tipos de células que infectam no hospedeiro e as estratégias utilizadas para escapar do sistema imune (VERMA; WEITZMAN, 2005; BRAVE et al., 2007). Por exemplo, entre os vetores virais estudados para o desenvolvimento de vacinas contra AIDS, os que mais se destacaram em estudos pré-clínicos e clínicos foram o vírus da vaccinia ankara modificado (MVA) e adenovírus (Ad) humano sorotipo 5. Para a realização de ensaios de proteção em modelos animais, visto que o HIV é um vírus que infecta exclusivamente humanos, foi desenvolvido o vírus da imunodeficiência símia-humana quimérica (SHIV) (LI et al., 1992). Ambos, MVA e Ad5, conferiram proteção contra desafio feito com SHIV 89.6P, uma cepa altamente patogênica (AMARA et al., 2001; SHIVER et al., 2002) e estão sendo avaliados em estudos clínicos (GARBER; SILVESTRI; FEINBERG, 2004).

1.2 Vetores Adenovirais

Ad foram descobertos em 1953, isolados de cultura de tecido de adenóide humana (ROWE et al., 1953). Desde então, mais de 50 sorotipos de Ad humano foram isolados e caracterizados. Ad são vírus líticos pertencentes à família Adenoviridae, a qual é dividida em quatro gêneros: *Aviadenovirus*, *Siadenovirus*, *Atadenovirus* e *Mastadenovirus* que utilizam como hospedeiro anfíbios, répteis, aves e um grande número de mamíferos, incluindo os seres humanos (ICTVdB, 2009). Ad humano podem infectar e replicar em diversos órgãos, tais como trato respiratório, olhos, trato genito-urinário, trato gastrointestinal e fígado (VERMA; WEITZMAN, 2005).

O material genético dos Ad consiste em DNA linear dupla-fita e é circundado por um capsídeo de proteínas icosaédricas não envelopado, com 70-110 nm de diâmetro. A maior parte da estrutura do capsídeo é composto por 240 hexons, enquanto 12 vértices consistem em bases penton ligadas a fibras (PINTO; ERTL, 2002; SOUZA et al., 2005; ICTVdB, 2009). Para infectar as células os Ad utilizam o receptor CAR (receptor de coxsackivírus e adenovírus) (BERGELSON et al., 1997). A internalização da partícula viral ocorre através de endocitose mediada por clatrina e requer interação entre a base da proteína penton e o receptor celular integrina αV (WICKHAM et al., 1993). Após o processo de internalização, as partículas virais escapam das vesículas endossomais e o transporte para o núcleo é acompanhado por gradual rompimento da partícula viral (GREBER et al., 1993). O genoma viral é então introduzido através dos poros nucleares e associa-se a histonas (GREBER et al., 1997). O genoma é transcrito e replicado em vários centros de replicação distintos no núcleo da célula infectada. Embora o processo de replicação ocorra no núcleo da célula hospedeira o DNA viral não se integra ao genoma da célula hospedeira (POMBO et al., 1994; MOUNTAIN, 2000). O processo de replicação dos Ad ocorre tanto em células em repouso quanto em células em divisão.

O genoma viral dos Ad é composto por DNA linear dupla-fita com aproximadamente 36 kb flanqueado por seqüências terminais repetitivas (ITRs) e contém cinco regiões transcricionais *early* (E1A, E1B, E2, E3 e E4) e uma região de transcrição *late* (L 1-5). A replicação dos Ad é geralmente dividida em dois eventos cronologicamente distintos. Os eventos precoces são codificados pela região *early* (E) do genoma e podem ocorrer antes da replicação do material genético e atuam na regulação da transcrição. Os eventos tardios são codificados pela região *late* e são responsáveis pelos eventos que ocorrem durante ou após a replicação do genoma viral e sintetizam a maior parte das proteínas estruturais (PINTO; ERTL, 2002; SOUZA et al., 2005; ICTVdB, 2009).

Três regiões do genoma considerados não essenciais para a viabilidade viral podem ser utilizadas para inserção de material genético exógeno. Ad recombinantes podem ser obtidos através da deleção das regiões E1, E3 ou E4, ou através de duplas deleções para grandes insertos. Dependendo da estratégia escolhida, os vetores resultantes podem ser replicante-competentes ou não. Pelo fato da região E1 ser crucial para o início da replicação viral, vírus deletados de E1 tornam-se partículas replicante-incompetentes, seguras para administração e expressão de genes *in vivo*. No entanto, esses Ad recombinantes podem ser facilmente propagados em cultura celular, através de utilização de células complementares, tais como células HEK 293, que expressam o produto do gene deletado (PINTO; ERTL; 2002; SOUZA et al., 2005).

Ad humano sorotipo 5 recombinante, deletado da região E1, foi primeiramente utilizado em terapia gênica. Porém, devido à grande resposta imune induzida contra o vetor e o produto do transgene foi sugerido seu uso como vetor de vacinas (XIANG et al., 1996). O uso dos Ad como vetores vacinais apresentam diversas vantagens. A habilidade para infectar diferentes tipos de células é uma das principais razões pela qual os Ad têm sido desenvolvidos como vetores para administração de genes exógenos em aplicações como vacinas (DANTHINNE; IMPERIALE, 2000). Outra característica importante é que estes vírus infectam eficientemente as células dendríticas, uma das principais células apresentadoras de antígeno para os linfócitos T (BETT; PREVEC; GRAHAM, 1993; KOOTSTRA; VERMA, 2003). Além disso, quando deletados da região E1, os Ad não são citopáticos, o que resulta em prolongada expressão do transgene resultando em uma maior apresentação de antígeno. Ao mesmo tempo, o genoma dos Ad permanece episomal no núcleo da célula hospedeira, o que minimiza os riscos de oncogênese e ativação de genes celulares (KOOTSTRA; VERMA, 2003).

Devido às vantagens apresentadas pelos Ad como vetores para administração de genes exógenos contra doenças infecciosas, vários estudos pré-clínicos tem sido realizados utilizando-

se vetores adenovirais para o desenvolvimento de vacinas contra diferentes enfermidades, conforme demonstrado na Tabela 1. Além disso, vetores adenovirais também têm sido freqüentemente testados em estratégias vacinais na modalidade dose-reforço.

Tabela 1. Estudos pré-clínicos realizados utilizando Ad como vetor vacinal.

PATÓGENO	ANTÍGENO	REFERÊNCIA
FMDV	VP1	(LIU et al., 2006)
FMDV	Proteína 3C/3CD	(LU et al., 2008)
Hantavírus	Glicoproteína e Proteína do Nucleocapsídeo	(SAFRONETZ et al., 2009)
HIV	Env	(ABE et al., 2009)
HIV	Gag	(LIN et al., 2007)
HIV	Gag, Pol e Nef	(SHIVER; EMINI, 2004)
HPV	Oncoproteínas E6 e E7	(LEE et al., 2008)
HSV	Timidina quinase (HSV-tk)	(LANGFORD et al., 2009)
Influenza aviária	Hemaglutinina	(TORO; TANG, 2009)
<i>Plasmodium falciparum</i>	Proteína CSP	(STEWART et al., 2007)
Rotavírus	G1VP7 e G3VP7	(WANG et al., 2008)
RSV	Glicoproteína	(FU et al., 2009)
SARS-Coronavírus	Proteína N	(CHUNLING et al., 2006)
VEEV	Proteínas estruturais	(O'BRIEN et al., 2009)
Vírus ebola	Glicoproteína	(SULLIVAN et al., 2003; RICHARDSON et al., 2009)
Vírus rábico	Glicoproteína	(LI et al., 2006; HAN et al., 2008)

Vetores adenovirais apresentam ainda muitas vantagens sobre vacinas convencionais (PINTO; ERTL; 2002; SOUZA et al., 2005). Estes vírus são relativamente estáveis, fáceis de manipular e deles podem ser prontamente obtidos altos títulos ($> 10^{13}$ unidades formadores de

placa/ml). Por não serem vírus envelopados, os Ad podem ser facilmente purificados. Depois de liofilizados, estes vírus não necessitam de refrigeração, o que facilita a administração da vacina especialmente em países em desenvolvimento onde as condições ideais para manter a vacina funcional podem ser precárias. Além disso, vetores adenovirais podem ser introduzidos através de diferentes vias, tais como intranasal, oral, intratraqueal, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutânea e intravaginal e induzir resposta imune sistêmica e de mucosas (PINTO; ERTL, 2002).

Contudo, apesar dos bons resultados obtidos com este vetor em ensaios experimentais, existem algumas desvantagens, sendo a principal delas a imunidade pré-existente em seres humanos (FARINA et al., 2001). Muitos indivíduos infectados por Ad, principalmente na infância, apresentam anticorpos neutralizantes contra o vetor (TATSIS; ERTL, 2004). Aproximadamente 30-40% de indivíduos dos Estados Unidos e da Europa ocidental apresentam anticorpos neutralizantes específicos para Ad humano sorotipo 5 e este percentual pode chegar a 80-90% em países da África Subsaariana (FARINA et al., 2001; VOGELS et al., 2003; KOSTENSE et al., 2004; SUMIDA et al., 2004; SUMIDA et al., 2005; THORNER et al., 2006; ABBINK et al., 2007). Anticorpos neutralizantes, mesmo que em baixos títulos, podem reduzir a eficiência da transcrição de genes virais, tornando transiente a expressão do transgene (TATSIS; ERTL, 2004). Outra limitação dessa abordagem são as exposições subsequentes ao vetor. Assim como na infecção natural, a administração de Ad com a finalidade de imunização gera resposta imune humoral que também impede a eficácia da expressão do transgene. Estudos pré-clínicos realizados em camundongos mostraram que administração repetida de Ad através da via intranasal ou intravenosa é ineficaz devido a presença de anticorpos neutralizantes específicos para a partícula viral (CHEN; KOVESDI; BRUDER, 2000).

Para superar este problema de imunidade pré-existente presente na população e preservar as vantagens da utilização de Ad recombinantes como vacinas, foi desenvolvido um vetor adenoviral a partir de um Ad de origem símia, isolado de linfonodos mesentéricos de chimpanzés (FARINA et al., 2001). Este vírus de chimpanzé normalmente não circula na população humana e por isso, não possui epítomos para células B que possam ter reação cruzada com os sorotipos comuns de Ad humanos (FITZGERALD et al., 2003). Além disso, têm a vantagem de conservar a característica de indução de ampla resposta imune presentes nos Ad humanos. Devido às vantagens apresentadas por esses vetores e a baixa prevalência de anticorpos neutralizantes contra o vírus, vários sorotipos derivados de chimpanzé tem sido desenvolvidos e empregados como vacinas contra HIV (REYES-SANDOVAL et al., 2004; LIN et al., 2007; MCCOY et al., 2007), raiva (ZHOU et al., 2006), influenza (ROY et al., 2007), malária (REYES-SANDOVAL et al., 2008) e câncer (PERUZZI et al., 2009).

Em nosso laboratório, Ad de chimpanzé dos sorotipos 6 e 68 (AdC6 e AdC68, respectivamente) expressando a forma truncada da proteína Gag p37 (p17 e p24) do HIV-1 foram capazes de induzir resposta imune celular em camundongos quando administrados por via intramuscular (PINTO et al., 2003), oral (PINTO et al., 2004), intranasal e intravaginal (de SOUZA et al., 2007). Adicionalmente, de Souza e colaboradores demonstraram que a administração de AdC6gag37 através da via intravaginal aumenta a população de células T γ/δ no trato genital (de SOUZA et al., 2007). Células T γ/δ podem representar até 50% da população de células T em tecidos de mucosas, como o trato genital (FIDEL; WOLF; KUKURUGA, 1996; CARDING; EGAN, 2002; KONIGSHOFER; CHIEN, 2006). Diversos estudos mostraram que células T γ/δ estão envolvidas na resposta imune inata contra uma gama de patógenos que iniciam o processo de infecção em tecidos mucosos (FIDEL; WOLF; KUKURUGA, 1996;

CARDING; EGAN, 2002). Entretanto, o envolvimento de células T γ/δ na resposta imune inata da mucosa vaginal após exposição ao AdC6 não foi avaliado.

1.3 Imunidade de mucosas, células T γ/δ e células *natural killer* (NK)

O sistema imune de mucosas é responsável pela mediação da relação entre o hospedeiro e microorganismos, tais como bactérias comensais, e forma a primeira linha de defesa física e imunológica contra patógenos. Em seres humanos, 80% de todos os imunócitos concentram-se nas mucosas. Estas células estão contidas nos vários tecidos linfóides associados às mucosas (MALT) ou transitando entre eles (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005). O MALT representa um sistema altamente compartimentalizado. Estes compartimentos linfóides são definidos anatomicamente e atuam como os principais sítios indutores de resposta imune nas mucosas (MOWAT, 2003). Contudo, ensaios de marcação de células T e B com o corante PKH-26 revelaram que os linfonodos ilíacos devem funcionar como um sítio indutor da resposta imune para o qual as células migram (LEHNER, 2003).

O sistema imune de mucosas possui desenvolvimento independente do sistema imune periférico. Como principal consequência deste fato, somente a resposta imune iniciada em sítios de mucosas pode levar à imunidade efetiva nestes tecidos (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005). O trato genital inferior, ou seja, vagina e vulva, têm a habilidade de iniciar uma resposta imune contra vários patógenos transmitidos sexualmente além do HIV, tais como vírus do herpes simples, *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* (MERRIMAN et al., 1984; HEDGES et al., 1999). Portanto, estratégias vacinais baseadas na administração de antígenos por vias de mucosas têm sido desenvolvidas para prevenir doenças causadas por agentes infecciosos que utilizam sítios mucosos como porta de entrada (WANG et al., 1997; BAGARAZZI et al., 1999;

ABEL et al., 2003; BOGERS et al., 2004). Um grande número de estudos têm demonstrado que imunizações pelas vias de mucosas induzem resposta imune mais efetiva nestes locais quando comparada as imunizações sistêmicas, inclusive células T CD8⁺ específicas (BELYAKOV et al., 2001; BERZOFSKY; AHLERS; BELYAKOV, 2001; KOZLOWSKI; NEUTRA, 2003) e isto parece ser aplicado a maioria dos tipos de vacinas (STEVCEVA; STROBER, 2004). Desta maneira, acredita-se que vacinas capazes de proteger contra HIV, por exemplo, devam induzir imunidade persistente nestes compartimentos (BELYAKOV; BERZOFSKY, 2004).

A resposta imune nos tecidos mucosos é governada pela natureza do imunógeno, o tipo de célula apresentadora de antígeno (APC) envolvida e o microambiente presente. As populações celulares envolvidas são fenotipicamente e funcionalmente distintas dos tecidos linfóides sistêmicos, onde além de células T e B residentes, estão presentes células dendríticas, neutrófilos, macrófagos, células *natural killer* (NK), mastócitos, linfócitos T regulatórios (CD4⁺ CD25⁺) e células T γ/δ (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005).

Receptores de células T γ/δ (TCR γ/δ), receptores de células T α/β (TCR α/β) e imunoglobulinas são produtos do rearranjo dos segmentos gênicos V (*variable*), D (*diversity*) e J (*joining*) que, durante a maturação linfocítica, geram uma grande diversidade de receptores antigênicos proporcionando ao sistema imune dos vertebrados a habilidade de reconhecer uma grande diversidade de moléculas antigênicas. A descoberta da cadeia γ do TCR de linfócitos γ/δ ocorreu durante pesquisas sobre a cadeia α do TCR (SAITO et al., 1984) e culminou na identificação de uma nova população de linfócitos apresentando o TCR com o heterodímero γ/δ (BANK et al., 1986; BRENNER et al., 1986; LANIER et al., 1987). O uso de múltiplos segmentos gênicos e processamento dos rearranjos para remover ou adicionar nucleotídeos ao produto V-D-J resultam, em teoria, em uma diversidade muito maior para as células com TCR γ/δ do que para as células B e T combinadas (CARDING; EGAN, 2002).

Células T γ/δ possuem o TCR formado por cadeias polipeptídicas γ e δ e diferem de células T α/β pelo tipo de antígeno que reconhecem, mecanismo de reconhecimento de antígenos, desenvolvimento tímico, assim como sua distribuição anatômica na periferia (ALLISON; GARBOCZI, 2002; CARDING; EGAN, 2002). Células T γ/δ constituem somente uma pequena proporção (1-5%) de linfócitos que circulam no sangue periférico e órgãos linfóides secundários (FIDEL; WOLF; KUKURUGA, 1996; CARDING; EGAN, 2002; KONIGSHOFER; CHIEN, 2006). Entretanto, estes linfócitos encontram-se disseminados nos tecidos epiteliais, tais como o trato reprodutivo, intestino e a pele, onde eles podem compreender 50% de toda população de células T (FIDEL; WOLF; KUKURUGA, 1996; CARDING; EGAN, 2002; KONIGSHOFER; CHIEN, 2006).

Células T γ/δ apresentam o mecanismo de reconhecimento de antígenos semelhante ao das imunoglobulinas (HAYDAY, 2000). Enquanto células T α/β necessitam que antígenos sejam processados e associados às moléculas do MHC para serem reconhecidos, células T γ/δ podem reconhecer antígenos sem a necessidade de processamento e apresentação (CHIEN; JORES; CROWLEY, 1996; HAYDAY, 2000; KONIGSHOFER; CHIEN, 2006). Além disso, estudos em camundongos demonstraram que subgrupos de linfócitos T γ/δ do trato reprodutivo destes animais têm desenvolvimento tímico distinto de subgrupos de células T γ/δ periféricas e de outros tecidos mucosos, visto que estes linfócitos apresentam reconhecimento de antígenos independente de moléculas de MHC (DAS et al., 2000; GOULD; PLOEGH; SCHUST, 2001).

Resultados obtidos em alguns modelos de doenças infecciosas indicam que células T γ/δ podem desempenhar diferentes funções dependendo do estágio da resposta imune na qual elas são ativadas (BORN et al., 1999; HAYDAY, 2000). Além disso, trabalhos com camundongos *knock out*, desprovidos de linfócitos expressando TCR γ/δ ou TCR α/β , mostraram que células T γ/δ estão envolvidas em estágios iniciais da resposta imune contra infecções bacterianas e virais,

antes mesmo da resposta de linfócitos T α/β (CHIEN; JORES; CROWLEY, 1996; CARDING; EGAN, 2002). Esses resultados sugerem que células T γ/δ situadas em tecidos mucosos contribuem na proteção destes tecidos e na resposta imune em estágios iniciais contra infecções. Essas células podem agir como um elo entre a resposta imune inata e adaptativa e promover a resposta de células T α/β (CARDING; EGAN, 2002). Sítios mucosos apresentam ainda um ambiente complexo, contendo microorganismos comensais, que eventualmente podem causar patologia. Portanto, acredita-se que células T γ/δ residentes desses tecidos exerçam funções imunoregulatórias e imunoprotetoras (HAYDAY et al., 2001) e ainda, dependendo do tecido mucoso ou tecido linfóide em que se encontram, podem exibir fenótipos e funções diferentes (BONNEVILLE, 2006). Outra característica da plasticidade de células T γ/δ foi evidenciada em um estudo que relatou células expressando o receptor $V\gamma 2$ e $V\delta 2$ com características de células apresentadoras de antígenos (BRANDES; WILLIMANN; MOSER, 2005). Desta maneira, quando ativadas, estas células processam antígenos eficientemente e fornecem sinais co-estimulatórios suficientes para induzir células T α/β virgens à proliferação e diferenciação.

As células NK, uma população de linfócitos que contribuem para resposta protetora contra uma variedade de infecções e câncer, estão distribuídas em órgãos linfóides e não linfóides (TRINCHIERI, 1989; BIRON, 1997). Análises da frequência de células NK em camundongos e em humanos demonstraram que estas células estão contidas em maior número em órgãos não linfóides, tais como fígado e pulmão, do que em órgãos linfóides secundários, como baço e linfonodos (CRISPE; MEHAL, 1996; NORRIS et al., 1998; GREGOIRE et al., 2007). Células NK não expressam TCR e não apresentam a molécula CD3 em sua superfície (TRINCHIERI, 1989). Entretanto, essas células podem mediar lise de células infectadas, dependente de perforina, quando estimuladas por IFN do tipo I (α/β) e IL-12, produzidos por células dendríticas e macrófagos (BIRON et al., 1999). Quando submetidas à proliferação, estas

células sintetizam citocinas, tais como IFN- γ , TNF- α , GM-CSF (TRINCHIERI, 1989; BIRON, 1997) e quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES (BLUMAN et al., 1996; OLIVA et al., 1998).

A resposta imune mediada por células é um importante mecanismo de proteção do hospedeiro em infecções vaginais ocasionadas por vírus e bactérias. Diversos estudos realizados em modelo murino de infecção intravaginal com o vírus do herpes simples mostraram envolvimento significativo de células NK com a diminuição da carga viral no trato genital e em outros órgãos (ASHKAR; ROSENTHAL, 2003; GILL; ROSENTHAL; ASHKAR, 2005; THAPA; KUZIEL; CARR, 2007). Ainda em modelo murino, células NK desempenham um papel precoce no controle da infecção através da síntese de IFN- γ em infecções bacterianas causadas por *Chlamydia trachomatis* (TSENG; RANK, 1998). No entanto, infelizmente, poucos estudos envolvendo células NK em tecidos de mucosas têm sido realizados.

Os diversos tipos celulares do sistema imunológico presentes nas mucosas do trato genital são fundamentais para homeostase e defesa destes tecidos, que abrigam vários microorganismos comensais, tornando este ambiente hostil para agentes infecciosos. Devido a compartimentalização desses tecidos e as populações celulares neles contidos, acredita-se que resposta imune protetora de longa duração em sítios mucosos deva ser iniciada nestes locais. Vários estudos têm demonstrado que células T γ/δ e células NK atuam na resposta imune inata em resposta a agentes infecciosos que iniciam o processo de infecção através dos tecidos de mucosas. Portanto, considerando a possível importância das células T γ/δ e células NK na indução da resposta imune adaptativa através da produção de citocinas e quimiocinas, decidiu-se avaliar a frequência e a ativação dessas células após imunização intravaginal com AdC6gag37 e elucidar os mecanismos para o estabelecimento de uma resposta imune celular adaptativa duradoura em tecidos de mucosas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta imune mediada por células do trato genital de camundongos BALB/c após inoculação intravaginal com uma vacina de adenovírus recombinante.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar a dose de AdC6gag37 capaz de induzir células T γ/δ e células NK no trato genital, baço e linfonodos ilíacos em camundongos após imunização intravaginal com AdC6gag37.

Quantificar células T γ/δ e células NK no trato genital, baço e linfonodos ilíacos em diferentes tempos após imunização intravaginal com AdC6gag37.

Avaliar a ativação de células T γ/δ após imunização através da expressão dos antígenos de superfície CD25 e CD69.

Investigar a expressão de quimiocinas e citocinas produzidas pelas células T γ/δ nos diferentes tecidos analisados através de PCR em tempo real.

3. METODOLOGIA

3.1. Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio – Protocolo 250/03) e pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (PP00068/CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2 Modelo animal

Foram utilizados camundongos *Mus musculus*, linhagem BALB/c, isogênicos, haplótipo H-2k^d, fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP/CCB/UFSC), sob padrão sanitário convencional, com água e alimentação *ad libitum*.

3.3 Adenovírus recombinante

Adenovírus símio sorotipo 6, com a região E1 de seu genoma substituída por uma seqüência que codifica a forma truncada da proteína Gag p37 (p17 e p24) do HIV-1 (AdC6gag37), proveniente do Instituto Wistar (Filadélfia, EUA) foi utilizado neste estudo (PINTO et al., 2004). Os vetores adenovirais foram propagados em células 293, posteriormente purificados em gradiente de cloreto de césio e o número de partículas virais (p.v.) determinado por espectrofotometria. Os estoques virais continham aproximadamente $5,8 \times 10^{12}$ p.v./ml e

foram armazenados a -80°C . Para os ensaios de imunização, os estoques foram descongelados e diluídos em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) estéril.

3.4 Imunização de camundongos

Camundongos BALB/c receberam, pela via subcutânea, 3 mg de acetato de medroxiprogesterona (Depo-Provera, Pfizer Inc.). Cinco dias após, os animais foram anestesiados com 3,82 mg de cloridrato de ketamina (Dopalen, Vetbrands), e 0,66 mg de cloridrato de 2-2,6-xilidino 5,6 dihidro 4H 1,3 tiazina (Rompum, Bayer) administrados pela via intraperitoneal. Em seguida, estes animais foram imunizados com diferentes concentrações de AdC6gag37 (10^5 , 10^7 , 10^9 e 10^{10} p.v./animal), em um volume final de 10 μl , instilados através de uma pipeta automática na mucosa vaginal. Ao mesmo tempo, um grupo controle recebeu PBS seguindo-se o mesmo protocolo de imunização. Após este procedimento os animais foram posicionados dorsalmente sobre a serragem com os membros inferiores levemente inclinados durante aproximadamente 10 minutos.

3.5 Coleta das amostras e obtenção de células

Células presentes no trato genital, baço e linfonodos ilíacos foram obtidas em diferentes tempos após a imunização. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o trato genital, baço e linfonodos ilíacos foram removidos cirurgicamente e mantidos em meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab) e 1% de PSA (100U/ml de Penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de Streptomicina e 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de Anfotericina B) (Sigma) até o processamento das amostras.

Após a remoção do trato genital (vagina, útero, trompas e ovários), o tecido foi fragmentado em pedaços de aproximadamente 0,5 cm e submetido à dissociação enzimática através de ciclos de agitação a 130 x g por 1 hora a 37°C em recipiente apropriado contendo 1,37 mg/ml de Colagenase tipo I (Gibco) diluída em meio RPMI suplementado com 5% de SBF e 1% de PSA em um volume final de 10 ml. Ao final de cada ciclo, a suspensão celular foi coletada e mantida a 4°C. Este procedimento foi repetido três vezes e, ao final do terceiro ciclo, as células foram centrifugadas a 300 x g por 10 minutos a 18°C. As células foram suspensas em 4 ml de Percoll (LGC Biotecnologia) 40% e transferidas lentamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur para um tubo contendo 2 ml de Percoll 70%, sendo centrifugadas a 600 x g por 20 minutos a 20°C. Em seguida, a camada da interface entre o Percoll 70% e 40%, contendo as células mononucleares, foi recolhida e submetida a duas consecutivas centrifugações com 10 ml de meio RPMI suplementado com 5% de SBF e 1% de PSA a 300 x g por 5 minutos a 18°C.

As células provenientes do baço foram obtidas através da maceração deste órgão entre lâminas de vidro, centrifugadas a 300 x g por 5 minutos a 18°C, suspensas e mantidas em tampão de lise de hemácias (168,06 mM de cloreto de amônio, 9,98 mM de bicarbonato de potássio e 0,09 mM de ácido etilenodiaminotetracético - EDTA) por 5 minutos a 4°C. Após este período, as células foram centrifugadas duas vezes com 10 ml de meio Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Cultilab) a 300 x g por 5 minutos a 18°C.

Para o isolamento de linfócitos presentes nos linfonodos ilíacos utilizou-se um pistilo para realizar a dissociação mecânica desses órgãos e assim obter a liberação das células. Em seguida, as células foram centrifugadas duas vezes com 5 ml de meio DMEM a 300 x g por 5 minutos a 18°C.

Ao final de todos os procedimentos, o número de células viáveis de cada tecido descrito acima foi determinado através da contagem com corante azul de Tripán (Vetec) 0,02% em câmara de Neubauer.

3.6 Obtenção de células T γ/δ da mucosa do trato genital

A suspensão celular obtida do trato genital, como descrito no item 3.5, foi submetida à depleção de células não-T e seleção positiva de células T γ/δ utilizando-se um *kit* comercial (TCR γ/δ + T Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec) de acordo com as instruções do fabricante. Após a contagem em câmara de Neubauer, as células foram suspensas em 450 μ l de solução tampão (PBS, 0,5% de soro albumina bovina - BSA e 2mM de EDTA), homogeneizadas e incubadas com 50 μ l de solução para depleção de células não-T (anti-TCR γ/δ conjugado com biotina, anticorpos anti-CD45R/B220 e anti-CD 11b conjugados com partículas magnéticas, Miltenyi Biotec) por 30 minutos a 4°C. Após este período, as células foram centrifugadas com 10 ml de solução tampão a 300 x g por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado suspenso em 2 ml de solução tampão. A suspensão celular foi então aplicada em uma coluna LD (Miltenyi Biotec) fixada a um suporte magnético e posteriormente a coluna foi lavada com 2 ml de solução tampão. Em seguida, as células conjugadas com partículas magnéticas foram coletadas através de lavagens após a retirada da coluna do campo magnético.

A fração efluente contendo células T γ/δ foi coletada e centrifugada a 300 x g por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado suspenso em 450 μ l de solução tampão e incubado com anticorpo anti-biotina conjugado com partículas magnéticas (Miltenyi Biotec) por 30 minutos a 4°C. Em seguida as células foram centrifugadas com 10 ml de solução tampão a 300 x g por 10 minutos a 4°C. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e o

precipitado suspenso em 1 ml de solução tampão. Esta suspensão foi então aplicada em uma coluna MS (Miltenyi Biotec) fixada a um suporte magnético e a coluna foi lavada com 1 ml de solução tampão. Após este procedimento, a coluna foi rapidamente removida do suporte magnético e aplicou-se 1 ml de tampão com auxílio de um êmbolo para coletar as células T γ/δ . Em seguida, o número de células viáveis de cada fração descrita acima foi determinado através da contagem com corante azul de Tripán 0,02% em câmara de Neubauer.

3.7 Marcação de superfície celular

Após serem isoladas como descrito no item 3.5, as células provenientes do trato genital, baço e linfonodos ilíacos foram suspensas em 5 ml de solução tampão de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) (PBS suplementado com 2% de SBF), posteriormente filtradas em uma membrana de 30 μ m (BD Biosciences), colocadas em placas de 96 cavidades (1 x 10⁶ células por cavidade) e então incubadas com 0,1 μ g do anticorpo anti-CD16/32 (clone 2.4G2, BD Pharmigen) por 20 minutos a 4°C. Após este procedimento as células foram centrifugadas com 200 μ l de solução tampão de FACS a 250 x g por 5 minutos por 18°C.

Para os ensaios de dose-resposta e cinética, as células foram marcadas simultaneamente com 0,1 μ g do anticorpo anti-TCR β (clone H57-597, BD Pharmigen) conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), 0,025 μ g do anticorpo anti-TCR γ/δ (clone HM 3804, Caltag Laboratories) conjugado com ficoeritrina (PE) e 0,2 μ g do anticorpo anti-CD3 (clone 145-2C11, BD Pharmigen) conjugado com proteína clorofila-peridina (PerCP) durante 30 minutos a 4°C.

Para avaliar a frequência de células NK, as células foram marcadas com 0,2 μ g do anticorpo anti-CD4 (clone H129.19, BD Pharmigen) conjugado com FITC, 0,2 μ g do anticorpo

anti-CD49b/Pan NK (clone DX5, BD Pharmigen) conjugado com PE e 0,2 µg anticorpo anti-CD8 (clone 57-6.7, BD Pharmigen) conjugado com PerCP durante 30 minutos a 4°C.

A ativação de células T γ/δ provenientes do trato genital também foi avaliada através de marcação de superfície celular. Para isso, 1 a 5×10^5 células T γ/δ isoladas como descrito no item 3.6 foram marcadas simultaneamente com 0,2 µg do anticorpo anti-CD69 (clone H1.2F3, BD Pharmigen) conjugado com FITC, 0,025 µg do anticorpo anti-TCR γ/δ conjugado com PE e 0,1 µg do anticorpo anti-CD25 (clone PC61, BD Pharmigen) conjugado com PerCP-Cy5.5 durante 30 minutos a 4°C.

A análise das amostras foi realizada em citômetro de fluxo, modelo FACSCalibur (Becton Dickinson), utilizando o programa CellQuest™ (BD Biosciences) e os eventos adquiridos analisados com o programa FlowJo (© Tree Star, Inc.) versão 8.6.3.

3.8 Padronização de parâmetros de detecção e estratégia de *gates*

Durante a aquisição das células, parâmetros celulares como dispersão da luz frontal (determinado pelo *forward scatter* - FSC) e dispersão de luz lateral (estabelecido pelo *side scatter* - SSC) foram definidos através de ajustes nos detectores FSC e SSC até a obtenção de valores ideais para cada tipo de tecido analisado. Determinou-se ainda a população de células duplo-negativas através de ajustes nos detectores de fluorescência FITC (FL1), PE (FL2) e PerCP (FL3) para as células do trato genital, baço e linfonodos ilíacos.

Os valores da intensidade de fluorescência dos antígenos foram determinados separadamente para cada detector utilizando-se o anticorpo primário anti-CD3 conjugado com FITC ou PE ou PerCP. Para obter o ajuste de cada fluoróforo, as células provenientes do trato

genital, baço e linfonodos ilíacos foram colocadas em placas de 96 cavidades na concentração de 1×10^6 células por cavidade e então incubadas separadamente com 0,2 μg do anticorpo anti-CD3 (clone 145-2C11, BD Pharmigen) conjugado com FITC, 0,1 μg do anticorpo anti-CD3 (clone 145-2C11, BD Pharmigen) conjugado com PE e 0,2 μg do anticorpo anti-CD3 (clone 145-2C11, BD Pharmigen) conjugado com PerCP durante 30 minutos a 4°C . Após este período as células foram centrifugadas com 150 μl de tampão de FACS a $250 \times g$ por 5 min a 18°C e então fixadas com 100 μl de paraformaldeído 4% por 20 minutos a 4°C . Em seguida, as células foram centrifugadas duas vezes a $250 \times g$ por 5 min a 4°C , sendo o precipitado suspenso em 500 μl de tampão de FACS para aquisição em citômetro de fluxo. Durante a aquisição foram realizados os ajustes nos detectores de FITC, PE e PerCP (FL1 versus FL2, FL2 versus FL1, FL2 versus FL3 e FL3 versus FL2) até a obtenção de valores ideais para cada tecido analisado.

Após terem sido estabelecidos os valores citados acima, as células do trato genital, baço e linfonodos ilíacos previamente marcadas conforme descrito no item 3.7 foram adquiridas em citômetro de fluxo, totalizando 200.000 eventos. Todos os parâmetros pré-estabelecidos foram confirmados a cada aquisição utilizando-se o mesmo procedimento acima descrito.

A análise da frequência de células T γ/δ de todos os ensaios foi realizada primeiramente com a separação das células T de todas as outras células da amostra através do *gate* da população CD3^+ , observando-se os parâmetros FSC e SSC e subtraindo-se as frequências encontradas nos controles negativos. A partir deste *gate*, obteve-se a frequência de células positivas para o TCR com cadeias γ/δ . Nos ensaios de ativação verificou-se ainda quais destas células apresentavam expressão dos marcadores de superfície celular CD25 e CD69, determinando-se assim a frequência de células T γ/δ^+ com fenótipo ativado.

A frequência de células NK foi obtida através de um *gate* na população de células negativas para as moléculas CD4 e CD8, observando-se os parâmetros FSC e SSC e subtraindo-

se as frequências encontradas nos controles negativos. A partir dessa população verificou-se quais células eram positivas para a molécula CD49b/Pan NK (DX5).

3.9 Avaliação da expressão de citocinas e quimiocinas do trato genital de camundongos BALB/c através de PCR em tempo real

3.9.1. Extração e isolamento de RNA total

Para extração de RNA total de linfócitos $T\gamma/\delta$ adicionou-se 1 ml de Trizol[®] (Invitrogen) a $1-5 \times 10^5$ células. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 μ l de clorofórmio (Merck) e as amostras foram novamente homogeneizadas lentamente por 15 segundos, incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente e submetidas à centrifugação a $2.400 \times g$ por 15 minutos a 4°C . Após este procedimento, a camada superior foi transferida para um novo tubo onde se acrescentou 500 μ l de isopropanol (Merck). As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a $2.400 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido a duas consecutivas centrifugações a $1.200 \times g$ por 7 minutos a 4°C com 1 ml de etanol (Merck) 75% diluído em água DEPC (dietilpirocarbonato) 0,1% autoclavada. Após a obtenção do RNA total, o tubo foi submetido à secagem em estufa 37°C e em seguida o RNA foi dissolvido em 20 μ l de água livre de RNases e armazenado a -80°C .

O RNA total foi quantificado no espectrofotômetro Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) através da leitura simultânea da densidade ótica (D.O.) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm, observando-se a razão entre eles.

3.9.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) através da reação de transcrição reversa (RT)

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada em duas etapas. Foram colocados em um microtubo 250 ng de iniciador randômico, 1µg de RNA total extraído de células T γ/δ , 10mM de deoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Invitrogen) em quantidades equimolares (0,50mM cada) e água livre de RNases para um volume final de 13 µl. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 5 segundos a 2.000 x g em temperatura ambiente. Após este procedimento, as amostras foram submetidas a um ciclo de 65°C por 5 minutos em termociclador (Master Cycler Gradient – Eppendorf).

Após esta etapa, foram adicionados à solução o tampão de reação da enzima (Invitrogen), concentrado 5 vezes, 0,1M de ditioneitol (DTT) (Invitrogen), 40U/µl de RNase OUT (Invitrogen) e 200 U da enzima transcriptase reversa SuperScript III RT (Invitrogen). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 5 segundos a 2.000 x g. Em seguida, as amostras foram submetidas a um ciclo de 5 minutos a 25°C, um ciclo de 50 minutos a 50° C e posteriormente 15 minutos a 70° C. Ao final da reação, cDNA foi diluído 8 vezes e armazenado a -20° C para posterior utilização nas reações de PCR em tempo real.

3.9.3 Sequências dos pares de iniciadores específicos

As sequências dos mRNAs de CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), CXCL10 (IP-10), perforina e granzima B foram obtidas através do acesso ao *GenBank*. Os iniciadores específicos para cada gene foram desenhados por meio da ferramenta *web* localizada

em <http://frodo.wi.mit.edu/>, analisados com o auxílio do programa FastPCR e sintetizados pela Invitrogen, de acordo com as sequências apresentadas na Tabela 2.

Os iniciadores específicos para os genes: IFN- α , IFN- β , IFN- γ , conforme descrito na Tabela 2 (BORDIGNON et al., 2008) foram gentilmente cedidos pelo Doutor Juliano Bordignon (IBMP/ICC/FIOCRUZ) e 18S, TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12-p40, conforme citados na Tabela 2, foram desenhados previamente pelo Professor Dr. André Báfica (LIDI/MIP/CCB/UFSC), respectivamente.

Tabela 2. Sequências dos iniciadores específicos utilizados nas reações de PCR em tempo real.

GENE	OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA (5' - 3')	AMPLICON
18S	Sense	CACGGCCGGTACAGTGAAAC	119 pb
	Anti-sense	CCCGTCGGCATGTATTAGCT	
IFN- α	Sense	GACTCATCTGCTGCTTGAATGCAACCCTCC	194 pb
	Anti-sense	GACTCACTCCTTCTCCTCACTCAGTCTTGCC	
IFN- β	Sense	CGCTGCGTTCCTGCTGTG	154 pb
	Anti-sense	GATCTTGAAGTCCGCCCTGTAG	
IFN- γ	Sense	CTTGGATATCTGGAGGAACTGGC	235 pb
	Anti-sense	GCGCTGGACCTGTGGGTTGTTGA	
TNF- α	Sense	AAAATTCGAGTGACAAGCCTGTAG	181 pb
	Anti-sense	CCCTTGAAGAGAACCTGGGAGTAG	
IL-6	Sense	GGCCTTCCCTACTTCACAAG	126 pb
	Anti-sense	ATTTCCACGATTTCCAGAG	
IL-10	Sense	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	191 pb
	Anti-sense	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	
IL-12-p40	Sense	CTCACATCTGCTGCTCCACAAG	101 pb
	Anti-sense	AATTTGGTGCTTCACACTTCAGG	
CCL3	Sense	TCTTCTCAGCGCCATATGGA	73 pb
	Anti-sense	CGTGGAATCTTCCGGCTGTA	
CCL4	Sense	TGCTCGTGGCTGCCTTCT	67 pb
	Anti-sense	CAGGAAGTGGGAGGGTCAGA	
CCL5	Sense	GTGCCCACGTCAAGGAGTAT	75 pb
	Anti-sense	TCCTTCGAGTGACAAACACG	
CXCL10	Sense	GGACGGTCCGCTGCAA	62 pb
	Anti-sense	CCCTATGGCCCTCATTCTCA	
Perforina	Sense	GCAGGTCAGGCCAGCATAAG	80 pb
	Anti-sense	GCAGTCCTGGTTGGTGACCTT	
Granzima B	Sense	TCGACCCTACATGGCCTTAC	98 pb
	Anti-sense	GAGCAGCAGTCAGCACAAAG	

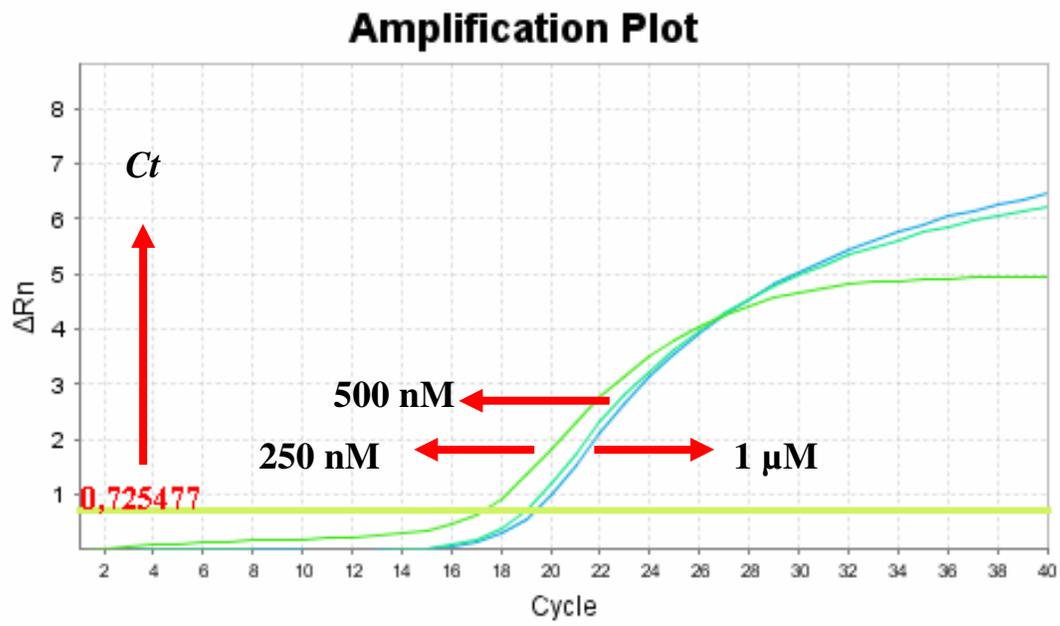
Abreviações: pb, pares de bases.

3.9.4 Padronização da concentração ideal dos iniciadores específicos

Para definir a concentração ideal dos iniciadores utilizados na PCR em tempo real foram utilizadas amostras de cDNA provenientes de camundongo imunizado com LPS (controle positivo) cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. André Báfica (BAFICA et al., 2007). Todos os iniciadores mostrados na Tabela 2 foram avaliados. Em uma placa de 96 cavidades foram colocados os iniciadores nas concentrações de 250 nM, 500 nM e 1 μ M, 2,5 μ l de cDNA, 5 μ l de Sybr® Green (Applied Biosystems) e água ultra-purificada estéril tratada com DEPC 0,1% para completar o volume final de 10 μ l. As amostras foram homogeneizadas, a placa centrifugada por 5 segundos a 250 x g e submetida a um ciclo inicial de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, finalizando com a curva de dissociação com um ciclo de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As reações foram realizadas em um StepOnePlus™ Real-time PCR System, gentilmente cedido para uso pelo Prof. Dr. João Batista Calixto (PPGF/CCB/UFSC).

A Figura 1.A mostra um gráfico de amplificação para exemplificar as padronizações realizadas. Neste caso especificamente, os iniciadores da quimiocina CXCL10 foram avaliados e a concentração selecionada foi 500 nM. Além disso, foram consideradas apenas as amplificações que apresentaram a curva de dissociação com um único pico, como demonstrado na figura 1.B.

A



B

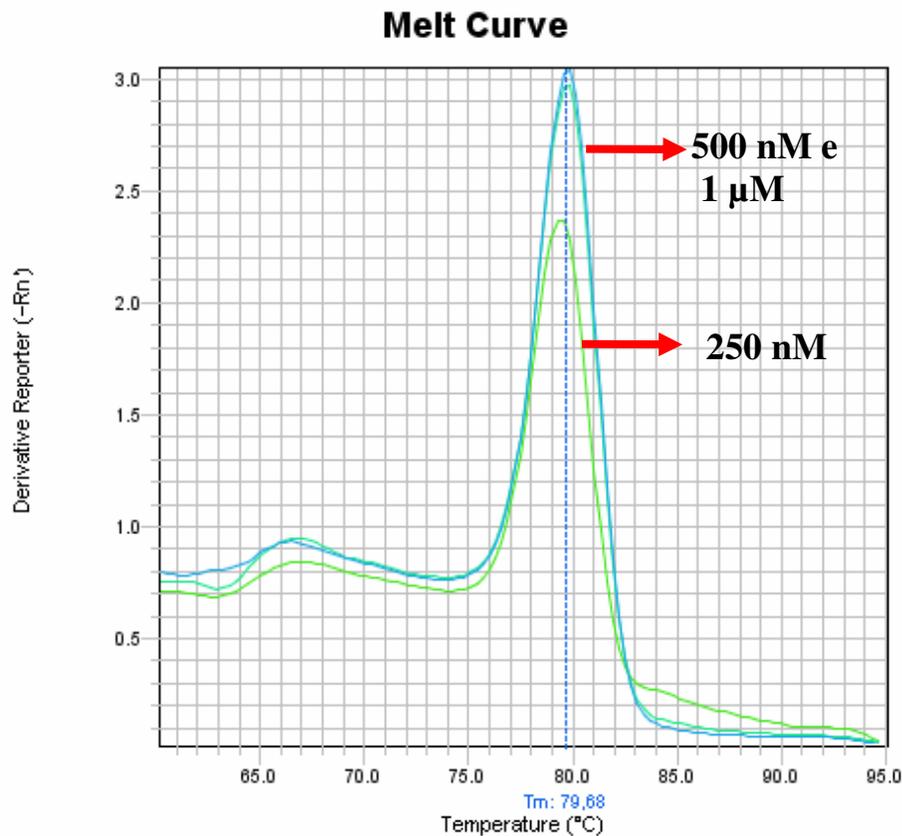


Figura 1. Padonização da concentração dos iniciadores utilizados na PCR em tempo real. (A) Gráfico de amplificação mostrando na linha horizontal o número de ciclos de amplificação e na vertical o sinal de fluorescência (ΔRn). A linha verde horizontal (C_t) indica o ciclo limiar de cada amostra. As concentrações avaliadas estão indicadas pelas setas. (B) Curva de *melting* evidenciando no eixo X a temperatura de dissociação dos iniciadores um único pico.

3.9.5 Amplificação do segmento gênico através da PCR em tempo real

Após determinar a concentração ideal dos iniciadores específicos para amplificação dos segmentos gênicos avaliados neste trabalho, a reação foi realizada utilizando-se 500 nM para os iniciadores CCL4, CXCL10, IFN- α e TNF- α e 250 nM para os demais iniciadores (Tabela 2). Todas reações de amplificação foram realizadas nas mesmas condições citadas no item 3.9.4. A

amplificação do gene constitutivamente expresso 18S ribossomal foi utilizado como controle endógeno da reação e o controle negativo foi feito sem a adição do cDNA.

A quantidade relativa do produto de PCR foi determinada pelo método limiar do ciclo comparativo (*Ct*) como descrito por BÁFICA et al., 2003, onde cada amostra foi anteriormente normalizada pelo gene 18S ribossomal e expressa como aumento relativo versus controles não tratados.

3.10 Análise estatística

O número absoluto de células T γ/δ foi definido calculando-se primeiramente o número total de células T CD3⁺ (frequência de células T CD3⁺ x número absoluto de células do *gate* SSC e FSC/100) e em seguida o número absoluto de células T γ/δ ⁺ (frequência T γ/δ ⁺ x número absoluto de células T CD3⁺/100) e o número absoluto de células NK foi definido calculando-se primeiramente o número total de células T CD4CD8⁻ (frequência de células T CD4CD8⁻ x número absoluto de células do *gate* FSC e SSC/100) e em seguida o número absoluto de células NK (frequência DX5⁺ x número absoluto de células T CD4CD8⁻ /100).

Os resultados das porcentagens apresentadas foram obtidos através da seguinte fórmula:

$$X\% = \left(\frac{\text{porcentagem grupo imunizado}}{\text{porcentagem grupo controle}} - 1 \right) \times 100$$

A partir dos resultados obtidos foi realizada análise estatística utilizando-se o teste não paramétrico Mann-Whitney U (GraphPad InStat®).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da frequência de células T γ/δ do trato genital e órgãos linfóides secundários após imunização com o vetor AdC6gag37

Inicialmente avaliou-se a dose de AdC6gag37 capaz de induzir aumento na frequência e no número de células T γ/δ do trato genital, baço e linfonodos ilíacos. Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados com 10^5 , 10^7 e 10^{10} partículas virais de AdC6gag37 através da via intravaginal e três dias após a imunização os animais foram sacrificados e as células dos tecidos citados acima foram isoladas para avaliação da frequência dos antígenos de superfície celular CD3, TCR γ/δ e TCR α/β através de citometria de fluxo.

Como demonstrado na Figura 2, os camundongos imunizados com 10^{10} p.v. de AdC6gag37 apresentaram um aumento na frequência (17,03%) de células T γ/δ presentes no trato genital três dias após a imunização intravaginal, quando comparados aos animais do grupo controle. Contudo, este aumento não difere estatisticamente do grupo controle ($p= 0,7$). Os camundongos imunizados com as doses de 10^5 e 10^7 p.v. de AdC6gag37 mostraram frequências similares ao grupo controle. Observou-se ainda que a frequência de células CD3⁺ diminuiu nos grupos que receberam AdC6gag37, sendo menor no grupo de animais imunizados com a dose de 10^7 partículas virais (Figura 2).

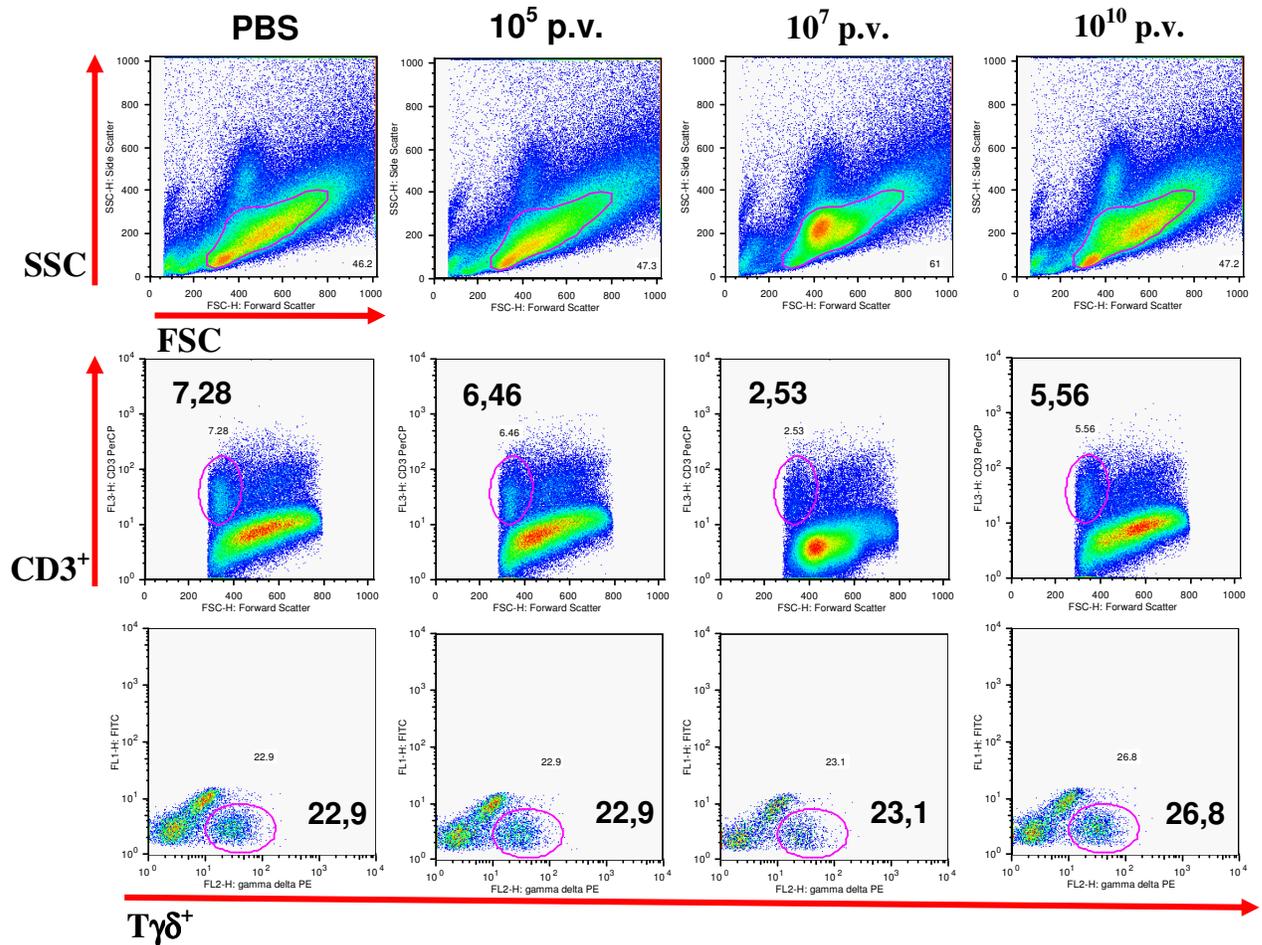


Figura 2. Avaliação da frequência de células T γ/δ do trato genital após imunização intravaginal com diferentes doses de AdC6gag37. Camundongos BALB/c fêmeas receberam 3 mg de acetato de medroxiprogesterona subcutaneamente e cinco dias após foram imunizados com as doses indicadas de AdC6gag37. Células do trato genital foram coletadas três dias após a imunização, marcadas com anticorpos anti-TCR γ/δ -PE e anti-CD3-PerCP e adquiridas em citômetro de fluxo. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes (4-5 animais por grupo/experimento).

A frequência de células T γ/δ esplênicas avaliadas três dias após a imunização com as doses de 10^5 , 10^7 e 10^{10} p.v de AdC6gag37 não mostraram alterações em relação ao grupo controle, como pode ser observado na Figura 3. Neste tecido, a análise da frequência de células T α/β também não demonstrou alterações em relação ao grupo que recebeu PBS em quaisquer doses administradas (Figura 3). Contudo, a frequência de células T $CD3^+$ foi maior em todos os

grupos que receberam o vetor adenoviral. A frequência de células T CD3⁺ três dias após a imunização variou de 18% a 36%.

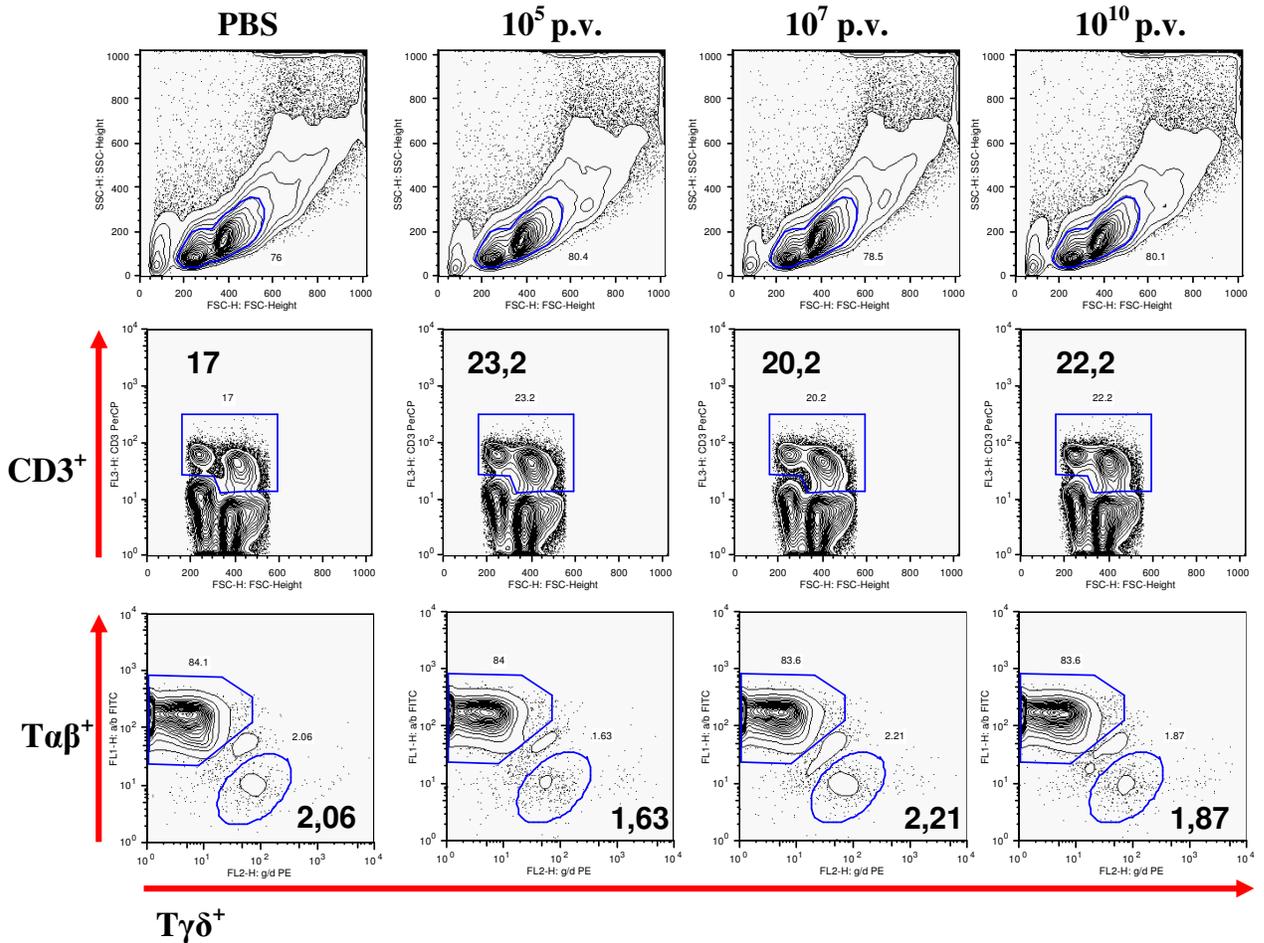


Figura 3. Avaliação da frequência de células T γ/δ presentes no baço após imunização intravaginal com diferentes doses de AdC6gag37. Camundongos BALB/c fêmeas receberam 3 mg de acetato de medroxiprogesterona subcutaneamente e cinco dias após foram imunizados com as doses indicadas de AdC6gag37. Células do baço foram coletadas três dias após imunização e marcadas com anticorpos anti-TCR β -FITC, anti-TCR γ/δ -PE e anti-CD3-PerCP e adquiridas em citômetro de fluxo. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes (4-5 animais por grupo/experimento).

Nos linfonodos ilíacos dos camundongos imunizados com AdC6gag37, a frequência de células T γ/δ três dias após a administração das diferentes doses do vetor vacinal mostrou-se muito similar ao grupo que recebeu PBS (Figura 4). Da mesma maneira, as frequências de células

T α/β não sofreram alterações em nenhuma dose utilizada neste ensaio. Embora não se tenha detectado alterações na frequência de células T γ/δ e T α/β nos linfonodos ilíacos após a imunização com AdC6gag37, todas as doses administradas foram capazes de induzir aumento na população de células CD3⁺, sendo 5,7%, 10,5% e 10,7% maior que o grupo controle nos animais que receberam as doses de 10⁵, 10⁷ e 10¹⁰ partículas virais, respectivamente.

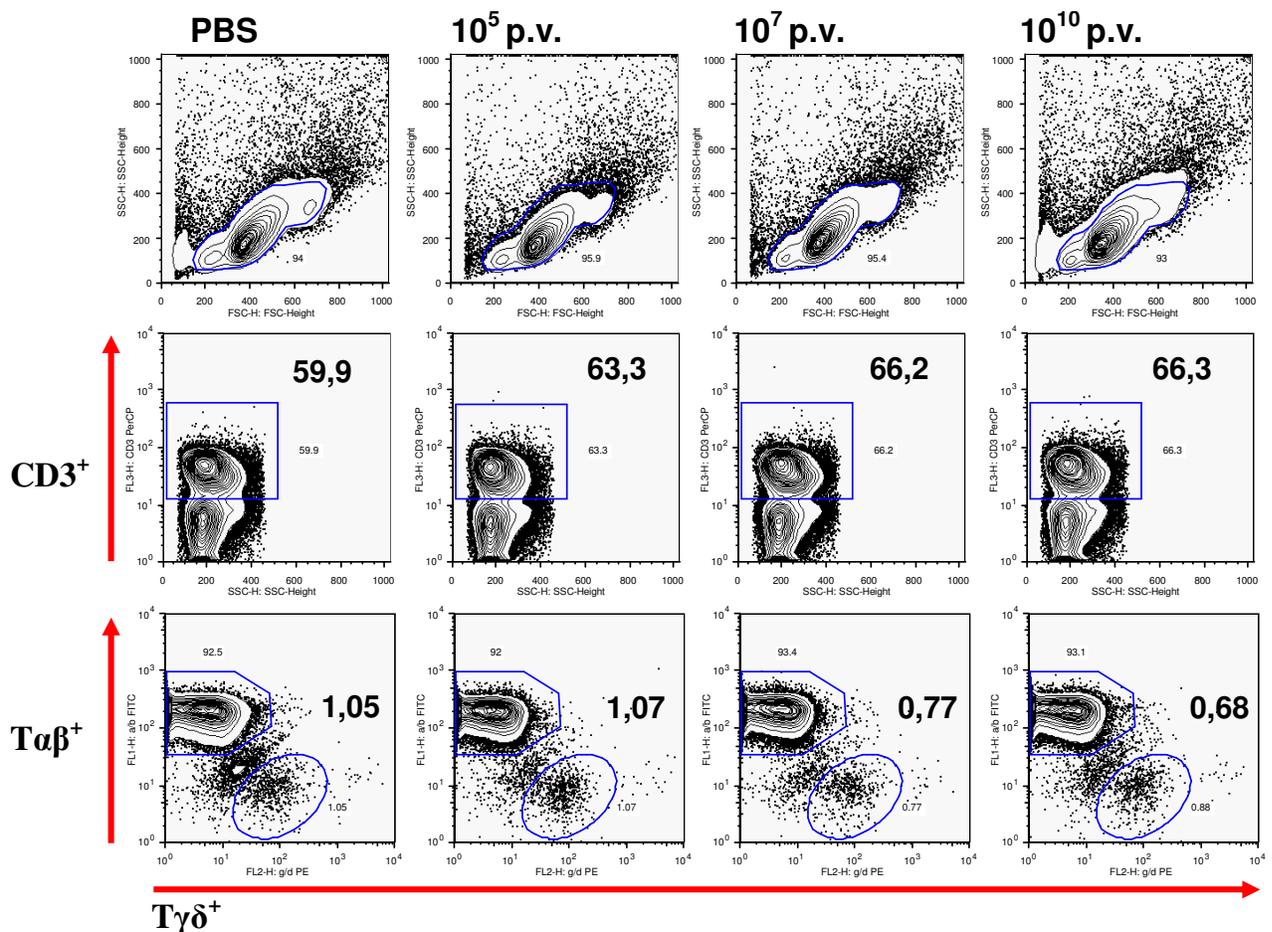


Figura 4. Avaliação da frequência de células T γ/δ presentes nos linfonodos ilíacos após imunização intravaginal com diferentes doses de AdC6gag37. Camundongos BALB/c fêmeas receberam 3 mg de acetato de medroxiprogesterona subcutaneamente e cinco dias após foram imunizados com as doses indicadas de AdC6gag37. Células dos linfonodos ilíacos foram coletadas três dias após a imunização e marcadas com anticorpos anti-TCR β -FITC, anti-TCR γ/δ -PE e anti-CD3-PerCP e adquiridas em citômetro de fluxo. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes (4-5 animais por grupo/experimento).

Esses dados sugerem que a imunização intravaginal com 10^{10} p.v. de AdC6gag37 é capaz de induzir um aumento marginal na frequência de células T γ/δ no trato genital, porém a administração desse vetor parece não influenciar a resposta destas células em órgãos linfóides secundários, como baço e linfonodos ilíacos.

4.2 Cinética da resposta imune de células T γ/δ

Após estabelecer a dose de AdC6gag37 que induz um aumento na porcentagem de células T γ/δ do trato genital, avaliou-se a frequência e o número absoluto dessas células no trato genital, baço e linfonodos ilíacos em diferentes dias após a imunização. Para tanto, camundongos BALB/c fêmeas receberam 3 mg de progesterona e cinco dias depois foram imunizados com a dose de 10^{10} partículas virais de AdC6gag37 através da via intravaginal. Nos dias 1, 3, 5 e 7 após este procedimento os animais foram sacrificados e as células do trato genital, baço e linfonodos ilíacos foram coletadas para avaliação em citômetro de fluxo.

Como demonstrado na Figura 5A, detectou-se no terceiro dia após a imunização um aumento na frequência de células T γ/δ no trato genital. Nos dias 1 e 5, a frequência dessa população de células foi muito semelhante ao grupo controle e 7 dias após a imunização essa porcentagem apresentou um decréscimo. Concomitantemente, quando analisou-se o número absoluto dessas células, observou-se que no terceiro após a imunização ocorre um pico da resposta de células T γ/δ no trato genital, que diminui no sétimo dia (Figura 5B). Embora o aumento na frequência e no número absoluto de células T γ/δ tenha sido observado, este aumento não foi estatisticamente significativo ($p= 0,4$). Em todos os dias avaliados, tanto a frequência como o número absoluto de células T γ/δ não mostraram alterações no baço e nos linfonodos ilíacos (dados não mostrados).

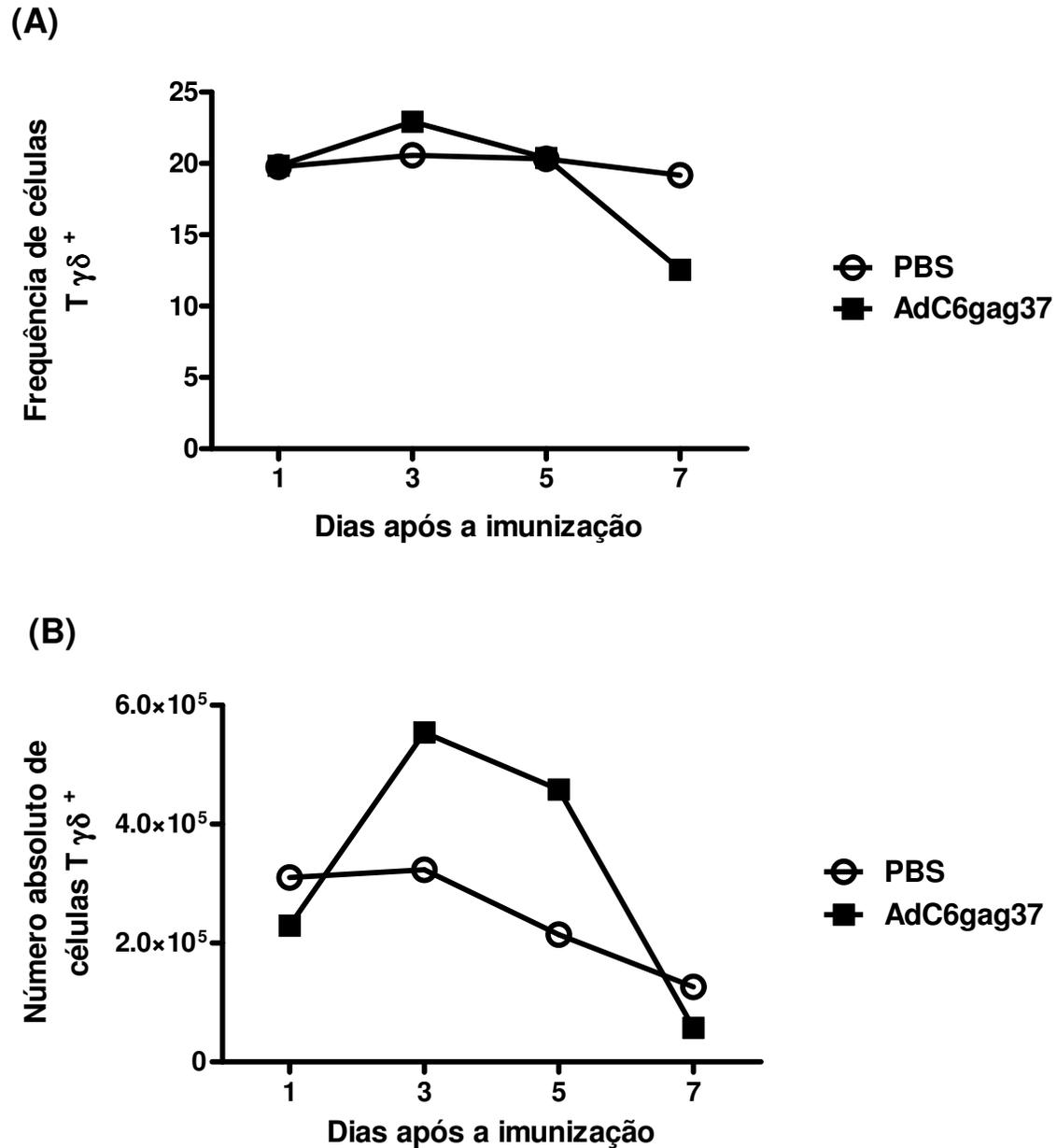


Figura 5. Cinética da frequência (A) e do número absoluto (B) de células T γ/δ do trato genital de camundongos BALB/c em diferentes dias após imunização com AdC6gag37. Camundongos BALB/c fêmeas receberam 3 mg de acetato de medroxiprogesterona subcutaneamente e cinco dias após foram imunizados com 10^{10} p.v. de AdC6gag37. Células do trato genital foram coletadas 1, 3, 5 e 7 dias após a imunização, marcadas com anticorpos anti-TCR γ/δ -PE e anti-CD3-PerCP e adquiridas em citômetro de fluxo. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes (4-5 animais por grupo/experimento).

4.3 Avaliação da ativação de células T γ/δ

Uma vez que a utilização da dose de 10^{10} partículas virais de AdC6gag37 induz um aumento na frequência e no número absoluto de células T γ/δ no trato genital três dias após a imunização, decidiu-se avaliar o grau de ativação dessas células através da análise da expressão dos marcadores CD25 e CD69. Para tanto, camundongos BALB/c fêmeas foram inoculadas com 10^{10} p.v. de AdC6gag37 através da via intravaginal cinco dias após receberem 3 mg de progesterona. Três dias após a imunização os animais foram sacrificados e as células do trato genital foram coletadas para análise em citômetro de fluxo.

Células de linhagem linfóide e mielóide expressam a molécula CD69 rapidamente sob ativação, portanto a presença deste marcador nas células T γ/δ após a imunização com AdC6gag37 fornece informações sobre o fenótipo destas células. Como demonstrado na Figura 6A, células T γ/δ provenientes dos animais imunizados com AdC6gag37 apresentaram um aumento na expressão do marcador CD69. Entretanto a expressão de CD25 se mostrou inalterada nessas condições (Figura 6B). Esses resultados sugerem que AdC6gag37 induz ativação de células T γ/δ do trato genital.

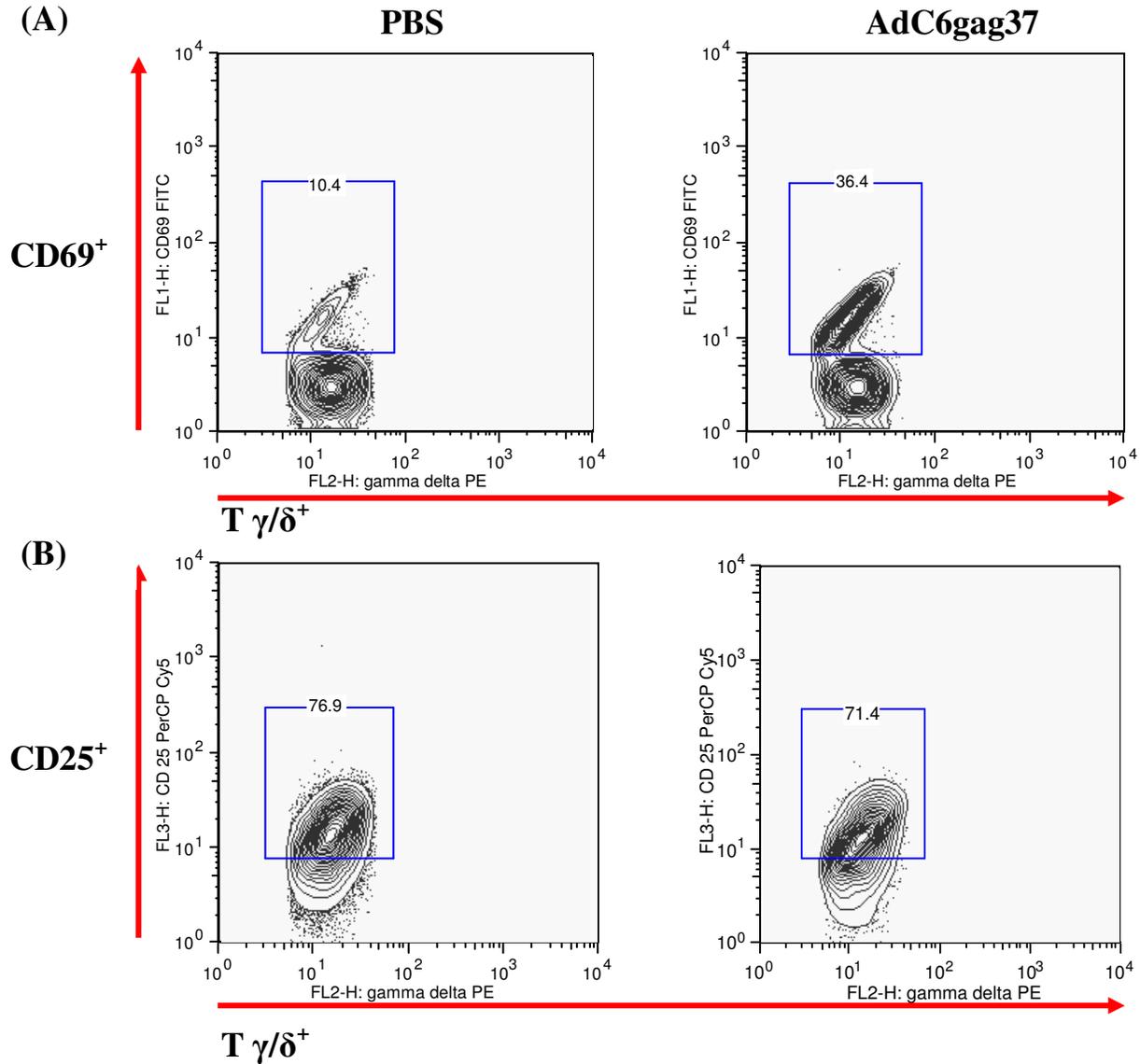


Figura 6. Expressão de CD69 (A) e CD25 (B) em células T γ/δ do trato genital após imunização intravaginal com AdC6gag37. Camundongos BALB/c fêmeas receberam 3 mg de acetato de medroxiprogesterona subcutaneamente e cinco dias após foram imunizados com 10^{10} p.v. de AdC6gag37 pela via intravaginal. Células do trato genital foram coletadas três dias após a imunização e células T γ/δ foram isoladas através de seleção positiva com partículas magnéticas. Posteriormente, as células foram marcadas com os anticorpos anti-CD69-FITC, anti-TCR γ/δ -PE e anti-CD25-PerCP-Cy5 e adquiridas em citômetro de fluxo. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes (10-15 animais por grupo/experimento).

4.4 Perfil de expressão gênica de células T γ/δ do trato genital após imunização com AdC6gag37

Para investigar se o aumento observado no número de células T γ/δ após imunização com o vetor vacinal, bem como seu fenótipo ativado, está relacionado com um aumento na produção de citocinas e quimiocinas, células T γ/δ do trato genital foram isoladas através de seleção positiva com partículas magnéticas e a expressão gênica foi analisada através da PCR em tempo real.

Observou-se que a imunização intravaginal com AdC6gag37 induziu um aumento na expressão de genes relacionados com mecanismos de citotoxicidade mediada por células, bem como genes de citocinas e quimiocinas. Como demonstrado na Figura 7, três dias após imunização com AdC6gag37, células T γ/δ presentes no trato genital apresentaram um aumento nos transcritos de perforina, granzima B, IL-6, IL-12, CXCL-10, CCL4, CCL5 e CCL3. Não foram detectadas alterações nos transcritos de IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α e IL-10 no tempo analisado.

Esses resultados sugerem que a imunização intravaginal com AdC6gag37 induz aumento na expressão de citocinas, quimiocinas e proteínas citotóxicas que podem estar envolvidas na resposta imune contra o vetor vacinal.

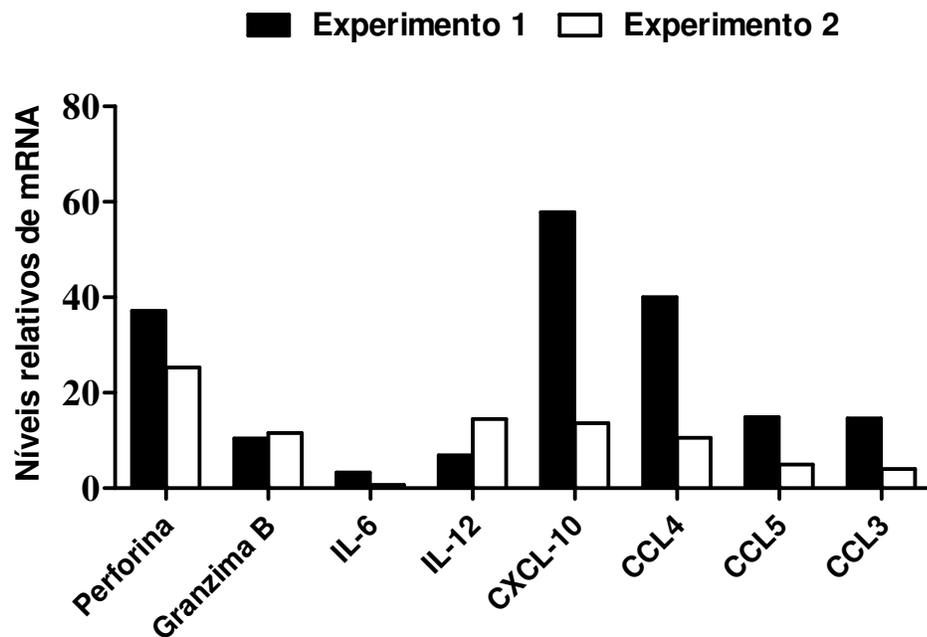


Figura 7. Perfil de expressão gênica de células T γ/δ do trato genital após a imunização com AdC6gag37. Camundongos BALB/c receberam 3 mg de progesterona e 5 dias após foram imunizados com AdC6gag37 através da via intravaginal. Três dias após a imunização os animais foram sacrificados e as células do trato genital foram coletadas e isoladas com partículas magnéticas. RNA total foi extraído e cDNA obtido através da reação de transcrição reversa a partir de 1 μ g de mRNA. A PCR em tempo real foi realizada em um StepOne Plus™ utilizando SYBR Green como repórter. Os níveis relativos de expressão gênica foram determinados pelo método limiar do ciclo comparativo (*Ct*) através do qual dados de cada amostra foram normalizados com o gene constitutivamente expresso 18S ribossomal. Resultados mostram dois experimentos independentes (20 animais por grupo/experimento).

4.5 Avaliação da frequência de células NK do trato genital e órgãos linfóides secundários após imunização com o vetor AdC6gag37

Com o intuito de investigar se a imunização com AdC6gag37 induz outras células da resposta imune inata, avaliou-se a frequência de células NK do trato genital e órgãos linfóides secundários após a exposição ao vetor adenoviral. Para isso, camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados com 10^5 , 10^7 e 10^9 p.v. de AdC6gag37 e sete dias após este procedimento os animais foram sacrificados e as células do trato genital, baço e linfonodos ilíacos foram coletadas

e marcadas com os anticorpos anti-CD4-FITC, anti-CD49b/Pan NK-PE (DX5) e anti-CD8-PerCP para aquisição em citômetro de fluxo.

No trato genital, detectou-se aumento de 103% e 115% na população de células NK quando os animais foram imunizados com as doses de 10^5 e 10^7 partículas virais de AdC6gag37, respectivamente (Figura 8). Além disso, como demonstrado na Figura 9, observou-se que o número absoluto de células NK do trato genital foi três vezes maior comparado ao grupo controle. O grupo que recebeu 10^5 p.v. de AdC6gag37 também demonstrou um aumento no número absoluto de células NK. Em contraste, os animais que receberam 10^9 p.v. não mostraram nenhuma alteração em relação à frequência de células NK (Figura 8) e ao número absoluto desta população celular (Figura 9).

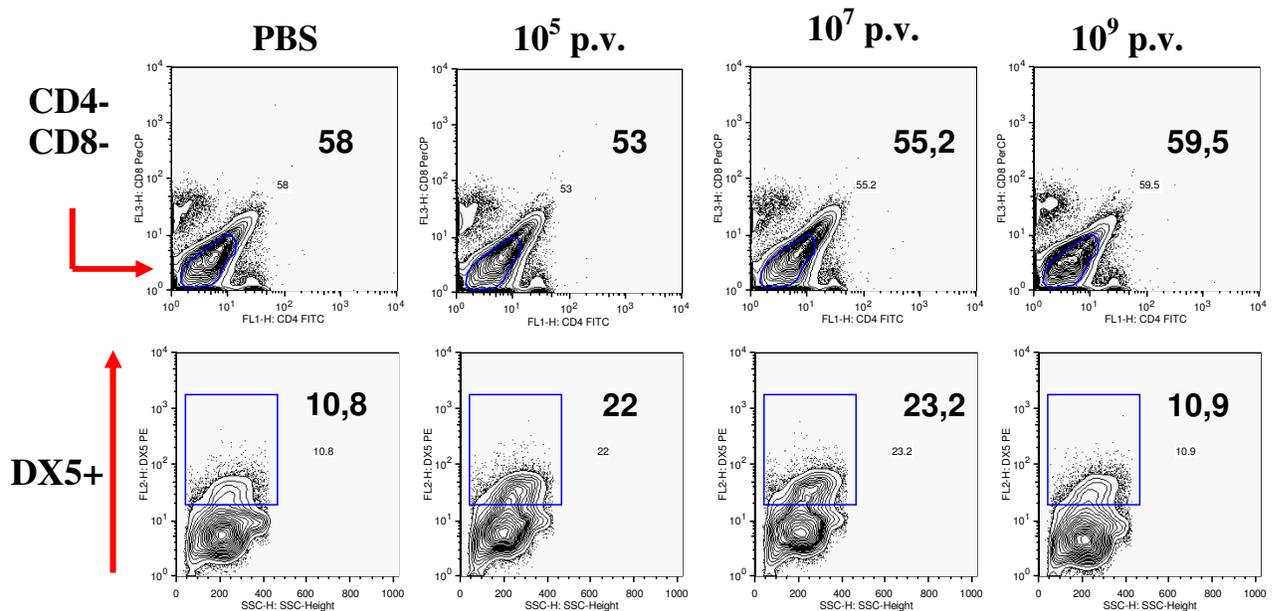


Figura 8. Frequência de células NK do trato genital após a imunização com diferentes doses de AdC6gag37. Camundongos BALB/c fêmeas receberam 3 mg de acetato de medroxiprogesterona subcutaneamente e cinco dias após foram imunizados com as doses indicadas de AdC6gag37. Células do trato genital foram coletadas sete dias após a imunização e marcadas com anticorpos anti-CD4-FITC, anti-CD49b/Pan NK-PE e anti-CD8-PerCP. Estes resultados são representativos de dois experimentos independentes (4-5 animais por grupo/experimento).

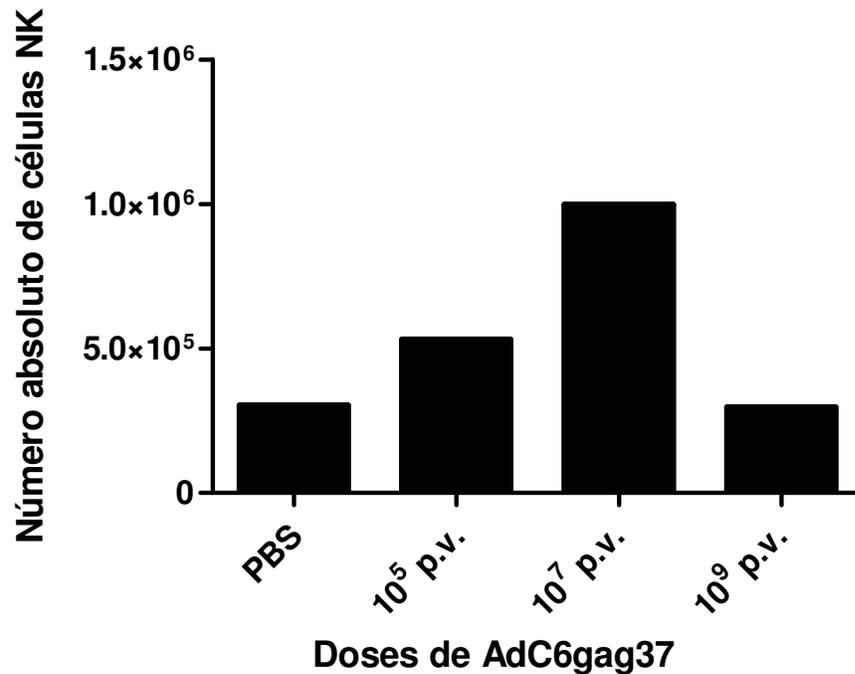


Figura 9. Número absoluto de células NK do trato genital após imunização intravaginal com diferentes doses de AdC6gag37. Camundongos BALB/c fêmeas receberam 3 mg de acetato de medroxiprogesterona subcutaneamente e cinco dias após foram imunizados com as doses indicadas de AdC6gag37. Células do trato genital foram coletadas sete dias após a imunização, marcadas com os anticorpos anti-CD4-FITC, anti-CD49b/Pan NK-PE e anti-CD8-PerCP e adquiridas em citômetro de fluxo. Estes resultados são representativos de dois experimentos independentes (4-5 animais por grupo/experimento).

A avaliação de células NK esplênicas mostrou que as doses de 10^7 e 10^9 p.v. de AdC6gag37 foram capazes de aumentar a frequência dessas células sete dias após a imunização (Figura 10). Entretanto, quando se imunizou os animais com 10^5 p.v. de AdC6gag37 não observou-se alterações na frequência de células NK esplênicas.

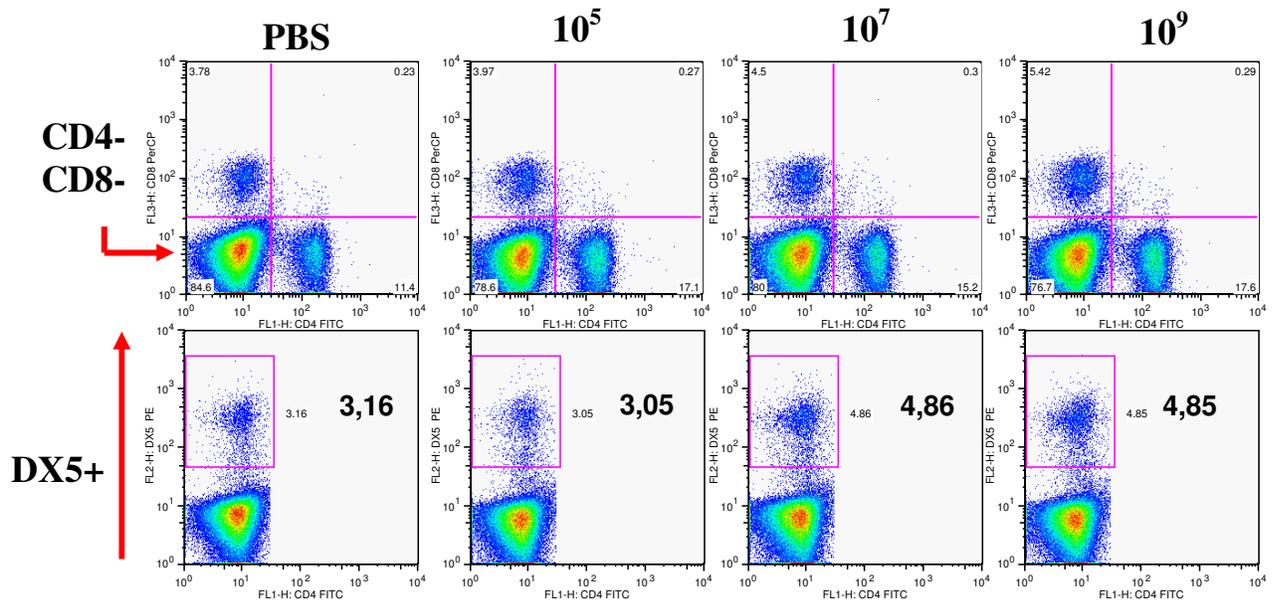


Figura 10. Frequência de células NK esplênicas após a imunização com diferentes doses de AdC6gag37. Camundongos BALB/c fêmeas receberam 3 mg de acetato de medroxiprogesterona subcutaneamente e cinco dias após foram imunizados com as doses indicadas de AdC6gag37. Células do baço foram coletadas sete dias após a imunização e marcadas com anticorpos anti-CD4-FITC, anti-CD49b/Pan NK-PE e anti-CD8-PerCP. Estes resultados são representativos de dois experimentos independentes (4-5 animais por grupo/experimento).

Nos linfonodos ilíacos não foram detectadas alterações na frequência de células NK em quaisquer doses administradas. O número absoluto de células NK do baço e dos linfonodos ilíacos mostraram-se semelhantes ao grupo controle em todas as doses de Adc6gag37 administradas (dados não mostrados).

Em resumo, a avaliação do ensaio de dose-resposta de células NK do trato genital sete dias após a imunização mostrou que as doses de 10^5 e 10^7 partículas virais de AdC6gag37 foram capazes de induzir aumento na frequência e no número absoluto dessas células enquanto no baço houve aumento apenas na frequência de células NK dos animais imunizados com 10^7 e 10^9 partículas virais de AdC6gag37. Nenhuma alteração foi encontrada na população de células NK dos linfonodos ilíacos. Estes resultados em conjunto sugerem que AdC6gag37 é capaz de

modular a frequência de células da imunidade inata, como células T γ/δ e células NK, no trato genital de camundongos.

5. DISCUSSÃO

Estratégias vacinais utilizando vetores recombinantes têm demonstrado sucesso na indução de resposta imune celular adaptativa contra inúmeras doenças, especialmente com a utilização de Ad humano recombinante. No entanto, infecções ocasionadas por Ad são frequentes na infância e grande parcela da população humana possui anticorpos neutralizantes contra este vetor, reduzindo assim sua imunogenicidade. Ad humano sorotipo 5 foi selecionado pela Merck & Co. Inc. para o desenvolvimento de uma vacina contra AIDS com base na comparação de diversos vetores (SHIVER et al., 2002; SHIVER; EMINI, 2004). Entretanto, em setembro de 2007, o ensaio clínico de fase II denominado HIV Vaccine Trials Network 502, também conhecido como STEP, foi abruptamente encerrado devido ao insucesso em seus resultados preliminares, visto que a vacina não foi capaz de evitar a infecção causada pelo HIV ou afetar o curso da doença nas pessoas que se tornaram infectadas (NIAID, 2007). Informações têm sugerido que a resposta imune mediada por células T foram menores em indivíduos que apresentaram imunidade pré-existente ao vetor (BAROUCH, 2008). Uma alternativa para superar essa limitação da imunidade pré-existente e manter as vantagens dos adenovírus recombinantes como vacinas tem sido o desenvolvimento de Ad outras espécies animais, tal como o Ad isolado de chimpanzés do sorotipo 6, denominado AdC6.

Inúmeros patógenos são transmitidos por vias de mucosas. Apesar disso, a maioria das vacinas licenciadas é para administração parenteral. Isso se deve provavelmente ao nosso conhecimento limitado sobre o sistema imune de mucosas, comparado ao sistema imune periférico, e também por questões práticas, visto que administração parenteral de antígenos gera

resposta de anticorpos e linfócitos que podem ser facilmente mensuradas no sangue, enquanto que a avaliação da resposta imune de mucosas necessita de técnicas mais complexas e laboriosas (NEUTRA; KOZLOWSKI, 2006). Como consequência deste fato, poucas vacinas de mucosas tem sido aprovadas para uso humano, incluindo vacina oral contra poliomielite (MODLIN, 2004), *Salmonella typhi* (LEVINE, 2000), *Vibrio cholerae* (LEVINE, 2000), rotavírus (KAPIKIAN et al., 1996) e uma vacina nasal contra vírus influenza (BELSHE et al., 1998). Contudo, recentemente, pesquisas de vacinas de mucosas tem recebido maior atenção, estimuladas por novas informações sobre o sistema imune de mucosas e pela ameaça causada pelo HIV, que é transmitido principalmente por vias de mucosas (KOZLOWSKI; NEUTRA, 2003; BELYAKOV; BERZOFSKY, 2004).

Resposta imune de mucosas é eficientemente induzida quando se faz administração do antígeno diretamente nas superfícies de mucosas, enquanto vacinas administradas parenteralmente são pobres indutoras de resposta imune nos tecidos mucosos (LAMM, 1997; LEVINE, 2000). Resposta imune mediada por células T nas mucosas foram demonstradas após imunização oral, nasal, retal ou vaginal (KLAVINSKIS et al., 1996; STAATS et al., 2001). Acredita-se que a obtenção de imunidade protetora contra HIV deva ser induzida através de imunizações locais, ou seja, pelas vias retal e vaginal (LEHNER, 2003).

Como demonstrado previamente por de Souza e colaboradores, a imunização de camundongos com AdC6gag37 através da via intravaginal ou intranasal foi capaz de induzir resposta imune mediada por células T CD8⁺ específicas e essa resposta foi aumentada substancialmente por reforço homólogo através de vias de mucosas (de SOUZA et al., 2007). Neste estudo detectou-se também um aumento de células T γ/δ em mucosas do trato genital após imunização. Vetores adenovirais deletados da região E1 são altamente imunogênicos e ativam resposta imune inata *in vivo* (SCHNELL et al., 2001; ZHANG et al., 2001; MURUVE, 2004;

MURUVE et al., 2004). Essa resposta é dose-dependente, está relacionada com a via de administração e ocorre precocemente em resposta às proteínas do capsídeo viral (ST GEORGE, 2003; BESSIS; GARCIACOZAR; BOISSIER, 2004).

No presente estudo foi realizado ensaio de dose-resposta no qual avaliou-se a frequência e o número absoluto de células T γ/δ e células NK induzidas por AdC6gag37. Análises da frequência de células T γ/δ no trato genital demonstraram que 10^{10} partículas virais de AdC6gag37, a maior dose utilizada neste trabalho, foi a única dose capaz de induzir aumento na porcentagem dessas células (Figura 2). Interessantemente, a frequência de células NK esplênicas e do trato genital não apresentaram a mesma tendência de aumento, uma vez que no trato genital ocorreu expressiva indução de resposta com 10^5 e 10^7 partículas virais (Figura 8) e no baço as doses capazes de aumentar esses parâmetros foram de 10^7 e 10^9 partículas virais (Figura 10). Diversos testes clínicos e pré-clínicos têm demonstrado que a resposta imune inata do hospedeiro contra Ad é dose-dependente (CRYSTAL et al., 1994; YEI et al., 1994; MCCOY et al., 1995; WORGALL et al., 1997; MURUVE et al., 1999; ZHANG et al., 2001; RAPER et al., 2003). Estudos *in vitro* com células mononucleares do sangue periférico estimuladas com vetores adenovirais demonstraram que produção de citocinas induzidas pelo vetor é dose-dependente até uma dose limiar, acima da qual não ocorre mais aumento da produção de citocinas (HIDAKA et al., 1999; LIU et al., 2001; HIGGINBOTHAM et al., 2002). Acredita-se que este efeito *plateau* seja devido à saturação de receptores necessários para o início do processo infeccioso dos Ad. Sendo assim, aumentar a dose do vetor adenoviral, quando essa resposta atingir um *plateau*, não implicaria no aumento da expressão do transgene visto que esses receptores não estariam disponíveis e quantidade de partículas virais que seriam internalizados seria sempre a mesma. Apesar destes trabalhos demonstrarem a dose-dependência induzida por vetores adenovirais, no presente estudo, quando analisou-se a frequência de células NK, este perfil de resposta não foi

observado, posto que no trato genital a maior dose administrada apresentou decréscimo em relação as demais doses.

O presente estudo demonstrou que imunização com AdC6gag37 através da via intravaginal foi capaz de induzir aumento na frequência e no número de células T γ/δ no trato genital (Figuras 2 e 5). Nos linfonodos ilíacos, provável órgão linfóide que drena a região do trato genital não houve alteração na frequência ou número dessas células (Figura 4), sugerindo que este aumento no trato genital ocorreu devido à expansão clonal de células T γ/δ residentes na mucosa vaginal. Estes resultados são corroborados por RAKASZ e colaboradores que demonstraram aumento de células T γ/δ no trato genital de camundongos quando imunizados com o vírus do herpes simples através da via intravaginal. Este aumento foi detectado quatro dias após a imunização (RAKASZ et al., 1999). Embora em modelos de imunização intravaginal com Ad e vírus do herpes simples tenham demonstrado aumento de células T γ/δ , este perfil de resposta não foi encontrado em camundongos infectados experimentalmente com *Candida albicans* (FIDEL et al., 1999), sugerindo que a resposta induzida pela imunização intravaginal é dependente do antígeno. Em outro estudo, em modelo de camundongos infectados com *Yersinia pseudotuberculosis*, foi demonstrado um aumento de células T γ/δ em mucosas intestinais devido a expansão clonal, uma vez que essas células não apresentaram componentes intracelulares e extracelulares requeridos para re-circulação periférica após infecção (FAHRER et al., 2001).

Assim, como observado nas células T γ/δ do trato genital, a frequência de células NK após imunização intravaginal com AdC6gag37 mostrou que a resposta dessas células parece estar relacionada com a via de administração, pois detectou-se um aumento de células NK no trato genital dos animais imunizados com o vetor adenoviral (Figura 8 e 9), e uma leve alteração na frequência dessas células no baço (Figura 10) e nenhuma nos linfonodos ilíacos (dados não mostrados). Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Ruzek e colaboradores após

avaliação da resposta de células NK esplênicas em camundongos imunizados com vetores adenovirais. Este estudo mostrou proeminente indução de células NK após administração intravenosa do vetor (RUZEK et al., 2002). Entretanto, administração desses vetores através de outras vias de imunização, tais como subcutânea, intraperitoneal e intradérmica demonstrou menor indução de células NK esplênicas quando comparada a imunização sistêmica.

A avaliação de marcadores de ativação realizada no presente trabalho demonstrou que o grau de ativação de células T γ/δ provenientes de camundongos imunizados com o vetor adenoviral é consideravelmente maior que o grupo controle (Figura 6), sugerindo que AdC6gag37 induz ativação destas células. Esta avaliação foi realizada através da marcação de antígenos de superfície CD69 e CD25.

A molécula CD69 é um antígeno de diferenciação expresso rapidamente após ativação de linfócitos T e B e outras células de origem hematopoiéticas, incluindo células NK (TESTI et al., 1994). Uma vez expresso em linfócitos T, CD69 atua como uma molécula co-estimulatória induzindo a ativação e proliferação celular. Estudos *in vivo* em modelo murino de infecção intranasal com vetores adenovirais demonstraram expressão aumentada de CD69 em linfócitos T α/β (STAMPFLI et al., 1998; STAMPFLI et al., 1999). O perfil de expressão da molécula CD69 destes estudos foi semelhante ao presente trabalho, sugerindo que AdC6gag37 é capaz de induzir ativação das células T γ/δ . Outra observação importante descrita por Sanches-Mateos e Testi e colaboradores é a expressão constitutiva de CD69 em células residentes de tecidos linfóides (SANCHEZ-MATEOS et al., 1989; TESTI et al., 1994). Demonstrou-se no presente trabalho que células T γ/δ presentes no trato genital de camundongos do grupo controle apresentaram expressão basal deste marcador (Figura 6A), sugerindo que essas células residentes das mucosas do trato genital apresentam padrão de expressão da molécula CD69 semelhante aos resultados obtidos com células de tecidos linfóides.

Outro marcador de ativação selecionado para este estudo foi a molécula CD25. Esta molécula consiste na subunidade α do receptor da interleucina 2 (IL-2) e aumento de sua expressão é induzida através da produção de IL-2 (MALEK, 2008). Observou-se no presente trabalho que expressão de CD25 em células T γ/δ das mucosas do trato genital após imunização não apresentou alterações consideráveis em relação com o grupo controle (Figura 6B). Como as análises foram realizadas três dias após a imunização, é possível que alterações na expressão dessa molécula tenha ocorrido anteriormente a análise, visto que o pico de expressão de IL-2 *in vivo* ocorre entre 5-6 horas após o estímulo com antígeno, depois decresce e não é mais detectável após aproximadamente 16 horas (SOJKA et al., 2004).

A habilidade das células da imunidade inata para detectar patógenos é crucial para ativar vias de sinalização que resultam na expressão de genes relacionados a citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que atuarão na resposta imune contra a infecção. Diversos grupos têm demonstrado que resposta imune inata contra adenovírus é mediada por vias dependentes e independentes de receptores tipo *Toll* (HENSLEY et al., 2005; BASNER-TSCHAKARJAN et al., 2006; CERULLO et al., 2007; HARTMAN et al., 2007; IACOBELLI-MARTINEZ; NEMEROW, 2007; NOCIARI et al., 2007; ZHU; HUANG; YANG, 2007). A eliminação destes vírus é mediada por células dendríticas via TLR9-MyD88, levando à produção de interferons tipo I (BASNER-TSCHAKARJAN et al., 2006; ZHU; HUANG; YANG, 2007). Entretanto, os mecanismos que suportam este envolvimento específico da célula via TLR9-MyD88 na eliminação dos adenovírus permanecem obscuros.

Demonstrou-se no presente trabalho que AdC6gag37 é capaz de induzir células T γ/δ presentes no trato genital a expressar genes relacionados com mecanismos de citotoxicidade mediado por células, assim como citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Três dias após a imunização com o vetor adenoviral, essas células mostraram um aumento relevante nos

transcritos de perforina CXCL-10 e CCL4 (Figura 7). Detectou-se também aumento na expressão de genes de granzima B, IL-6, IL-12, CCL5 e CCL3 (Figura 7).

O padrão de expressão gênica observado sugere que células T γ/δ apresentam características de células efetoras visto que, através da expressão de perforina e granzima B, essas células podem mediar a morte de células infectadas, assim como células T CD8⁺ e células NK. Fahrer e colaboradores, já citados neste trabalho, mostraram que células T γ/δ de mucosas intestinais de camundongos expressam granzima A, B e outros mediadores citotóxicos após infecção com *Y. pseudotuberculosis* (FAHRER et al., 2001). Adicionalmente, citotoxicidade de células T γ/δ mediada por Fas/FasL tem sido demonstrada por diversos estudos (FAHRER et al., 2001; HUBER; SHI; BUDD, 2002; PONOMAREV; DITTEL, 2005; AJUEBOR et al., 2008).

Expressão de IL-6 é descrita em diversos estudos em resposta a vetores adenovirais (ZSENGELLER et al., 2000; SCHNELL et al., 2001; ZHANG et al., 2001; HIGGINBOTHAM et al., 2002). IL-6 é uma citocina pleiotrópica que apresenta múltiplos efeitos em diferentes linhagens celulares (TAGA; KISHIMOTO, 1997). A função biológica da IL-6 na indução da expressão de várias proteínas da fase aguda é uma característica desejável para o desenvolvimento de vacinas. Além disso, esta citocina induz produção de imunoglobulinas em células B ativadas. A presença de transcritos de IL-6 neste presente trabalho, embora detectável, mostrou-se pouco relevante (Figura 7). Na maioria dos estudos realizados com vetores adenovirais, a detecção de IL-6 foi demonstrada poucas horas após a imunização ou estimulação de células. Neste estudo, as análises da expressão de citocinas de células T γ/δ foram realizadas três dias após imunização.

Análises da expressão de citocinas pró-inflamatórias deste trabalho mostraram ainda expressão da subunidade p40 da IL-12 (Figura 7). O desenvolvimento da função efetora e da expansão clonal de células T citotóxicas exigem que uma célula T encontre um antígeno

específico e durante esse reconhecimento é necessário a interação de moléculas co-estimulatórias, mas para o estabelecimento de ótima resposta dessas células é necessário ainda um terceiro tipo de sinal, que pode ser derivado de IL-12 ou de sinais inflamatórios fornecidos por ligantes de tipo *Toll* e IFN tipo I (WILLIAMS; BEVAN, 2007). Belyakov e colaboradores demonstraram em modelo de imunização por vias de mucosa que a indução de linfócitos T citotóxicos é dependente de IL-12 (BELYAKOV et al., 1998). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado que IL-12 promove proliferação de células T CD8⁺ ativadas durante resposta imune e atua no desenvolvimento da citotoxicidade bem como na produção de IFN- γ (CURTSINGER et al., 1999; SCHMIDT; MESCHER, 1999). Por outro lado, células estimuladas na ausência de IL-12 não são capazes de expressar granzima B e não apresentam função citotóxica (CURTSINGER; LINS; MESCHER, 2003).

No presente trabalho foi possível detectar aumento da expressão das quimiocinas CXCL10, CCL5, CCL3 e CCL4 após imunização com AdC6gag37 (Figura 7). Quimiocinas compõem um sofisticado sistema de comunicação usado por todos os tipos celulares, incluindo células do sistema imune (ROT; VON ANDRIAN, 2004). Elas estão envolvidas no recrutamento e ativação de neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos para o local de dano tecidual ou infecção (BORGLAND et al., 2000).

Diversos autores tem demonstrado que vetores adenovirais são capazes de induzir CXCL-10, uma quimiocina de 10 kDa também conhecida por proteína induzida por IFN- γ (IP-10) (OTAKE et al., 1998; MURUVE et al., 1999; BORGLAND et al., 2000; ZENG et al., 2005). CXCL-10 é constitutivamente expressa em baixos níveis no timo, baço e linfonodos (GATTASS et al., 1994). No entanto, esta quimiocina pode ser altamente induzida em uma variedade de células tais como, células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos, células mesangiais, monócitos e neutrófilos por estimulação com IFN- α , IFN- β e IFN- γ ou por LPS e em células T através de exposição a

antígenos (LUSTER; RAVETCH, 1987; OHMORI; HAMILTON, 1990; VANGURI; FARBER, 1990). CXCL-10 direciona a migração e estimula a adesão de células T e células NK ativadas através da ligação e ativação de CXCR3, seu receptor, que é expresso preferencialmente em linfócitos T fenótipo Th1 (DUFOR et al., 2002). CXCL-10 e CXCR3 tem sido associados em resposta imune Th1 em diversos trabalhos, um achado consistente com a quimiotaxia preferencial de linfócitos Th1 ativados por CXCL-10 (BONECCHI et al., 1998; WARD; BACON; WESTWICK, 1998; ANNUNZIATO et al., 1999). O envolvimento de CXCL-10 e seu receptor CXCR3 com respostas imune Th1 sugere que indução de CXCL10 por AdC6gag37 representa um importante passo para o desenvolvimento de vacinas para estimulação de resposta imune mediada por células T.

Detectou-se no presente estudo, aumento da expressão das quimiocinas CCL5, CCL3 e CCL4 em células T γ/δ das mucosas do trato genital (Figura 7). Estes resultados são corroborados por Fahrer e colaboradores que demonstraram a expressão dessas quimiocinas em células T γ/δ provenientes da mucosa intestinal de camundongos após infecção com *Y. pseudotuberculosis* (FAHRER et al., 2001). Além disso, diversos estudos têm demonstrado que Ad são capazes de estimular CCL5, CCL3 e CCL4 (ZSENGELLER et al., 2000; BURSILL et al., 2003; TAMANINI et al., 2006; YOON et al., 2007). A expressão dessas quimiocinas é extremamente importante para o desenvolvimento da imunidade adaptativa, visto que elas estão envolvidas no recrutamento e maturação de células T, células dendríticas, neutrófilos e células NK para o local da infecção ou dano tecidual (FERNANDEZ; LOLIS, 2002; ZENG et al., 2003).

Diversos modelos de infecções virais têm demonstrado que células T γ/δ ativadas são capazes de produzir IFN- γ para modular a resposta inflamatória (SELIN et al., 2001; YIN et al., 2002; WANG et al., 2003; PONOMAREV et al., 2004; NANNO et al., 2007), contudo neste estudo não detectou-se expressão desta citocina. Adicionalmente, transcritos de TNF- α , IFN- α , IFN- β e

IL-10 não foram detectados neste trabalho. Talvez a cinética de expressão dessas citocinas ocorra de maneira diferente das demais detectadas, explicando assim a ausência de detecção dos referidos transcritos.

Além do papel das células T γ/δ na resposta imune inata contra Ad, essas células também estão envolvidas na proteção das mucosas (CARDING et al., 1990; BOISMENU; HAVRAN, 1997). Células T γ/δ são capazes de mediar a morte de células infectadas por HIV ou SIV (MALKOVSKY et al., 1992; WALLACE et al., 1996). Em tecidos de mucosas, como o trato genital feminino, o HIV inicia o processo de infecção através de células epiteliais ou de células dendríticas, mesmo na ausência de trauma, onde células epiteliais permitem que o vírus atravesse para a mucosa por transcitose. As partículas virais são internalizadas por células epiteliais em estruturas semelhantes a endossomos, podendo desta forma cruzar a mucosa epitelial e infectar células mononucleares presentes na lâmina própria. A transmissão e disseminação do HIV ocorre através de células dendríticas, que podem transmitir os vírus para as células T $CD4^+ CCR5^+$ (BOMSEL, 1997; MCDONALD et al., 2003). Em modelo de infecção intravaginal de macacos com SIV, realizado com a finalidade de determinar a relação da resposta de células T $CD8^+$ específicas com a cinética e magnitude da infecção notou-se um retardamento na geração dessa resposta, que pode ser responsável pela falha na contenção da infecção pelo vírus (REYNOLDS et al., 2005). Uma resposta precoce nestes locais poderia limitar a replicação e a disseminação viral, permitindo tempo suficiente para a imunidade adaptativa montar uma resposta protetora efetiva. Um estudo demonstrou aumento significativo de células T γ/δ nas mucosas retal e linfonodos ilíacos após imunização com gp120 e p27 por via retal em macacos desafiados com SIV (LEHNER et al., 2000). Análises dos mecanismos de proteção dessas células revelaram que linfócitos T γ/δ são capazes de gerar fatores antivirais, tais como RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , CCL5, CCL3 e CCL4 que podem prevenir infecção por SIV, visto que essas quimiocinas ligam-

se aos co-receptores primários utilizados pelo vírus, bloqueando assim sua entrada na célula hospedeira (LEHNER et al., 2000). Além disso, em humanos infectados com HIV, o subgrupo V δ 1 de células T γ/δ é super expresso com ou sem expressão aumentada dos subgrupos V γ 9, V γ 2-V γ 4 (AUTRAN et al., 1989; DE PAOLI et al., 1991; DE MARIA et al., 1992; HINZ et al., 1994; BOULLIER et al., 1995).

Como demonstrado neste trabalho, Ad6gag37 induz uma variedade de respostas nas células T γ/δ que podem atuar como células efetoras ou que são capazes de produzir citocinas e quimiocinas que atuam no recrutamento de outras células efetoras para o local da infecção. Além de células como neutrófilos, monócitos e células T, o recrutamento e ativação de células dendríticas para o local da infecção é crucial para o desenvolvimento de uma ótima resposta imune adaptativa. Ajuebor e colaboradores mostraram que camundongos *knockout* de células T γ/δ foram associados com diminuição significativa (41% de redução) de células T CD8⁺ no fígado após administração de vetores adenovirais (AJUEBOR et al., 2008).

Atualmente, não existem vacinas efetivas contra agentes infecciosos do trato reprodutivo feminino humano, com exceção do vírus da hepatite B e do vírus do papiloma humano. Deparando-se com a incidência mundial de doenças sexualmente transmissíveis, tais como infecções causadas pelo HIV, HSV e *Chlamydia trachomatis*, vacinas que previnam doenças nestes sítios mucosos são necessárias. O desenvolvimento de memória imunológica é fundamental para proteção contra futuras exposições ao agente infeccioso, portanto, para que uma vacina possa ser eficaz é necessário que ela induza resposta imune celular adaptativa. Por sua vez, esta resposta somente é alcançada através da atuação de células e moléculas da resposta imune inata. Deste modo, como demonstrado neste estudo, vetores adenovirais podem ter particular significância para o desenvolvimento de futuras estratégias vacinais contra agentes infecciosos transmitidos por vias de mucosas, visto que este vetor vacinal é capaz de induzir

células da imunidade inata nestes compartimentos. Assim, os resultados obtidos neste estudo juntamente aos dados já existentes na literatura podem direcionar o desenvolvimento de vacinas que podem ser administradas em sítios de mucosas.

6. CONCLUSÕES

- A dose de 10^{10} partículas virais é a melhor dose de AdC6gag37 na indução de células T γ/δ no trato genital três dias após imunização;
- A imunização com AdC6gag37 induz um aumento relevante de células T γ/δ no terceiro dia após a imunização, havendo um decréscimo no sétimo dia.
- O vetor adenoviral não foi capaz de induzir resposta de células T γ/δ no baço e linfonodos ilíacos nos diferentes tempos analisados;
- As doses de 10^5 e 10^7 partículas virais de AdC6gag37 foram as melhores doses para induzir aumento na frequência e no número de células NK no trato genital sete dias após a imunização intravaginal;
- 10^7 e 10^9 partículas virais de Ad6gag37 foram capazes de induzir aumento na frequência de células NK no baço sete dias após imunização intravaginal;
- AdC6gag37 não induziu células NK nos linfonodos ilíacos nos tempos analisados;
- O vetor adenoviral induz aumento na expressão do marcador de ativação CD69 em células T γ/δ três dias após imunização intravaginal;
- Células T γ/δ do trato genital de camundongos não demonstraram alteração na expressão do marcador de ativação CD25 em relação ao grupo controle no tempo analisado;
- Células T γ/δ do trato genital de camundongos imunizados com AdC6gag37 apresentaram aumento na transcrição de genes de perforina, granzima B, IL-6, IL-12p40, CXCL-10, CCL5, CCL3 e CCL4.

- Não foi possível detectar transcritos das citocinas IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α e IL-10 nas células T γ/δ do trato genital de camundongos imunizados com AdC6gag37 no tempo analisado.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar a cinética de células T α/β do trato genital de camundongos imunizados por via intravaginal com AdC6gag37 a fim de correlacionar com a resposta de células T γ/δ .
- Realizar ensaio de estimulação *ex vivo* de células T γ/δ com AdC6gag37 para analisar expressão intracelular de IFN- γ .
- Avaliar expressão de citocinas e quimiocinas em diferentes tempos após a imunização intravaginal com AdC6gag37.
- Analisar expressão de citocinas e quimiocinas de células T γ/δ do trato genital de camundongos após imunização intravaginal com AdC6gag37 inativado por luz ultra violeta para elucidar se esta resposta é direcionada contra as proteínas do capsídeo viral.
- Realizar cinética da resposta de células NK do trato genital de camundongos imunizados com AdC6gag37.
- Avaliar expressão de IFN- γ intracelular de células NK estimuladas com AdC6gag37.
- Avaliar expressão de moléculas de adesão de células T γ/δ e células NK após imunização intravaginal com AdC6gag37.
- Realizar estudo de depleção de células T γ/δ e células NK para avaliar resposta de células T α/β .
- Investigar o papel de macrófagos células dendríticas neste modelo.

REFERÊNCIAS

ABBINK, P.; LEMCKERT, A. A.; EWALD, B. A.; LYNCH, D. M.; DENHOLTZ, M.; SMITS, S.; HOLTERMAN, L.; DAMEN, I.; VOGELS, R.; THORNER, A. R.; O'BRIEN, K. L.; CARVILLE, A.; MANSFIELD, K. G.; GOUDSMIT, J.; HAVENGA, M. J.; BAROUCH, D. H. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. **J Virol**, v. 81, n. 9, p. 4654-63, 2007.

ABE, S.; OKUDA, K.; URA, T.; KONDO, A.; YOSHIDA, A.; YOSHIZAKI, S.; MIZUGUCHI, H.; KLINMAN, D.; SHIMADA, M. Adenovirus type 5 with modified hexons induces robust transgene-specific immune responses in mice with pre-existing immunity against adenovirus type 5. **J Gene Med**, v. 11, n. 7, p. 570-9, 2009.

ABEL, K.; COMPTON, L.; ROURKE, T.; MONTEFIORI, D.; LU, D.; ROTHAEUSLER, K.; FRITTS, L.; BOST, K.; MILLER, C. J. Simian-human immunodeficiency virus SHIV89.6-induced protection against intravaginal challenge with pathogenic SIVmac239 is independent of the route of immunization and is associated with a combination of cytotoxic T-lymphocyte and alpha interferon responses. **J Virol**, v. 77, n. 5, p. 3099-118, 2003.

ADA, G. Vaccines and vaccination. **N Engl J Med**, v. 345, n. 14, p. 1042-53, 2001.

AJUEBOR, M. N.; JIN, Y.; GREMILLION, G. L.; STRIETER, R. M.; CHEN, Q.; ADEGBOYEGA, P. A. Gammadelta T cells initiate acute inflammation and injury in adenovirus-infected liver via cytokine-chemokine cross talk. **J Virol**, v. 82, n. 19, p. 9564-76, 2008.

ALLISON, T. J.; GARBOCZI, D. N. Structure of gammadelta T cell receptors and their recognition of non-peptide antigens. **Mol Immunol**, v. 38, n. 14, p. 1051-61, 2002.

AMARA, R. R.; VILLINGER, F.; ALTMAN, J. D.; LYDY, S. L.; O'NEIL, S. P.; STAPRANS, S. I.; MONTEFIORI, D. C.; XU, Y.; HERNDON, J. G.; WYATT, L. S.; CANDIDO, M. A.; KOZYR, N. L.; EARL, P. L.; SMITH, J. M.; MA, H. L.; GRIMM, B. D.; HULSEY, M. L.; MILLER, J.; MCCLURE, H. M.; MCNICHOLL, J. M.; MOSS, B.; ROBINSON, H. L. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. **Science**, v. 292, n. 5514, p. 69-74, 2001.

ANNUNZIATO, F.; COSMI, L.; GALLI, G.; BELTRAME, C.; ROMAGNANI, P.; MANETTI, R.; ROMAGNANI, S.; MAGGI, E. Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo. **J Leukoc Biol**, v. 65, n. 5, p. 691-9, 1999.

ASHKAR, A. A.; ROSENTHAL, K. L. Interleukin-15 and natural killer and NKT cells play a critical role in innate protection against genital herpes simplex virus type 2 infection. **J Virol**, v. 77, n. 18, p. 10168-71, 2003.

AUTRAN, B.; TRIEBEL, F.; KATLAMA, C.; ROZENBAUM, W.; HERCEND, T.; DEBRE, P. T cell receptor gamma/delta+ lymphocyte subsets during HIV infection. **Clin Exp Immunol**, v. 75, n. 2, p. 206-10, 1989.

BAFICA, A.; FENG, C. G.; SANTIAGO, H. C.; ALIBERTI, J.; CHEEVER, A.; THOMAS, K. E.; TAYLOR, G. A.; VOGEL, S. N.; SHER, A. The IFN-inducible GTPase LRG47 (Irgm1) negatively regulates TLR4-triggered proinflammatory cytokine production and prevents endotoxemia. **J Immunol**, v. 179, n. 8, p. 5514-22, 2007.

BAFICA, A.; SCANGA, C. A.; SCHITO, M. L.; HIENY, S.; SHER, A. Cutting edge: in vivo induction of integrated HIV-1 expression by mycobacteria is critically dependent on Toll-like receptor 2. **J Immunol**, v. 171, n. 3, p. 1123-7, 2003.

BAGARAZZI, M. L.; BOYER, J. D.; JAVADIAN, M. A.; CHATTERGOON, M. A.; SHAH, A. R.; COHEN, A. D.; BENNETT, M. K.; CICCARELLI, R. B.; UGEN, K. E.; WEINER, D. B. Systemic and mucosal immunity is elicited after both intramuscular and intravaginal delivery of human immunodeficiency virus type 1 DNA plasmid vaccines to pregnant chimpanzees. **J Infect Dis**, v. 180, n. 4, p. 1351-5, 1999.

BANK, I.; DEPINHO, R. A.; BRENNER, M. B.; CASSIMERIS, J.; ALT, F. W.; CHESS, L. A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes. **Nature**, v. 322, n. 6075, p. 179-81, 1986.

BAROUCH, D. H. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. **Nature**, v. 455, n. 7213, p. 613-9, 2008.

BASNER-TSCHAKARJAN, E.; GAFFAL, E.; O'KEEFFE, M.; TORMO, D.; LIMMER, A.; WAGNER, H.; HOCHREIN, H.; TUTING, T. Adenovirus efficiently transduces plasmacytoid dendritic cells resulting in TLR9-dependent maturation and IFN-alpha production. **J Gene Med**, v. 8, n. 11, p. 1300-6, 2006.

BELSHE, R. B.; MENDELMAN, P. M.; TREANOR, J.; KING, J.; GRUBER, W. C.; PIEDRA, P.; BERNSTEIN, D. I.; HAYDEN, F. G.; KOTLOFF, K.; ZANGWILL, K.; IACUZIO, D.; WOLFF, M. The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children. **N Engl J Med**, v. 338, n. 20, p. 1405-12, 1998.

BELYAKOV, I. M.; BERZOFSKY, J. A. Immunobiology of mucosal HIV infection and the basis for development of a new generation of mucosal AIDS vaccines. **Immunity**, v. 20, n. 3, p. 247-53, 2004.

BELYAKOV, I. M.; DERBY, M. A.; AHLERS, J. D.; KELSALL, B. L.; EARL, P.; MOSS, B.; STROBER, W.; BERZOFSKY, J. A. Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 4, p. 1709-14, 1998.

BELYAKOV, I. M.; HEL, Z.; KELSALL, B.; KUZNETSOV, V. A.; AHLERS, J. D.; NACSA, J.; WATKINS, D. I.; ALLEN, T. M.; SETTE, A.; ALTMAN, J.; WOODWARD, R.; MARKHAM, P. D.; CLEMENTS, J. D.; FRANCHINI, G.; STROBER, W.; BERZOFSKY, J. A. Mucosal AIDS vaccine reduces disease and viral load in gut reservoir and blood after mucosal infection of macaques. **Nat Med**, v. 7, n. 12, p. 1320-6, 2001.

BERGELSON, J. M.; CUNNINGHAM, J. A.; DROGUETT, G.; KURT-JONES, E. A.; KRITHIVAS, A.; HONG, J. S.; HORWITZ, M. S.; CROWELL, R. L.; FINBERG, R. W. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. **Science**, v. 275, n. 5304, p. 1320-3, 1997.

BERZOFSKY, J. A.; AHLERS, J. D.; BELYAKOV, I. M. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 3, p. 209-19, 2001.

BESSIS, N.; GARCIACOZAR, F. J.; BOISSIER, M. C. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. **Gene Ther**, v. 11 Suppl 1S10-7, 2004.

BETT, A. J.; PREVEC, L.; GRAHAM, F. L. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. **J Virol**, v. 67, n. 10, p. 5911-21, 1993.

BIRON, C. A. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. **Curr Opin Immunol**, v. 9, n. 1, p. 24-34, 1997.

BIRON, C. A.; NGUYEN, K. B.; PIEN, G. C.; COUSENS, L. P.; SALAZAR-MATHER, T. P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. **Annu Rev Immunol**, v. 17189-220, 1999.

BLUMAN, E. M.; BARTYNSKI, K. J.; AVALOS, B. R.; CALIGIURI, M. A. Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. **J Clin Invest**, v. 97, n. 12, p. 2722-7, 1996.

BOGERS, W. M.; BERGMEIER, L. A.; MA, J.; OOSTERMEIJER, H.; WANG, Y.; KELLY, C. G.; TEN HAAFT, P.; SINGH, M.; HEENEY, J. L.; LEHNER, T. A novel HIV-CCR5 receptor vaccine strategy in the control of mucosal SIV/HIV infection. **AIDS**, v. 18, n. 1, p. 25-36, 2004.

BOISMENU, R.; HAVRAN, W. L. An innate view of gamma delta T cells. **Curr Opin Immunol**, v. 9, n. 1, p. 57-63, 1997.

BOMSEL, M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. **Nat Med**, v. 3, n. 1, p. 42-7, 1997.

BONECCHI, R.; BIANCHI, G.; BORDIGNON, P. P.; D'AMBROSIO, D.; LANG, R.; BORSATTI, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; GRAY, P. A.; MANTOVANI, A.; SINIGAGLIA, F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. **J Exp Med**, v. 187, n. 1, p. 129-34, 1998.

BORDIGNON, J.; PROBST, C. M.; MOSIMANN, A. L.; PAVONI, D. P.; STELLA, V.; BUCK, G. A.; SATPROEDPRAI, N.; FAWCETT, P.; ZANATA, S. M.; DE NORONHA, L.; KRIEGER, M. A.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. Expression profile of interferon stimulated genes in central nervous system of mice infected with dengue virus Type-1. **Virology**, v. 377, n. 2, p. 319-29, 2008.

BORGLAND, S. L.; BOWEN, G. P.; WONG, N. C.; LIBERMANN, T. A.; MURUVE, D. A. Adenovirus vector-induced expression of the C-X-C chemokine IP-10 is mediated through capsid-dependent activation of NF-kappaB. **J Virol**, v. 74, n. 9, p. 3941-7, 2000.

BORN, W.; CADY, C.; JONES-CARSON, J.; MUKASA, A.; LAHN, M.; O'BRIEN, R. Immunoregulatory functions of gamma delta T cells. **Adv Immunol**, v. 7177-144, 1999.

BOULLIER, S.; COCHET, M.; POCCIA, F.; GOUGEON, M. L. CDR3-independent gamma delta V delta 1+ T cell expansion in the peripheral blood of HIV-infected persons. **J Immunol**, v. 154, n. 3, p. 1418-31, 1995.

BRANDES, M.; WILLIMANN, K.; MOSER, B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. **Science**, v. 309, n. 5732, p. 264-8, 2005.

BRAVE, A.; LJUNGBERG, K.; WAHREN, B.; LIU, M. A. Vaccine delivery methods using viral vectors. **Mol Pharm**, v. 4, n. 1, p. 18-32, 2007.

BRENNER, M. B.; MCLEAN, J.; DIALYNAS, D. P.; STROMINGER, J. L.; SMITH, J. A.; OWEN, F. L.; SEIDMAN, J. G.; IP, S.; ROSEN, F.; KRANGEL, M. S. Identification of a putative second T-cell receptor. **Nature**, v. 322, n. 6075, p. 145-9, 1986.

BURSILL, C. A.; CAI, S.; CHANNON, K. M.; GREAVES, D. R. Adenoviral-mediated delivery of a viral chemokine binding protein blocks CC-chemokine activity in vitro and in vivo. **Immunobiology**, v. 207, n. 3, p. 187-96, 2003.

CARDING, S. R.; ALLAN, W.; KYES, S.; HAYDAY, A.; BOTTOMLY, K.; DOHERTY, P. C. Late dominance of the inflammatory process in murine influenza by gamma/delta + T cells. **J Exp Med**, v. 172, n. 4, p. 1225-31, 1990.

CARDING, S. R.; EGAN, P. J. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 5, p. 336-45, 2002.

CERULLO, V.; SEILER, M. P.; MANE, V.; BRUNETTI-PIERRI, N.; CLARKE, C.; BERTIN, T. K.; RODGERS, J. R.; LEE, B. Toll-like receptor 9 triggers an innate immune response to helper-dependent adenoviral vectors. **Mol Ther**, v. 15, n. 2, p. 378-85, 2007.

CHEN, P.; KOVESDI, I.; BRUDER, J. T. Effective repeat administration with adenovirus vectors to the muscle. **Gene Ther**, v. 7, n. 7, p. 587-95, 2000.

CHIEN, Y. H.; JORES, R.; CROWLEY, M. P. Recognition by gamma/delta T cells. **Annu Rev Immunol**, v. 14, p. 1451-32, 1996.

CHUNLING, M.; KUN, Y.; JIAN, X.; JIAN, Q.; HUA, S.; MINSHENG, Z. Enhanced induction of SARS-CoV nucleocapsid protein-specific immune response using DNA vaccination followed by adenovirus boosting in BALB/c mice. **Intervirology**, v. 49, n. 5, p. 307-18, 2006.

CRISPE, I. N.; MEHAL, W. Z. Strange brew: T cells in the liver. **Immunol Today**, v. 17, n. 11, p. 522-5, 1996.

CRYSTAL, R. G.; MCELVANEY, N. G.; ROSENFELD, M. A.; CHU, C. S.; MASTRANGELI, A.; HAY, J. G.; BRODY, S. L.; JAFFE, H. A.; EISSA, N. T.; DANIEL, C. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. **Nat Genet**, v. 8, n. 1, p. 42-51, 1994.

CURTSINGER, J. M.; LINS, D. C.; MESCHER, M. F. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. **J Exp Med**, v. 197, n. 9, p. 1141-51, 2003.

CURTSINGER, J. M.; SCHMIDT, C. S.; MONDINO, A.; LINS, D. C.; KEDL, R. M.; JENKINS, M. K.; MESCHER, M. F. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. **J Immunol**, v. 162, n. 6, p. 3256-62, 1999.

DANTHINNE, X.; IMPERIALE, M. J. Production of first generation adenovirus vectors: a review. **Gene Ther**, v. 7, n. 20, p. 1707-14, 2000.

DAS, G.; GOULD, D. S.; AUGUSTINE, M. M.; FRAGOSO, G.; SCIUTTO, E.; STROYNOWSKI, I.; VAN KAER, L.; SCHUST, D. J.; PLOEGH, H.; JANEWAY, C. A., JR. Qa-2-dependent selection of CD8alpha/alpha T cell receptor alpha/beta(+) cells in murine intestinal intraepithelial lymphocytes. **J Exp Med**, v. 192, n. 10, p. 1521-8, 2000.

DE MARIA, A.; FERRAZIN, A.; FERRINI, S.; CICCONE, E.; TERRAGNA, A.; MORETTA, L. Selective increase of a subset of T cell receptor gamma delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. **J Infect Dis**, v. 165, n. 5, p. 917-9, 1992.

DE PAOLI, P.; GENNARI, D.; MARTELLI, P.; BASAGLIA, G.; CROVATTO, M.; BATTISTIN, S.; SANTINI, G. A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection. **Clin Exp Immunol**, v. 83, n. 2, p. 187-91, 1991.

de SOUZA, A. P.; HAUT, L. H.; SILVA, R.; FERREIRA, S. I.; ZANETTI, C. R.; ERTL, H. C.; PINTO, A. R. Genital CD8+ T cell response to HIV-1 gag in mice immunized by mucosal routes with a recombinant simian adenovirus. **Vaccine**, v. 25, n. 1, p. 109-16, 2007.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. First of two parts. **N Engl J Med**, v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000a.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. Second of two parts. **N Engl J Med**, v. 343, n. 2, p. 108-17, 2000b.

DUFOUR, J. H.; DZIEJMAN, M.; LIU, M. T.; LEUNG, J. H.; LANE, T. E.; LUSTER, A. D. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. **J Immunol**, v. 168, n. 7, p. 3195-204, 2002.

ELLIS, R. W. New technologies for making vaccines. **Vaccine**, v. 17, n. 13-14, p. 1596-604, 1999.

FAHRER, A. M.; KONIGSHOFER, Y.; KERR, E. M.; GHANDOUR, G.; MACK, D. H.; DAVIS, M. M.; CHIEN, Y. H. Attributes of gammadelta intraepithelial lymphocytes as suggested by their transcriptional profile. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 18, p. 10261-6, 2001.

FARINA, S. F.; GAO, G. P.; XIANG, Z. Q.; RUX, J. J.; BURNETT, R. M.; ALVIRA, M. R.; MARSH, J.; ERTL, H. C.; WILSON, J. M. Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. **J Virol**, v. 75, n. 23, p. 11603-13, 2001.

FENNER, F.; HENDERSON, D.A.; ARITA, I.; JEZEK, Z.; LADNYI, I.D. Early efforts at control: variolation, vaccination, and isolation and quarantine. **History of International Public Health**, 6. ed. Geneva, 1988. 245-276.

FERNANDEZ, E. J.; LOLIS, E. Structure, function, and inhibition of chemokines. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 42, p. 424-69, 2002.

FIDEL, P. L., JR.; LUO, W.; STEELE, C.; CHABAIN, J.; BAKER, M.; WORMLEY, F., JR. Analysis of vaginal cell populations during experimental vaginal candidiasis. **Infect Immun**, v. 67, n. 6, p. 3135-40, 1999.

FIDEL, P. L., JR.; WOLF, N. A.; KUKURUGA, M. A. T lymphocytes in the murine vaginal mucosa are phenotypically distinct from those in the periphery. **Infect Immun**, v. 64, n. 9, p. 3793-9, 1996.

FITZGERALD, J. C.; GAO, G. P.; REYES-SANDOVAL, A.; PAVLAKIS, G. N.; XIANG, Z. Q.; WLAZLO, A. P.; GILES-DAVIS, W.; WILSON, J. M.; ERTL, H. C. A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 gag. **J Immunol**, v. 170, n. 3, p. 1416-22, 2003.

FU, Y.; HE, J.; ZHENG, X.; WU, Q.; ZHANG, M.; WANG, X.; WANG, Y.; XIE, C.; TANG, Q.; WEI, W.; WANG, M.; SONG, J.; QU, J.; ZHANG, Y.; HONG, T. Intranasal immunization with a replication-deficient adenoviral vector expressing the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus elicits protective immunity in BALB/c mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 381, n. 4, p. 528-32, 2009.

GARBER, D. A.; SILVESTRI, G.; FEINBERG, M. B. Prospects for an AIDS vaccine: three big questions, no easy answers. **Lancet Infect Dis**, v. 4, n. 7, p. 397-413, 2004.

GATTASS, C. R.; KING, L. B.; LUSTER, A. D.; ASHWELL, J. D. Constitutive expression of interferon gamma-inducible protein 10 in lymphoid organs and inducible expression in T cells and thymocytes. **J Exp Med**, v. 179, n. 4, p. 1373-8, 1994.

GILL, N.; ROSENTHAL, K. L.; ASHKAR, A. A. NK and NKT cell-independent contribution of interleukin-15 to innate protection against mucosal viral infection. **J Virol**, v. 79, n. 7, p. 4470-8, 2005.

GOULD, D. S.; PLOEGH, H. L.; SCHUST, D. J. Murine female reproductive tract intraepithelial lymphocytes display selection characteristics distinct from both peripheral and other mucosal T cells. **J Reprod Immunol**, v. 52, n. 1-2, p. 85-99, 2001.

GREBER, U. F.; SUOMALAINEN, M.; STIDWILL, R. P.; BOUCKE, K.; EBERSOLD, M. W.; HELENIUS, A. The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. **EMBO J**, v. 16, n. 19, p. 5998-6007, 1997.

GREBER, U. F.; WILLETTS, M.; WEBSTER, P.; HELENIUS, A. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. **Cell**, v. 75, n. 3, p. 477-86, 1993.

GREGOIRE, C.; CHASSON, L.; LUCI, C.; TOMASELLO, E.; GEISSMANN, F.; VIVIER, E.; WALZER, T. The trafficking of natural killer cells. **Immunol Rev**, v. 220169-82, 2007.

HAN, Y. W.; ALEYAS, A. G.; GEORGE, J. A.; KIM, S. J.; KIM, H. K.; YOON, H. A.; YOO, D. J.; KANG, S. H.; KIM, K.; EO, S. K. Polarization of protective immunity induced by replication-incompetent adenovirus expressing glycoproteins of pseudorabies virus. **Exp Mol Med**, v. 40, n. 6, p. 583-95, 2008.

HARTMAN, Z. C.; KIANG, A.; EVERETT, R. S.; SERRA, D.; YANG, X. Y.; CLAY, T. M.; AMALFITANO, A. Adenovirus infection triggers a rapid, MyD88-regulated transcriptome response critical to acute-phase and adaptive immune responses in vivo. **J Virol**, v. 81, n. 4, p. 1796-812, 2007.

HAYDAY, A. C. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. **Annu Rev Immunol**, v. 18975-1026, 2000.

HEDGES, S. R.; MAYO, M. S.; MESTECKY, J.; HOOK, E. W., 3RD; RUSSELL, M. W. Limited local and systemic antibody responses to *Neisseria gonorrhoeae* during uncomplicated genital infections. **Infect Immun**, v. 67, n. 8, p. 3937-46, 1999.

HENSLEY, S. E.; GILES-DAVIS, W.; MCCOY, K. C.; WENINGER, W.; ERTL, H. C. Dendritic cell maturation, but not CD8+ T cell induction, is dependent on type I IFN signaling during vaccination with adenovirus vectors. **J Immunol**, v. 175, n. 9, p. 6032-41, 2005.

HIDAKA, C.; MILANO, E.; LEOPOLD, P. L.; BERGELSON, J. M.; HACKETT, N. R.; FINBERG, R. W.; WICKHAM, T. J.; KOVESDI, I.; ROELVINK, P.; CRYSTAL, R. G. CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts. **J Clin Invest**, v. 103, n. 4, p. 579-87, 1999.

HIGGINBOTHAM, J. N.; SETH, P.; BLAESE, R. M.; RAMSEY, W. J. The release of inflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells in vitro following exposure to adenovirus variants and capsid. **Hum Gene Ther**, v. 13, n. 1, p. 129-41, 2002.

HINZ, T.; WESCH, D.; FRIESE, K.; RECKZIEGEL, A.; ARDEN, B.; KABELITZ, D. T cell receptor gamma delta repertoire in HIV-1-infected individuals. **Eur J Immunol**, v. 24, n. 12, p. 3044-9, 1994.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nat Med**, v. 11, n. 4 Suppl, p. S45-53, 2005.

HUBER, S.; SHI, C.; BUDD, R. C. Gammadelta T cells promote a Th1 response during coxsackievirus B3 infection in vivo: role of Fas and Fas ligand. **J Virol**, v. 76, n. 13, p. 6487-94, 2002.

IACOBELLI-MARTINEZ, M.; NEMEROW, G. R. Preferential activation of Toll-like receptor nine by CD46-utilizing adenoviruses. **J Virol**, v. 81, n. 3, p. 1305-12, 2007.
ICTVdB. The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of viruses. ICTVdB Management (2006). 00.001. Adenoviridae. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>> . Acesso em 15 maio 2009.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M.; PEREZ-SCHAEL, I. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. **J Infect Dis**, v. 174 Suppl 1S65-72, 1996.

KLAVINSKIS, L. S.; BERGMEIER, L. A.; GAO, L.; MITCHELL, E.; WARD, R. G.; LAYTON, G.; BROOKES, R.; MEYERS, N. J.; LEHNER, T. Mucosal or targeted lymph node immunization of macaques with a particulate SIVp27 protein elicits virus-specific CTL in the genito-rectal mucosa and draining lymph nodes. **J Immunol**, v. 157, n. 6, p. 2521-7, 1996.

KONIGSHOFER, Y.; CHIEN, Y. H. Gammadelta T cells - innate immune lymphocytes? **Curr Opin Immunol**, v. 18, n. 5, p. 527-33, 2006.

KOOTSTRA, N. A.; VERMA, I. M. Gene therapy with viral vectors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 43413-39, 2003.

KOSTENSE, S.; KOUDSTAAL, W.; SPRANGERS, M.; WEVERLING, G. J.; PENDERS, G.; HELMUS, N.; VOGELS, R.; BAKKER, M.; BERKHOUT, B.; HAVENGA, M.; GOUDSMIT, J. Adenovirus types 5 and 35 seroprevalence in AIDS risk groups supports type 35 as a vaccine vector. **AIDS**, v. 18, n. 8, p. 1213-6, 2004.

KOZLOWSKI, P. A.; NEUTRA, M. R. The role of mucosal immunity in prevention of HIV transmission. **Curr Mol Med**, v. 3, n. 3, p. 217-28, 2003.

LAMM, M. E. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. **Annu Rev Microbiol**, v. 51311-40, 1997.

LANGFORD, G.; DAYAN, A.; YLA-HERTTUALA, S.; ECKLAND, D. A preclinical assessment of the safety and biodistribution of an adenoviral vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene (Cerepro(R)) after intracerebral administration. **J Gene Med**, v. 11, n. 6, p. 468-76, 2009.

LANIER, L. L.; FEDERSPIEL, N. A.; RUITENBERG, J. J.; PHILLIPS, J. H.; ALLISON, J. P.; LITTMAN, D.; WEISS, A. The T cell antigen receptor complex expressed on normal peripheral blood CD4-, CD8- T lymphocytes. A CD3-associated disulfide-linked gamma chain heterodimer. **J Exp Med**, v. 165, n. 4, p. 1076-94, 1987.

LEE, D. W.; ANDERSON, M. E.; WU, S.; LEE, J. H. Development of an adenoviral vaccine against E6 and E7 oncoproteins to prevent growth of human papillomavirus-positive cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 134, n. 12, p. 1316-23, 2008.

LEHNER, T. Innate and adaptive mucosal immunity in protection against HIV infection. **Vaccine**, v. 21 Suppl 2S68-76, 2003.

LEHNER, T.; MITCHELL, E.; BERGMEIER, L.; SINGH, M.; SPALLEK, R.; CRANAGE, M.; HALL, G.; DENNIS, M.; VILLINGER, F.; WANG, Y. The role of gammadelta T cells in generating antiviral factors and beta-chemokines in protection against mucosal simian immunodeficiency virus infection. **Eur J Immunol**, v. 30, n. 8, p. 2245-56, 2000.

LEVINE, M. M. Immunization against bacterial diseases of the intestine. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 31, n. 4, p. 336-55, 2000.

LI, J.; FABER, M.; PAPANERI, A.; FABER, M. L.; MCGETTIGAN, J. P.; SCHNELL, M. J.; DIETZSCHOLD, B. A single immunization with a recombinant canine adenovirus expressing the rabies virus G protein confers protective immunity against rabies in mice. **Virology**, v. 356, n. 1-2, p. 147-54, 2006.

LI, J.; LORD, C. I.; HASELTINE, W.; LETVIN, N. L.; SODROSKI, J. Infection of cynomolgus monkeys with a chimeric HIV-1/SIVmac virus that expresses the HIV-1 envelope glycoproteins. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 5, n. 7, p. 639-46, 1992.

LIN, S. W.; CUN, A. S.; HARRIS-MCCOY, K.; ERTL, H. C. Intramuscular rather than oral administration of replication-defective adenoviral vaccine vector induces specific CD8+ T cell responses in the gut. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2187-93, 2007.

LIU, Y.; CHIRIVA-INTERNATI, M.; GRIZZI, F.; SALATI, E.; ROMAN, J. J.; LIM, S.; HERMONAT, P. L. Rapid induction of cytotoxic T-cell response against cervical cancer cells by human papillomavirus type 16 E6 antigen gene delivery into human dendritic cells by an adeno-associated virus vector. **Cancer Gene Ther**, v. 8, n. 12, p. 948-57, 2001.

LIU, Y.; HU, R.; ZHANG, S.; ZHANG, F.; LI, Z.; WEI, X.; CHEN, L. Expression of the Foot-and-Mouth Disease Virus VP1 protein using a replication-competent recombinant canine adenovirus type 2 elicits a humoral antibody response in a porcine model. **Viral Immunol**, v. 19, n. 2, p. 202-9, 2006.

LU, Z.; BAO, H.; CAO, Y.; SUN, P.; GUO, J.; LI, P.; BAI, X.; CHEN, Y.; XIE, B.; LI, D.; LIU, Z.; XIE, Q. Protection of guinea pigs and swine by a recombinant adenovirus expressing O serotype of foot-and-mouth disease virus whole capsid and 3C protease. **Vaccine**, v. 26 Suppl 6G48-53, 2008.

LUSTER, A. D.; RAVETCH, J. V. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). **J Exp Med**, v. 166, n. 4, p. 1084-97, 1987.

MALEK, T. R. The biology of interleukin-2. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 453-79, 2008.

MALKOVSKY, M.; FISCH, P.; MACKENZIE, D.; BARTZ, S. R.; RADTKE, B. E.; WALLACE, M.; MANNING, J.; COLIZZI, V.; PAUZA, C. D. Specificity and function of gamma delta T lymphocytes. **Folia Biol (Praha)**, v. 38, n. 5, p. 293-306, 1992.

MCALEER, W. J.; BUYNACK, E. B.; MAIGETTER, R. Z.; WAMPLER, D. E.; MILLER, W. J.; HILLEMANN, M. R. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. **Nature**, v. 307, n. 5947, p. 178-80, 1984.

MCCOY, K.; TATSIS, N.; KORIOTH-SCHMITZ, B.; LASARO, M. O.; HENSLEY, S. E.; LIN, S. W.; LI, Y.; GILES-DAVIS, W.; CUN, A.; ZHOU, D.; XIANG, Z.; LETVIN, N. L.; ERTL, H. C. Effect of preexisting immunity to adenovirus human serotype 5 antigens on the immune responses of nonhuman primates to vaccine regimens based on human- or chimpanzee-derived adenovirus vectors. **J Virol**, v. 81, n. 12, p. 6594-604, 2007.

MCCOY, R. D.; DAVIDSON, B. L.; ROESSLER, B. J.; HUFFNAGLE, G. B.; JANICH, S. L.; LAING, T. J.; SIMON, R. H. Pulmonary inflammation induced by incomplete or inactivated adenoviral particles. **Hum Gene Ther**, v. 6, n. 12, p. 1553-60, 1995.

MCDONALD, D.; WU, L.; BOHKS, S. M.; KEWALRAMANI, V. N.; UNUTMAZ, D.; HOPE, T. J. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. **Science**, v. 300, n. 5623, p. 1295-7, 2003.

MERRIMAN, H.; WOODS, S.; WINTER, C.; FAHNLANDER, A.; COREY, L. Secretory IgA antibody in cervicovaginal secretions from women with genital infection due to herpes simplex virus. **J Infect Dis**, v. 149, n. 4, p. 505-10, 1984.

MODLIN, J. F. Poliomyelitis in the United States: the final chapter? **JAMA**, v. 292, n. 14, p. 1749-51, 2004.

MOUNTAIN, A. Gene therapy: the first decade. **Trends Biotechnol**, v. 18, n. 3, p. 119-28, 2000.

MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 4, p. 331-41, 2003.

MURUVE, D. A. The innate immune response to adenovirus vectors. **Hum Gene Ther**, v. 15, n. 12, p. 1157-66, 2004.

MURUVE, D. A.; BARNES, M. J.; STILLMAN, I. E.; LIBERMANN, T. A. Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo. **Hum Gene Ther**, v. 10, n. 6, p. 965-76, 1999.

MURUVE, D. A.; COTTER, M. J.; ZAISS, A. K.; WHITE, L. R.; LIU, Q.; CHAN, T.; CLARK, S. A.; ROSS, P. J.; MEULENBROEK, R. A.; MAELANDSMO, G. M.; PARKS, R. J. Helper-dependent adenovirus vectors elicit intact innate but attenuated adaptive host immune responses in vivo. **J Virol**, v. 78, n. 11, p. 5966-72, 2004.

NIAID. Estatement : Immunizations are discontinued in two HIV vaccine trial. Disponível em: <<http://www3.niaid.nih.gov/>> . Acesso em 06 jun 2009.

NANNO, M.; SHIOHARA, T.; YAMAMOTO, H.; KAWAKAMI, K.; ISHIKAWA, H. gammadelta T cells: firefighters or fire boosters in the front lines of inflammatory responses. **Immunol Rev**, v. 215103-13, 2007.

NEUTRA, M. R.; KOZLOWSKI, P. A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 2, p. 148-58, 2006.

NOCIARI, M.; OCHERETINA, O.; SCHOGGINS, J. W.; FALCK-PEDERSEN, E. Sensing infection by adenovirus: Toll-like receptor-independent viral DNA recognition signals activation of the interferon regulatory factor 3 master regulator. **J Virol**, v. 81, n. 8, p. 4145-57, 2007.

NORRIS, S.; COLLINS, C.; DOHERTY, D. G.; SMITH, F.; MCENTEE, G.; TRAYNOR, O.; NOLAN, N.; HEGARTY, J.; O'FARRELLY, C. Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. **J Hepatol**, v. 28, n. 1, p. 84-90, 1998.

O'BRIEN, L.; PERKINS, S.; WILLIAMS, A.; EASTAUGH, L.; PHELPS, A.; WU, J.; PHILLPOTTS, R. Alpha interferon as an adenovirus-vectored vaccine adjuvant and antiviral in Venezuelan equine encephalitis virus infection. **J Gen Virol**, v. 90, n. Pt 4, p. 874-82, 2009.

OHMORI, Y.; HAMILTON, T. A. A macrophage LPS-inducible early gene encodes the murine homologue of IP-10. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 168, n. 3, p. 1261-7, 1990.

OLIVA, A.; KINTER, A. L.; VACCAREZZA, M.; RUBBERT, A.; CATANZARO, A.; MOIR, S.; MONACO, J.; EHLER, L.; MIZELL, S.; JACKSON, R.; LI, Y.; ROMANO, J. W.; FAUCL, A. S. Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. **J Clin Invest**, v. 102, n. 1, p. 223-31, 1998.

OTAKE, K.; ENNIST, D. L.; HARROD, K.; TRAPNELL, B. C. Nonspecific inflammation inhibits adenovirus-mediated pulmonary gene transfer and expression independent of specific acquired immune responses. **Hum Gene Ther**, v. 9, n. 15, p. 2207-22, 1998.

PERUZZI, D.; DHARMAPURI, S.; CIRILLO, A.; BRUNI, B. E.; NICOSIA, A.; CORTESE, R.; COLLOCA, S.; CILIBERTO, G.; LA MONICA, N.; AURISICCHIO, L. A novel chimpanzee serotype-based adenoviral vector as delivery tool for cancer vaccines. **Vaccine**, v. 27, n. 9, p. 1293-300, 2009.

PINTO, A. R.; ERTL, H. C. J.; Genetically modified adenoviruses as recombinant vaccines. **Current Topics in Virology**, v. 2, n. p. 269-284, 2002.

PINTO, A. R.; FITZGERALD, J. C.; GAO, G. P.; WILSON, J. M.; ERTL, H. C. Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen upon oral immunization of mice with a simian E1-deleted adenoviral vector. **Vaccine**, v. 22, n. 5-6, p. 697-703, 2004.

- PINTO, A. R.; FITZGERALD, J. C.; GILES-DAVIS, W.; GAO, G. P.; WILSON, J. M.; ERTL, H. C. Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen through a prime boost regimen with heterologous E1-deleted adenoviral vaccine carriers. **J Immunol**, v. 171, n. 12, p. 6774-9, 2003.
- PLOTKIN, S. A. Immunologic correlates of protection induced by vaccination. **Pediatr Infect Dis J**, v. 20, n. 1, p. 63-75, 2001.
- PLOTKIN, S. A. Six revolutions in vaccinology. **Pediatr Infect Dis J**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2005a.
- PLOTKIN, S. A. Vaccination against the major infectious diseases. **C R Acad Sci III**, v. 322, n. 11, p. 943-51, 1999.
- PLOTKIN, S. A. Vaccines in the 21st century. **Hybrid Hybridomics**, v. 21, n. 2, p. 135-45, 2002.
- PLOTKIN, S. A. Vaccines: past, present and future. **Nat Med**, v. 11, n. 4 Suppl, p. S5-11, 2005b.
- POMBO, A.; FERREIRA, J.; BRIDGE, E.; CARMO-FONSECA, M. Adenovirus replication and transcription sites are spatially separated in the nucleus of infected cells. **EMBO J**, v. 13, n. 21, p. 5075-85, 1994.
- PONOMAREV, E. D.; DITTEL, B. N. Gamma delta T cells regulate the extent and duration of inflammation in the central nervous system by a Fas ligand-dependent mechanism. **J Immunol**, v. 174, n. 8, p. 4678-87, 2005.
- PONOMAREV, E. D.; NOVIKOVA, M.; YASSAI, M.; SZCZEPANIK, M.; GORSKI, J.; DITTEL, B. N. Gamma delta T cell regulation of IFN-gamma production by central nervous system-infiltrating encephalitogenic T cells: correlation with recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 173, n. 3, p. 1587-95, 2004.
- RAKASZ, E.; MUELLER, A.; PERLMAN, S.; LYNCH, R. G. Gammadelta T cell response induced by vaginal Herpes simplex 2 infection. **Immunol Lett**, v. 70, n. 2, p. 89-93, 1999.
- RAPER, S. E.; CHIRMULE, N.; LEE, F. S.; WIVEL, N. A.; BAGG, A.; GAO, G. P.; WILSON, J. M.; BATSHAW, M. L. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. **Mol Genet Metab**, v. 80, n. 1-2, p. 148-58, 2003.

REYES-SANDOVAL, A.; FITZGERALD, J. C.; GRANT, R.; ROY, S.; XIANG, Z. Q.; LI, Y.; GAO, G. P.; WILSON, J. M.; ERTL, H. C. Human immunodeficiency virus type 1-specific immune responses in primates upon sequential immunization with adenoviral vaccine carriers of human and simian serotypes. **J Virol**, v. 78, n. 14, p. 7392-9, 2004.

REYES-SANDOVAL, A.; SRIDHAR, S.; BERTHOUD, T.; MOORE, A. C.; HARTY, J. T.; GILBERT, S. C.; GAO, G.; ERTL, H. C.; WILSON, J. C.; HILL, A. V. Single-dose immunogenicity and protective efficacy of simian adenoviral vectors against *Plasmodium berghei*. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 3, p. 732-41, 2008.

REYNOLDS, M. R.; RAKASZ, E.; SKINNER, P. J.; WHITE, C.; ABEL, K.; MA, Z. M.; COMPTON, L.; NAPOE, G.; WILSON, N.; MILLER, C. J.; HAASE, A.; WATKINS, D. I. CD8⁺ T-lymphocyte response to major immunodominant epitopes after vaginal exposure to simian immunodeficiency virus: too late and too little. **J Virol**, v. 79, n. 14, p. 9228-35, 2005.

RICHARDSON, J. S.; YAO, M. K.; TRAN, K. N.; CROYLE, M. A.; STRONG, J. E.; FELDMANN, H.; KOBINGER, G. P. Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e5308, 2009.

ROT, A.; VON ANDRIAN, U. H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 891-928, 2004.

ROWE, W. P.; HUEBNER, R. J.; GILMORE, L. K.; PARROTT, R. H.; WARD, T. G. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 84, n. 3, p. 570-3, 1953.

ROY, S.; KOBINGER, G. P.; LIN, J.; FIGUEREDO, J.; CALCEDO, R.; KOBASA, D.; WILSON, J. M. Partial protection against H5N1 influenza in mice with a single dose of a chimpanzee adenovirus vector expressing nucleoprotein. **Vaccine**, v. 25, n. 39-40, p. 6845-51, 2007.

RUZEK, M. C.; KAVANAGH, B. F.; SCARIA, A.; RICHARDS, S. M.; GARMAN, R. D. Adenoviral vectors stimulate murine natural killer cell responses and demonstrate antitumor activities in the absence of transgene expression. **Mol Ther**, v. 5, n. 2, p. 115-24, 2002.

SAFRONETZ, D.; HEGDE, N. R.; EBIHARA, H.; DENTON, M.; KOBINGER, G. P.; ST JEOR, S.; FELDMANN, H.; JOHNSON, D. C. Adenovirus vectors expressing hantavirus proteins protect hamsters against lethal challenge with andes virus. **J Virol**, v. 83, n. 14, p. 7285-95, 2009.

SAITO, H.; KRANZ, D. M.; TAKAGAKI, Y.; HAYDAY, A. C.; EISEN, H. N.; TONEGAWA, S. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. **Nature**, v. 309, n. 5971, p. 757-62, 1984.

SANCHEZ-MATEOS, P.; CEBRIAN, M.; ACEVEDO, A.; LOPEZ-BOTET, M.; DE LANDAZURI, M. O.; SANCHEZ-MADRID, F. Expression of a gp33/27,000 MW activation inducer molecule (AIM) on human lymphoid tissues. Induction of cell proliferation on thymocytes and B lymphocytes by anti-AIM antibodies. **Immunology**, v. 68, n. 1, p. 72-9, 1989.

SCHMIDT, C. S.; MESCHER, M. F. Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T cells in vivo. **J Immunol**, v. 163, n. 5, p. 2561-7, 1999.

SCHNELL, M. A.; ZHANG, Y.; TAZELAAR, J.; GAO, G. P.; YU, Q. C.; QIAN, R.; CHEN, S. J.; VARNAVSKI, A. N.; LECLAIR, C.; RAPER, S. E.; WILSON, J. M. Activation of innate immunity in nonhuman primates following intraportal administration of adenoviral vectors. **Mol Ther**, v. 3, n. 5 Pt 1, p. 708-22, 2001.

SEDER, R. A.; HILL, A. V. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 793-8, 2000.

SELIN, L. K.; SANTOLUCITO, P. A.; PINTO, A. K.; SZOMOLANYI-TSUDA, E.; WELSH, R. M. Innate immunity to viruses: control of vaccinia virus infection by gamma delta T cells. **J Immunol**, v. 166, n. 11, p. 6784-94, 2001.

SHIVER, J. W.; EMINI, E. A. Recent advances in the development of HIV-1 vaccines using replication-incompetent adenovirus vectors. **Annu Rev Med**, v. 55355-72, 2004.

SHIVER, J. W.; FU, T. M.; CHEN, L.; CASIMIRO, D. R.; DAVIES, M. E.; EVANS, R. K.; ZHANG, Z. Q.; SIMON, A. J.; TRIGONA, W. L.; DUBEY, S. A.; HUANG, L.; HARRIS, V. A.; LONG, R. S.; LIANG, X.; HANDT, L.; SCHLEIF, W. A.; ZHU, L.; FREED, D. C.; PERSAUD, N. V.; GUAN, L.; PUNT, K. S.; TANG, A.; CHEN, M.; WILSON, K. A.; COLLINS, K. B.; HEIDECKER, G. J.; FERNANDEZ, V. R.; PERRY, H. C.; JOYCE, J. G.; GRIMM, K. M.; COOK, J. C.; KELLER, P. M.; KRESOCK, D. S.; MACH, H.; TROUTMAN, R. D.; ISOPI, L. A.; WILLIAMS, D. M.; XU, Z.; BOHANNON, K. E.; VOLKIN, D. B.; MONTEFIORI, D. C.; MIURA, A.; KRIVULKA, G. R.; LIFTON, M. A.; KURODA, M. J.; SCHMITZ, J. E.; LETVIN, N. L.; CAULFIELD, M. J.; BETT, A. J.; YOUIL, R.; KASLOW, D. C.; EMINI, E. A. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. **Nature**, v. 415, n. 6869, p. 331-5, 2002.

SILVERS, M. J.; STEPTOE, M. M. Historical overview of vaccines. **Prim Care**, v. 28, n. 4, p. 685-95, v, 2001.

SOJKA, D. K.; BRUNIQUEL, D.; SCHWARTZ, R. H.; SINGH, N. J. IL-2 secretion by CD4+ T cells in vivo is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition. **J Immunol**, v. 172, n. 10, p. 6136-43, 2004.

SOUZA, A. P.; HAUT, L.; REYES-SANDOVAL, A.; PINTO, A. R. Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. **Braz J Med Biol Res**, v.38, n.4, Apr, p.509-22. 2005.

ST GEORGE, J. A. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. **Gene Ther**, v. 10, n. 14, p. 1135-41, 2003.

STAATS, H. F.; BRADNEY, C. P.; GWINN, W. M.; JACKSON, S. S.; SEMPOWSKI, G. D.; LIAO, H. X.; LETVIN, N. L.; HAYNES, B. F. Cytokine requirements for induction of systemic and mucosal CTL after nasal immunization. **J Immunol**, v. 167, n. 9, p. 5386-94, 2001.

STAMPFLI, M. R.; CWIARTKA, M.; GAJEWSKA, B. U.; ALVAREZ, D.; RITZ, S. A.; INMAN, M. D.; XING, Z.; JORDANA, M. Interleukin-10 gene transfer to the airway regulates allergic mucosal sensitization in mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 21, n. 5, p. 586-96, 1999.

STAMPFLI, M. R.; WILEY, R. E.; NEIGH, G. S.; GAJEWSKA, B. U.; LEI, X. F.; SNIDER, D. P.; XING, Z.; JORDANA, M. GM-CSF transgene expression in the airway allows aerosolized ovalbumin to induce allergic sensitization in mice. **J Clin Invest**, v. 102, n. 9, p. 1704-14, 1998.

STEVCEVA, L.; STROBER, W. Mucosal HIV vaccines: where are we now? **Curr HIV Res**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2004.

STEWART, V. A.; MCGRATH, S. M.; DUBOIS, P. M.; PAU, M. G.; METTENS, P.; SHOTT, J.; COBB, M.; BURGE, J. R.; LARSON, D.; WARE, L. A.; DEMOITIE, M. A.; WEVERLING, G. J.; BAYAT, B.; CUSTERS, J. H.; DUBOIS, M. C.; COHEN, J.; GOUDSMIT, J.; HEPPNER, D. G., JR. Priming with an adenovirus 35-circumsporozoite protein (CS) vaccine followed by RTS,S/AS01B boosting significantly improves immunogenicity to Plasmodium falciparum CS compared to that with either malaria vaccine alone. **Infect Immun**, v. 75, n. 5, p. 2283-90, 2007.

SULLIVAN, N. J.; GEISBERT, T. W.; GEISBERT, J. B.; XU, L.; YANG, Z. Y.; ROEDERER, M.; KOUP, R. A.; JAHRLING, P. B.; NABEL, G. J. Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. **Nature**, v. 424, n. 6949, p. 681-4, 2003.

SUMIDA, S. M.; TRUITT, D. M.; KISHKO, M. G.; ARTHUR, J. C.; JACKSON, S. S.; GORGONE, D. A.; LIFTON, M. A.; KOUDSTAAL, W.; PAU, M. G.; KOSTENSE, S.; HAVENGA, M. J.; GOUDSMIT, J.; LETVIN, N. L.; BAROUCH, D. H. Neutralizing antibodies and CD8+ T lymphocytes both contribute to immunity to adenovirus serotype 5 vaccine vectors. **J Virol**, v. 78, n. 6, p. 2666-73, 2004.

SUMIDA, S. M.; TRUITT, D. M.; LEMCKERT, A. A.; VOGELS, R.; CUSTERS, J. H.; ADDO, M. M.; LOCKMAN, S.; PETER, T.; PEYERL, F. W.; KISHKO, M. G.; JACKSON, S. S.; GORGONE, D. A.; LIFTON, M. A.; ESSEX, M.; WALKER, B. D.; GOUDSMIT, J.; HAVENGA, M. J.; BAROUCH, D. H. Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. **J Immunol**, v. 174, n. 11, p. 7179-85, 2005.

TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 797-819, 1997.

TAMANINI, A.; NICOLIS, E.; BONIZZATO, A.; BEZZERRI, V.; MELOTTI, P.; ASSAEL, B. M.; CABRINI, G. Interaction of adenovirus type 5 fiber with the coxsackievirus and adenovirus receptor activates inflammatory response in human respiratory cells. **J Virol**, v. 80, n. 22, p. 11241-54, 2006.

TATSIS, N.; ERTL, H. C. Adenoviruses as vaccine vectors. **Mol Ther**, v. 10, n. 4, p. 616-29, 2004.

TESTI, R.; D'AMBROSIO, D.; DE MARIA, R.; SANTONI, A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. **Immunol Today**, v. 15, n. 10, p. 479-83, 1994.

THAPA, M.; KUZIEL, W. A.; CARR, D. J. Susceptibility of CCR5-deficient mice to genital herpes simplex virus type 2 is linked to NK cell mobilization. **J Virol**, v. 81, n. 8, p. 3704-13, 2007.

THORNER, A. R.; VOGELS, R.; KASPERS, J.; WEVERLING, G. J.; HOLTERMAN, L.; LEMCKERT, A. A.; DILRAJ, A.; MCNALLY, L. M.; JEENA, P. M.; JEPSEN, S.; ABBINK, P.; NANDA, A.; SWANSON, P. E.; BATES, A. T.; O'BRIEN, K. L.; HAVENGA, M. J.; GOUDSMIT, J.; BAROUCH, D. H. Age dependence of adenovirus-specific neutralizing antibody titers in individuals from sub-Saharan Africa. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 10, p. 3781-3, 2006.

TORO, H.; TANG, D. C. Protection of chickens against avian influenza with nonreplicating adenovirus-vectored vaccine. **Poult Sci**, v. 88, n. 4, p. 867-71, 2009.

TRINCHIERI, G. Biology of natural killer cells. **Adv Immunol**, v. 47, p. 187-376, 1989.

TSENG, C. T.; RANK, R. G. Role of NK cells in early host response to chlamydial genital infection. **Infect Immun**, v. 66, n. 12, p. 5867-75, 1998.

VANGURI, P.; FARBER, J. M. Identification of CRG-2. An interferon-inducible mRNA predicted to encode a murine monokine. **J Biol Chem**, v. 265, n. 25, p. 15049-57, 1990.

VERMA, I. M.; WEITZMAN, M. D. Gene therapy: twenty-first century medicine. **Annu Rev Biochem**, v. 74, p. 11-38, 2005.

VIGNUZZI, M.; WENDT, E.; ANDINO, R. Engineering attenuated virus vaccines by controlling replication fidelity. **Nat Med**, v. 14, n. 2, p. 154-61, 2008.

VOGELS, R.; ZUIJDGEEST, D.; VAN RIJNSOEVER, R.; HARTKOORN, E.; DAMEN, I.; DE BETHUNE, M. P.; KOSTENSE, S.; PENDERS, G.; HELMUS, N.; KOUDSTAAL, W.; CECCHINI, M.; WETTERWALD, A.; SPRANGERS, M.; LEMCKERT, A.; OPHORST, O.; KOEL, B.; VAN MEERENDONK, M.; QUAX, P.; PANITTI, L.; GRIMBERGEN, J.; BOUT, A.; GOUDSMIT, J.; HAVENGA, M. Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. **J Virol**, v. 77, n. 15, p. 8263-71, 2003.

WALLACE, M.; BARTZ, S. R.; CHANG, W. L.; MACKENZIE, D. A.; PAUZA, C. D.; MALKOVSKY, M. Gamma delta T lymphocyte responses to HIV. **Clin Exp Immunol**, v. 103, n. 2, p. 177-84, 1996.

WANG, B.; DANG, K.; AGADJANYAN, M. G.; SRIKANTAN, V.; LI, F.; UGEN, K. E.; BOYER, J.; MERVA, M.; WILLIAMS, W. V.; WEINER, D. B. Mucosal immunization with a DNA vaccine induces immune responses against HIV-1 at a mucosal site. **Vaccine**, v. 15, n. 8, p. 821-5, 1997.

WANG, M.; SHU, Y.; QU, J. G.; WANG, J. W.; HONG, T. [Improved expression of human rotavirus G1VP7 and G3VP7 antigens in the recombinant adenoviruses by codon optimization]. **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi**, v. 22, n. 6, p. 437-9, 2008.

WANG, T.; SCULLY, E.; YIN, Z.; KIM, J. H.; WANG, S.; YAN, J.; MAMULA, M.; ANDERSON, J. F.; CRAFT, J.; FIKRIG, E. IFN-gamma-producing gamma delta T cells help control murine West Nile virus infection. **J Immunol**, v. 171, n. 5, p. 2524-31, 2003.

WARD, S. G.; BACON, K.; WESTWICK, J. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. **Immunity**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 1998.

WELLER, T. H.; ROBBINS, F. C.; ENDERS, J. F. Cultivation of poliomyelitis virus in cultures of human foreskin and embryonic tissues. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 72, n. 1, p. 153-5, 1949.

WHO. The global burden of disease: 2004 update. Disponível em: <http://www.who.int/>. Acesso em: 01 mai. 2009

WICKHAM, T. J.; MATHIAS, P.; CHERESH, D. A.; NEMEROW, G. R. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. **Cell**, v. 73, n. 2, p. 309-19, 1993.

WILLIAMS, M. A.; BEVAN, M. J. Effector and memory CTL differentiation. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 171-92, 2007.

WORGALL, S.; WOLFF, G.; FALCK-PEDERSEN, E.; CRYSTAL, R. G. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. **Hum Gene Ther**, v. 8, n. 1, p. 37-44, 1997.

XIANG, Z. Q.; YANG, Y.; WILSON, J. M.; ERTL, H. C. A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. **Virology**, v. 219, n. 1, p. 220-7, 1996.

YEI, S.; MITTEREDER, N.; WERT, S.; WHITSETT, J. A.; WILMOTT, R. W.; TRAPNELL, B. C. In vivo evaluation of the safety of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA to the lung. **Hum Gene Ther**, v. 5, n. 6, p. 731-44, 1994.

YIN, Z.; CHEN, C.; SZABO, S. J.; GLIMCHER, L. H.; RAY, A.; CRAFT, J. T-Bet expression and failure of GATA-3 cross-regulation lead to default production of IFN-gamma by gammadelta T cells. **J Immunol**, v. 168, n. 4, p. 1566-71, 2002.

YOON, J. S.; KIM, H. H.; LEE, Y.; LEE, J. S. Cytokine induction by respiratory syncytial virus and adenovirus in bronchial epithelial cells. **Pediatr Pulmonol**, v. 42, n. 3, p. 277-82, 2007.

ZENG, X.; MOORE, T. A.; NEWSTEAD, M. W.; DENG, J. C.; LUKACS, N. W.; STANDIFORD, T. J. IP-10 mediates selective mononuclear cell accumulation and activation in response to intrapulmonary transgenic expression and during adenovirus-induced pulmonary inflammation. **J Interferon Cytokine Res**, v. 25, n. 2, p. 103-12, 2005.

ZENG, X.; MOORE, T. A.; NEWSTEAD, M. W.; HERNANDEZ-ALCOCEBA, R.; TSAI, W. C.; STANDIFORD, T. J. Intrapulmonary expression of macrophage inflammatory protein 1alpha (CCL3) induces neutrophil and NK cell accumulation and stimulates innate immunity in murine bacterial pneumonia. **Infect Immun**, v. 71, n. 3, p. 1306-15, 2003.

ZHANG, Y.; CHIRMULE, N.; GAO, G. P.; QIAN, R.; CROYLE, M.; JOSHI, B.; TAZELAAR, J.; WILSON, J. M. Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages. **Mol Ther**, v. 3, n. 5 Pt 1, p. 697-707, 2001.

ZHOU, D.; CUN, A.; LI, Y.; XIANG, Z.; ERTL, H. C. A chimpanzee-origin adenovirus vector expressing the rabies virus glycoprotein as an oral vaccine against inhalation infection with rabies virus. **Mol Ther**, v. 14, n. 5, p. 662-72, 2006.

ZHU, J.; HUANG, X.; YANG, Y. Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways. **J Virol**, v. 81, n. 7, p. 3170-80, 2007.

ZINKERNAGEL, R. M. On natural and artificial vaccinations. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 415-46, 2003.

ZSENGELLER, Z.; OTAKE, K.; HOSSAIN, S. A.; BERCLAZ, P. Y.; TRAPNELL, B. C. Internalization of adenovirus by alveolar macrophages initiates early proinflammatory signaling during acute respiratory tract infection. **J Virol**, v. 74, n. 20, p. 9655-67, 2000.