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

RODRIGO BENEDETTI GASSEN

**Dinâmica das células T auxiliares foliculares nas infecções virais: foco
em Vírus Sincicial Respiratório.**

**PORTO ALEGRE
2015**

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

RODRIGO BENEDETTI GASSEN

**DINÂMICA DAS CÉLULAS T AUXILIARES FOLICULARES NAS INFECÇÕES
VIRAIS: FOCO EM VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO**

Porto Alegre, 2015

RODRIGO BENEDETTI GASSEN

DINÂMICA DAS CÉLULAS T AUXILIARES FOLICULARES NAS INFECÇÕES
VIRAIS: FOCO EM VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Cristina Beatriz Bonorino
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Ana Paula Duarte Souza

Porto Alegre, 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G251d Gassen, Rodrigo Benedetti
Dinâmica das células T auxiliares foliculares nas infecções virais: foco em Vírus Sincicial Respiratório. / Rodrigo Benedetti Gassen. – Porto Alegre, 2015.
67f. Gráf.; il. Inclui dois artigos científicos a serem submetidos à publicação.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Cristina Beatriz Bonorino
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Ana Paula Duarte Souza

1. Pediatria. 2. Asma - Fisiopatologia. 3. Criança. 4. Vírus Sinciciais Respiratórios. 5. Linfócitos T. 6. Linfócitos T CD4-Positivos Foliculares. I. Bonorino, Cristina Beatriz. II. Souza, Ana Paula Duarte. Título.

CDD 618.9223

Bibliotecária Responsável: Elisete Sales de Souza - CRB 10/1441



*“Pode-se encontrar a felicidade mesmo nas horas mais sombrias, se a pessoa se lembrar
de acender a luz”.*

Alvo P. W. B. Dumbledore



Dedicatória

*A minha mãe **Marlene**, pelo amor incondicional e pelo companheirismo e incentivo constante.*

*Aos meus amigos **Juliana, Allan, Arthur, Mariá, Gabi D, Gabi K, Natália e Priscila** pelo apoio.*

*À minha **imaginação**, que faz parte dessa vitória.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a força maior que rege a natureza e todos os destinos da terra, por me propiciar o desejo do conhecimento e me fazer trilhar os caminhos da academia.

Agradeço a meus professores do ensino médio e fundamental, por serem meus primeiros mentores. Eles viram meus primeiros passos no ramo da educação, e através deles estendo meus agradecimentos aos colégios Castelo Branco e Dom Hermeto da cidade de Três de Maio no Rio Grande do Sul.

Agradeço à escolha do meu curso de graduação. Ter me formado bacharel em farmácia me trouxe até aqui, e abriu meus horizontes em relação à área de pesquisa que estou trilhando.

Agradeço ao professor Luiz Rodrigues, pelo incentivo em entrar na pós-graduação da PUCRS, e pela amizade e coleguismo.

Agradeço a todos os meus amigos que estiveram ao meu lado nessa caminhada, me descontraindo, me auxiliando e dando dicas. A meus colegas de laboratório que se tornaram grandes amigos, presentes nos momentos bons de descobertas e nos momentos ruins, quando algum experimento não saia como esperado, e isso é o que mais acontece.

Não poderia esquecer-se de agradecer a paciência, pois é uma qualidade essencial para um pesquisador, sem ela nenhum conseguiria chegar lá.

À minha querida co-orientadora Ana Paula Duarte pelo auxílio imediato a qualquer momento de dúvida e a super acolhida em seu laboratório. E à minha orientadora Cristina Bonorino que sempre esteve presente, para reuniões, dúvidas e esclarecimentos. Espero que no futuro seja um pouco parecido com elas.

Por último, e mais importante, quero agradecer a minha mãe Marlene Inês Benedetti que é minha maior fã. Eu mostro pra ela todos os resultados dos meus experimentos, mesmo sabendo que nada será compreendido, devido à mesma nunca ter estudado o mundo da imunologia como eu. Contudo, ela me olha com um sorriso enorme no rosto e me elogia sempre que pode para todos seus amigos, me deixando um pouco envergonhado por fora, mas com um orgulho enorme por fazê-la feliz. Amo-te do fundo do meu coração mãe!

RESUMO

Introdução: Os vírus que causam doenças em humanos podem causar epidemias e pandemias levando à morte de milhares de pessoas. Quando um vírus infecta o organismo, o sistema imunológico é ativado para tentar controlar essa infecção. A principal resposta contra vírus em geral consiste em células T CD8+ citotóxicas e os anticorpos produzidos por células B. Contudo, tanto as células B como as T CD8+ necessitam de células auxiliares T CD4+ para uma resposta eficiente, sendo que a produção de anticorpos precisa de um tipo específico de células auxiliares, as células T CD4+ foliculares (TFH). Ambas as respostas podem gerar memória, assim em uma segunda infecção pela mesma cepa viral podemos responder de maneira mais eficaz.

Nesses dois artigos seguintes discutiremos a função de células TFH na resposta viral. Primeiramente temos um artigo que revisa todos os estudos que conseguiram fazer uma ligação entre essa população celular e vírus diversos, como HIV, HBV, EBV, LCMV e Influenza. Após temos um artigo original tentando desvendar o mecanismo pelo qual o Vírus Sincicial Respiratório (RSV) inibe uma resposta imunológica humoral adequada. Anticorpos gerados em infecções pelo RSV frequentemente possuem baixa afinidade e pouco poder de neutralização, gerando acúmulo de imunocomplexos inflamatórios nas vias aéreas inferiores em crianças até os 2 anos de idade. Isso pode levar à morte por bronqueolite e pneumonia em cerca de 50% dos casos, e aumenta a chance de desenvolvimento de asma na vida adulta. As células TFH tem um importante papel na ajuda às células B, para a produção de anticorpos de alta afinidade, e troca de classe de imunoglobulinas.

Objetivo: Entender os mecanismos imunológicos relacionados às células TFH nas respostas virais e descobrir como o RSV diminui a eficiência dos anticorpos.

Métodos e Resultados: No primeiro artigo foi realizada uma revisão nas bases de dados Medline/Pubmed por artigos originais publicados no período de 2008 a 2014, utilizando os termos “TFH” e “Virus” juntos. Já no segundo artigo foi realizada uma pesquisa original com modelo animal, focada em determinar a interação do RSV com as células TFH. O RSV foi capaz de aumentar a quantidade de células TFH *in vitro*, aumentando também sua proliferação (Ki67) e morte (Anexina-V), diminuindo o

tamanho dos centros germinativos *in vivo* e diminuindo a quantidade de anticorpos IgG contra ovalbumina. In vitro, o RSV induziu PD-L1 em células B e em células dendríticas.

Conclusão: As células TFH são de fundamental importância para a resposta humoral viral. Diferentes tipos de vírus têm formas peculiares de interagir com o sistema imune e assim com as células TFH, como podemos notar no artigo de revisão. Os resultados do artigo original sugerem que o RSV pode comprometer a função de células TFH ao induzir PD-L1 em células dendríticas e células B, impedindo o desenvolvimento do centro germinativo e diminuindo a quantidade de anticorpos.

ABSTRACT

Introduction: Viruses cause diseases in humans and can cause epidemics and pandemics leading to death of thousands of people. When a virus infects the body, the immune system is activated to control the infection. The primary response against viruses consist mainly of cytotoxic CD8+ T cells and antibodies produced by B cells, however, both B and CD8 + T cells require auxiliary CD4 + T cells to generate an effective response. The production of antibodies needs a specific type helper cells, CD4 + follicular T cells (TFH). Both responses can generate memory, so in a second infection by the same virus strain can respond more efficient way.

In these next two articles we discuss the TFH cell function towards viral response. First we produced an article that reviews all studies that performed a connection between this cell population and different viruses, such as HIV, HBV, EBV, LCMV and influenza. We next present an original article trying to unravel the mechanism by which the Respiratory Syncytial Virus (RSV) inhibits adequate humoral immune responses. Antibodies generated in RSV infections often have low affinity and little neutralizing activity, resulting in the accumulation of inflammatory immune complexes in the lower airways of children under 2 years of age. RSV can lead to death by bronchiolitis and pneumonia in approximately 50% of cases and increases the chance of developing asthma later in life. The TFH cells play an important role in helping B cells for class switching and the production of high affinity immunoglobulin.

Objective: To understand the immunological mechanisms related to TFH cells in viral responses and investigate the mechanisms underlying the effect of RSV in decreasing antibody efficiency.

Methods and Results: In the first article we reviewed Medline / Pubmed for original articles published from 2008 to 2014, using the terms "TFH" and "Virus" together. In the second article was conducted original research with animal models, focused on determining the interaction of RSV with the TFH cells. In our model, RSV was able to increase the amount of TFH cells *in vitro*, promoting their proliferation (Ki67) and death (Annexin-V). *In vivo*, RSV did not induce an increase in germinal centers and decreased the amount of IgG antibodies. We observed that RSV was capable of PD-L1 induction in dendritic cells as well in B cells.

Conclusion: TFH cells are crucial for anti-viral humoral responses. Different types of viruses interact through varied mechanisms with the immune system. Our results suggest that the RSV induces PD-L1 in dendritic cells and B cells, and may be able to cause death by apoptosis in TFH cells, reducing the size of germinal centers and decreasing the amount of antibodies

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

1. **FIGURA 1.** Esquematização da busca e seleção de referências para o artigo de revisão.....26

CAPÍTULO III

1. **FIGURA 1.** RSV induz a proliferação de células TFH *in vitro*.....54
 2. **FIGURA 2.** RSV induz morte por apoptose de células TFH *in vitro*.....55
 3. **FIGURA 3.** RSV inativado é capaz de diminuir o tamanho do centro germinativo e a quantidade de anticorpos IgG.....57
 4. **FIGURA 4.** A presença de RSV induz PD-L1 em células dendríticas e células B *in vitro*, sendo dependente da sinalização STAT em ambas e de TNF α somente de células dendríticas.....59
 5. **FIGURA 5.** Imunização com RSV inativado *in vivo* é capaz de induzir PD-L1 em células B do linfonodo mesentérico, mas não no baço.....62
-

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	<i>Protein kinase B</i>
AG490	Inibidor de Jack/STAT
B	Células B
B GC	Células B do centro germinativo
BCR	Receptor de células B
Bcl-6	<i>B-cell lymphoma 6 protein</i>
CD62L	Ligante de CD62
CCR7	<i>C-C chemokine receptor type 7</i>
CCR5	<i>C-C chemokine receptor type 5</i>
CXCL13	<i>C-X-C motif chemokine 13</i>
CXCR6	<i>C-X-C chemokine receptor type 6</i>
CXCR3	<i>C-X-C chemokine receptor type 3</i>
CXCR5	<i>C-X-C chemokine receptor type 5</i>
CFA	Adjuvante completo de Freund
c-MAF	<i>V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog</i>
CD40	Molécula co-estimulatória
CD40L	Ligante do CD40
CD19	<i>B-lymphocyte antigen</i>
CD28	Molécula co-estimulatória
CD45R	B220, antígeno de célula B
CD274	<i>Programmed death-ligand 1 (PD-L1)</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
EBV	<i>Epstein-Barr virus</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FDC	Célula Dendrítica Folicular

FAS	Molécula de apoptose
FV	<i>Friend virus</i>
GPR15	<i>G protein-coupled receptor 15</i>
GL-7	Antígeno de células B do centro germinativo
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HBV	Vírus da hepatite B
HSV-1	<i>Herpes simplex type 1</i>
HE	Hematoxilina e eosina
ICOS	<i>Inducible T-cell COStimulator</i>
ICOSL	Ligante de ICOS
IL-6	Interleucina 6
IL-21	Interleucina 21
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-6R	Receptor de Interleucina 6
IL-21R	Receptor de Interleucina 21
IFN- γ	<i>Interferon Gamma</i>
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
LCMV	Vírus da Coriomeningite Linfocítica
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MHC	Molécula de Histocompatibilidade principal
MFI	Média da Intensidade de Fluorescência
MHV68	<i>Murid herpesvirus 68</i>
MEDLINE	<i>Medical Literature Analysis and Retrieval System Online</i>
OVA	Ovalbumina

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PUBMED	<i>Index at US National Library of Medicine</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	Ligante 1 de PD-1
PD-L2	Ligante 2 de PD-1
RSV	Vírus Sincicial Respiratório
RSV A2	Vírus Sincicial Respiratório cepa A2
RABV	<i>Rabies virus</i>
SBF	Soro Fetal Bovino
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SLAM	<i>The signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) family</i>
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
T CD3+	Antígeno de células T
T CD4+	Células T Auxiliar
T CD8+	Célula T Citotóxica
TFH	Células T CD4 Folicular
TFH GC	Células T CD4 Folicular do centro germinativo
TH1	T auxiliar tipo 1
TH2	T auxiliar tipo 2
TH9	T auxiliar tipo 9
TH17	T auxiliar tipo 17
Treg	Célula T regulatória
T-bet	<i>TH1 cell-specific transcription factor</i>
TNF α	Fator de Necrose Tumoral
TLR	Ligante Tipo Toll
TLR4	Ligante Tipo Toll 4

UV	Luz Ultravioleta
VSV	Virus da Estomatite Vesicular
VACV	<i>Vaccinia virus</i>
Ki67	<i>protein associated with cell proliferation</i>

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I	14
1.1	APRESENTAÇÃO.....	16
1.2	JUSTIFICATIVA	18
1.3	OBJETIVOS.....	19
1.3.1	Objetivo geral.....	19
1.3.2	Objetivos específicos	19
1.4	REFERÊNCIAS.....	20
2	CAPÍTULO II	21
2.1	ARTIGO DE REVISÃO	22
3	CAPÍTULO III	45
3.1	ARTIGO ORIGINAL	46
4	CAPÍTULO IV	65
4.1	CONCLUSÃO	67

1 CAPÍTULO I

APRESENTAÇÃO

JUSTIFICATIVA

OBJETIVOS

REFERÊNCIAS

1.1 APRESENTAÇÃO

Vírus são estruturas proteicas consideradas parasitas intracelulares obrigatórios, portanto somente dentro de uma célula conseguem se reproduzir e disseminar. Existem diferentes tipos de vírus capazes de infectar diferentes seres vivos. Os vírus que causam doenças em humanos são de grande importância clínica, pois podem causar epidemias e pandemias levando à morte de milhares de pessoas. Alguns possuem grande capacidade mutagênica [1]. Contudo quando um vírus infecta o organismo humano, o mesmo possui um sistema de defesa capaz de controlar essa infecção. A principal resposta do sistema imunológico contra vírus consiste em células T CD8+ citotóxicas capazes de destruir células infectadas com o vírus, e também as células B, que produzem anticorpos neutralizantes que impedem sua adsorção a células alvo, ambas as respostas necessitam de células auxiliares T CD4+. A produção de anticorpos necessita de um tipo específico de células auxiliares, as células T CD4+ foliculares (TFH), tendo como principal função ajudar às células B. A resposta de memória também é fundamental para combater as infecções que se sucedem, de maneira mais rápida e eficiente [2].

O Vírus sincicial respiratório (RSV) é o responsável por cerca de três milhões de hospitalizações e de 66 mil mortes por ano de recém-nascidos e crianças de até dois anos de idade. A infecção mais grave ocorre em lactentes, com agressão no trato respiratório inferior, causando pneumonia e bronqueolite, sendo a infecção viral mais recorrente em recém-nascidos [3]. As tentativas de desenvolver uma vacina não conseguiram eficácia contra subseqüentes reinfecções, porém [4, 5] diminuiu o risco de doenças respiratórias graves na fase adulta. Isso demonstra que estudos com este vírus são necessários para melhor compreender sua ação no organismo.

A principal resposta imunológica contra vírus consiste na ação de anticorpos neutralizantes e células T CD8+ citotóxicas, porém ambas as respostas necessitam de células T auxiliares para uma função eficiente [6]. Contudo, quando o RSV gera a ativação de células T, as mesmas falham em manter a resposta de células T CD8+ eficientemente, pois sua ativação é bloqueada quando o vírus induz moléculas de inibição como PD-L1 em células dendríticas [7]. O mesmo ocorre com formação de anticorpos de alta afinidade, porque as células B necessitam de sinais provenientes

das células T auxiliares foliculares, através da produção de citocinas (IL-6 e IL-21) e outros sinais moleculares. As células TFH também são fundamentais no desenvolvimento dos centros germinativos [8-10]. Porém, já foi observado que o RSV diminui a resposta T e B, através da indução de PD-L1 em células B, levando à perda de função das TFH. Esse é um dos mecanismos de escape do vírus HIV [11]. O HIV diminui a função das células B de maneira indireta, por levar as células T PD-1+ à anergia, diminuindo a resposta contra o vírus e aumentando da replicação viral. Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho foi investigar a influência do vírus sincicial respiratório sobre as células do sistema imunológico, principalmente as células T CD4+ do fenótipo folicular. Investigamos aqui mecanismos pelos quais o vírus inibe a geração de uma resposta humoral ineficiente.

1.2 JUSTIFICATIVA

Atualmente não existem revisões na literatura sobre o papel das células T CD4+ do fenótipo folicular em infecções virais. Portanto, na primeira parte deste trabalho foi realizada uma pesquisa reunindo todo material encontrando em um único artigo de revisão. Na segunda parte foi desenvolvido um artigo original sobre o Vírus Sincicial Respiratório, que infecta crianças de até dois anos de idade, levando a cerca de três milhões de hospitalizações e 66 mil mortes por ano de recém-nascidos. Não existem pesquisas conclusivas sobre o real motivo da falha na formação de anticorpos de alta afinidade para neutralização do vírus, então hipotetizamos que o RSV consegue escapar do sistema imune ao impedir a geração de uma memória anti-viral eficiente. O entendimento dos mecanismos pelos quais isso ocorre será fundamental para o desenvolvimento de novas terapias, utilizando as células TFH como o centro da resolução contra o dano pulmonar causado pela infecção por vírus sincicial respiratório em crianças.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Entender o papel das células TFH nas infecções virais

1.3.2 Objetivos específicos

Elaborar uma revisão dos dados existentes na literatura que envolviam a resposta de células TFH perante a infecções virais.

Elaborar um artigo original desvendando mecanismos pelo qual o RSV inibe a geração de uma resposta humoral eficiente.

1.4 REFERÊNCIAS

1. Rouse, T.B and Sehrawat, S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nat Ver Immunol.* 2010. v. 10, p. 514–526.
 2. Montfoort, N. et al. Understanding MHC class I presentation of viral antigens by human dendritic cells as a basis for rational design of therapeutic vaccines. *F Immunol.* 2014. v. 5, p. 1-14.
 3. Hall, C B, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med.* 2009. v. 360, p. 588-598.
 4. Glezen, W P, et al. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child.* 1986, v. 140, p. 543- 546.
 5. Henderson, F W, et al. Respiratory syncytial virus infections, reinfections and immunity: a prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med.* 1979, v. 300, p. 530- 534.
 6. Robert, N J, et al. Interleukin 1 and interleukin 1 inhibitor production by human macrophages exposed to influenza virus or respiratory syncytial virus: respiratory syncytial virus is a potent inducer or inhibitor activity. *J Exp Med.* 1986, v. 163, p. 511-519.
 7. Yao, S. et al. Control of pathogenic effector T-cell activities in situ by PD-L1 expression on respiratory inflammatory dendritic cells during respiratory syncytial virus infection. *Mucosal Immunology.* 2014.
 8. Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Ver. Immunol.* 2011. v. 29, p. 621-663.
 9. Eto, D. et al. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *Plos one.* 2011. v. 6, p. 3.
 10. Kim, C.H. et al. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J. Exp. Med.* 2001. v. 193, p. 1373–1381.
 11. Cubas, R A. et al. Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nature medicine.* 2013. v. 19, p. 494-499.
-