



Universidade de Brasília- UnB
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular
Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro

**Validação do transcriptoma por meio da análise de expressão
de genes de células dendríticas na presença de *Trypanosoma cruzi***

AMANDA PEREIRA ROCHA

Brasília – DF

2018

AMANDA PEREIRA ROCHA

Validação do transcriptoma por meio da análise de expressão de genes de células dendríticas na presença de *Trypanosoma cruzi*

Orientador: Prof. Dr. Jaime Martins de Santana

Co-orientadora: Prof. Dr. Izabela Marques Dourado Bastos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília – Faculdade de Medicina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília –DF

2018

“Knowledge is simply a kind of fuel; it needs the motor of understanding to convert it into power.”

John Wyndham

Agradecimentos

Gostaria de agradecer imensamente ao meu orientador, professor Jaime Santana, pela oportunidade que me deu de trabalhar em seu laboratório com sua equipe, por ter acreditado na minha capacidade e por ter me guiado sempre que precisei. Sou muito grata por ter colaborado tanto com meu crescimento científico, acadêmico e pessoal.

À minha orientadora, professora Izabela Dourado, por ser tão atenciosa, paciente e solícita e ter me ajudado tanto ao longo desse trajeto. Obrigada pelas orientações, pelos conselhos, pelas broncas e por dividir sua imensa experiência profissional comigo.

Aos demais professores que me acompanharem ao longo dessa jornada, prof. Carla Nunes, Flávia Nadder, Beatriz Dolabela, Cecília Favali, Marcelo Brígido e Ildinete Pereira que sempre se mostraram tão disposta e sempre me auxiliavam quando precisei e que contribuíram tanto para o meu desenvolvimento profissional.

À Natalia Gil, que foi durante todo esse tempo minha orientadora, colega e irmã na batalha diária dos experimentos. Juntas compartilhamos o trabalho, o cansaço, as frustrações e também as conquistas. Agradeço muito os seus ensinamentos e todo tempo e energia dedicados à mim, todo conhecimento que adquiri nesse período é graças a você.

À todos os meus colegas de laboratório por terem me acolhido com tanto afeto e terem permitido me sentir em uma família novamente: Camila, Milene, Débora, Bia, Marta, Grazi, Carol, Luz, Kaio, Lais, Natalia e todos os demais, poder trabalhar com vocês é um prazer enorme.

Em especial à Clênia Azevedo por ser uma pessoa tão incrível e sempre me auxiliar quando mais precisei e hoje ter se tornado minha inspiração como cientista, como mulher, como cidadã e como ser humano. À Yanna por todo o apoio prestado e pelo seu carinho, principalmente por ser responsável por todos os “*T. cruzi*” presentes neste trabalho estarem em itálico e escritos corretamente. Ao Allan, companheiro de tantos anos ao longo da graduação e na pós-graduação e por ser responsável por ter me inserido nesse laboratório e conhecer a área e o projeto que me fascinaram. Ao Arthur por me dar suporte nas horas mais sufocantes e ser tão compreensível. À Marcelle por ser companheira nas noites, madrugadas, finais de semana e feriados, além da sua vasta experiência compartilhada e por ser uma pessoa admirável.

Ao Alessandro e à Heloísa por terem sempre tempo para ouvir minhas reclamações, tempo para ler meus trabalhos e paciência para me suportar quando tudo está um caos.

Aos colegas de outros laboratórios que também foram imprescindíveis para dar todo suporte que precisei e me ajudarem sempre que possível: Agnelo, Agenor, Sarah, Isabel Souza, Renata, Lucas, Gabriel Pasquareli. Este trabalho não seria possível sem vocês.

Ao meu pai, minha mãe e minha irmã, que apesar de todos os impasses, sempre estiveram ao meu lado e puderam compartilhar todas as alegrias e derrocadas junto comigo. Aos meus amigos que estiveram sempre presente nessa jornada: Carlos Eduardo, Rhayza, Natália Aguiar, mesmo eu os abandonando diversas vezes. Obrigada pela compreensão e por não desistirem de mim e sempre estarem tão dispostos a me ajudarem. Sou imensamente grata por me reerguerem todas as vezes que necessitei, estarem sempre dispostos a me ajudar e principalmente por confiarem tanto na minha capacidade, o que mais me impulsionou nas dificuldades foi saber que vocês estariam lá para torcer e vibrar junto comigo.

Aos órgãos de fomento que permitiram realizar esse trabalho: CAPES, CNPq e FAP-DF e ao programa de pós graduação em patologia molecular, por todo o auxílio prestado.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: *antigen presenting cell* (células apresentadoras de antígenos)

CD1a: Molécula CD1a

CD11c: *Integrin Subunit Alpha* (subunidade alfa integrina)

CD14: molécula CD14

CXCL9: Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (ligante 9 de quimiocina com motivo C-X-C)

DAMPs: damage associated molecular partners (padrões associados à dano) DCs: Células dendríticas

DC-SIGN: *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

FSC: *Forward scatter*

GIPLs: Glicosilinositol fosfato

GM-CSF: Fator estimular de colônias de macrófagos e granulócitos

HLA: Antígeno leucocitário humano

iDCs: células dendríticas imaturas

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina IL-12p70

iNOS: Sintase óxido nítrico induzível

mDCs: Células dendríticas maduras.

MHC I/ II: Complexo principal de histocompatibilidade de classe I/ II

NF- κ B: Fator nuclear κ B

NO: *nitric oxide* (óxido nítrico)

PAMPs: Padrões moleculares associados ao patógeno

PBMCs: *periferic blood mononuclear cells* (células mononucleares do sangue periférico)

PCR: *Polymerase chain Reaction* (reação em cadeia de polymerase)

Q-PCR: *Real Time PCR (PCR em tempo real)*

RIN: *RNA Integrity Number*

RNS: *reactive nitrogen species* (espécies reativas de nitrogênio)

ROS: *reactive oxygen species* (espécies reativas do oxigênio)

SFB: Soro Fetal bovino

SSC: *Side scatter*

Th1: (*T helper type 1*)T auxiliador tipo 1

Th2: (*T helper type 2*)T auxiliador tipo 2

TLR: *Toll like receptors* (receptores do tipo *tol*)

TMs: tripomastigotas metacíclicos

TNF: Fator de necrose tumoral alfa (fator de necrose tumorl)

TNFSF18: *Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 18* (ligante da superfamília de fator necrose tumoral, membro 18)

USP18: *ubiquitin specific peptidase* (peptidase específica de ubiquitina 18)

Resumo:

A doença de Chagas afeta cerca de 8 milhões de pessoas ao redor do mundo e cerca de um terço dessas desenvolve as formas graves da doença, sendo o maior caso de cardiomiopatia causada na América Latina e também está entre o maior causador de mortes dentro das doenças tropicais negligenciadas. Mesmo sendo conhecida há 111 anos, os mecanismos que desenvolvem a patologia continuam um enigma, principalmente se tratando de estudos em humanos. Apesar disso, hoje é indiscutível o papel da resposta imune do hospedeiro frente ao agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi*, no controle da infecção ou na sua disseminação, além dos mecanismos desencadeados na fase inicial da doença serem determinantes para o estabelecimento de uma fase crônica. Uma das primeiras células imunes a interagir com este patógeno são as células dendríticas (DCs), as quais são responsáveis por intermediar uma resposta imune não específica para uma específica e que possui uma função determinante dentro da patologia.. Este trabalho então visa uma análise da resposta inicial que é desencadeada em DCs frente ao *T. cruzi* a partir da validação de genes que foram vistos como diferencialmente expressos no transcriptoma realizado da interação inicial ente DCs e *T. cruzi* após 12h. Alguns desse genes modulados diferencialmente sob ação do patógeno foram o ligante da superfamília de fator necrose tumoral, membro 18 (TNFSF18), ligante 9 de quimiocina com motivo C-X-C (CXCL9) e peptidase específica de ubiquitina 18 (USP18), que possuíram sua expressão aumentada sob infecção. Essa superexpressão constatada por RNA-seq, foi confirmada neste estudo através de RT-qPCR após um processo de padronização e escolha de critérios rigorosos para garantir a qualidade da interpretação dos dados e poder comparar com veracidade os dados provenientes de duas metodologias distintas. Ficou comprovado então que a expressão gênica dessa interação patógeno-hospedeiro poderia ser atestada por RT-qPCR, viabilizando estudos posteriores de outros genes e também em uma população amostral maior, permitindo assim analisar a resposta inicial de forma mais abrangente. Isso tornará possível garimpar genes que tenham um papel fundamental na infecção e estudá-los com mais profundidade. Também é importante ressaltar que não necessariamente um aumento de expressão de transcrito reflete no nível proteico, como foi aferido neste trabalho ao mensurar algumas citocinas como IFN- γ , TNF, IL-6, IL-4, IL-10, IL-2 e IL-12, em que houve aumento de expressão de TNF sob infecção que condiz com seu nível de transcrito detectado, porém IL-10 que também foi supregulada a nível transcricional, não possuía o mesmo comportamento a nível proteico, tendo uma regulação importante e decisiva na expressão pelo hospedeiro

Abstract

Chagas disease affects around 8 million people worldwide and about one-third of them develops severe forms of the disease, being the largest cause of cardiomyopathy caused in Latin America and also among the largest cause of death within neglected tropical diseases. Even though it has been known for 111 years, the mechanisms that develop pathology remain an enigma, especially when it comes to studies in humans. Despite this, the role of the host immune response to the etiologic agent, *Trypanosoma cruzi*, in the control of the infection or its dissemination is indisputable, besides the mechanisms triggered in the initial phase of the disease are determinant for the establishment of a chronic phase. One of the first immune cells to interact with this pathogen is the dendritic cells (DCs), which are responsible for being a mediator between a less specific immune response to a more specific and that has a determining function within the pathology. This work then aims an analysis of the initial response that is triggered in DCs against *T. cruzi* from a transcriptome performed from the initial interaction between DCs and *T. cruzi* after 12h. Some of these genes differentially modulated under the action of the pathogen were the tumor necrosis factor, member 18 (TNFSF18), CXC (CXCL9) motif chemokine ligand 9 and ubiquitin 18 specific peptidase (USP18), which had their expression considerably increased after infection. This overexpression verified by RNA-seq was confirmed in this study through RT-qPCR after a process of standardization and selection of strict criteria to guarantee the quality of data interpretation and to be able to compare data from two different methodologies. It was then proved that the differential gene expression obtained in the transcriptome, a robust but more expensive and inaccessible technique, could be attested by RT-qPCR, allowing further studies of other genes and also in a larger sample population, thus allowing an analysis of the initial response in DCs by the T, I crossed more comprehensively in order to mine genes that have a fundamental role in the infection and study them in more depth. It is also important to note that not necessarily an increase in transcript expression reflects at the protein level, as measured in this work when measuring some cytokines such as IFN- γ , TNF, IL-6, IL-4, IL-10, IL-2 and IL-12, in which there was an increase in expression of TNF under infection that matches its detected level of transcript, but IL-10, which was also upregulated at the transcriptional level, did not have the same behavior at the protein level, having an important and decisive regulation in expression by the host

Sumário

Agradecimentos	iii
Lista de abreviaturas	vi
Resumo	viii
Abstract	ix
1. Introdução	1
1.1. Doença de Chagas	2
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.3. Imunidade contra <i>T. cruzi</i>	6
1.4. Células Dendríticas: APCs mediadoras entre a resposta imune inata e adquirida.....	14
1.5. Resposta das DCs contra patógenos e/ou seus componentes	16
1.6. Contexto atual	19
2. Justificativa	23
3. Objetivo	24
3.1. Etapas	24
4. Metodologia	25
4.1. Manutenção dos parasitos	25
4.2. Metaciclogênese	25
4.3. Obtenção e purificação de monócitos	34
4.4. Diferenciação de monócitos	26
4.5. Infecção de DCs com TMs	26
4.6. Taxa de infecção	26
4.7. Quantificação de citocinas	27
4.8. Extração de RNA	27
4.9. Análise de integridade de RNA	27
4.10. RT-qPCR	27
4.11. Desenho de iniciadores	28
5. Resultados.....	30
5.1. Avaliação de infecção prévia por <i>T. cruzi</i> dos doadores.....	30
5.2. Confirmação de uso de cepa CL Brener nos ensaios.....	30
5.3. Eficiência de metaciclogênese.....	35
5.4. Eficiência da purificação de monócitos	35
5.5. Diferenciação de monócito em DCs	38
5.6. Taxa de infecção	40
5.7. Escolha de DEGs para validação.....	44
5.8. Desenho e padronização de iniciadores para amplificação de genes selecionados	47
5.9. Estratégia de validação para DEGs	56

5.10. Testes de concentração inicial de RNA	57
5.11. Nova análise transcriptômica.....	61
5.12. Validação de DEGs.....	63
5.13. Quantificação de citocinas	67
6. Discussão.....	70
7. Conclusão.....	79
8. Referências bibliográficas.....	80
9. Material suplementar	105

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como uma das 13 doenças tropicais negligenciadas mais importantes, a qual está entre as que possuem maior taxa de mortalidade (Hotez, 2007).

A infecção é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e estabelece-se de forma clássica através do vetor, os insetos da família Reduviidae e da subfamília Triatominae, onde formas do parasita se encontram nas fezes destes insetos e são liberadas durante o repasto sanguíneo; caso as fezes contaminadas entrem em contato com a ferida causada pela picada, uma ferida pré-existente ou até mesmo em mucosas, o *T. cruzi* consegue infectar seu hospedeiro (Chagas, 1909). Mas há também outros meios de transmissão como através de transfusões sanguíneas e doações de órgãos, de forma congênita, e também via oral, através da ingestão de alimentos contaminados, como caldo-de-cana e açaí, este último sendo responsável por surtos de infecções agudas em regiões sem a presença de vetores (Rassi Jr, Rassi & Marin-Neto, 2010).

Devido aos grandes programas de controle vetorial e varredura rigorosa nos bancos de sangue, a transmissão zoonótica teve uma redução drástica, porém ainda sendo uma das principais vias de transmissão em áreas endêmicas e também tem tornado raro os casos de contaminação através de transfusões sanguíneas. Isso fez com que infecções orais tenham sido mais frequentes em áreas não-endêmicas, que devido a alta carga parasitária, tem sido relacionado com casos mais graves da doença (Rassi Jr, Rassi & Marin-Neto, 2010; Eickhoff, 2013 e Fiocruz, 2015).

Estima-se que cerca de 8 milhões de pessoas atualmente estejam infectadas ao redor do mundo (WHO,2018 e CDC, 2018) e que 36.800 novos casos surjam anualmente (Morilo et al, 2015), além de ser responsável por cerca de 10.000 mortes anuais. Os dados atuais revelam que aproximadamente 25 milhões de pessoas vivem em áreas de risco. (WHO, 2018).

A patologia é endêmica da América Latina e apesar de se concentrar majoritariamente em 21 países dessa região(WHO, 2017), esta enfermidade já se espalhou pelo globo, havendo um número cada vez maior e crescente de casos em outros países em que não se registrava antes a presença da doença. Este quadro epidemiológico atual se deve pela transmissão doméstica via vetor nas populações endêmicas ao longo dos anos, ao grande êxodo rural que ocorreu nas últimas décadas (Bern,2015) e também ao grande fluxo migratório que houve nas últimas décadas (Coura & Viñas, 2010, Schmunis, 2007 e Andrade, Gollob & Dutra, 2014.).

O maior número de casos de pessoas infectadas em países não-endêmicos são os Estados Unidos, com cerca de 300 mil casos, seguida pela Espanha, onde são os destinos mais comuns dos imigrantes que habitam

áreas de risco (Rassi Jr, Rassi e Marin-Neto, 2010), mas há relatos em outros países como Japão, Austrália e outras regiões da Europa (Coura & Viñas, 2010; Clayton, 2010 e Bonney, 2014).

A enfermidade apresenta duas fases bem discerníveis. A fase aguda dura de 6 a 8 semanas (WHO, 2002) e é caracterizada por ser assintomática na maioria dos casos ou pelos pacientes apresentarem sintomas brandos e inespecíficos como diarreia, calafrios, sonolência (Bonney & Engman, 2015), febre, mal-estar, hepatoesplenomegalia, linfocitose. O sinal mais perceptível é quando há inchaço no local de entrada do parasito (Bern, 2015), desencadeado por um processo inflamatório, denominado como chagoma ou se ocorrer nas mucosas do olho acarretando um edema preiorbital, recebe a denominação de sinal de Romana (Tanowitz, 1992 e Bern, 2015), que podem ocorrer 1 a 2 semanas após a exposição com o patógeno (Rassi Jr, Rassi e Marin-Neto, 2010).

A maioria dos casos não são detectados por terem manifestações subclínicas e por serem constatados apenas microscopicamente pela parasitemia. Cerca de 1% dos casos desenvolvem manifestações severas, devido a miocardite ou meningoencefalite (Bern, 2015 e Bonney & Engman, 2015). Mas, essas estatísticas divergem quando se tratam de infecção via oral, onde há aumento da morbidade e mortalidade (Bern, 2015 e Bonney & Engman, 2015). Grande parte dos casos, cerca de 60 a 70% não irá desenvolver manifestações clínicas aparentes, permanecendo na forma indeterminada da doença, onde possuem exame sorológico positivo para anticorpos e resultados normais de electrocardiograma (ECG) e radiológicos do peito, cólon, e esôfago (Rassi Jr, Rassi e Marin-Neto, 2010).

Por volta de 30 a 40% dos pacientes irão desenvolver a fase crônica da doença, o qual é caracterizada por anomalias cardíacas e/ou digestivas, onde pode surgir quadros clínicos como cardiomegalia, megaesôfagos e megacólon e se desenvolve em um período muito variável, de 10 a 30 anos após exposição com o patógeno e pode perdurar durante toda a vida do indivíduo (Rassi Jr, Rassi e Marin-Neto, 2010; Bern, 2015 & revisado em Bonney & Engman, 2015). Pessoas nessa fase ficam susceptíveis a acidente vascular cerebral (AVC) e outras causas de tromboembolismos por causa da formação de trombos, principalmente no ventrículo esquerdo ou aneurisma (Bern, 2015) e podem vir a óbito devido a arritmias ou falhas cardíacas (WHO, 2015).

A doença de Chagas é uma causa importante de morte prematura e um grande problema de saúde pública por causa do seu efeito incapacitante e mortalidade considerável, com taxas de mortalidade de 10 anos variando de >10% a <80%, dependendo do dano cardíaco (WHO, 2015). Com o alastramento da patologia das regiões rurais para zonas urbanas e também pela imigração para outras áreas, fez com que a doença de Chagas se torna um importante problema médico e social (Coura & Viñas, 2010) e também acarretando um grande problema econômico, atingindo adultos jovens economicamente ativos principalmente na América Latina (Moncayo, 2009).

1.2. *TRYPANOSOMA CRUZI*

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, pertencente ao filo Sarcomastigophora, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* e subgênero *Schizotrypanum* (Martins et al, 2012). Este patógeno é caracterizado por possuir um flagelo e uma mitocôndria única contendo DNA denominado de cinetoplasto (de Lana, Marques & Machado, 2010).

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo, apresentando diversos estágios distintos, sendo que o gênero *Trypanosoma* possui mais estágios do que qualquer outro dentro dos Trypanosomatidae (Hoare & Wallace, 1966), que são classificados quanto a morfologia do corpo celular, a posição e formato do cinetoplasto e de onde emerge o flagelo (de Lana, Marques & Machado, 2010).

Entre as várias formas que podem apresentar, três são classificadas como as principais, que são apresentadas na figura 1. A forma epimastigota está presente no trato gastrointestinal do inseto vetor, que é capaz de se replicar mas não de infectar células mamíferas. A forma tripomastigota está presente no final do trato gastrointestinal e nas fezes do inseto (chamado de tripomastigota metacíclico) e também na corrente sanguínea do hospedeiro (chamado de tripomastigota sanguíneo) é infectiva, porém não replicativa. Já a forma amastigota é intracelular, encontrada apenas no organismo hospedeiro, e que é apta a se replicar dentro das células (de Lana, Marques & Machado, 2010; revisão em Tyler & Engman, 2001).

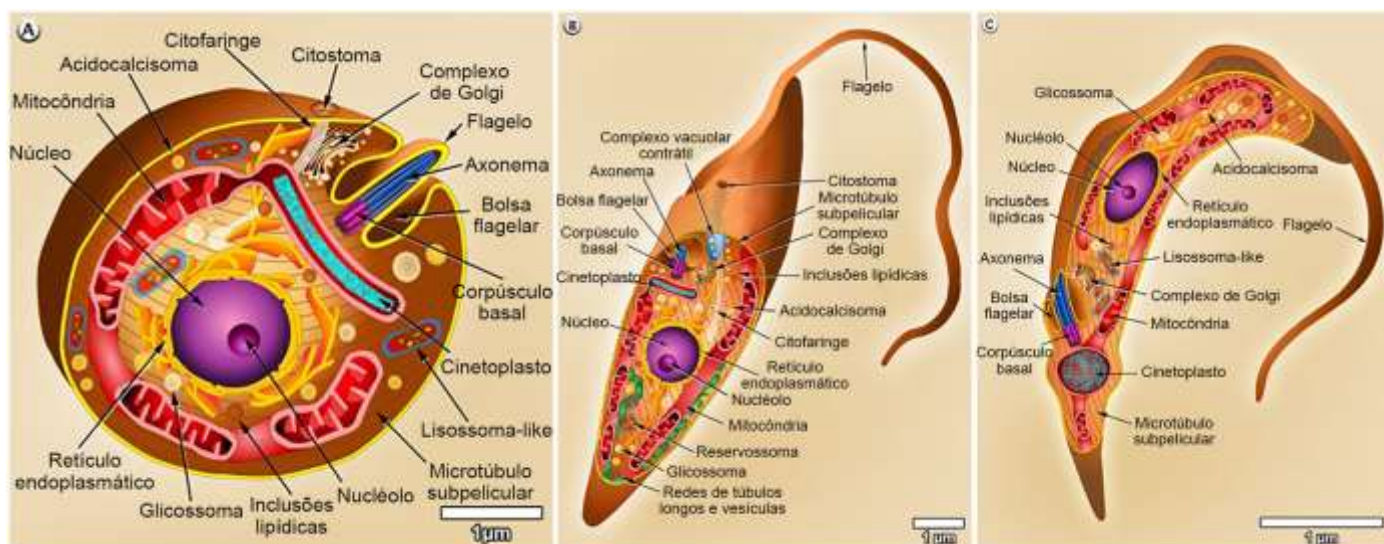


Figura 1. Representação esquemática de formas de vida distintas que o *T. cruzi* pode adquirir ao longo do ciclo, tanto no vetor quanto no hospedeiro: epimastigota, tripomastigota (representando tanto forma metacíclica quanto sanguínea) e amastigota, respectivamente. (Adaptado de Teixeira et al., 2012)

O ciclo de vida do *T. cruzi* no vetor se inicia quando o inseto hematófago pica um organismo mamífero infectado e suga seu sangue contendo as formas tripomastigotas sanguíneas. Essas formas tripomastigotas ao

alcançarem o intestino do barbeiro se diferenciam para epimastigotas, devido a mudanças das condições do microambiente, onde passa a se replicar. Esses se aderem a cutícula da parede gastrointestinal e quando alcançam o final do trato gastrointestinal, desencadeia um processo de diferenciação denominado metaciclogênese, em que as formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (Bonaldo et al, 1988; revisado em Tyler & Engman, 2001), diferenciação desencadeada devido a um estresse nutricional (Camargo, 1964), que serão liberados nas fezes durante o próximo repasto sanguíneo.

Já o ciclo de vida no hospedeiro mamífero inicia-se quando um triatomíneo infectado libera suas fezes contaminadas durante a hematofagia do indivíduo mamífero. Caso as fezes entrem em contato com mucosa, uma ruptura na pele ou com a própria lesão deixada pela picada, o parasito consegue entrar na corrente sanguínea e pode infectar qualquer célula nucleada (Tyler & Engman, 2001). Quando este patógeno entra em contato com uma célula, adere-se à sua membrana e desencadeia um processo de internalização criando um vacúolo parasitóforo, onde lisossomos irão se fundir descarregando seu conteúdo de enzimas digestivas e acidificando o vacúolo, mas o parasito não é destruído e inicia sua diferenciação para a forma amastigota, conseguindo assim evadir para o citoplasma, onde finaliza sua diferenciação e inicia a seu ciclo replicativo intracelular. Depois de vários ciclos de replicação quando a célula infectada está abarrotada de parasitos, as formas amastigotas se diferenciam novamente em tripomastigotas e a motilidade constante de seus flagelos rompem a células liberando essas formas na corrente sanguínea, permitindo que esses tripomastigotas sanguíneos possam invadir novas células (Bern, 2015).

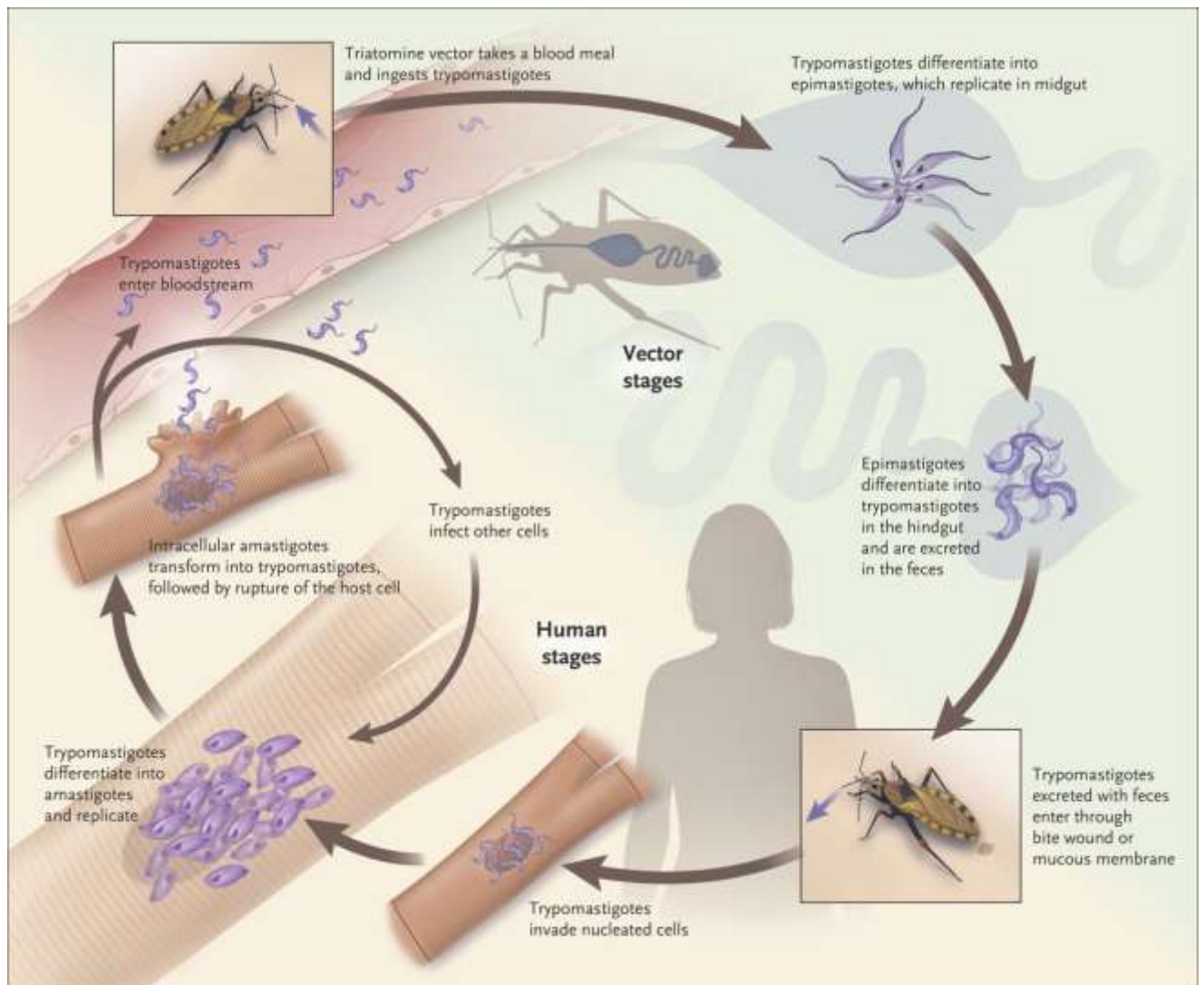


Figura 2. Ciclo de vida do *T. cruzi* e suas diferentes formas no hospedeiro invertebrado e vertebrado ao longo da infecção (Bern, 2015).

Já foram reconhecidas ao longo do tempo, diferenças genéticas e bioquímicas de cepas de *T. cruzi* e que é responsável pela distinção e complexidade do perfil epidemiológico da doença de Chagas, (Zingales et al, 2009), causado tanto por evolução clonal (Tibayrenc et al, 1986) quanto por trocas genéticas entre os parasitas (Sturm & Campbell, 2009), o que foi constatado devido a presença de organismos híbridos no ambiente selvagem. Vários comitês se seguiram desde 1999, a fim de revisar o conhecimento que se tinha até então a cerca dessas variações dentro da espécie do protozoário e definir um sistema para agrupar cepas distintas dentro de grupos que obtivessem características em comum entre elas. O último sistema de classificação foi definido na 2ª reunião satélite em 2009, em que foi estabelecido que as cepas de *T. cruzi* poderiam ser agrupadas em 6 DTUs (*Discret typing units*) (Zingales et al., 2009), que podem ser definidos como conjuntos de linhagens que são geneticamente relacionados entre si do que qualquer outro e que são identificados como em comum a partir de características moleculares, imunológicas e genéticas (Tibayrenc et al, 1986)

1.3. IMUNIDADE CONTRA O *T. CRUZI*

Tendo em vista que a doença de Chagas é uma doença infecciosa, o sistema imunológico do indivíduo infectado possui um papel primordial para o controle do patógeno ou para o sucesso da disseminação e estabelecimento deste. O sistema imunológico é definido como um conjunto de órgãos, células e moléculas específicas que são responsáveis por promover a homeostasia do organismo e agir quando esta é quebrada, acarretado tanto por uma lesão ou pela invasão e ação de organismo e/ou seus componentes que são potencialmente prejudiciais e podem causar dano tecidual, trazendo consequências nocivas e comprometendo a integridade do hospedeiro (Matzinger, 1994 e Lipscomb e Masten, 2002). Este sistema se desenvolveu ao longo da evolução devido a pressão seletiva ocasionada por micro-organismos infecciosos, o que fez com que os hospedeiros desenvolvessem mecanismos de defesa diversos contra patógenos, a fim de controlá-los e reestabelecer o equilíbrio do indivíduo (Janeway & Medzhitov, 1997).

Os tripomastigotas possuem diversas moléculas em sua superfície que podem ser reconhecidos por receptores reconhecedores de padrões (PRRs) de células imunes, que reconhecem moléculas conservadas em potenciais agentes patogênicos. Isso permite o seu reconhecimento e sua internalização por essas e conseqüentemente, permitindo a indução de uma resposta frente ao patógeno e/ou os utilizando para ganhar acesso ao interior das células. Dentro dos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) expressos pelos tripomastigotas, se encontram um conjunto de glicoproteínas presente na sua superfície, com as mais diversas funções. A maioria dessas glicoproteínas possuem um motivo de glicosilfosfatidionositol (GPI), sendo uma âncora para permitir o atracamento dessas proteínas à superfície, permitindo a sua clivagem e liberação do grupamento da cabeça, tendo implicações em mecanismos biológicos (Villalta et al., 1998; Gaulton & Pratt, 1994).

Há também a presença de mucinas (Di Noia et al., 1996) e glicoproteínas diversas (Schenkman, Diaz e Nussenzweig, 1991), como a trans-sialidase (Andrews e Whittlow, 1989) que são responsáveis por se atracar a células hospedeiras e são detectadas por essas, desencadeando sua internalização (De Pablos e Osuna, 2012 e Bartholomeu et al., 2014). Outras moléculas do *T. cruzi* também podem ser reconhecidas por receptores do tipo toll (TLRs), como glicoinositolfosfolipideo (GIPL), assim como seu DNA e RNA, que são identificados pelo TLR9 e TLR7, respectivamente

Glicoproteínas do tipo mucina ancoradas a GPI, assim apenas como GPI derivadas do *T. cruzi* podem ser reconhecidas pelo TLR2 (Camargo et al., 1997 e Almeida et al., 2000), estimulando a produção de CCL2 e assim induzir recrutamento leucocitário para o sítio de infecção quando há administração de IFN- γ em conjunto (Coelho et al., 2002), além de induzir a produção de IL-12, (responsável pela polarização de linfócitos Th1), TNF- α (Camargo et al., 1997) e óxido nítrico (NO) (Campos et al., 2004).

Apesar do reconhecimento dessas moléculas de *T. cruzi* reconhecidas por TLR2 sinalizar uma resposta positiva e adequada contra este patógeno, modelos *in vivo* mostraram que a ausência desse receptor gerava uma maior produção de IFN- γ , sugerindo que uma imunoregulação deste receptor pelo parasita para atrasar a resposta contra este (Campos et al., 2004 e Ropert & Gazzineli, 2004). Constatou-se também que o efeito regulatório atrelado a TLR2 poderia depender do tipo de célula imune que portava o receptor, visto que seu estímulo acarretava em produção de TNF- α por macrófagos, mas impedia a produção de IL-12p40 em DCs (Gravina et al., 2013) mostrando seu efeito regulatório sobre esse tipo celular, e que, portanto, a resposta poderia variar dependendo do reconhecimento dominante por um tipo celular específico.

Foi identificado também que o TLR9 era capaz de ser ativado ao detectar ilhas CpG não metiladas provenientes do DNA de *T. cruzi* (presentes em grande quantidade em regiões do genoma que codificam mucinas, proteínas associadas a mucinas (MASPs) e trans-sialidases (Bartholomeu et al., 2008) e desencadear produção de citocinas em APCs (Bafica et al., 2006) e que teria um papel crucial na infecção, pois a sua ausência acarretava em elevada parasitemia e sobrevivência diminuída dos animais. O efeito protetivo desencadeado por TLR9 poderia ser justificado pela translocação de TLR9 para os lisossomos durante a captura do parasito por DCs e ativação aumentada da via do NF- κ B refletindo na produção elevada de citocinas pró-inflamatória (Bartholomeu et al., 2008)

A importância de proteínas acopladoras que eram recrutadas para as regiões citoplasmáticas dos TLRs quando estes eram ativados e responsável por enviar a sinalização para culminar nas suas ações subsequentes, também foi atestada. Animais deficientes na proteína acopladora de resposta primária de diferenciação moleóide 88 (MyD88), mostraram uma parasitemia equivalente a animais deficientes em TLR2 e TLR9, mas com uma mortalidade mais acentuada (Bafica et al., 2006), sugerindo assim que outros TLRs poderiam estar envolvidos no reconhecimento e na sinalização via MyD88, mas esta seria crucial para o desenvolvimento de uma resposta imune frente ao *T. cruzi* (Campos et al., 2004). Além disso, animais deficientes em MyD88 apresentaram um comprometimento na produção de citocinas como IL-12 e IFN- γ e produção de espécies reativas em nitrogênio (Campos et al., 2004), ressaltando a importância dessa proteína no controle do *T. cruzi* e da detecção dos seus componentes pelos TLRs.

TLR4 também mostrou ser um receptor importante na detecção deste agente infeccioso, devido a sua falta acarretar em uma alta parasitemia e mortalidade precoce de animais sob infecção do *T. cruzi* juntamente com a presença de MD-2 funcional e ativação da via do NF- κ B (Oliveira et al., 2004)

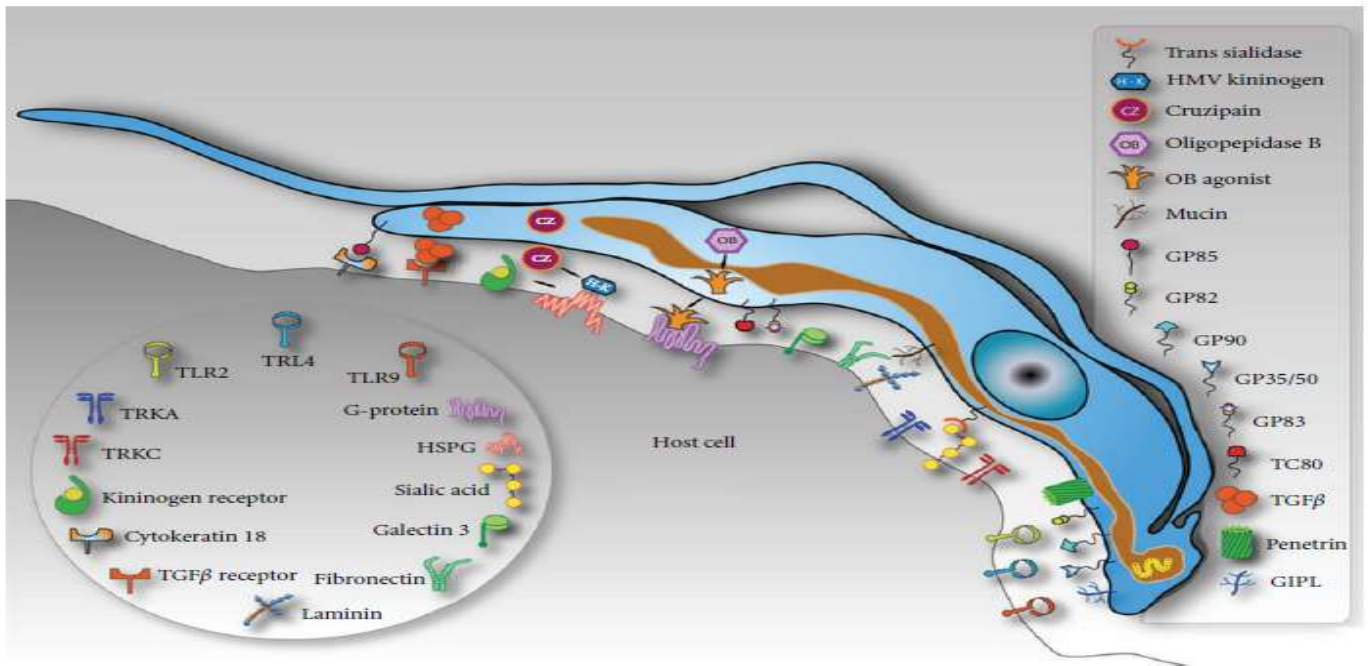


Figura 3: PAMPs presentes na superfície do *T. cruzi* e seus respectivos receptores que os reconhecem na superfície da célula do hospedeiro (de Souza et al., 2010).

Após a internalização do parasito na célula hospedeira, este então fica contido em um vacúolo denominado de vacúolo parasitóforo. Algumas proteínas quando detectadas nesse endossomo podem funcionar como marcadores para determinar seu estágio pré-formado, como Rab5. Este vacúolo então sofre um processo de maturação em que ganha novas proteínas para auxiliar em processos posteriores e passa a ser denominado como endossomo tardio, como havendo a substituição de Rab5 por Rab7.

Há então a fusão de lisossomos a este vacúolo que contém enzimas hidrolíticas e descarregam esse material no seu interior que possuem capacidade de digerir uma ampla gama de biomoléculas e se tornam ativas em um pH ácido, em que há a um decaimento de pH (Huotari e Helenius, 2011). A ação dessas enzimas é requisitada afim de degradar o patógeno aprisionado no vacúolo.

Viu-se que a invasão e a contenção do *T. cruzi* em células não fagocíticas era totalmente depende da expressão de dinamina, ao qual sua ausência abolia completamente a sua entrada e que a deficiência nas proteínas Rab5 e Rab7, proteínas existentes nos endossomos precoces e tardios, respectivamente, diminuía significativamente a taxa de infecção dessas células, (Wilkowsky et al., 2002), mostrando que o parasito necessitava da formação de um endossomo precoce para entrada e subsequentemente a maturação desse endossomo para efetivar uma infecção.

Foi observado que os lisossomos também poderiam ter um papel na entrada desses agentes infecciosos (Tardieux, Nathanso & Andrews, 1992 e Rodriguez et al., 1996) quando se fundiam a membrana plasmática

facilitando sua entrada, visto que o impedimento da fusão de lisossomos a membrana diminuía sua invasão (Woosley & Burleigh, 2004)

A fusão de lisossomos e a consequente liberação de seu material dentro do vacúolo parasitóforo (Carvalho & de Souza, 1989) promoveria a degradação e consequente morte do patógeno aprisionado neste compartimento, entretando, este parasito é dotado de uma maquinaria eficaz que o permite não ser atingido pelas enzimas hidrolíticas, possuindo enzimas antioxidantes em sua superfície que contrapõe a ação das enzimas do hospedeiro, permitindo sua sobrevivência dentro de um ambiente altamente danoso (Piacenza et al., 2008).

A fusão de lisossomos ao vacúolo parasitóforo é um mecanismo imprescindível para o sucesso da infecção pelo *T. cruzi*, pois além de permitir a retenção dos tripomastigotas altamente móveis no interior da célula (Andrade & Andrews, 2004), também desencadeia a sua diferenciação, iniciando assim sua transformação em amastigota (Cardoso et al., 2016), sua forma replicativa intracelular no hospedeiro mamífero. O microambiente ácido criado então neste vacúolo é crucial para o estabelecimento do *T. cruzi* dentro das células hospedeiras, o que pode ser visto quando é induzido um aumento de pH dentro deste compartimento, inibe o escape deste parasito para o citoplasma (Ley et al., 1990).

Depois disso, o parasito em estágio de transição consegue desestabilizar a membrana do vacúolo parasitóforo (VP), ocasionando a sua quebra e assim permitindo sua consequente evasão para o citoplasma da célula, onde o parasito termina o seu processo de diferenciação em amastigota e agora passa a ser apto a se replicar no interior da célula hospedeira, multiplicando-se sucessivas vezes (Nogueira e Cohn, 1976) até completar todo o citoplasma e diferenciar novamente para tripomastigota, desta vez tripomastigota sanguíneo, onde há lise da célula hospedeira devido ao batimento intenso do flagelo dos parasitos no interior da células, permitindo que estes parasitos consigam infectar outras células e assim estabelecendo uma infecção com sucesso.

Alguns mecanismos já foram especulados e comprovados como sendo responsáveis pelo enfraquecimento e consequente quebra da membrana do vacúolo parasitóforo, permitindo sua saída para o citoplasma. Um deles é referente ao tripomastigota possuir uma proteína que promove a formação de poros nessa membrana e é ativada dependente de um pH ácido. Isso foi constatado ao verificar que sobrenadante de cultura de tripomastigotas induziam citotoxicidade em células quando induzido um pH ácido e detectado nesse sobrenadante uma proteína com reatividade cruzada para anticorpos que detectam o componente do sistema complemento C9, responsável por criar a estrutura que forma poros na membrana. Além disso foi visto que essa proteína conseguia ser detectada no lúmen do vacúolo parasitóforo contendo o parasito (Andrews et al., 1990) e que esta proteína consegue provocar a formação de canais em membranas de células alvo (Andrews e Whittlow, 1989)

Outro mecanismo estudado é referente ao enfraquecimento da membrana do vacúolo parasitóforo mediado pelo sequestro de ácido siálico de proteínas estruturais da membrana, como LAMP1 e LAMP2, que são altamente sialinizadas (Kornfeld e Mellman, 1989 e Albertti et al., 2010), enfraquecendo sua estrutura e tornando mais susceptível à rupturas (Hall et al., 1992). A importância do ácido siálico para manter a integridade da membrana do VP pode ser constatada visto que células com defeito em sialinização facilitam o escape do *T. cruzi* quando infectados por este (Hall et al., 1992). Essa ação é mediada por uma proteína do *T. cruzi* que se torna ativa em pH baixos, denominada trans-sialidases, que teria a função de retirar o ácido siálico de proteínas da membrana e transferir para as mucinas presentes na sua superfície (Schenkman et al., 1993)

Após o estabelecimento de infecção de uma célula, sua replicação e consequente lise da célula quando está sobrecarregada de parasitos, estes então são liberados para o meio extracelular e pode ganhar acesso a corrente sanguínea, conseguindo assim atingir e infectar outras células ao longo do organismo, mas o que também acaba tornando o *T. cruzi* susceptível a ação das proteínas do sistema complemento e sua consequente destruição. Porém o parasito apresenta mecanismos para desativar e/ou bloquear os mais diversos componentes deste sistema (Krettli et al., 1979). Uma proteína importante que permite o *T. cruzi* evadir do complemento e está presente na sua superfície é a calreticulina (Aguillon et al., 2000), que pode impedir o reconhecimento de carboidratos presente na superfície do patógeno se ligando ao MBL evitando sua ligação as mananas e também pode se ligar a ficolinas impedindo a conversão de C4-C4b (Sosoniuk et al., 2014), além disso após ativação da via clássica do complemento devido a produção de anticorpos contra o *T. cruzi*, a calreticula pode também se ligar a C1 (Ferreira et al., 2004a) e evitar acoplamento de C4 (Valck et al., 2010). Todas essas estratégias mediadas por essa única proteína prejudica as etapas posteriores, impedindo assim a ativação do sistema complemento.

Há a presença de outras proteínas que se ligam a C3b e ou C4b dissociando a formação de C3 convertase como proteína regulatória do complemento (CRP) (Noris et al., 1991 e Beucher & Noris, 2008) e fator de decaimento acelerante de tripomastigota (T-DAF) (Joiner et al., 1988) e muitas outras proteínas que podem intervir na lise do parasito por meio do complemento.

Além de todo o arsenal já citado acima que o *T. cruzi* apresenta para driblar mecanismos diversos da resposta imune do hospedeiro, esse parasito também é caracterizado por desencadear um atraso significativo de uma resposta eficaz contra esse, o que pode ser visto pelo fato do parasito induzir uma expressão gênica pequena em células do hospedeiro em uma fase inicial da infecção quando comparado com outros patógenos (Vaena et al., 2002) e isso reflete diretamente nos mecanismos de evasão do parasito para permitir a sua replicação inicial e também na visualização de uma resposta tardia (Padilla, Simpson & Tarleton, 2009). Isso pode ocorrer devido ao patógeno estar apto a evitar a detecção de seus PAMPs ou imunoregular seu

reconhecimento através da ativação de TLR2 em DCs, que como já foi visto, promove um atraso na resposta (Gravina et al., 2013), além de seu escape do VP para o citoplasma, evitando assim sua destruição e a consequente disponibilidade de DNA ou RNA para ativação de TLR9 e TLR7 (Cardoso et al., 2016), respectivamente, que sua indução se mostraram eficiente para promover uma resposta eficaz frente a este patógeno, permitindo que este não seja sensoriado ou module negativamente a resposta quando é reconhecido pelo hospedeiro.

Fora esse mecanismo, o *T. cruzi* também apresenta um grande repertório de proteínas de superfície altamente polimórficas, acarretando em uma variabilidade antigênica e assim gerando o atraso da montagem de uma resposta adequada (Borst, 2002). O sistema imune então consegue reconhecer e montar uma resposta contra os antígenos comuns presente no patógeno e não consegue identificar aqueles que são mais raros, o que acaba produzindo anticorpos para os antígenos mais comum, que ao longo da infecção serão eliminados e promovendo a seleção de antígenos raros. Isso permite sua disseminação e obrigando a montagem de uma nova resposta específica para estes novos antígenos, evitando a produção de anticorpos específicos e com alta afinidade (Bento et al., 1996 e Bermejo et al., 2011), o que impede uma resposta de linfócitos T (Padilha, Simpson & Tarleton, 2009). Isso resulta em episódios alternados de aumento de parasitemia e sua subsequente resolução quando novos variáveis antigênicas são selecionadas enquanto as antigas são combatidas, que apesar de necessitar de validade experimental mais contundente, já é uma estratégia observada em outros agentes infecciosos (Pays et al., 2004) e o *T. cruzi* apresenta uma grande variedade de antígenos de superfície encontradas em família de multigenes altamente polimórficos (Buscaglia et al., 2002; Bartholomeu et al., 2009 e Dos Santos et al., 2012)

Devido ao fato de o *T. cruzi* ser um patógeno intracelular obrigatório, a resposta mais eficaz contra este tipo de patógeno é aquela mediada por linfócitos T auxiliares do tipo Th1 e linfócitos T citotóxicos, visto que suas ações alvejam a destruição de patógenos que vivem e se replicam no interior das células. Ao infectar células imunes como macrófagos e conseguirem sobreviver em seu interior devido a presença de mecanismos de escapes como evadir da fagocitose e conseguir se estabelecer no meio intracelular, seria necessário o auxílio de linfócitos T CD4+ que reconhecem esse parasito no interior do macrófago infectado e assim o ativassem, aumentando seu poder microbicida para poder aniquilar o patógeno persistente, estratégia utilizada quando há uma infecção persistente e a fagocitose não é suficiente para destruir o patógeno. Esse poder microbicida é caracterizado pelos linfócitos T CD4+, que ao reconhecerem o antígeno apresentado no interior dos macrófagos, induz nestes a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), moléculas altamente tóxicas que serão direcionadas para aniquilar o parasito

Para que esses linfócitos T CD4⁺ possam ser ativados, mostrando que estão sendo requisitados contra um antígeno específico, e subsequentemente diferenciado para o tipo Th1, há a necessidade, além da apresentação de antígenos a essas células e concomitante co-estimulação, de produção de IL-12, a principal citocina envolvida na indução da diferenciação e linfócitos T naive para T efetores em conjunto com outras, com IFN-gama, principalmente por ocasionar a inibição da produção de citocinas envolvidas na diferenciação de Th2 como IL-4 (Seder et al., 1993). IL-12 é principalmente produzida por APCs, como macrófagos mas a sua principal fonte são as DCs, que é estimulada pelo reconhecimento de uma ameaça. A produção de IL-12 é acentuada quando há um coestímulo pelo IFN- γ , uma alça positiva para potencializar essa ação.

A maior fonte de IFN- γ é proveniente de linfócitos Th1 efetores, porém em um momento inicial da infecção, essas células ainda não foram recrutadas, tampouco diferenciada para induzir a produção desta citocina, havendo a necessidade de uma fonte que secrete esta citocina previamente até uma produção mais robusta pelos linfócitos Th1. Assim induz a diferenciação completa de Th1 e está pronta para atuar auxiliando células fagocíticas, através da secreção maciça de IFN- γ , que em células como macrófagos, aumentando sua ação sobre o patógeno.

De fato foi mostrado que a infecção mediada pelo *T. cruzi* induz a produção de IL-12 por macrófagos, e que esta por sua vez, era capaz de estimular a produção de IFN- γ e também mostrou-se sua importância dentro do contexto da infecção em que inibindo a ação de IL-12 isso gerava maior susceptibilidade dos animais, mostrando maior parasitemia e mortalidade (Aliberti et al., 1996). Durante a fase aguda da doença, IFN- γ era majoritariamente produzido por células NK, visto que sua deleção fez tanto em modelos *in vitro* como *in vivo* diminuía drasticamente a mensuração dessa citocina além de tornar os animais que eram resistentes ao parasito em susceptíveis (Cardillo et al., 1996).

Além disso, IFN- γ também tem um papel crucial na contenção do parasito, por induzir a produção NO a partir de L-arginina, destruindo o patógeno no interior de macrófagos, tanto *in vitro* (Gazzinell et al., 1992) como *in vivo* (Reed, 1988; Torrico et al., 1991; Vespa, Cunha e Silva, 1994). A atenuação de IFN- γ acarreta em aumento da parasitemia e da mortalidade (Reed, 1988 e Torrico et al., 1991). Reiterando a importância de IFN- γ dentro da infecção, citocinas que inibiam sua ação como IL-10 (Silva et al., 1992) e TGF- β (Silva, Twardzik & Reed, 1991) promoviam maior susceptibilidade ao parasito.

Foi constatado então que *T. cruzi* induzia a diferenciação de linfócitos em Th1 e suas ações efetoras auxiliavam no controle do parasito, como se tornado depois a principal fonte de IFN- γ que promovia a ativação de macrófagos (Silva et al., 1992 e Torrico et al, 1991) e também promoviam a mudança de isotipo de anticorpos para IGg2a e IgG1 em camundongos (Minoprio et al., 1986) e humanos (Morgan et al., 1996),

respectivamente, que são especializado em promover ativação de complemento e opsonização, mostrando características nítidas de uma resposta Th1.

Apesar da importância inquestionável dos linfócitos T CD4+ Th1 dentro da patologia, a sua ação acaba sendo limitada devido as estratégias de escapes desenvolvidas pelo parasito. Como a principal função dos linfócitos T CD4+ Th1 é produzir grandes quantidades de IFN- γ que por sua vez tem a capacidade de ativar macrófagos para destruir patógenos persistentes (Munoz-Fernandez, Fernandez & Fresno, 1992), o *T. cruzi* possui a habilidade de tolerar um ambiente altamente tóxico desencadeado pela produção de ROS e RNS, pois este possui enzimas antioxidantes na sua superfície que conseguem neutralizar esses compostos como as peroxidases e as superóxidos desmutases (SODs) e tornar o microambiente ameno para sua sobrevida (Pianezza et al., 2009).

Fora isso, o ambiente altamente oxidante criado na tentativa de aniquilar o patógeno mostrou-se benéfico para a replicação amastigotas nas células hospedeira, devido a essa condição favorecer a disponibilidade de ferro que pode ser captado pelos amastigotas e assim induzir seu crescimento. Estudos em que se utilizaram componentes capazes de impedir o ambiente oxidante em modelo de infecção tanto *in vitro* como *in vivo*, mostrou redução drástica da replicação dessas formas intracelulares assim como diminuição da parasitemia em tecidos de animais infectados (Paiva et al., 2012)

Os linfócitos T CD4+ Th1 também teriam um papel primordial em ativar linfócitos T citotóxicos para agirem contra células infectadas, o que foi comprovado sua função devido ao fato de não haver detecção de citotoxicidade com a depleção de linfócito TCD4+ Th1 (Minoprio et al., 1991). Além disso, linfócitos T citotóxicos seriam os principais atores envolvidos na imunopatologia da doença de Chagas em que seriam o tipo celular imune mais abundante nos tecidos afetados pelo patógeno, sendo o principal responsável pelos processos inflamatórios desencadeados no tecido, porém os linfócitos T CD4+ teriam uma ação indireta nesse efeito, o que foi constatado ao ver que sua depleção diminui a inflamação desses tecidos (Tarleton et al., 1992)

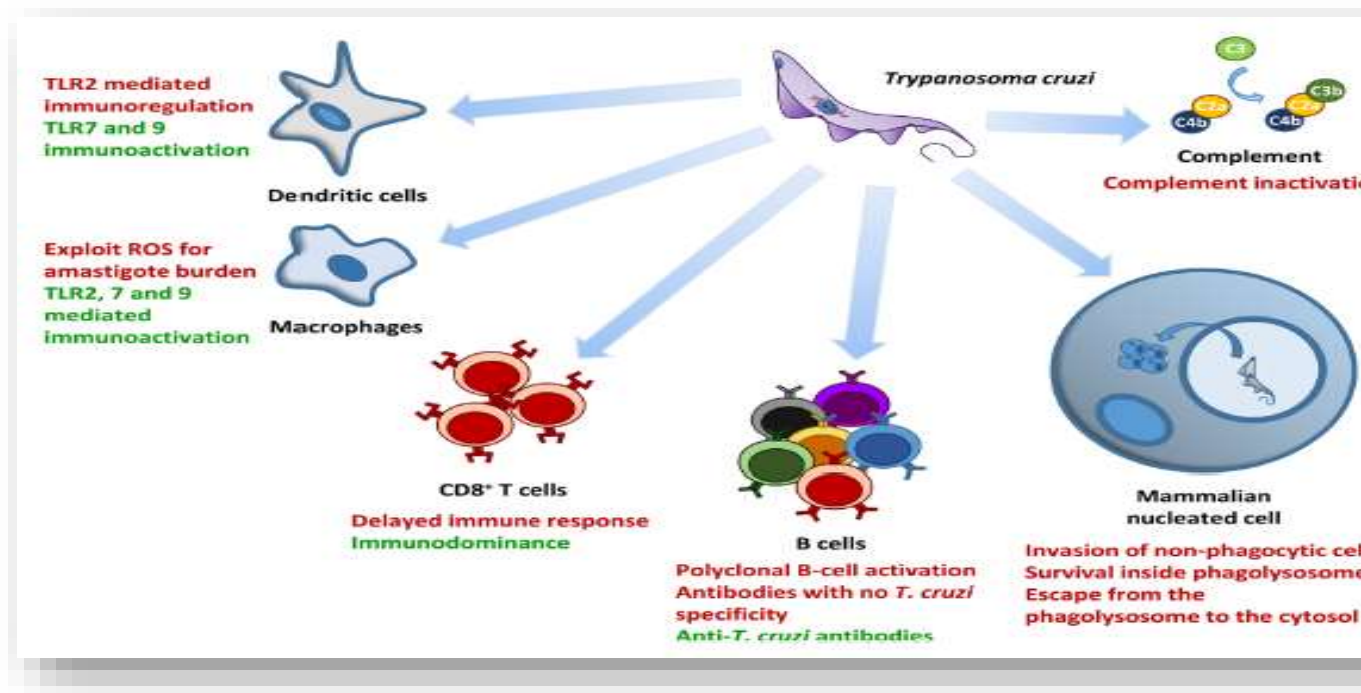


Figura 4: Resumo de mecanismos de evasão do *T. cruzi* da imunidade do hospedeiro. Em verde representado mecanismos com efeito protetivo para o hospedeiro, enquanto em vermelho, mecanismos que auxiliam na evasão do patógeno (Cardoso, Reis-Cunha e Bartholomeu, 2016).

1.4. CÉLULAS DENDRÍTICAS: APCS MEDIADORAS ENTRE A RESPOSTA IMUNE INATA E ADQUIRIDA

O sistema imune é composto por diversos tipos celulares com funções distintas que podem ser separados em grupos dependendo dos mecanismos que são utilizados por esses para auxiliar na iniciação do processo imunológico ou para cessá-lo. Entre esses grupos, há um que abarca células especializadas em capturar, processar e apresentar antígenos às células do sistema imune adquirido, além de fornecer a sinalização necessária para induzir diferenciação e divisão de células especializadas da imunidade adquirida, os linfócitos, para que estes por sua vez, ao reconhecerem um antígeno, e assim consiga montar uma resposta adequada e específica frente àquele agente infeccioso. Essas células são denominadas células apresentadoras de antígenos (APCs) e, portanto, são consideradas cruciais para ligar a imunidade inata à adquirida (Beutler, 2004; Medzhitov & Janeway, 2000 e Lipscomb & Masten, 2002).

Dentre os vários tipos de APCs podemos dar ênfase às células dendríticas (DCs). Essa linhagem se destaca dentro das demais APCs por possuir grande plasticidade fenotípica, apresentar ampla distribuição anatômica ao longo do organismo, sendo encontrada tanto em tecidos periféricos como não periféricos (Banchereau et al., 2000), por possuírem uma alta especialização para captar antígenos e grande eficiência na sua apresentação. Além disso, é o único tipo celular que possui a capacidade de realizar apresentação-cruzada, mas a sua maior característica é notoriamente a sua habilidade migratória, que ao capturar um antígeno e

induzida por este, se torna apta a migrar através dos vasos linfáticos do sítio de infecção até os órgãos linfoides secundários, como os linfonodos, onde encontram células específicas do sistema imune adquirido, como linfócitos T e lá os apresentam esses antígenos (Lipscomb e Masten, 2002, Banchereau & Steinman, 1998 e Banchereau et al, 2000)

Macrófagos e linfócitos B também possuem função de APCs, entretanto, essas apresentam antígenos e ativam majoritariamente linfócitos T CD4⁺ efetores, que foram previamente ativados, enquanto as DCs possuem a capacidade de ativar linfócitos T virgens, que nunca foram ativados previamente (Wakim et al., 2008; Celli et al., 2012; Choi et al., 2009; Lindquist et al., 2004). As DCs são, portanto, o principal tipo celular capaz de induzir uma resposta imune primária e estabelecer uma resposta de memória mais tardiamente (Banchereau et al., 2000).

A função principal então desse tipo celular é funcionar como sentinelas do organismo, sensoriando o ambiente em que se encontram e detectar quando há uma quebra da homeostasia, onde essas células possuem aptidão para ler, interpretar, traduzir e enviar esses sinais captados aos linfócitos sendo responsáveis por os ativar e os diferenciar para efetivarem a resposta mais adequada frente àquela ameaça. Caso não haja quebra de homeostasia, as DCs também são responsáveis por manter essa condição, apresentando antígenos autólogos para induzir tolerância nos mesmo linfócitos (Matzinger, 1994; Banchereau & Steinman, 1998, Banchereau et al., 2000, Lipscomb & Masten, 2002, Kapsenberg, 2003).

Quanto a grande plasticidade fenotípica, caracteriza-se por exercer papéis distintos e específicos quando estas se apresentam em sua fase imatura e após essas sofrerem maturação, que é acarretado devido à exposição à antígenos ou mediadores inflamatórios (Lipscomb e Masten, 2002 e em Banchereau & Steinman, 1998). Isso só é possível graças a uma regulação eficiente e fina que não está só ligada a iniciar uma resposta imune, mas é responsável também em promover um ambiente regulatório, e assim reestabelecer a homeostasia e também promover autotolerância, o que é crucial para evitar anomalias do sistema imune. (Hawiger et al., 2001 e Steinman, Hawiger & Nussenzweig, 2003)

Assim, DCs imaturas (iDCs) são especializadas em detectar e captar antígenos no local onde residem ou que foram recrutadas. Após capturar antígenos potencialmente danosos, no caso devido a uma invasão por agente patogênico, e sob ação de mediadores pró-inflamatórios produzidos pelas células locais do tecido (Kapsenberg, 2003), é engatilhada nessas células um processo de maturação, o que ocasiona uma modulação em seu fenótipo para se tornarem células especializadas em processar e apresentar esses antígenos e irão se tornar aptas a ativar linfócitos. Isso então permitirá a montagem de uma resposta adequada frente àquele antígeno (Guermonprez et al., 2002).

Se houver detecção de um antígeno não danoso, como um endógeno, essas células não sofrem maturação, e conseqüentemente, não se encontram aptas a ativar linfócitos. Ao invés disso, acaba induzindo

anergia nessas células, as tornando não responsivas contra aquele antígeno e mantendo uma resposta inativa. Portanto sua maturação é crucial para ligar a resposta inata à resposta adaptativa (Dhodapkar et al., 2001 e Steinman, 2012)

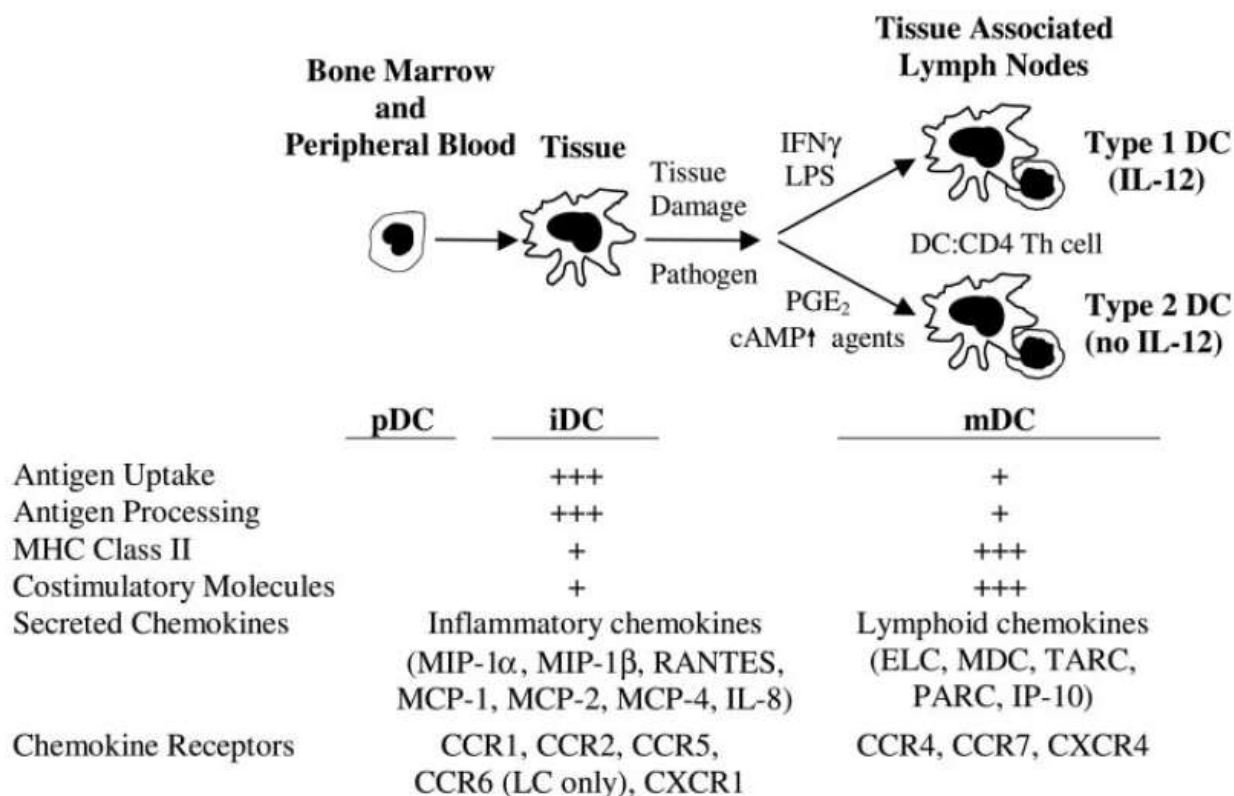


Figura 5: Fenótipos característicos de DCs no seu estado imaturo (iDCs) e maduro (mDCs), tanto condicionadas a induzir uma modulação de resposta para o tipo 1 (Th1), quanto para o tipo 2 (Th2) e seus respectivos fatores que podem influenciar o seu condicionamento (Lipscomb e Masten, 2002).

1.5. RESPOSTA DAS DCS CONTRA PATÓGENOS E/OU SEUS COMPONENTES.

Tendo em vista que as DCs são as células responsáveis por ligar a imunidade inata à adquirida, a forma como essas reconhecem o patógeno e a sinalização desencadeada por este do microambiente que as rodeiam, é determinante para influenciar sua maturação completa, os tipos de moléculas co-estimulatórias expressas e o tipo de citocinas produzidas. Esses fatores então são decisivos para influenciar o tipo de polarização que será induzida em linfócitos T (Kapsenberg, 2003).

Geralmente a ativação de TLR4 de DCs por LPS está associada a uma polarização para o tipo Th1 pela produção de IL-12, dependendo da dosagem, do tempo e do tecido onde se encontra (Langekamp et al., 2000; Puledran et al., 2001 e Boonstra et al., 2003).

Já foi visto que indução do heterodímero TLR2-TLR1 por um polipeptídeo de *Mycobacterium tuberculosis* induz menos produção de IL-12 por DCs quando comparado com TLR4 por LPS (Thoma-Usynski, Stenger & Modlin, 2000) e que indução de TLR2 induzia a expressão de RNAm referente subunidade IL-12p40, porém não a de IL12p35 (Re & Strominger, 2001), assim como também pode induzir a diferenciação de linfócitos Th1 através da ativação de TLR2 por extratos de micobactéria (Yoshimura et al., 1999).

Já a ativação do heterodímero TLR2-TLR6 por lipopolipetídeos de micobactéria, induz a produção pouco ou não induz de IL-12 e sim de IL-10, não polarizando linfócitos em uma resposta específica, assim como também induz pouca produção de IL-12 e muito de IL-10 (Re & Strominger, 2001 e Qi, Dennign & Soong, 2003 e Weigt et al., 2003). Foi visto também que há indução de IL-10 dependente de TLR2 ocasionado pela infecção com *Schistosoma mansoni*, o que é sustentado pelos componentes deste patógeno, como lisofosfatidilserina induzem um comportamento regulatório de DCs (van der Kleij et al., 2002).

Mas o reconhecimento por outros PRRs também pode desencadear a produção de IL-10, como o reconhecimento por meio de dectina 1 (Gantner et al., 2003) e DC-SIGN (Cambi et al., 2003). Esses resultados em conjunto quebram o paradigma de que DCs sempre sob estímulo de TLRs irão desencadear respostas Th1 (Kapsenberg, 2003)

Referente a ativação por TLR7 (Ito et al., 2002 e Lee et al., 2003) e de TLR9 (Hemmi et al., 2000 e Krug et al, 2001) por seus ligantes geralmente induz a produção de interferons do tipo I e desenvolvimento de atividade antiviral, sustentando uma resposta Th1, mediada pela produção de IL-12 e IFN- α , dependendo do subtipo de DC, ou seja favorecendo diferenciação de linfócitos para Th1.

O reconhecimento de componentes oriundos de patógenos pelos PRRs acabam induzindo as DCs a produzirem mediadores, como citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias que influenciam na sua modulação, e conseqüentemente, na sua capacidade de induzir respostas distintas, assim como também outros fatores produzidos por outras células em contato com o mesmo agente, portanto esses fatores irão ser decisivos para direcionar o condicionamento das DCs.

Os mediadores que estão envolvidos em definir o curso para Th1 devido a modulação de DCs diretamente, são interferons do tipo I (Luft et al., 2002) e IFN- γ (Vieira et al., 2000). IFN do tipo I geralmente são induzidos pela ativação de TLR3, 4, 7 e 9, principalmente sob infecção viral, acarretando também na produção de IL-12 (Doyle et al., 2002), enquanto ativação de TLR2 está associado ao desenvolvimento desse tipo de resposta sob infecção por *Mycobacteria* spp e *Salmonella* spp (Jouanguy et al., 1999).

Apesar das comprovações de DCs serem capazes de induzir Th2, ainda permanece obscuro que tipo de PRRs (principalmente TLRs, que são mais estudados) estão relacionados com a indução de polarização para Th2. O que se pode notar é que a ausência de MyD88 em animais inoculados com LPS acabou desenvolvendo

uma resposta Th2, ao invés de uma Th1 como é comumente observada, em que também não foi observado aumento de IL-4 (Kaisho et al., 2002) mostrando que independente do TLR ativado pelos componentes do patógeno, a proteína acopladora que se liga a esses teria um papel primordial em ditar o perfil de citocinas que seria produzido pelas DCs e a consequente diferenciação de linfócitos que ocasionaria.

Já alguns patógenos podem induzir uma resposta regulatória em DCs, o que pode ter um efeito paradoxal: promove tanto a sobrevivência e o estabelecimento desse agente, como também representa uma estratégia crucial do hospedeiro para amenizar a resposta frente a uma infecção a fim de evitar dano tecidual demasiado e poder acarretar em uma patologia ou ser letal ao hospedeiro.

Entre os fatores induzidos pelas DCs ou pelo microambiente pelo sensoriamento de PAMPs ligado a polarização para Th2, estão histamina (Caron et al., 2001), prostaglandina E2 (Kalinski et al., 1998) e quimiocinas como CCL2, CCL7, CCL8 e CCL13 (Braun, Lahey & Kelsall, 2000). A expressão da molécula co-estimulatória OX40L também já foi mostrada como induzir a polarização para esse tipo de resposta devido ao estímulo de produzir IL-4 (Oshima et al., 1998).

Alguns agentes são conhecidos por induzir esse tipo de resposta como estratégias de evasão da imunidade para promover uma infecção próspera e esses podem se utilizar de dois tipos de mecanismos: tanto impedindo a maturação de DCs (que como foi visto anteriormente, a maturação de DCs é uma característica fundamental para adquirir capacidade ativar a resposta adaptativa), como permitindo sua maturação, porém a manipulando para induzir a expressão de mediadores anti-inflamatórios e assim favorecer a ativação de linfócitos regulatórios (Treg).

Entre aqueles agentes infecciosos que utilizam a primeira estratégia, *Plasmodium falciparum* (Urban & Roberts, 2002), *Mycobacteria* spp (Taileux et al., 2003 e Geijtenbeek et al., 2003), hepatite C (Dolganiuc et al), herpes vírus (Salio et al., 1999) e citomegalovírus (Moutafsi et al., 2002), os quais possuem mecanismos que impedem a maturação completa de DCs, através do reconhecimento de seus componentes por uma gama muito variável de PRRs.

Agora patógenos como *Bordetella pertussi* (McGurk, McCann & Millis, 2002) e *S. mansoni* (van der Kleij et al., 2002) induzem DCs que ativam linfócitos Treg, além da *Candida albicans* que é capaz expandir essa população induzindo a produção de IL-10 pelas DCs (Montagnoli et al., 2002).

Além de IL-10 (Steinbrink et al., 1997), outro fator que está ligado a indução de DCs para prejudicarem sua maturação ou induzirem seu comportamento regulatório é o TGF- β (Sato et al., 2003) e moléculas inibitórias expressas pelas DCs juntamente com o complexo MHC-peptídeos, como CTLA4, PD1, PD2L (Kapsenberg, 2003).

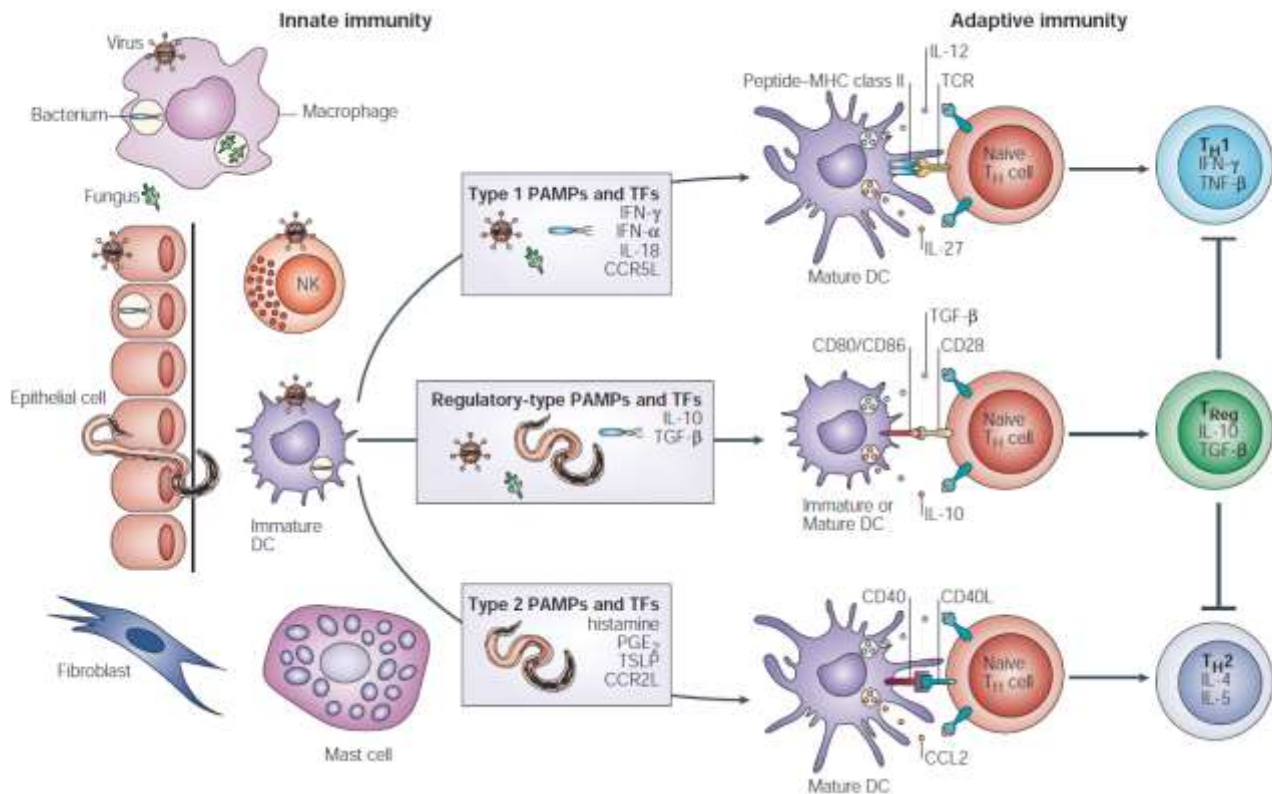


Figura 6: Diferenciação de DCs induzido pelo reconhecimento de PAMPs e fatores envolvidos no microambiente da infecção e consequente produção de mediadores pelas DCs que são responsáveis por polarizações de resposta distintas de linfócitos (Th1, Th2 e Treg) (Kapsenberg, 2003).

1.6. CONTEXTO ATUAL.

As informações que temos atualmente a respeito das respostas que o *T. cruzi* pode induzir em DCs humanas são muito escassas. A imensa maioria de dados que disponibilizamos hoje são de modelos murinos (Gil-Jaramillo et al., 2016), não representando com fidelidade o que é observado no ser humano e não abarcando a diversidade genética observada em uma população tão heterogênea. Recentemente nosso grupo publicou uma revisão ressaltando essa deficiência de estudos e a dificuldade de se trabalhar com um arcabouço tão frágil e um resumo do que se tem de conhecimento sobre essa interação é sintetizada na figura 7.

Brevemente, o que se sabe até o momento sobre a imunidade de DCs estimuladas pelo contato com *T. cruzi*, é que as respostas podem ser bem discrepantes quando se leva em consideração o tipo de cepa estudada (Zingales et al, 2009) e o diferenças genéticas do indivíduo (Marinho et al., 2004 e Freitas et al., 2009). De forma geral, cepas que possuem alta virulência, são capazes de provocar uma modulação nas DCs do hospedeiro, proporcionando eventos que diminuam seu reconhecimento e apresentação de antígenos, e consequentemente, a ativação de linfócitos T. Isso é ocasionado principalmente pelo patógenos induzirem uma diminuição de MHC tanto de classe I como de classe II expressos nas DCs, assim também como a indução de expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-β, gerando assim uma tolerância ao parasito através da indução de linfócitos T regulatório, o que auxilia no desenvolvimento de uma patologia e

estabelecimento de uma fase crônica. Já cepas menos virulentas são capazes de provocar uma resposta eficaz frente a esses agentes, caracterizada pelo aumento de expressão de MHC I e II e também de citocinas pró-inflamatória importantes, como IL-6, IL-8 e TNF, responsáveis pela indução inicial de um processo inflamatório, assim como aumento de IL-12, citocina indispensável para acarretar a diferenciação em Th1, resposta mais eficaz contra este tipo de patógeno (Gil-Jaramillo et al., 2016)

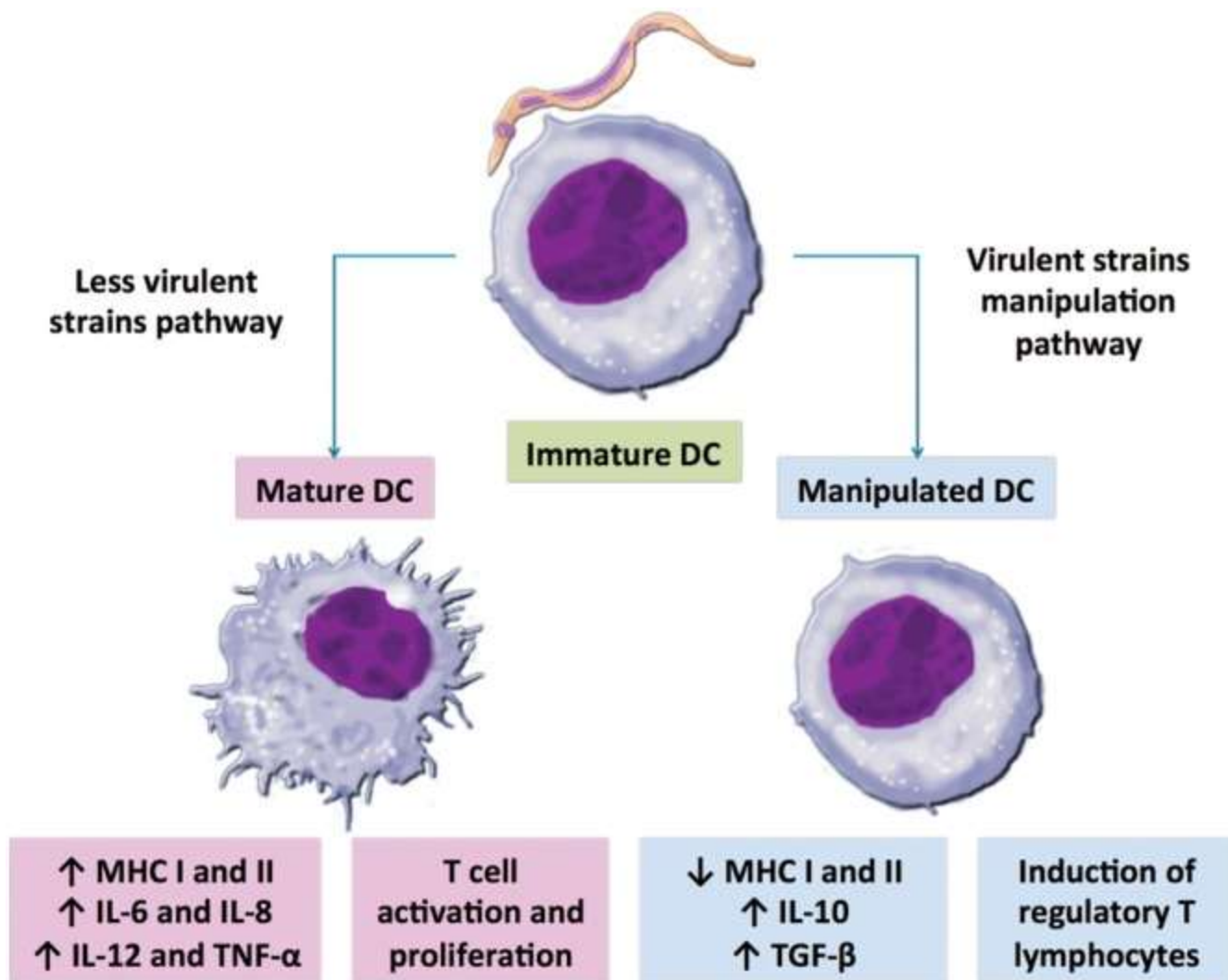


Figura 7. Tipos de modulação de respostas induzidas por diferentes cepas de *T. cruzi* em DCs, por permitirem ou manipularem sua maturação, e conseqüentemente, influenciarem no tipo de respostas que essas irão induzir nos linfócitos T. (Gil-Jaramillo et al., 2016).

Tendo em vista que a resposta imune do hospedeiro desencadeada contra o *T. cruzi* na fase aguda da doença é determinante para proporcionar tanto o controle do agente infeccioso, quanto promover o seu estabelecimento, os eventos que ocorrem nessa fase são cruciais para ditar o fluxo da patologia. Isso pode ser observado na diversidade de quadros clínicos apresentados pelos indivíduos infectados e explicar como a maioria dos casos da fase aguda passam para uma indeterminada enquanto uma parcela desenvolve uma fase crônica em que apresenta as formas mais graves da doença. Uma explicação a cerca dessa discrepância de manifestações apresentadas pode ser explicada tanto pelas diferenças genéticas de cada hospedeiro, como é

visto na clínica e também experimentalmente (Marinho et al., 2004 e Freitas et al., 2009), como também o tipo de cepa do parasito que está causando a infecção (Zingales et al, 2009), onde possui diferenças nítidas entre os grupos geneticamente.

As respostas geradas contra o parasito no início da infecção podem ser fundamentais para decidir o rumo da patologia. Analisando a expressão gênica através da abundância dos transcritos induzidos no hospedeiro pelo patógeno pode trazer informações valiosas a respeito do que é modulado durante essa interação. Então, pensando nisso, nosso grupo desenvolveu previamente um transcriptoma da interação de células dendríticas humanas proveniente de 3 doadores saudáveis com as formas infectivas do *T. cruzi* depois de um período de 12h, com o intuito de simular a primeira interação entre patógeno-hospedeiro e assim determinar a modulação engatilhada.

Foi observado que o parasito foi capaz de modular a expressão gênica das células hospedeiras, pois após interação, onde foi visto 1183 genes diferencialmente expressos (DEGs) no doador A, 1138 no doador B e 3918 no doador C, conforme mostrado na figura 8, quando comparados células controles com infectados.

Assim, foi obtido então uma análise preliminar da expressão gênica que era induzida nesse tipo celular pelo parasito estudado, servindo como subsídio para um estudo mais aprofundado em cima da expressão gênica que foi induzida neste contato. Nosso próximo passo seria averiguar se realmente os genes que foram mostrados como diferencialmente expressos condizem quando avaliamos sua expressão através de outra técnica, como a RT-qPCR e assim poder validá-los, comprovando que estes tiveram sua expressão alterada pela infecção e são bons candidatos para estudos posteriores e assim servirem como base para entender melhor a imunopatologia envolvida na infecção

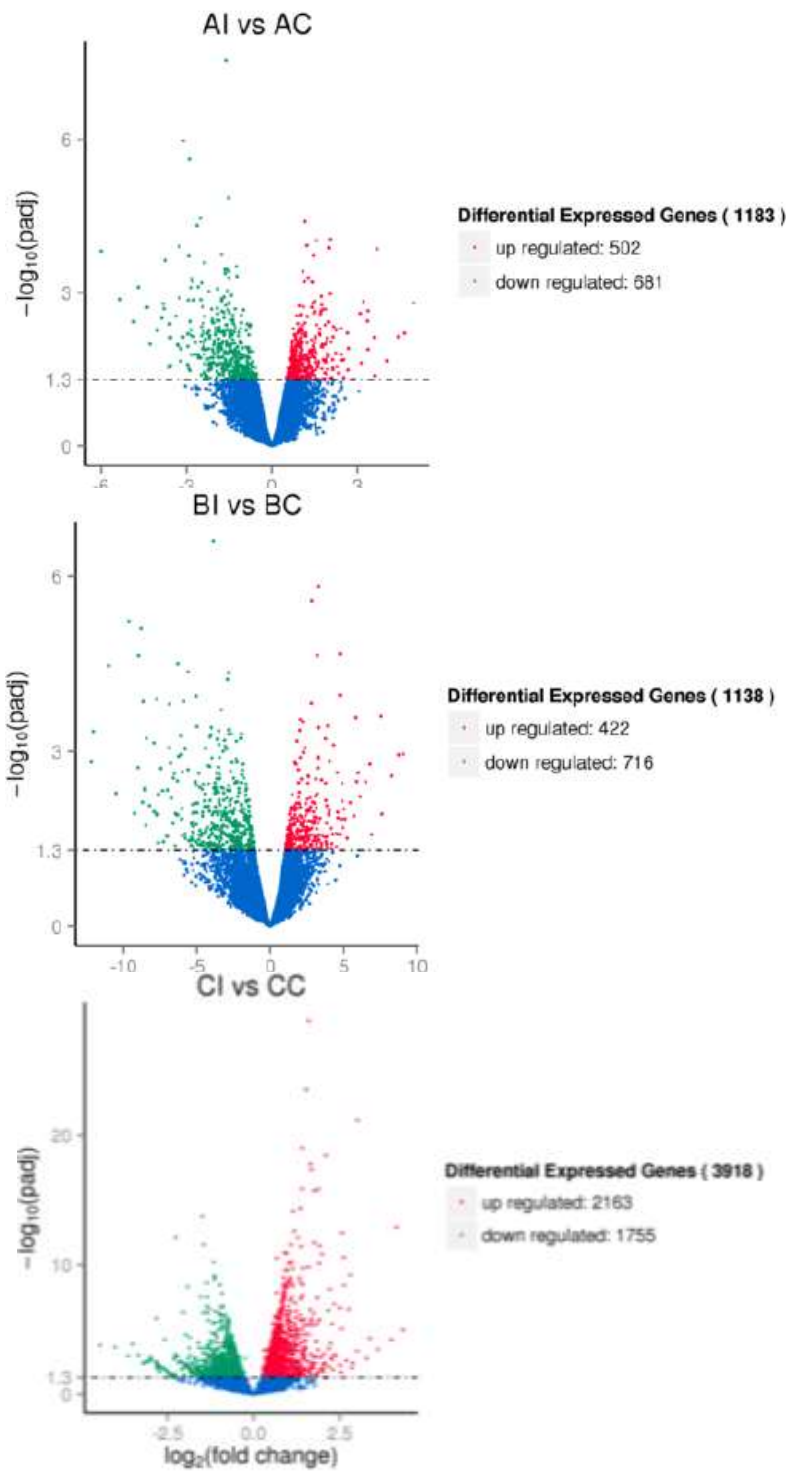


Figura 8. Análise transcriptômica de interação de DCs humanas de 3 doadores (A, B e C) com formas infectivas de *T. cruzi*, comparando condições infectadas (AI, BI e CI) e condições controles (AC, BC e CC) (Gil-Jaramilo, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas representa hoje uma grande ameaça à qualidade de vida das pessoas enfermas e um grande problema de saúde a nível global. É indiscutível a importância das respostas imunes frente a esse patógeno e seu papel determinante no desenvolvimento da doença, onde as células dendríticas possuem uma função fundamental em promover essas respostas.

Levando em consideração o fato da imensa maioria dos estudos hoje disponíveis se restringirem a modelos murinos (Gil-Jaramillo et al., 2016), há uma necessidade urgente de se promover estudos em células humanas e a resposta que é induzida nessas pelo parasito a fim de se alcançar um entendimento mais amplo e profundo a respeito da patologia, e assim futuramente, servirem como subsídio base desenvolvimento de tratamentos específicos e eficazes, visando amenizar ou aniquilar os efeitos adversos.

A análise de genes diferencialmente expressos induzidos pela infecção pelo *T. cruzi* em DCs humanas permite a garimpagem de genes que tenham um papel relevante dentro da patologia e assim permitir a descoberta de como esses genes se relacionam com a resposta imune frente ao patógeno.

Este estudo, ao recriar o primeiro momento em que o patógeno interage com as DCs do hospedeiro mamífero, irá averiguar qual a resposta que o parasito induz nessas células e assim servirá como base para entender como a infecção poderá ser controlada ou como se estabelece a patologia em diferentes indivíduos e assim ditará o destino da doença na fase aguda e se irá ocorrer o desenvolvimento de uma fase crônica.

3. OBJETIVO

Este estudo visa avaliar a interação após 12h, *in vitro*, entre DCs humanas derivadas de monócitos e as formas tripomastigotas metacíclicas da cepa CL Brener *T. cruzi* garimpando genes relevantes para serem estudados mais profundamente, e assim, validar genes diferencialmente expressos (DEGs) detectados no transcriptoma.e também avaliando se a expressão de proteínas correspondentes pela mensuração de citocinas após infecção.

3.1. ETAPAS:

Para o objetivo principal deste trabalho ser alcançado, serão realizadas as seguintes etapas

3.1.1. Confirmação de diferenciação eficiente das DCs a partir dos monócitos para garantir condições similares às realizadas durante a execução do transcriptoma, a fim de garantir veracidade e confiabilidade nos dados fornecidos. Para garantir esse controle de qualidade será realizado no início e ao longo do curso das infecções:

- a) Confirmação de que pacientes não estavam infectados previamente com o patógeno em estudo;
- b) Constatação de que método utilizado para obtenção dos monócitos está apto a fornecer uma amostra com alto grau de pureza a fim de obter uma população homogênea;
- c) Validação de que DCs se diferenciaram eficientemente de monócitos.

3.1.2. Verificação da cepa correta do parasito correto e diferenciação satisfatória para formas infectivas para a realização de infecções.

- a) Verificação de uso da cepa correta durante as infecções;
- b) Avaliação da eficiência de obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas.

3.1.3. Escolha dos DEGs para validação por RT- qPCR e desenho de iniciadores para os mesmos.

3.1.4. Validação de genes por qPCR: estabelecimento de etapas para padronização da técnica em nosso laboratório.

- a) Teste de eficiência de iniciadores encomendados;
- b) Montagem de estratégia para validação;
- c) Definição de quantidade de RNA utilizadas para cada reação;
- d) Verificação da integridade do material usado;
- e) Análise dos DEGs dentro dos doadores.

3.1.5. Análise de expressão a nível de proteínas através de mensuração de citocinas

4. METODOLOGIA

4.1. MANUTENÇÃO DO PARASITO

Parasitos *Trypanosoma cruzi* da cepa CL Brener foram cultivados em sua forma epimastigota em meio Liver Infusion Triptose (LIT) (Camargo, 1964), pH 7,3, suplementados com 5% de soro fetal bovino (SFB) e 0,1 µg/mL de gentamicina e incubados a 28 °C para simular as condições do estômago dos insetos vetores. O uso da cepa preterida foi confirmado pela detecção de sequências correspondentes às anotações de genes exclusivos de CL Brener detectados posteriormente no transcriptoma.

4.2. METACICLOGÊNESE

Os epimastigotas eram então coletados no final da fase estacionária e cultivados em meio Triatomine Artificial Urine (TAU) (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0.035% carbonato de sódio, 8 mM fosfato, pH 6,9) por 2 horas a 28 °C com a garrafa de cultura em posição horizontal para permitir a adesão dos parasitos (Bonaldo et al., 1988). O meio TAU simula a urina do inseto vetor que é pobremente nutritivo com o intuito de causar um estresse nutricional no parasito e induzir sua metaciclogênese (Camargo, 1964). Após esse período o meio TAU foi substituído por TAU3AAG (meio TAU com adição de 10 mM L-prolina, 50 mM L-glutamato de sódio, 2 mM L-aspartato de sódio e 10 mM glicose) de acordo com o protocolo estabelecido por Contreras et al, 1985b e aperfeiçoado por Goldenberg et al., 1987. Parasitos foram cultivados por 6 dias a 28 °C para induzir sua diferenciação em tripomastigotas metacíclicos (TMs) e após esse período foram coletados e incubados em SFB ativo para lisar formas epimastigotas remanescentes (Canavaci et al., 2010). Depois os TMs foram recuperados e lavados três vezes para retirada do soro e posterior uso na infecção. A taxa de metaciclogênese foi aferida por coloração com panótico (NewProv), para determinar localização do núcleo e cinetoplasto e discernir entre duas formas e contagem dos TMs dentro da população total sob microscopia óptica.

4.3. OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE MONÓCITOS

A coleta de sangue foi feita em concordância com as normas do comitê de ética brasileiro e após assinatura de termo de consentimento pelos doadores. Foram realizados testes para descartar infecção prévia pelo *T. cruzi* dos doadores usados no estudo através de detecção de sequência TcZ do parasito por PCR. Para as infecções foram coletados cerca de 80-100 mL de sangue em tubos heparinizados de 3 doadores saudáveis, a fim de evitar sua coagulação e as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram obtidas e coletadas da nuvem presente através de gradiente de separação por Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). As PBMCs em seguida foram lavadas do Ficoll, contadas e incubadas com anticorpos e tampão MACs (PBS pH 7,2 contendo 0,5% de BSA e 2 mM de EDTA) para CD14 conjugados com beads magnéticas por 20 min a 4°C, usando o kit CD14 Microbeads Human (Miltenyi Biotec) para obtenção dos monócitos (CD14+),

precursores de DCs (Ebstein et al., 2009). As células então foram introduzidas em colunas acopladas um campo magnético para eluição de células CD14⁻ após 3 lavagens com tampão MACs para obtenção da fração negativa. Após as lavagens, foi inserida 1 mL de tampão MACs à coluna, que foi desagregada do campo magnético e pressurizada com um embôlo para obtenção nos monócitos na fração positiva. Os monócitos recuperados foram posteriormente contados usando a técnica de exclusão por azul de tripan 0,4%.

4.4. DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS EM DCS

Os monócitos recuperados na fração positiva da separação magnética então foram cultivados em uma proporção de 5×10^5 células em meio RPMI (Gibco) suplementado com 10% de SFB (Gibco) inativado, 0,15 µg/mL de gentamicina com adição de 0,05 µg/mL de GM-CSF (Peprotech) para induzir a diferenciação em DCs (Witmer-Pack et al., 1987) e 0,16 µg/mL de IL-4 (Peprotech) para auxiliar na sua geração e impedir a diferenciação em macrófagos por 7 dias a 37 °C e 5% CO₂, seguindo protocolo estabelecido por Sallusto e Lanzavecchia, 1994. Foram descartados 150 µL e adição 200 µL de meio novo a cada 3 dias para manter células sob estímulo das citocinas.

A diferenciação de DCs a partir dos monócitos foi determinada pela expressão de algumas moléculas de superfície como (LN3 clone), CD1a (SK9 clone) and CD14 (61D3) conjugado com ficoeritrina (PE) através de citometria de fluxo realizada no FACs Verse (BD Bioscience). Células foram bloqueadas com tampão FACs por 20 min a 4 °C e depois desse período incubadas com os respectivos anticorpos conjugados com PE por 30 min, também a 4 °C. Depois disso, anticorpos que não se ligaram foram lavados e as células foram novamente ressuspensas em tampão FACs para análise no citômetro, utilizando o programa FACsuite (BD Bioscience).

4.5. INFECÇÃO DE DCS COM TMS

Após 7 dias de diferenciação de DCs, células foram coletadas e plaqueadas em uma densidade de 5×10^5 DCs por poço e infectadas com TMs na proporção de 10TMs: 1 DC e incubadas a 37 °C, 5% CO₂ por 12 h. Após esse período, células controles e infectadas foram lavadas e contadas pela técnica de exclusão de azul de tripan 0,4% e as amostras foram direcionadas para suas respectivas análises.

4.6. TAXA DE INFECÇÃO

A porcentagem de DCs infectadas pelos TMs foi aferida através de confecção de lâminas mediante cytospin a 400 g por 5 min, utilizando em média 1×10^5 células. Após esse processo, as lâminas foram coradas com panótico e um total de 300 células foram contadas sob microscopia óptica em cada condição de cada doador a fim de determinar a quantidade de células infectadas e o número de formas intracelulares do parasito (amastigotas) haviam nas DCs após o período de 12 h.

4.7. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Após a infecção, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até análises posteriores. Foi realizado a mensuração das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF e IFN- γ , pelo ensaio baseado em beads (CBA) usando o kit human inflammatory cytokines e Th1/Th2/Th17 cytokines (BD Bioscience) e através de citometria de fluxo utilizando FACs Verse (BD Bioscience) (Chen et al., 1999) segundo recomendações do fabricante. Esta metodologia permite a detecção e mensuração de diversos tipos de moléculas solúveis no sobrenadante provenientes de uma mesma amostra, reduzindo a quantidade de sobrenadante necessário para analisar as diferentes citocinas, reduzindo a quantidade de material necessário e de tempo na execução da análise, diferente do que acontece utilizando o método de ELISA (Horan & Wheelless, 1977, McHugh, 1994 e Fulton et al., 1997 e Carson & Vignali, 1999). Resultado de todas as amostras foram normalizadas para a mesma quantidade de células.

4.8. EXTRAÇÃO DE RNA

As alíquotas de DCs destinadas para extração de RNA foram lisadas e incubadas usando o reagente Trizol (Ambion) e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração. O reagente contém solução de fenol e guanidina isotiocinato (Chomczynski & Sacchi, 1987), permitindo lise das células e simultânea proteção contra degradação de RNA devido as propriedades de inibição de ribonucleases. DCs infectadas por 12 h e controle foram coletadas e RNA foi extraído utilizando o reagente Trizol (Ambion) seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, foi adicionado clorofórmio na proporção de 1:5 de Trizol, centrifugado a 12.000 g por 15 min para separação da fase aquosa, interfase e fase orgânica e fase aquosa foi coletada e RNA precipitado com isopropanol 100% a 12.000 g por 10 min e depois o sedimento foi lavado com etanol 75% a 7.500 g por 5 min e o material ressuspendido em água RNase free.

4.9. ANÁLISE DE INTEGRIDADE DE RNA

A integridade do RNA adquirido foi aferida por mensuração das bandas, velocidade de migração e razão referentes às subunidades 28S e 18S do ribossomo através do bioanalyzer (Agilent Technologies) em que foi atribuído um número de integridade de RNA (RIN). Amostras tiveram um RIN abaixo de 6 foram descartadas das análises posteriores (Schroeder et al., 2006)

4.10. ESCOLHA DE GENES PARA VALIDAÇÃO A PARTIR DE DEGS

Após realização de transcriptoma e filtragem dos genes diferencialmente expressos (DEGs) entre as condições infectadas e controle nos 3 doadores, foi escolhido alguns dentre estes para validação. Os genes foram selecionados dentre aqueles que apresentaram um valor de p ajustado (padj) $<0,01$, que apresentaram \log_2 fold change >2 . Dentre estes, foi feito uma análise de enriquecimento a fim de identificar o componente celular, função molecular e processo biológico que cada um destes genes estavam envolvidos mediante análise

na plataforma de bioinformática Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org/>). Também foi verificado quais os tecidos que haviam maior expressão desses genes para analisar se estavam sendo expressos em tecidos de interesse feitos neste estudo por intermédio da plataforma Bio GPS (<http://biogps.org/#goto=welcome>). Posteriormente, foi verificado se esses genes codificavam proteínas e quantidade de transcritos que poderiam ser gerados. Por questão de viabilidade técnica, foi escolhido genes que possuíam de 1 até 3 transcritos, assim como As sequências referente aos éxons de cada gene também foram analisadas para verificar a possibilidade do desenho de iniciadores, utilizando a plataforma Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>). Após escolha do par de iniciadores que atendiam todos os critérios acima citados, foi analisado a possibilidade *off targets* através do programa Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para avaliar a chance dos iniciadores desenhados se anelarem em outro local que não seja de interesse

4.11. RT-QPCR

A validação dos genes foi aferida através de RT-qPCR utilizando o GoTaq 2-step RT-qPCR system (Promega) seguindo o protocolo recomendando pelo fabricante e as condições padrões para PCR, utilizando a metodologia do SYBR green para detecção e mensuração das fitas duplas de DNA, usando o termociclador StepOne plus real-time PCR system (Applied Biosystem) e o programa para análise StepOne software v2.3 (Applied Biosystem)

4.12. DESENHO DE INICIADORES E VALIDAÇÃO DE INICIADORES E QPCR

Os iniciadores foram desenhados no primer blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/iniciador-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) para seguir os seguintes critérios: estarem entre o tamanho de 18 a 25 nucleotídeos, possuírem entre 50 e 60% de Guanina e citosina e apresentarem Tm ótimo de 60 °C, com 3 °C de diferença máxima entre os dois iniciadores componentes do par e anelarem em junções éxon-éxon a fim de evitar ampliações falso-positivas do DNA genômico, não refletindo o nível de mRNA. Os amplicons que foram gerados pelos pares de iniciadores possuíam tamanhos entre 50-250 bp, de acordo com o recomendado pelos protocolos dos kits adquiridos para RT-qPCR.

cDNA foi sintetizado a partir de RNA proveniente da infecção de DCs e amplificado pelo kit GoTaq 2 Step RT qPCR System (Promega) usando o StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystem), em que no primeiro passo o RNA referente às infecções foi convertido em cDNA por transcrição reversa por 1 h a 42 °C, usando iniciadores oligo d(T) para se anelar à cauda poli-A e assim permitir um enriquecimento de RNA mensageiro (mRNA) e no segundo passo efetuou-se a PCR para o alvo desejado utilizando o SYBR green para detecção das fitas duplas de DNA e leitura de fluorescência pelo aparelho. Foram usadas as condições padrões para realização da PCR : 95 °C por 2 min para ativação da DNA polimerase e para cada ciclo 95 °C por 15 s para desnaturação seguido de 1 min a 60 °C de extensão.

Foram realizados testes com os pares de iniciadores encomendados para atestar a eficiência obtida por uma curva padrão usando 4 ou 5 diluições de cDNA . Apenas os pares de iniciadores que obtiveram eficiência >90% foram selecionados para a validação dos DEGs obtidos no transcriptoma para teste de validação mediante RT-qPCR.

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO PRÉVIA POR *T. CRUZI* DOS DOADORES

Para confirmar que os doadores utilizados no estudo não estavam infectados previamente pelo protozoário causador da doença de Chagas e garantir que células coletadas e diferenciadas do sangue desses estavam entrando em contato pela primeira vez com o parasito, foi realizado coleta de sangue dos doadores, obtenção de PBMCs e extração de DNA dessas células.

Após obtenção do DNA de cada doador, foi realizado uma PCR para amplificação de uma sequência de 188 bp proveniente de uma região repetitiva de mini satélite de DNA nuclear exclusiva de *T. cruzi*, (Moser, Kirchoff e Donelson, 1989) denominado TcZ. Como controle positivo foi utilizado o DNA extraído de PBMCs de um paciente chagásico, (cedido gentilmente pela professora Nadjar Nitz, do laboratório Interdisciplinar de Biociências da Faculdade de Medicina, UnB). Houve amplificação da região TcZ no tamanho do amplicon esperado na amostra proveniente do paciente e também do DNA genômico proveniente de *T. cruzi* da cepa CL Brener, enquanto nada foi visto nas reações referentes ao DNA dos 3 doadores utilizados neste estudo, apresentado na figura 9. Bandas não esperadas de serem visualizadas pode ser artefatos de PCR, devido aos primers se anelarem em regiões repetitivas.

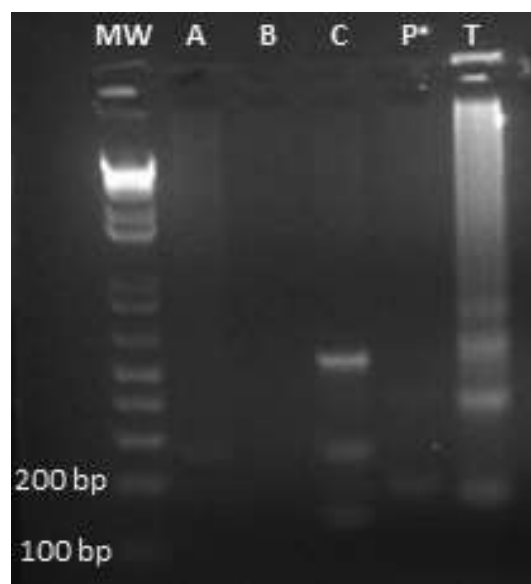


FIGURA 9. Doadores não apresentaram infecção prévia pelo *T. cruzi*. Resultado de PCR feita para amplificação de região de TcZ de *T. cruzi*, com cerca de 188 bp, em DNA de doadores referente ao doador A (A), doador B (B), doador C (C) e paciente chagásico 406 (P) e de *T. cruzi* (T) visualizado em gel de Agarose 2,5%. Marcador molecular de 20 bp (MW)

5.2. CONFIRMAÇÃO DE USO DE CEPA CL BRENER NOS ENSAIOS

Visando garantir que a cepa de *T. cruzi* utilizada nos experimentos seguintes eram de fato CL Brener, após resultados e análise do transcriptoma, as sequências detectadas foram usadas para serem mapeadas no genoma da Cepa CL Brener e determinar genes específicos presente apenas nesta cepa.

Foram detectadas sequências que correspondiam com genes anotados da cepa CL Brener dentro das análises de cada doador. Após filtragem apenas de genes codificadores de proteínas e remoção daqueles

referentes à proteínas hipotéticas, foi realizado uma análise dos genes mapeados na plataforma TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>), o qual contém disponível informações acerca dos genes anotados das espécies dentro da família dos tripanossomatídeos.

Visto que a cepa utilizada no estudo é híbrida, composta por dois alelos de duas cepas distintas, um proveniente da cepa esmeraldo-símile e outra não-esmeraldo-símile, e por ser a única composta por esses dois alelos, foi analisado então se seria detectado dois genes dentro das seqüências mapeadas, em que um fosse correspondente ao alelo P (não-esmeraldo-símile) e outro ao alelo S (esmeraldo-símile).

Foi visualizado que a imensa maioria das proteínas referente aos genes apresentavam duas cópias dentro da análise, cada um com código distinto que fazia referência ao alelo este estava anotado, um correspondendo ao alelo P e outro ao alelo S conforme mostrado na tabela 1. Como pode ser visto a comparação entre dois genes que foram detectados duas vezes, usado como exemplo o gene (H⁺)-ATPase G subunit (Tc00.1047053510993.10 e Tc00.1047053506375.110), ilustrado na figura 10 e como pode ser visto para mais exemplos na tabela 1.

The figure displays two screenshots of the TriTrypDB website. The top screenshot shows the gene page for TcCLB.506375.110, identified as (H⁺)-ATPase G subunit, putative. It lists the gene type as protein coding, located on chromosome 22 (TcChr22-S-202,298..202,633(+)) in the species *Trypanosoma cruzi*, strain CL Brener Esmeraldo-like. The status is 'Curated Reference Strain'. The bottom screenshot shows the gene page for TcCLB.510993.10, identified as (H⁺)-ATPase G subunit. It lists the gene type as protein coding, located on chromosome 22 (TcChr22-P-202,298..202,633(+)) in the species *Trypanosoma cruzi*, strain CL Brener Non-Esmeraldo-like. The status is 'Curated Non-Reference Strain'. Both pages include a 'Shortcuts' section with links to Synteny, BLAT Alignments, SNPs, Transcriptomics, Protein Features, and Proteomics, and a note that the genome is being actively curated at GeneDB.

Figura 10. Genes do *T. cruzi* identificados duas vezes nas análises transcricômicas das amostras infectadas de cada doador correspondiam à alelos diferentes, um proveniente da cepa esmeraldo-símile

e outro da cepa não-esmeraldo-símile, provando a identificação de uma cepa híbrida composta por esses dois alelos. Dados provenientes da plataforma TryTrypDB mostrando o tipo de gene, o cromossomo que este se encontra, sua localização, a cepa a qual o gene foi anotado, se referindo aos alelos presente na cepa híbrida CL Brener composta por alelo das cepas esmeraldo-símile e não esmeraldo-símile.

Genes que apareceram apenas uma única vez na análise, verificou-se que havia anotações apenas referente à um dos alelos, portando o outro não conseguindo ser mapeado no genoma devido a falta de seqüências depositadas deste gene neste alelo especificamente, como pode ser visto em um exemplo para o gene da ciclofilina (Tc00.1047053510259.50), representado na figura 11.

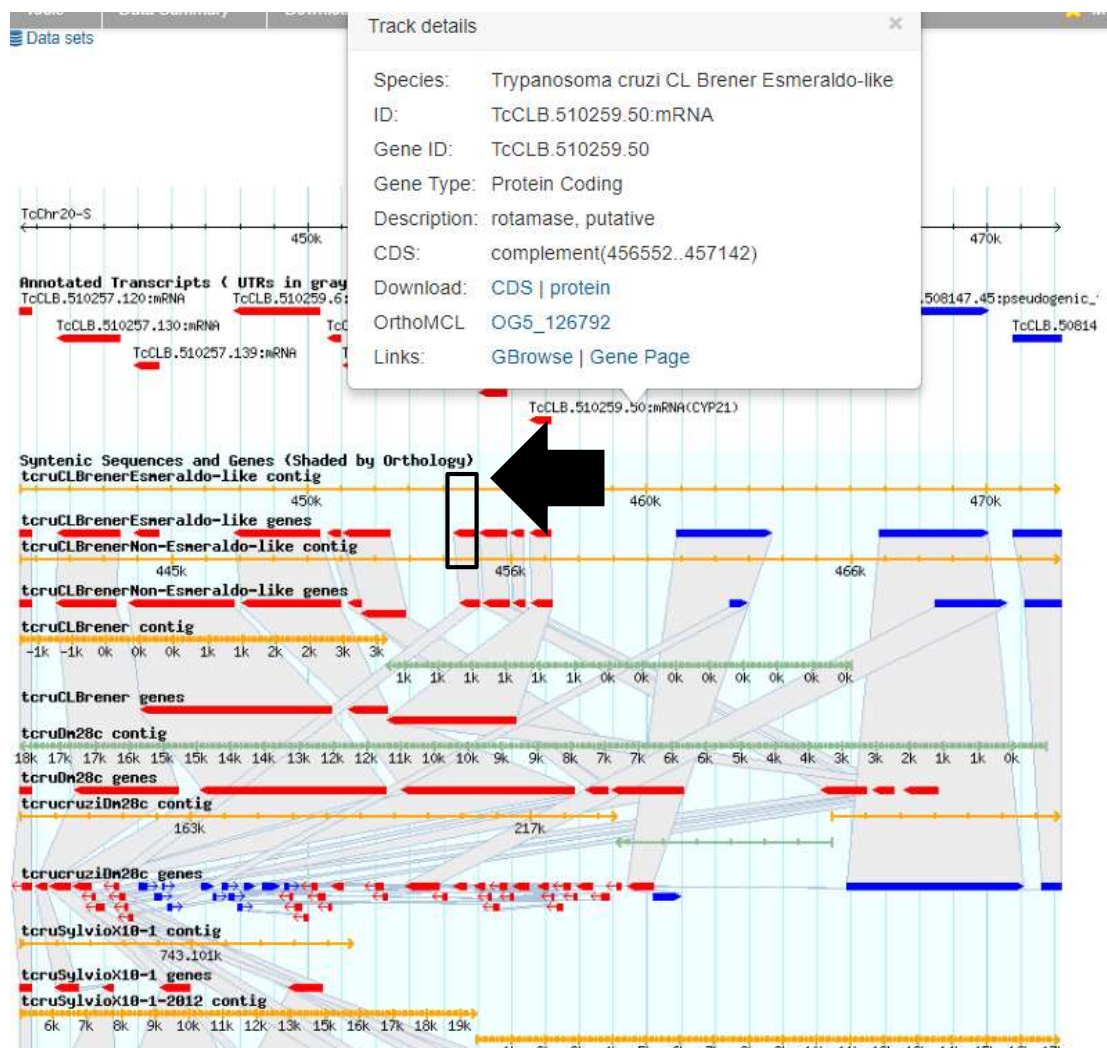


Figura 11. Comparação dos gene de ciclofilina (correspondente ao código Tc00.1047053510259.50) anotados em diferentes organismos dentro das localizações correspondentes dentro do cromosso

Portanto os genes sendo mapeados em ambos os alelos da cepa CL Brener, uma cepa híbrida, confirma que a cepa utilizada para os estudos é a pretendida e que condiz com a utilizada no transcriptoma, podendo ser utilizada nos estudos posteriores.

Tabela 1. Confirmação de uso de cepa CL Brener no estudo. Genes que foram mapeados dentro do genoma do *T. cruzi*, cepa CL Brener, quantidade média de reads detectadas dentro das amostras de cada doador (patAmean, patBmean, patCmean), descrição da proteína, alelo detectado, cromossomo que se localiza e sua posição exata dentro de cada cromossomo.

gene	patAmeanl	patBmeanl	patCmeanl	description	Alelo	chromossomo	localização
Tc00.1047053510993.10	35	178	154	(H+)-ATPase G subunit, putative	non-esmeraldo-like	22	TcChr22-P:202,298..202,633(+)
Tc00.1047053506375.110	25	126	99	(H+)-ATPase G subunit, putative	esmeraldo-like	22	TcChr22-S:202,298..202,633(+)
Tc00.1047053508209.100	214.5	1307	1115.5	10 kDa heat shock protein, putative	esmeraldo-like	29	TcChr29-S:745,179..745,481(+)
Tc00.1047053509505.50	124.5	969.5	735	10 kDa heat shock protein, putative	non-esmeraldo-like	29	TcChr29-P:744,698..745,240(+)
Tc00.1047053508209.120	67.5	626	531.5	10 kDa heat shock protein, putative	esmeraldo-like	29	TcChr29-S:743,068..743,370(+)
Tc00.1047053509505.70	33	264.5	251.5	10 kDa heat shock protein, putative	non-esmeraldo-like	29	TcChr29-P:747,392..747,694(+)
Tc00.1047053511589.130	199	1381.5	973.5	14-3-3 protein, putative	esmeraldo-like	18	TcChr18-S:114,896..115,684(-)
Tc00.1047053508851.180	159	1096	799	14-3-3 protein, putative	non-esmeraldo-like	18	TcChr18-P:114,534..115,322(-)
Tc00.1047053506775.80	146.5	959	766.5	14-3-3 protein, putative	esmeraldo-like	27	TcChr27-S:301,668..302,426(-)
Tc00.104705351167.90	79	489	360	14-3-3 protein, putative	non-esmeraldo-like	27	TcChr27-P:302,144..302,902(-)
Tc00.1047053509157.60	23	136	113.5	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, putative	esmeraldo-like	35	TcChr35-S:724,484..725,296(+)
Tc00.1047053510723.29	9	38.5	48	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, putative	non-esmeraldo-like	35	TcChr35-P:724,012..724,659(+)
Tc00.1047053506247.330	37	159.5	175	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative	non-esmeraldo-like	37	TcChr37-P:158,741..160,405(+)
Tc00.1047053511017.20	18.5	145	107	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative	non-esmeraldo-like	30	TcChr30-P:540,279..542,381(+)
Tc00.1047053509203.10	12.5	52.5	38	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative	esmeraldo-like	30	TcChr30-S:540,279..540,788(+)
Tc00.1047053511805.29	1.5	6	4	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative	esmeraldo-like	30	TcChr30-S:539,369..540,177(+)
Tc00.1047053509941.100	14.5	85	82	2,4-dienoyl-coa reductase FADH1, putative	non-esmeraldo-like	7	TcChr7-P:133,102..135,183(+)
Tc00.1047053510303.210	48.5	237.5	217.5	2,4-dienoyl-coa reductase-like protein, putative	non-esmeraldo-like	27	TcChr27-P:739,613..741,766(+)
Tc00.1047053510259.50	3.5	44.5	36	21 kDa cyclophilin, putative	esmeraldo-like	20	TcChr20-S:456,552..457,142(-)
Tc00.1047053507671.30	74.5	524.5	409	25 kDa translation elongation factor 1-beta	esmeraldo-like	34	TcChr34-S:987,426..988,094(-)
Tc00.1047053506201.39	103	604	513.5	25 kDa translation elongation factor 1-beta, putative	non-esmeraldo-like	34	TcChr34-P:987,379..988,047(-)
Tc00.1047053510311.70	17	44	48.5	26S protease regulatory subunit, putative	esmeraldo-like	36	TcChr36-S:852,295..853,491(-)
Tc00.1047053510265.20	9.5	37.5	36.5	26S protease regulatory subunit, putative	non-esmeraldo-like	36	TcChr36-P:852,285..853,481(-)
Tc00.1047053504221.20	36.5	256.5	189	26S proteasome regulatory non-ATPase subunit, putative	non-esmeraldo-like	36	TcChr36-P:49,080..49,895(-)
Tc00.1047053508409.9	0	0	1	26S proteasome regulatory non-ATPase subunit, putative	non-esmeraldo-like	36	TcChr36-P:49,996..50,842(-)
Tc00.1047053511071.140	8	48.5	42.5	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, putative	esmeraldo-like	26	TcChr26-S:97,342..98,556(+)
Tc00.1047053511899.40	4	24	23.5	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, putative	non-esmeraldo-like	26	TcChr26-P:104,108..105,322(+)
Tc00.1047053505807.180	69.5	448.5	386	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase, putative	esmeraldo-like	32	TcChr32-S:129,098..130,006(-)
Tc00.1047053507017.40	37.5	269	206	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase, putative	non-esmeraldo-like	32	TcChr32-P:129,098..130,006(-)
Tc00.1047053510717.30	45	232	196	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, putative	esmeraldo-like	16	TcChr16-S:162,904..165,924(+)
Tc00.1047053506337.70	36.5	165.5	146.5	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, putative	non-esmeraldo-like	16	TcChr16-P:162,904..165,924(+)

5.3. EFICIÊNCIA DA METACICLOGÊNESE

A fim de avaliar se método de diferenciação das formas epimastigotas cultivadas em tripomastigotas metacíclicos, adaptado em nosso laboratório, estava sendo eficiente, foi aferida a média de metaciclogênese alcançada para uso em cada infecção.

Foi realizado primeiramente uma curva de crescimento das formas epimastigotas de CL Brener feito em triplicata por 10 dias, que é ilustrada na figura 12, para saber em qual período de cultivo os parasitos seriam coletados para diferenciação, visto que foi observado maior eficiência de metaciclogênese quando era induzida sua diferenciação em fase estacionária (Gil- Jaramillo, 2016), diferente de serem coletados na fase log, como pre-estabelecido anteriormente (Canavacci et al., 2010). Por tanto, de acordo com a curva de crescimento obtido, ficou estabelecido por volta do 9-10^o como o melhor dia para iniciar o processo de metaciclogênese.

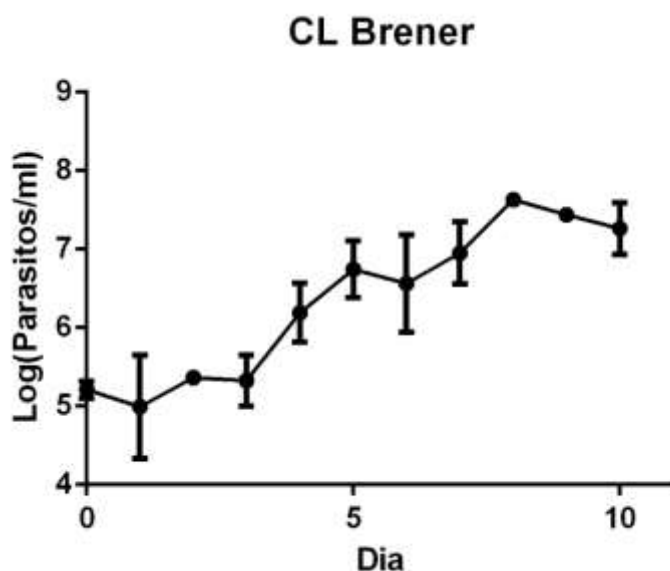


Figura 12. Curva de crescimento de epimastigotas da cepa CL Brener ao longo de 10 dias realizado em triplicata.

Foi visto que houve uma média de 72% de metaciclogênese obtido com o método escolhido para obter os tripomastigotas metacíclicos e assim realizar infecções subsequentes, diferente do que era visualizado na cultura no dia 0, onde havia cerca de 7% de metaciclogênese. A figura 13 mostra os parasitos antes e depois do processo de metaciclogênese, mostrando que ao término de 7 dias de diferenciação, a maioria apresentava morfologia e posição do núcleo e cinetoplasto correspondente com os das formas tripomastigotas metacíclicas, ao contrário do que é visto nos parasitos do dia 0 de metaciclogênese, em que quase todos são epimastigotas. Portanto, mostrou-se que a eficiência de metaciclogênese obtida ao longo dos experimentos foi satisfatória para dar continuidade ao trabalho.

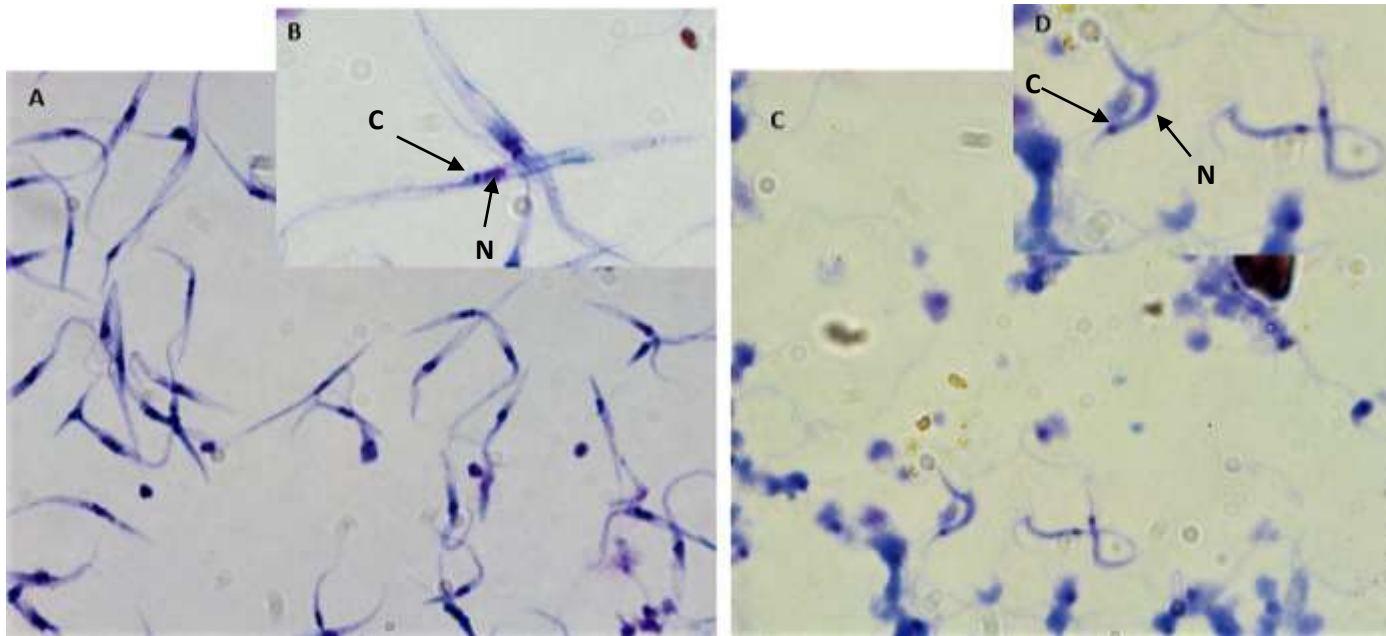


Figura 13. Metaciclôgênese alcançada para os testes de infecções adotando o método padronizado. Fotos de microscopia óptica mostrando a-b) formas epimastigotas no dia 0 de metaciclôgênese e c-d) tripomastigotas metacíclicos obtidos após 7 dias de metaciclôgênese. a e c) aumento de 100x e b e d) aumento de 100X + zoom de 1,5X. Setas indicam a posição do núcleo (N) e cinetoplasto (C)

5.4. EFICIÊNCIA DA PURIFICAÇÃO DE MONÓCITOS

Com intuito de aferir se metodologia utilizada para obtenção dos monócitos provenientes das PBMCs coletadas do sangue dos doadores estava sendo executada de forma eficiente, e assim, garantir uma população pura para ser usada como precursores para geração de DCs, foi avaliada a expressão de CD14 (marcador específico para identificação de monócitos) nas PBMCs, nas células provenientes da fração negativa (CD14) e na fração positiva (CD14+) após separação magnética para avaliar a purificação através de citometria de fluxo.

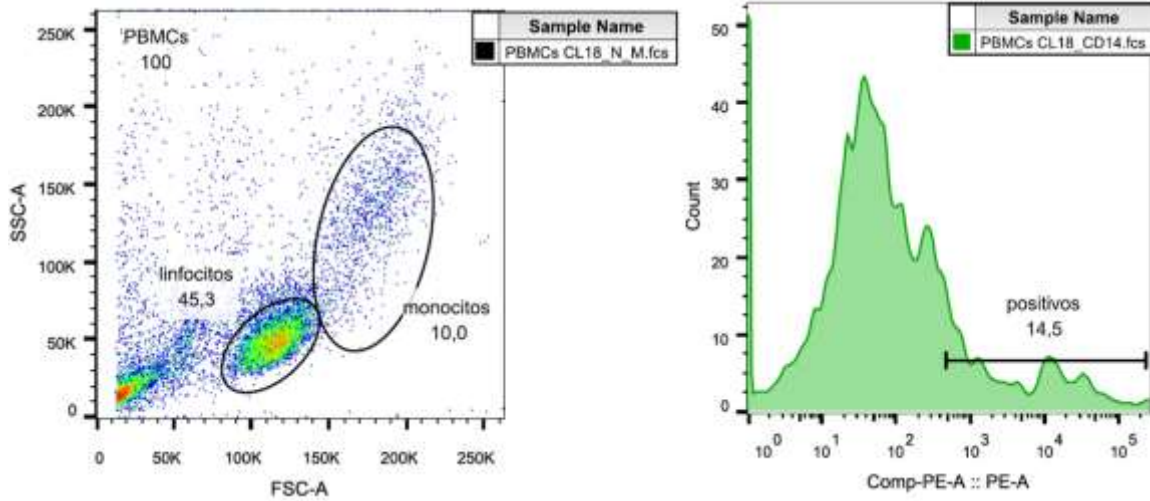
Os dados, que são mostrados na figura 14, mostram que antes da separação magnética, há a presença de duas populações bem discerníveis, sendo representadas pelos *gates* referente à população de monócitos e de linfócitos, definidos pelo seu tamanho e granulosidade. Nota-se que a maioria das PBMCs são linfócitos (cerca de 45%), enquanto uma pequena parcela é considerada monócitos (10%). Antes da separação magnética, havia a presença apenas de 14,5% de células CD14+ dentro das PBMCs totais.

Após separação magnética, nota-se que a população da fração negativa contida no *gate* referente aos monócitos praticamente desaparece quando comparado com as PBMCs que não foram submetidas à separação e mantém sua expressão de CD14+ basicamente igual de PBMCs. Já na fração positiva nota-se a presença majoritária de uma única população, definidas anteriormente como monócitos por FSCxSSC, e esta representa cerca de 84% de células CD14+. Esses resultados ilustram que o método de purificação utilizado é eficiente,

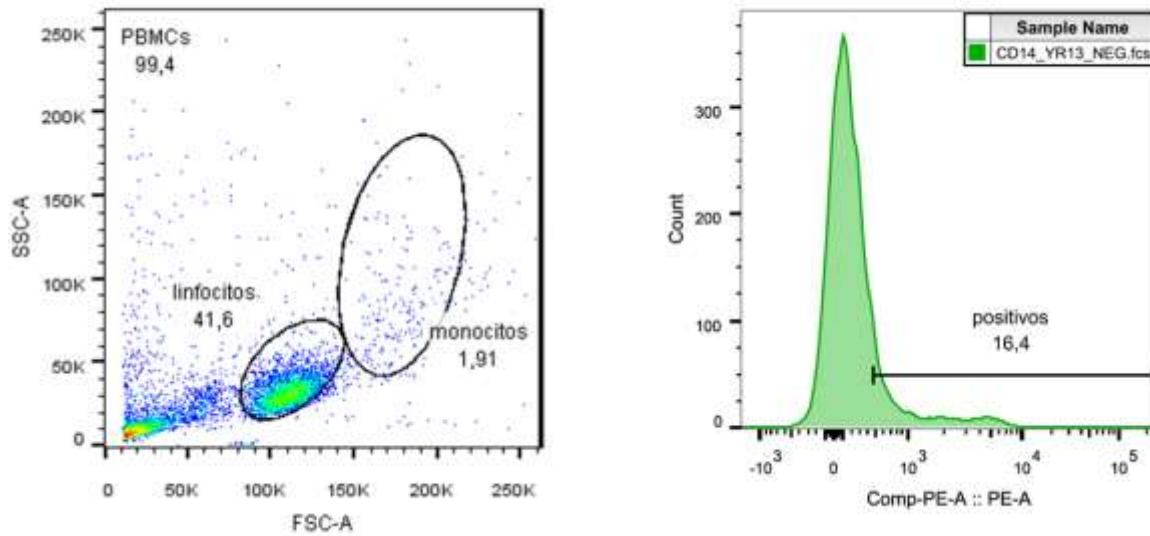
partindo de uma população com cerca de 14% de monócitos para uma com cerca de 84%, e portanto, se mostra eficaz para ser utilizada e dar prosseguimento as etapas subsequentes.

Outros marcadores, como HLA-DR e CD1a também foram mensurados na fração positiva para posterior comparação com essas mesmas células após 7 dias de diferenciação

A



B



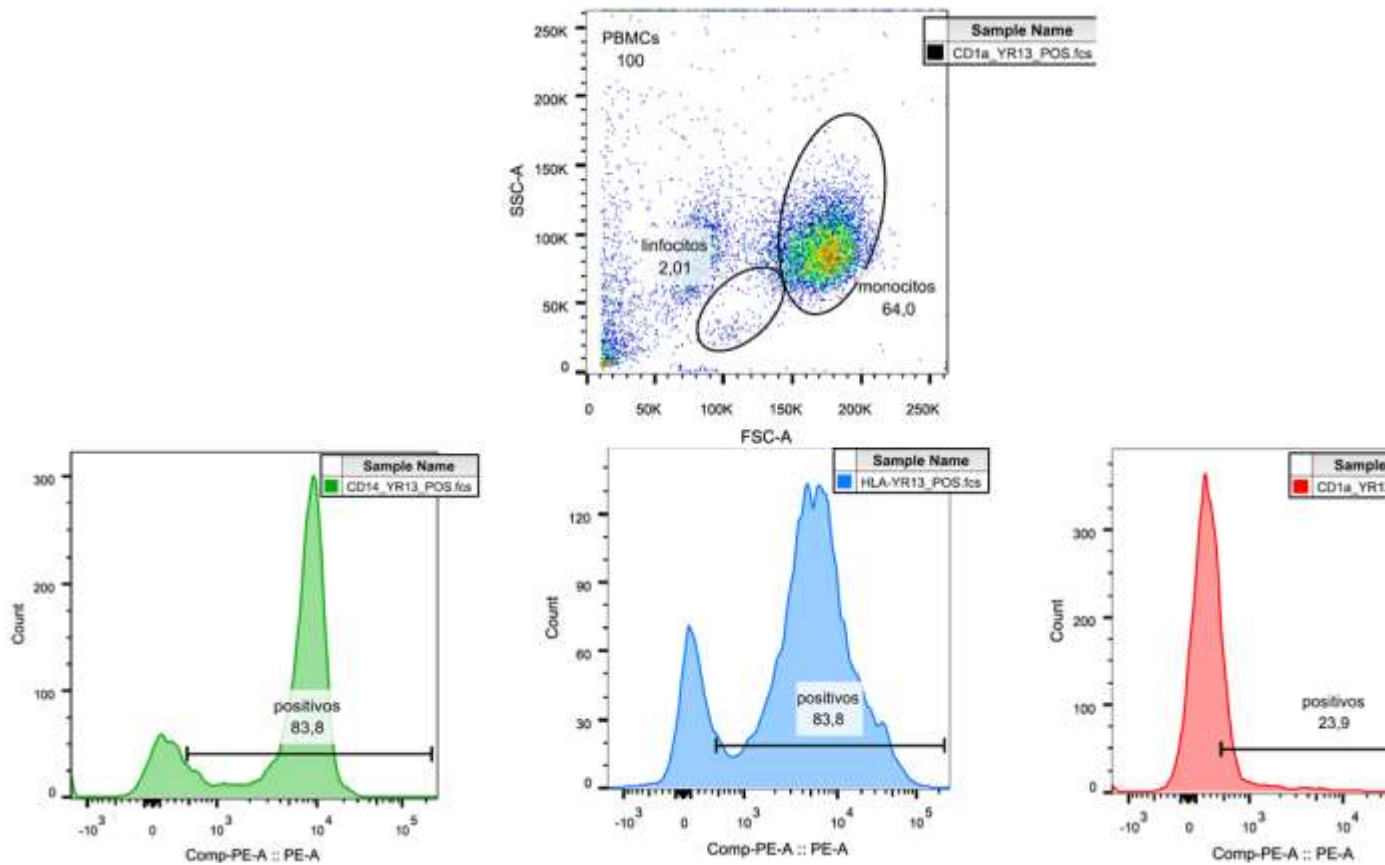
C

FIGURA 14. Eficiência de purificação de monócitos a partir de PBMCs de doadores. Visualização de células dentro da população referente ao monócitos definido pelo tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e detecção de CD14⁺ dentro da população total de a) PBMCs (antes da separação magnética), b) Fração negativa (população CD14⁻) e c) fração positiva (população CD14⁺)

5.5. DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS EM DCS.

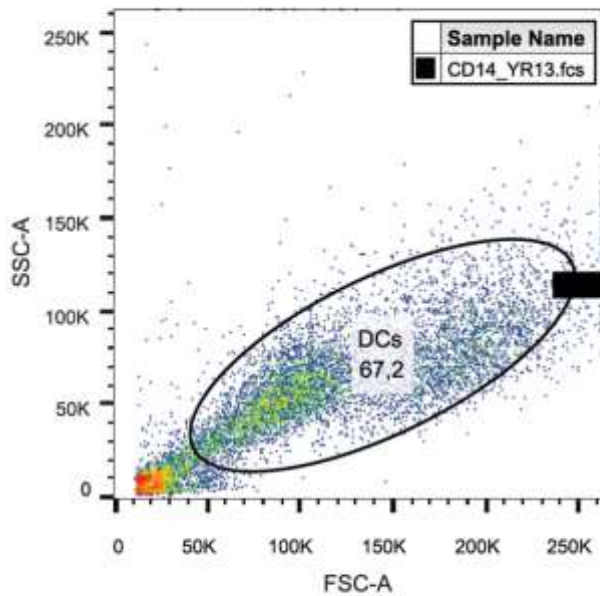
Para averiguar que houve diferenciação completa de monócitos em DCs, foi mensurado o nível de expressão de alguns marcadores que caracterizam essa linhagem celular. Foi avaliado a expressão de CD14, CD1a e HLA-DR das células após os 7 dias de cultivo em meio suplementado com IL-4 e GM-CSF e comparados com células obtidas na fração positiva da separação magnética.

A medida em que há diferenciação de monócitos em DCs, ocorre diminuição da expressão de CD14 e aumento da expressão de moléculas apresentadoras de antígenos CD1a e HLA-DR, apresentando fenótipo de uma APC. Estas após diferenciadas também apresentam uma alta expressão de da integrina CD11c (Steinman, Pack & Inaba, 1997).

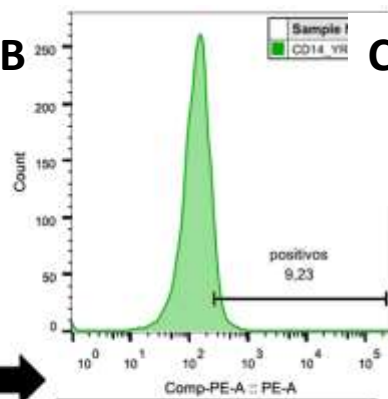
De acordo com a detecção desses marcadores para DCs, pode-se observar que houve diminuição significativa de expressão de CD14, enquanto obteve uma expressão aumentada de HLA-DR e CD1a, além de quase todas as células serem positivas para CD11c, como pode ser visualizado na figura 15, comprovando assim o sucesso da diferenciação dessas células a partir de seus precursores presente na circulação dos

doadores. A completa diferenciação das DCs também pode ser atestada através da sua morfologia conferida através de microscopia óptica, em que os monócitos possuem uma morfologia mais homogênea, arredondada e são fortemente aderidas à placa com o espaçamento contínuo entre elas, enquanto na medida que se transformam em DCs, as células vão adquirindo expansões citoplasmáticas e se tornam fracamente aderidas, com o centro da placa apresentando grandes aglomerados dessas células durante o processo de diferenciação (Inaba et al., 1994)

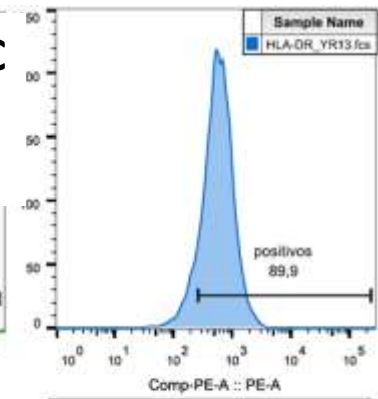
A



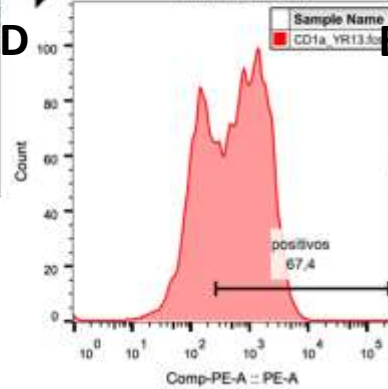
B



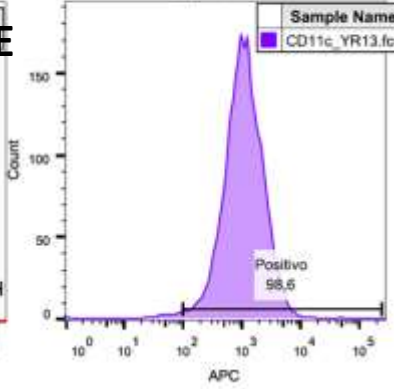
C



D



E



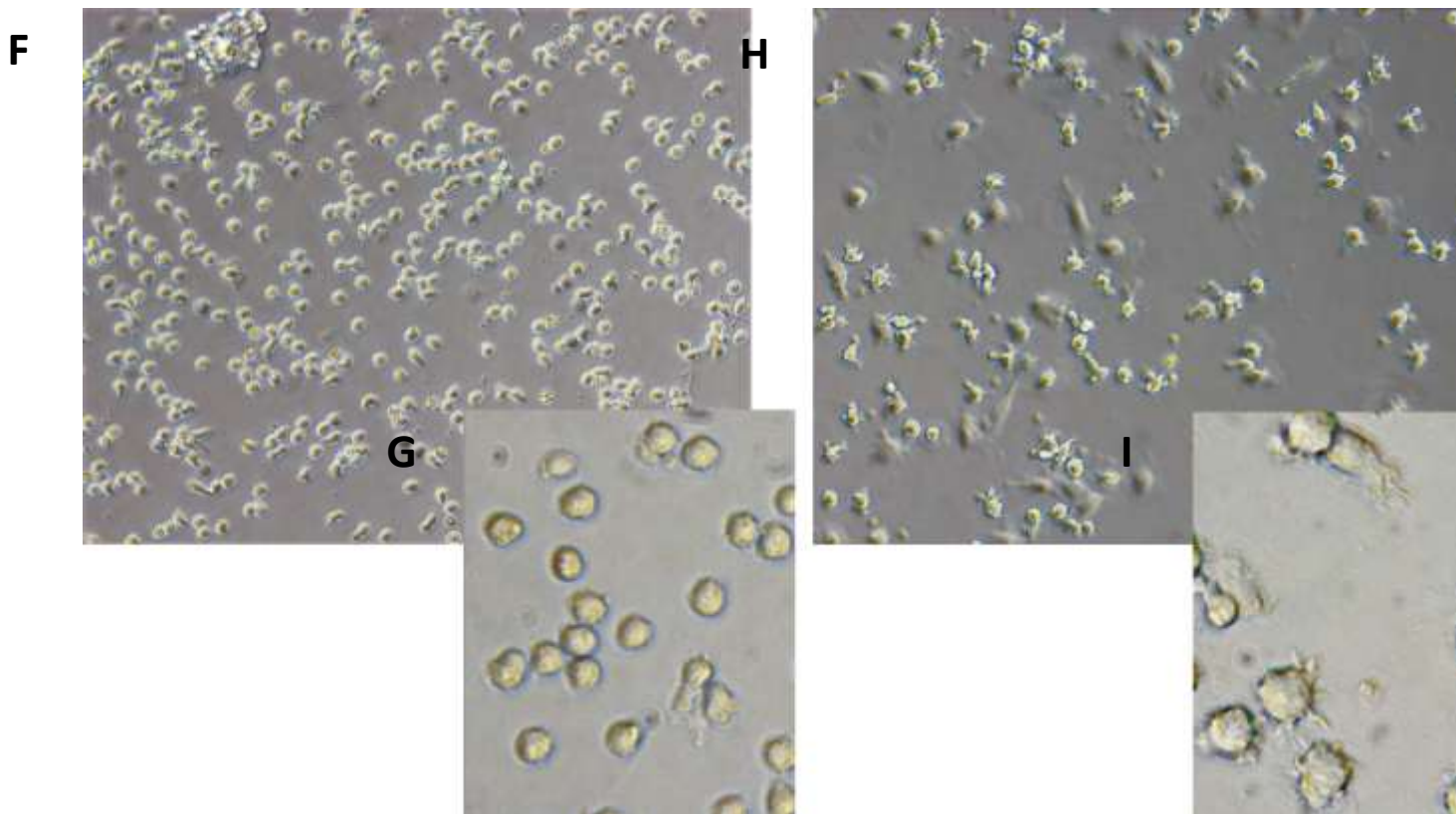


FIGURA 15. Diferenciação eficiente de DCs a partir de monócitos. a – e) Citometria de fluxo mostrando a) população de DCs após 7 dias de diferenciação sob ação de IL-4 e GM-CSF definida por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e detecção de marcadores que classificam essa linhagem celular como b) diminuição de CD14 e aumento de expressão de c)HLA-DR, d) CD1a e e) CD11c. f - i) Microscopia óptica mostrando diferenciação de mo-DCs. f e g) Monócitos no dia 0 e após h e i) 7 dias de diferenciação. f e h) células visualizadas em aumento de 20x e g e i) 40x

5.6. TAXA DE INFECÇÃO.

A fim de verificar se as DCs realmente estavam sendo infectadas pelo *T. cruzi* da cepa CL Brener após 12 dias de infecção (h.p.i), as células foram coletadas e foi realizado ensaios de imunofluorescência para detecção de parasitos intracelulares. Para isso foi utilizado DAPI para visualização dos núcleos de DCs e dos parasitos no interior dessas, assim como também foi utilizado anticorpos policlonais de soro proveniente de camundongo infectado para alvejar epítomos presentes no parasito seguidos de incubação com anticorpo secundário conjugado a Alexa flúor 488 (verde). As células não foram permeabilizadas, portanto, possibilitando os anticorpos terem acesso e marcarem apenas os parasitos que estava na porção de fora da célula, assim foi possível visualizar e discernir os parasitos que infectaram as DCs.

Os anticorpos policlonais eram capazes de alvejar proteínas provenientes de extratos de *T. cruzi* como pode ser visto no *western blot* realizado com soro de camundongo em uma proporção de 1:200, mostrado na figura 16, comprovando que o soro está apto a ser utilizado na imunofluorescência e detectar os parasitos.

Pode-se observar que os tripomastigotas metacíclicos estavam aptos a infectar as DCs dos doadores depois de 12 h.p.i após visualização de formas intracelulares (amastigotas) no interior das células, representado pelos núcleos vistos utilizando o filtro para o DAPI e que não eram detectados quando visualizados no filtro para o Alexa flúor 488, como pode ser constatado na figura 17.

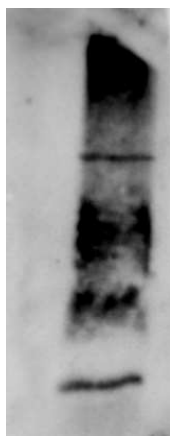


Figura 16. Anticorpos policlonais proveniente de soro de camundongo infectado reconhecem proteínas diversas de *T. cruzi*. *Western blot* de extrato de proteínas de *T.cruzi* da cepa CL Brener. usando anticorpos policlonais murino e anticorpo secundário conjugado a peroxidase para visualização por quimioluminescência após adição de substrato

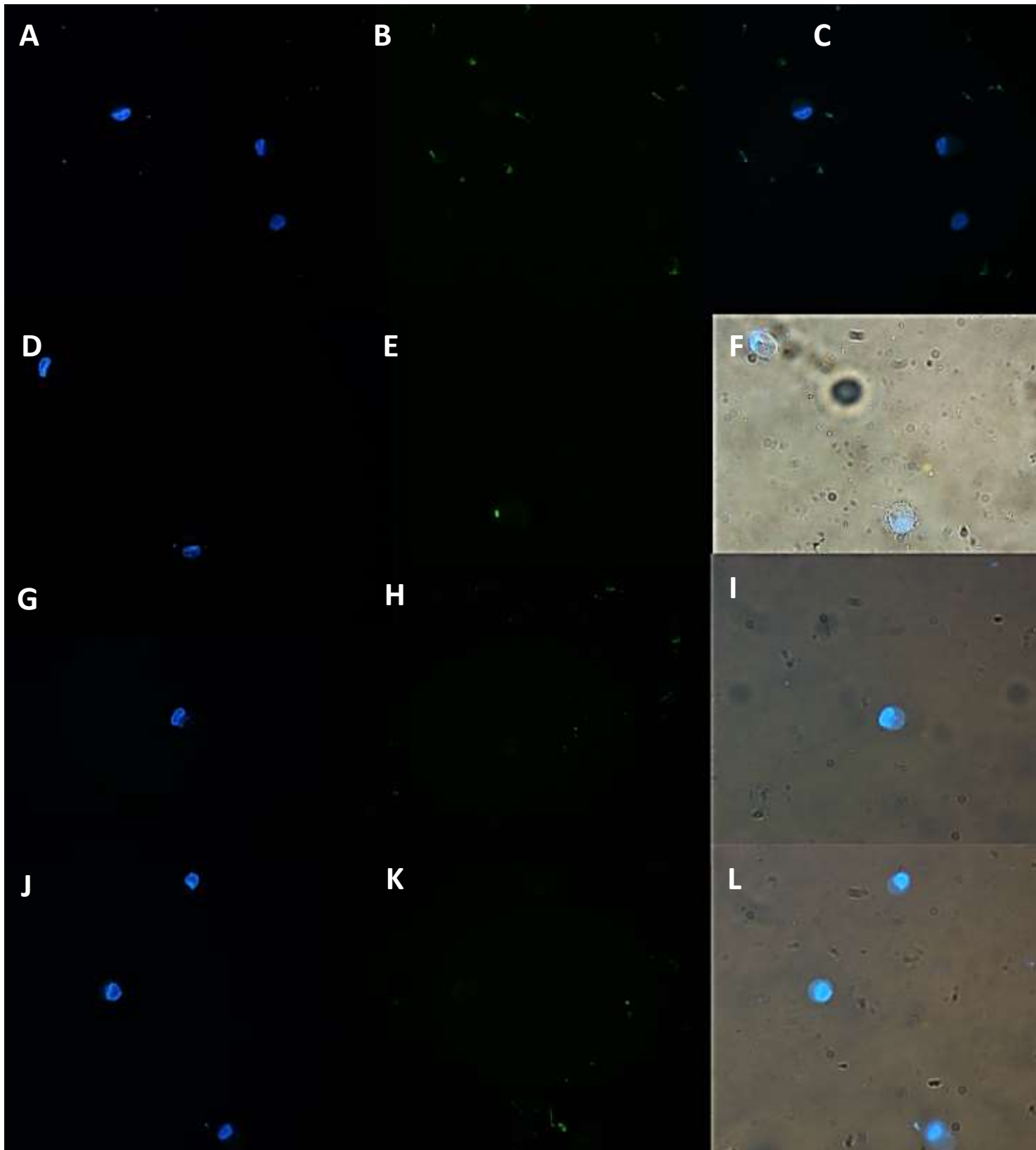


Figura 17. Infecção de DCs por tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* visualizado por imunofluorescência. a-l) DCs infectadas podem ser vistas pelas detecção de núcleos menores (amastigotas) próximos de núcleos maiores (DCs) através de vizualização do DAPI (azul) (a, d, g e j) e que não são visualizados pela detecção do Alexa flúor 488 (verde), ao contrário do que é visto para parasitos extracelulares, (b, e, h e k) e contraste de fase sobreposto junto com DAPI para delimitar mebrana plasmática das DCs e dos parasitos

(f, i e l). c) Sobreposição de DAPI e Alexa flúor para visualização dos parasitos extracelulares e DCs, concomitantemente.

Para avaliar a taxa de infecção de DCs pelos TMs após as 12h de interação ao longo dos testes de infecção, foram coletadas 10^5 células para confecção de lâminas e sua coloração com panótico com o intuito de visualizar o núcleo de amastigotas dentro da célula hospedeira, possibilitando a contagem de células infectadas e também mensurar a quantidade de amastigotas por célula. A infecção poderia ser aferida através de visualização de núcleos dos parasitos no interior das DCs, conforme mostrado na figura 18, mostrando a diferença de células controle e infectadas. Pelo menos 100 células foram contadas por condição e por replicata biológica para aferir a taxa de infecção.

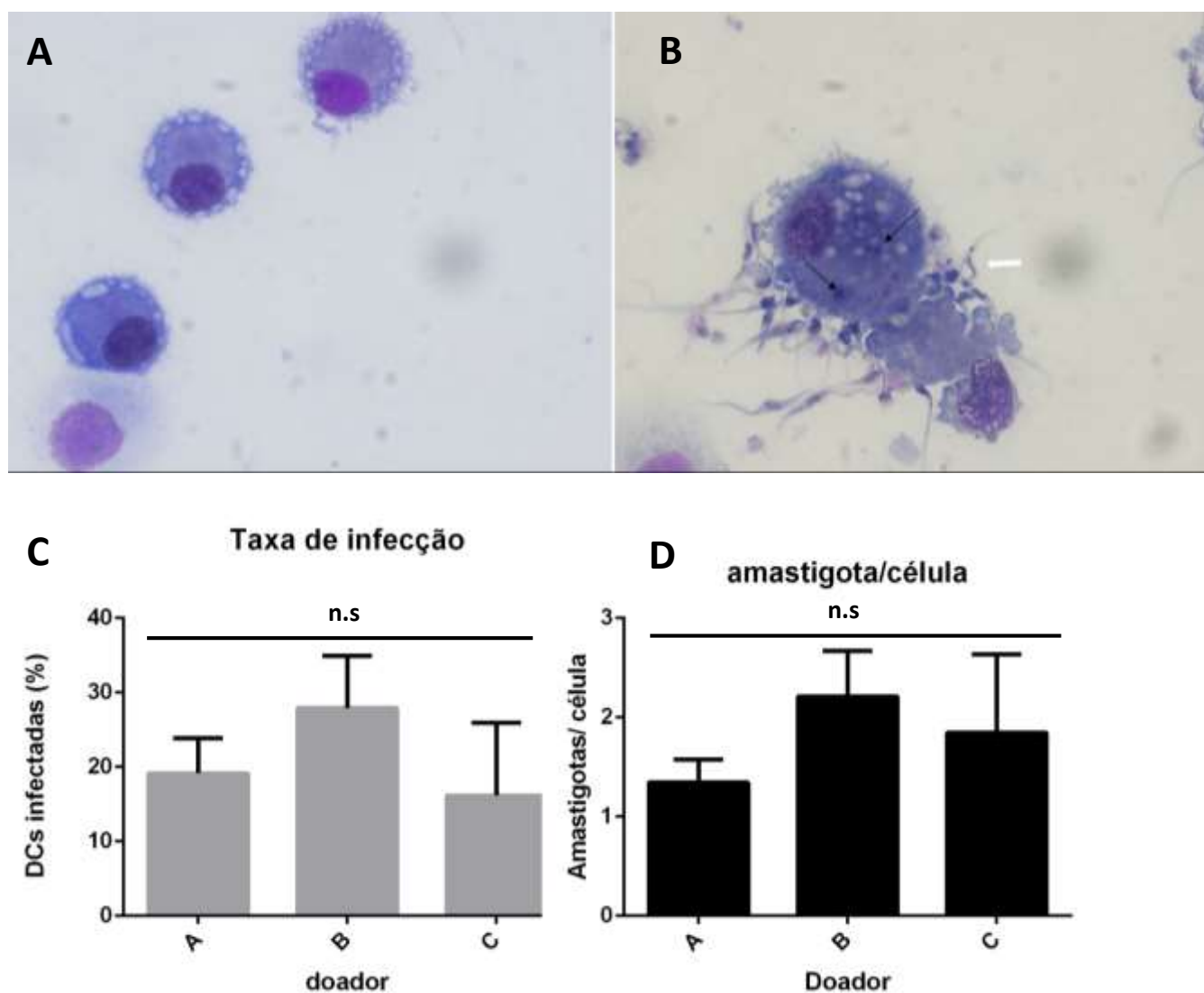


Figura 18. Taxa de infecção de DCs pelo *T. cruzi*. Representação de DCs através de microscopia óptica e coloração por panótico da condição a) controle e b) infectada, onde podem ser vistos parasitos extracelulares (seta branca) e intracelulares (seta preta). c) Porcentagem de DCs infectadas pelo parasito após 12 h.p.i e d) número de amastigotas por célula dentro dos doadores A, B e C. Análise estatística utilizando ANOVA one way. n = 3. N.s = não significativo.

Houve uma média de 21% de DCs dos doadores que foram infectadas e cerca de 1,78 amastigotas por célula em 12 h.p.i. Como pode ser visto, não houve diferença significativa de taxa de infecção entre os diferentes doadores, assim como também da quantidade de amastigotas por células.

5.7. ESCOLHA DE DEGS PARA VALIDAÇÃO

O transcriptoma realizado pelo nosso grupo anteriormente, comparando DCs em condições controle e infectadas pela cepa CL Brener do *T. cruzi* após 12h de infecção, mostrou que houve 1083 DEGs para o doador A, 1138 para o doador B e 3918 para o doador C. Visando selecionar genes que fossem bons candidatos para serem validados e posteriormente estudados mais profundamente, foram adotados alguns critérios para filtrá-los. As etapas realizadas para seleção de genes são demonstradas na figura 20.

Dentro desses DEGs, foram selecionados apenas os que tinham $\text{padj} < 0,01$, em que nos forneceu 2052 DEGs, em que 962 eram infraregulados e 1089 supraregulados. Após isso, os DEGs que apresentaram $\log_2\text{fold change} > 2$ foram filtrados. Após isso, a partir da análise de enriquecimento pela plataforma Gene Ontology (GO) (<http://geneontology.org/page/go-enrichment-analysis>), assim foram filtrados também aqueles genes que de certa maneira haviam alguma relação com resposta imunológica, que resultou em 72 genes infraregulados e 264 supraregulados.

Então tendo como base esses genes, outras plataformas de dados foram utilizadas para afunilar nossa pesquisa e assim selecionarmos aqueles DEGs que seriam validados posteriormente. Após análise no GO sobre a função molecular, o compartimento celular e o processo biológico que cada um desses genes estava atrelada, além da análise expressão diferencial em tecidos distintos no BioGPS (<http://biogps.org/#goto=welcome>). Depois foi observado se esses genes codificam proteínas e se possuem splicing alternativo no Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>), escolhendo aqueles genes com 1 a 3 transcritos por questões de viabilidade técnica para desenho de iniciadores.

Ao final do processo, foram escolhidos 8 genes (TNFS18, VNN1, CXCL9, IFNL1, USP18, FCN1, SEC24C e FOXQ1) para validação posterior por RT-qPCR. Além disso selecionamos 3 genes para serem usados como genes de referência: B2M, HPRT, como genes referência universais em humanos comumente utilizados na literatura científica e IL12B como controles específicos para DCs, para definir ao final qual deles seria um controle endógeno confiável.

Os genes selecionados e as suas respectivas características obtidas no transcriptoma, como gene ID, doadores em que tiveram expressão diferencial, número de reads e de RPKM obtidas nas condições controle e infectado, $\log_2\text{fold change}$, padj e se foi significativo foram sintetizados na tabela 2.

Tabela 2. Genes infra, supraregulados e endógenos selecionados para validação de transcriptoma realizado previamente através de RT-qPCR.

GeneID	Source	Readcount_Infected	Readcount_Control	RPKM_Infected	RPKM_Control	log2FoldChange	pval	padj	significant
ENSG00000120337	Bivs8C	267.082450978909	0.517917975797964	134.426823015653	0.140643691198461	-428372390788583,00000	978.725462300192	0.0017572	TRUE
ENSG00000112299	ClvsCC	0.428706113993333	0.964588756484999	0.14855635682954	0.183870669600192	-299548373827259,00000	102.895388240435	0.0013378	TRUE
ENSG00000085265	AlvsAC	0.59636856701492	108.725834545471	0.205512822601598	0.414476537183419	-279508363121031,00000	117.726494084312	0.0006010	TRUE
ENSG00000138755	Bivs8C	597.915389055002	0.766155971865785	221.121254817247	0.148573432050866	-446633269966614,00000	775.439185320806	0.0053582	TRUE
ENSG00000182393	Bivs8C	170.776944908627	0.145560981546238	201.532099968656	0.111312163462325	-965576382379874,00000	205.475139515426	5,82E+08	TRUE
ENSG00000184979	Bivs8C	104.596155319585	255.150872523803	456.007726147705	656.884776461475	-33434411285238,00000	138.932344271457	0.0001934	TRUE
ENSG00000164379	AlvsAC	394.163927675754	999.583020903434	223.042713714624	497.474518319789	205558810080211,00000	107.455254973344	0.0010453	TRUE
ENSG00000176986	ClvsCC	151.100928991457	897.963386435328	502.179838704075	218.817653515401	0,98836	150.452315872409	0.0001049	TRUE
ENSG00000120337	ClvsCC	296.665073028234	517.566701435531	1.326208387641	194.205404239741	209941106826437,00000	801.107750470147	3,54E-05	TRUE
ENSG00000165704									
ENSG00000166710									
ENSG00000113302									

Infra-regulados	■
Supra-regulados	■
Endógenos	■

Referente aos genes supraregulados, TNFSF18 (Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 18) codifica uma citocina que se liga ao receptor TNFRSF18 ou GTIR que está relacionada com a regulação de linfócitos T. O gene VNN1 (Vascular Non-Inflammatory Molecule) uma proteína que pode ser secretada ou associada a membranas e que está relacionado com o tráfico de células hematopoiéticas. Já CXCL9 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 9) codifica um quimiocina que atrai linfócitos para onde sua concentração é demasiada, se ligando ao seu receptor, CXCR3, porém não é capaz de recrutar neutrófilos. IFNL1 (Interferon Lambda 1), também conhecido com IL29, codifica uma citocina que está distantemente relacionada com os interferons do tipo 1 e geralmente sua expressão é induzida por infecção viral, que é responsável por aumentar a expressão de MHC-I, podendo interagir com receptores heterodiméricos compostos por IL10RB e IFNLR1. USP18 (Ubiquitin Specific Peptidase 18) codifica uma deubiquitinase e se localiza no núcleo, está envolvido na infra-regulação de uma resposta mediada pelos interferons do tipo I.

Já acerca dos genes infra-regulados, FCN1 (Ficolin 1) codifica uma proteína majoritariamente expressa em leucócitos provenientes do sangue periférico e acredita-se que tenha a função de ser uma proteína do plasma com atividade de se ligar a elastina e ser considerado uma lectina que atua como PRR. O gene SEC24C (SEC24 Homolog C, COPII Coat Complex Component) codifica uma proteína que sua função está atrelada a transporte de vesículas do retículo endoplasmático. E FOXQ1 (Forkhead Box Q1) codifica um fator de transcrição que está relacionado com desenvolvimento embriogênico, regulação do ciclo celular, sinalização celular e tumorigênese. Dados referentes da plataforma GeneCards (<https://www.genecards.org>), que fornece informações a respeito de genes humanos.

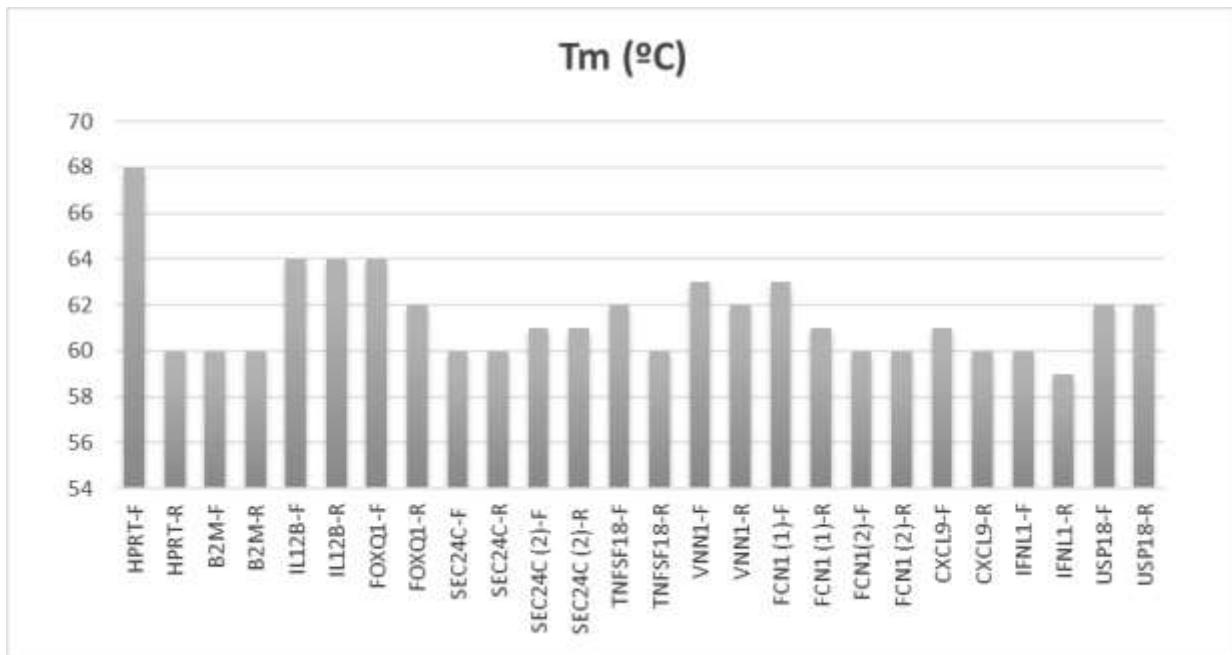
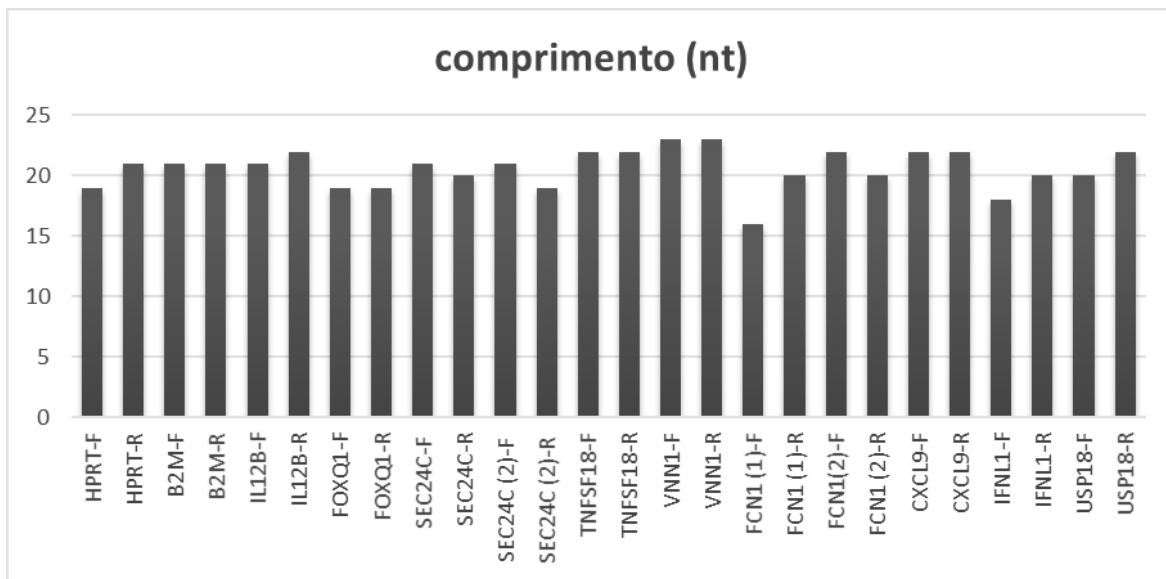
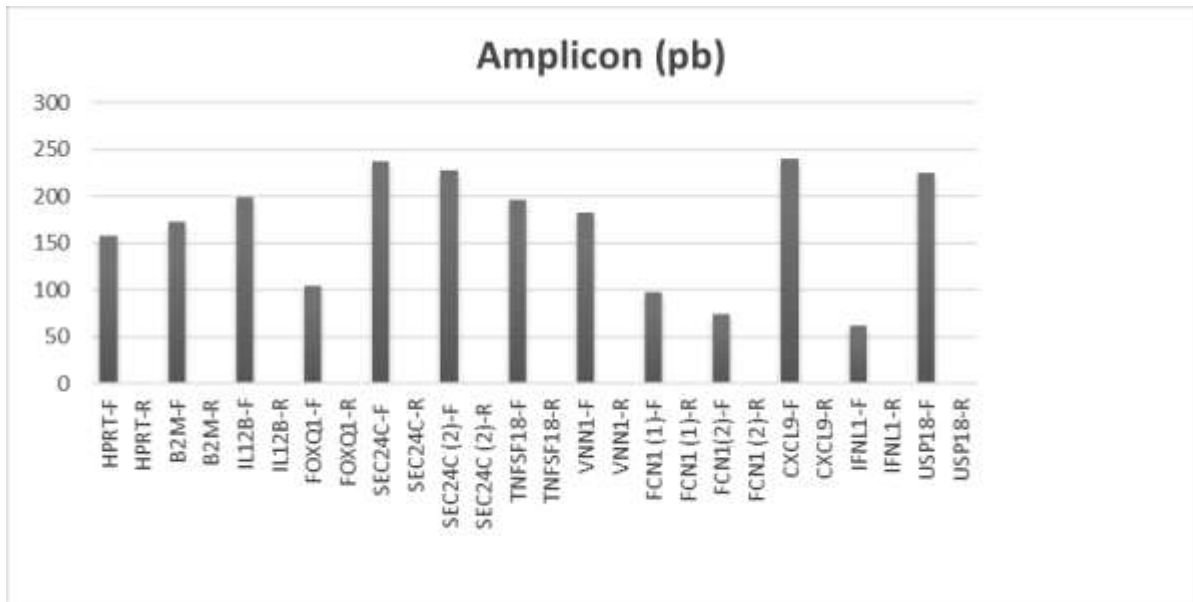
5.8. DESENHO E PADRONIZAÇÃO DE INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DE GENES SELECIONADOS

Depois da escolha dos genes, foram selecionados pares de iniciadores que atendiam todos os requisitos e exigências para adequação à validação de expressão gênica e comparação com o transcriptoma por RT-qPCR de maneira confiável, evitando falsos-positivos. Também foi priorizado amplificação dos alvos usando de forma conjunta todos os pares de iniciadores, para que todas as reações fossem feitas dentro de uma mesma etapa de PCR, evitando variação técnica.

Foram então selecionados e encomendados a síntese dos iniciadores apresentados na tabela abaixo pela empresa Exxtend (<https://www.exxtend.com.br/site/>). As sequências dos iniciadores obtidas ao longo do processo de seleção e confeccionados são mostrados na tabela 3. Foi avaliado as características destes pares em conjunto a fim de mostrar que todos possuíam parâmetros semelhantes, conforme ilustrados nos gráficos da figura 20.

Tabela 3. Iniciadores desenhados, selecionados e encomendados para realização de RT-qPCR para genes selecionados previamente. Dados referentes ao iniciador forward (F) ou reverse (R) quanto a sequência de nucleotídeos, tamanho do amplicon que seria gerado utilizando os pares de iniciadores citados em pares de base (pb), temperatura de fusão (Tm) em °C, comprimento de cada iniciador em nucleotídeos (nt) e porcentagem de guanina e citosina presente em cada iniciador (GC%)

Código	primers				
	Sequência	Amplicon (pb)	Tm	comprimento(nt)	GC%
HPRT-F	TATGGCGACCCGAGCCCT	158	68	19	68
HPRT-R	CATCTCGAGCAAGACGTTTCAG		60	21	52
B2M-F	GTCTTTCAGCAAGGACTGGTC	173	60	21	52
B2M-R	CAAATGCGGCATCTTCAAACC		60	21	48
IL12B-F	TGGATGCCGTTTACAAGCTCA	199	64	21	52
IL12B-R	TGGACCTGAACGCAGAATGTCA		64	22	50
FOXQ1-F	GTGCGCCACAACCTTTTCGC	105	64	19	65
FOXQ1-R	CTCGCTGTTGGGGTTGAGC		62	19	63
SEC24C-F	CCAGTGGTTTGAGTGTCTGTC	237	60	21	52
SEC24C-R	TCAGTAGCTGCCGAATCTCC		60	20	55
SEC24C (2)-F	GAGCCGGGAGATAATCTGAATGC	228	61	21	52
SEC24C (2)-R	GCTGTGGACCTGATTGCC		61	19	63
TNFSF18-F	GAGATCATCCTGGAAGCTGTGG	196	62	22	54
TNFSF18-R	CCAGTCAGACACCTTATTCACG		60	22	50
VNN1-F	GATCACATCAGCAGCAGATCAGG	182	63	23	52
VNN1-R	GTCTTTCTTGTACTGGGGTCTGG		62	23	52
FCN1 (1)-F	GCGGCCCGCCTAGACG	98	63	16	81
FCN1 (1)-R	GGGGAAATGGGGTACTTCC		61	20	60
FCN1(2)-F	ATGGCTCTGTGGACTTCTATCG	75	60	22	50
FCN1 (2)-R	CGTCATGGGAGTGTGTCTGG		60	20	60
CXCL9-F	GTGGTGTCTTTTCTCTTGGG	240	61	22	50
CXCL9-R	CCTTACATCTGCTGAATCTGG		60	22	50
IFNL1-F	TGTCACCACAGGAGCTAGC	62	60	18	58
IFNL1-R	CTTGAGTGACTCTTCCAAGGC		59	20	52
USP18-F	ATCCGGAATGCTGTGGATGG	225	62	20	55
USP18-R	AGACTCCGTAGATCCAGGAACG		62	22	54



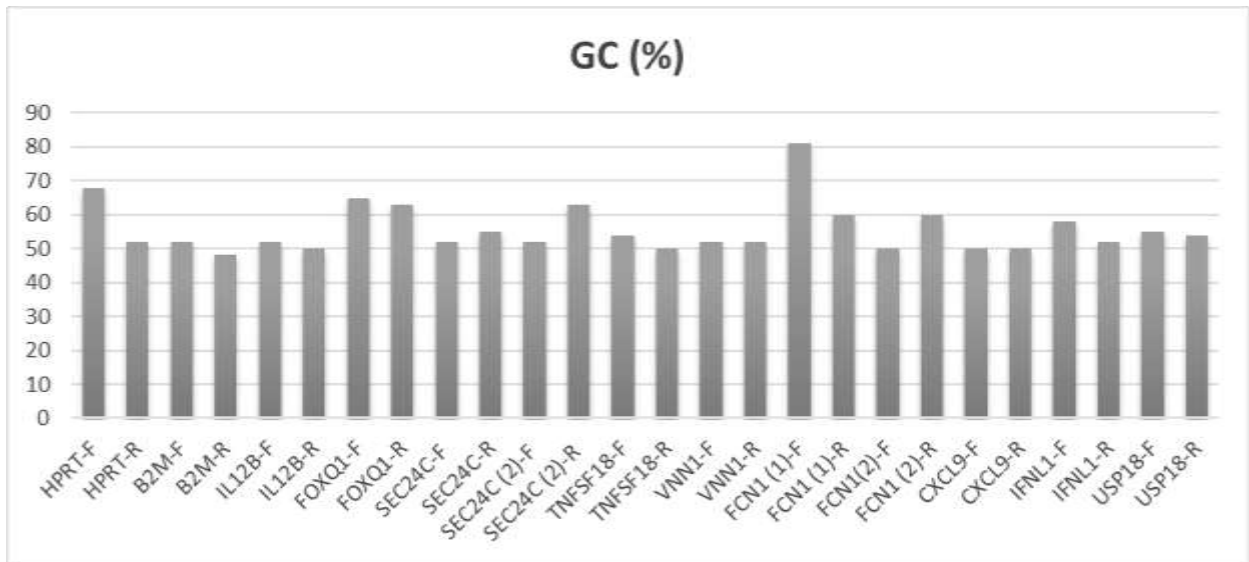


Figura 20. Comparação entre parâmetros entre os diferentes iniciadores para cada gene, como a) tamanho do amplicon gerado em pares de base (pb), b) tamanho de cada iniciador em nucleotídeos (nt), c) temperatura de fusão (Tm) e d) porcentagem de guanina e/ou citosina presente em cada iniciador (GC%)

Após o desenho e síntese de iniciadores, estes foram testados para analisar a sua confecção de maneira correta e amplificação adequada dentro dos seus respectivos alvos. Foi realizado então uma PCR convencional utilizando a GoTaq DNA polimerase (Promega) e 200nm de cada iniciador para amplificação de seus respectivos alvos correspondente em 100 ng de cDNA oriundo de RNA de DCs controle e infectadas por *T. cruzi*.

Para isso foi realizado anteriormente uma RT-PCR utilizando GoTaq 2 step RT-qPCR system (Promega). Os resultados são mostrados na figura 21. Como observado, a maioria dos genes tiveram amplificação em ambas as condições, com exceção dos amplicons referentes ao gene FOXQ1 e VNN1. Porém ao longo das qPCRs realizadas para testes subseqüente, foi observado a amplificação dos outros genes, com exceção de FOXQ1, mostrando que talvez abundância de transcritos fosse muito baixa e amplificação não conseguia ser vista em baixa resolução conferida pelo gel de Agarose, o que podia ser atestado pela grande quantidades de ciclos necessários para esse alvos serem visualizados em qPCR.

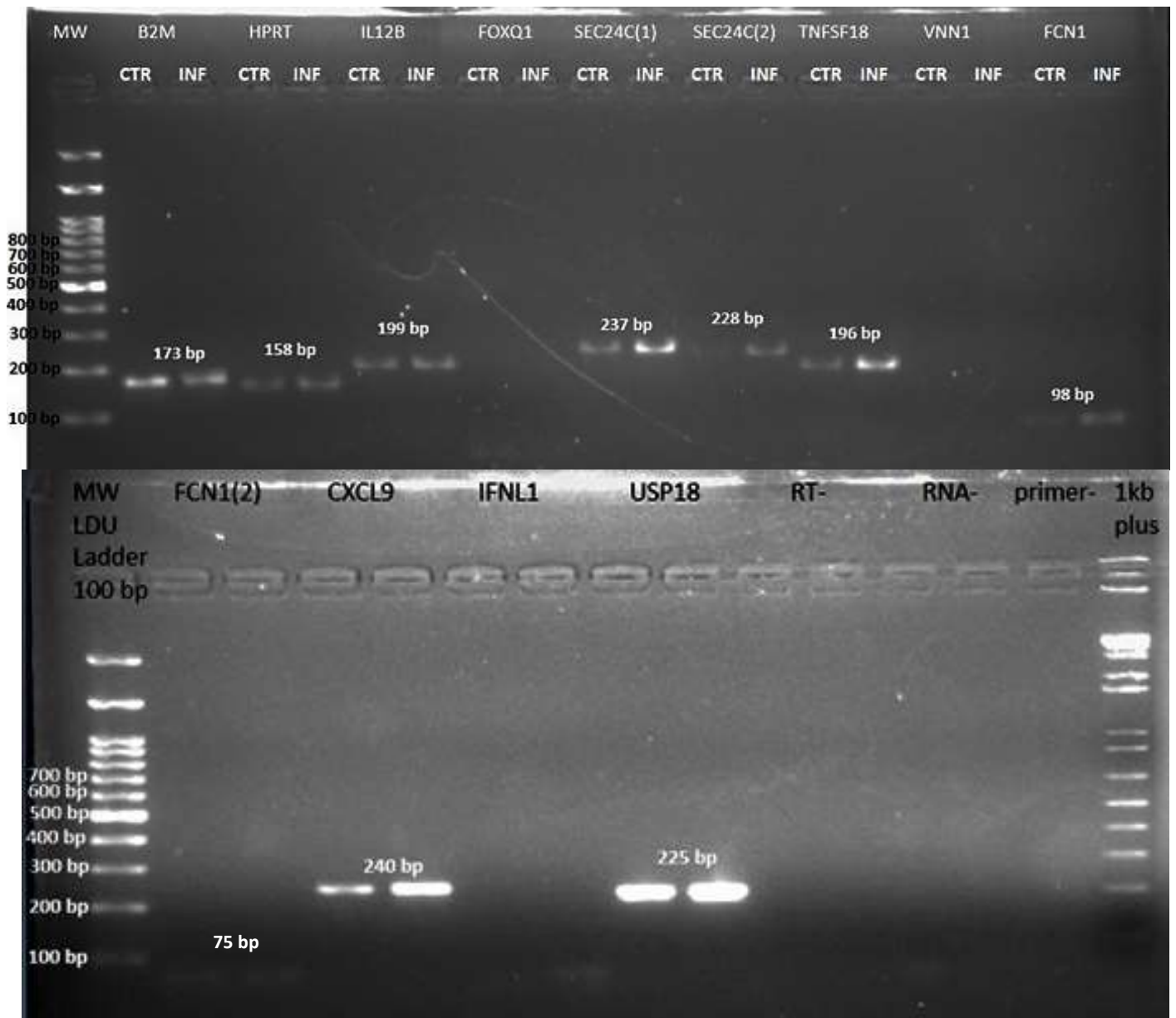


Figura 21. Iniciadores desenhados e sintetizados amplificaram alvos selecionados. Resultado de PCR em gel de Agarose 2,5% de iniciadores confeccionados para alvos selecionados em cDNA provenientes de transcrição reversa de RNA de DCs controle e infectadas por *T. cruzi*.

Como FOXQ1 não havia amplificado anteriormente, nem mesmo em outros testes realizados, e também HPRT estava amplificando fracamente para um controle, foram sintetizados novos pares de iniciadores para esses alvos seguindo as mesmas exigências para desenhos de iniciadores anteriores e feito combinações diferentes entre os pares novos e os antigos para averiguar se em algum desses haveria amplificação. Como pode ser visualizado na figura 22, a combinação de iniciadores F1 (iniciador forward antigo) e R2 (iniciador reverse novo) tanto para FOXQ1 quanto para HPRT foi capaz de amplificar amplicons de 370 bp e 150 bp, respectivamente, com melhor visualização quando comparado com combinação antiga de pares de iniciadores (F1+R1). Apesar de FOXQ1 apresentar uma banda fraca visualizada em gel de Agarose, nas qPCRs subsequentes foi possível ver amplificação do alvo de modo satisfatório.

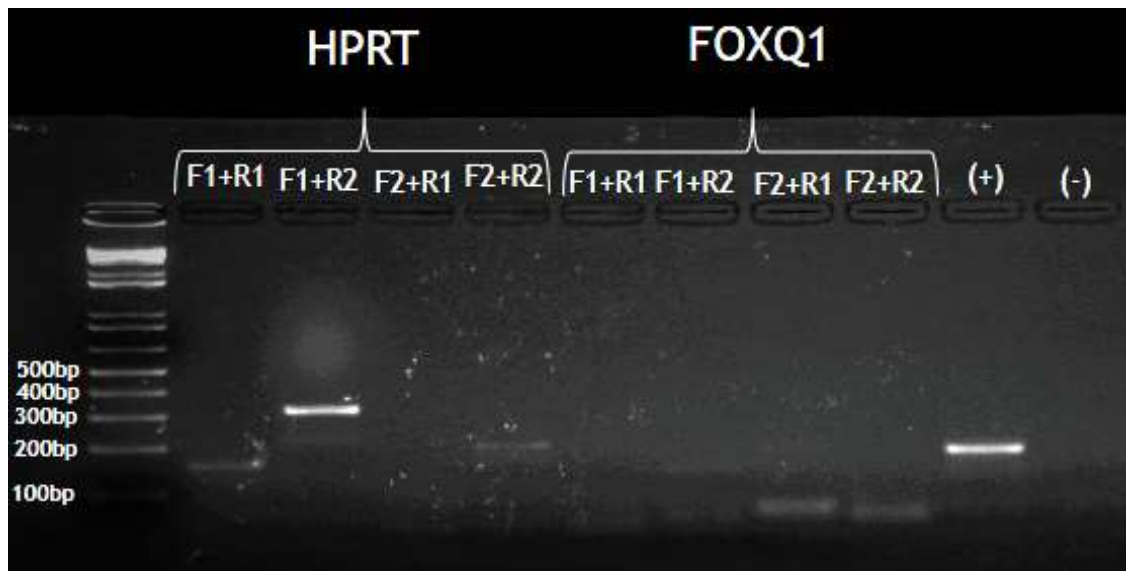


Figura 22. Nova combinação de iniciadores F1 e R2 amplificam genes HPRT e FOXQ1. Resultado de PCR utilizando diferentes combinações de iniciadores, utilizando tanto iniciadores antigos (F1 e R1) como iniciadores novos (F2 e R2) em gel de Agarose 2,5%

A fim de averiguar se iniciadores desenhados não amplificariam DNA genômico caso houvesse contaminação deste nas amostras de RNA e evitar que expressão gênica dos transcritos fossem aferida de maneira equivocada, foi realizado um teste para verificar se iniciadores, mesmo sendo confeccionados para se anelarem junção éxon-éxon, seriam capazes de amplificar DNA genômico.

Visto que devido a pouca quantidade de células obtidas no final da infecção para extração de RNA e a consequente quantidade limitada de material disponível para todas as reações com todos os genes propostos, seria inviável o uso de DNase para tratamento das amostras com o intuito de degradar possível GDNA que estivesse presente nas amostras, visto que havia perda de cerca de 50% do material no processo de desativação da DNase e recuperação do RNA restante, além de poder interferir na integridade do RNA usado nas análises posteriores.

Foi realizado então uma PCR convencional usando DNA genômico (gDNA) como molde e foram testados todos os pares de iniciadores para observar se haveria amplificação. Foi verificado que alguns pares de iniciadores possibilitavam a amplificação de *off-targets*, como os iniciadores para B2M, IL12B, FCN1-1 e SEC24C-2 (1750, 1700, 1250 e 420 bp, respectivamente), de acordo com resultado da PCR mostrado em gel de Agarose 2,5% da figura 23.

Como as ampliações observadas em GDNA para os pares de iniciadores para os 3 primeiros genes descritos eram muito maiores que os esperados para o amplifcon referente ao cDNA, que estão entre 50 e 250 bp, a amplificação de *off-targets* poderia ser evitada diminuindo o tempo de extensão da Taq Polymerase, o que de fato foi visto após diminuir o tempo de extensão de 18s para 10s. Como *off-targets* de SEC24C-2

apresentou tamanho próximo do amplicon desejado, ele seu comportamento foi analisado posteriormente em qPCRs para saber se esse seria descartado.

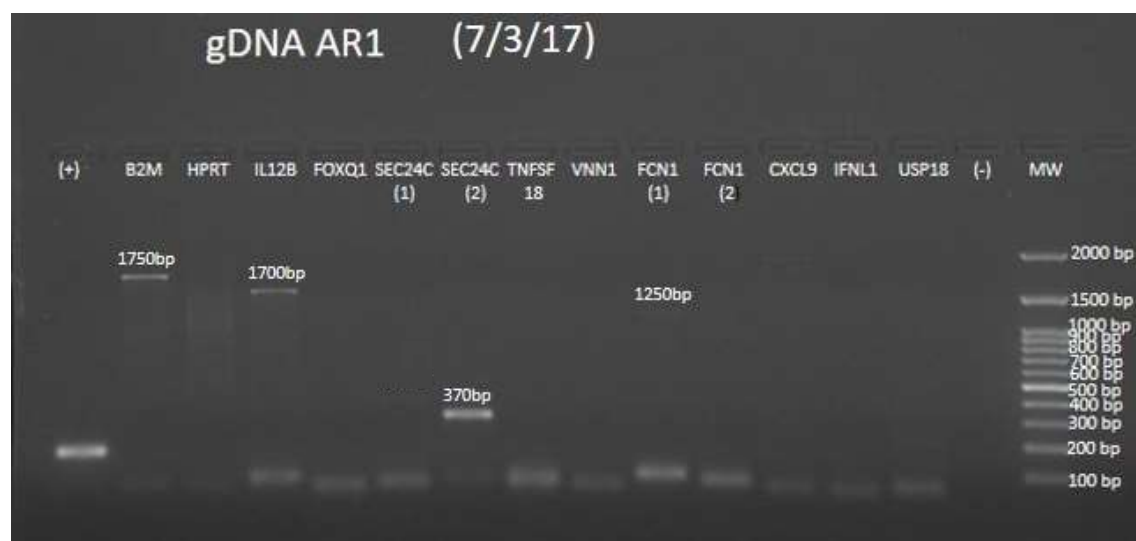


Figura 23. Amplificação de *off-targets* em gDNA proveniente de PBMCs humanas. Resultado de PCR de gDNA em gel de Agarose 2,5% para verificar amplificação de *off-targets* dos pares de iniciadores designados para os genes selecionados.

O próximo passo foi atestar a eficiência dos iniciadores designados para a validação dos genes selecionados do transcriptoma em RT-qPCR para gerar dados confiáveis a respeito da disponibilidade de RNA. Para atingir esse objetivo, foi realizado então RT-qPCR para a amplificação dos transcritos de interesse usando 4 a 5 diluições diferentes de RNA para atestar se amplificação seria proporcional a quantidade de material fornecido por reação e assim mensurar porcentagem de eficiência dos respectivos pares de iniciadores.

As diluições de cDNA foram feitas a partir de 1500 até 0,15 ng de RNA. Visto a quantidade limitada de RNA obtida de DCs e as concentrações maciças que seriam utilizadas para efetuar os testes subsequentes, foi realizado primeiramente um teste para verificar se poderia ser utilizado RNA proveniente de PBMCs para a realização dos testes de eficiência de iniciadores, devido a maior disponibilidade e facilidade de obtenção proveniente do sangue dos doadores.

Para este fim, foi realizado uma PCR utilizando os pares de iniciadores designados em cDNA oriundo de RT-PCR de RNA isolado de PBMCs. Como pode ser observado na figura 24, houve amplificação da maioria dos genes designados em cDNA proveniente de PBMCs, com exceção de IL12B, FOXQ1, FCN1-1 e IFNL1. Isso mostra que teste de eficiência de iniciadores poderia ser realizado com cDNA de PBMCs, viabilizado o uso de grandes quantidades de RNA. Quanto aos demais genes que não apresentaram amplificação em PBMCs, seria utilizado cDNA de DCs.

Como também nessa PCR pode ser visto amplificação de *off-targets* em iniciadores para genes FCN1-2, este gene foi descartado de análises posteriores

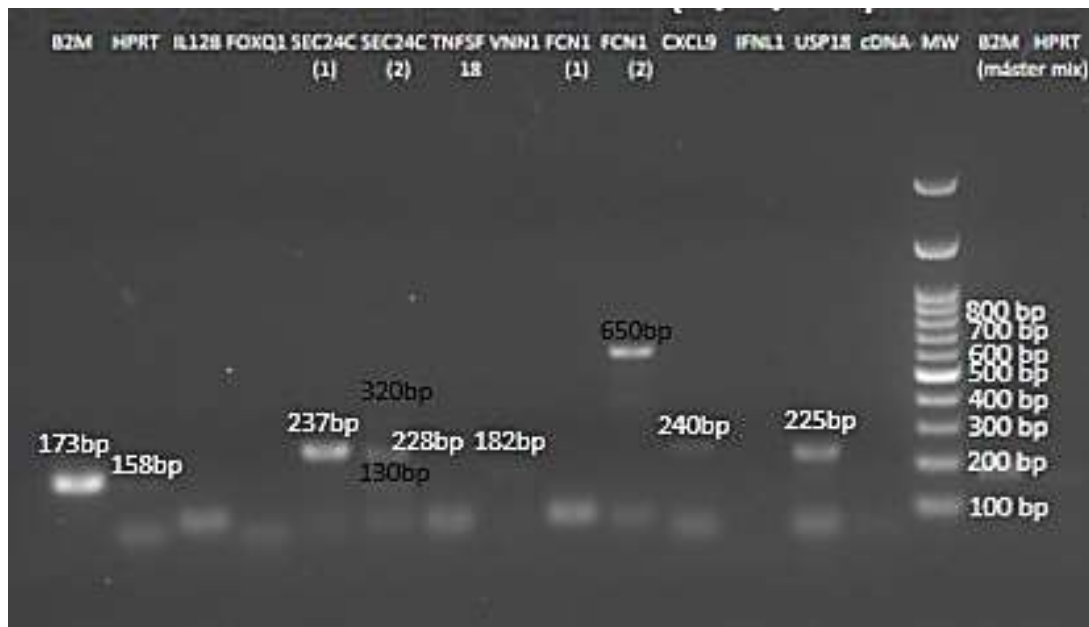


Figura 24 Amplificação de genes selecionados também pode ser visto em cDNA proveniente de RNA de PBMCs. Resultado de PCR em gel de Agarose 2,5% para genes selecionados em cDNA proveniente de PBMCs utilizando todos os pares de iniciadores que seriam utilizados.

Visto a possibilidade de se utilizar cDNA de PBMCs e a viabilidade de uma quantidade maior de RNA ser utilizada para fazer as diluições, o próximo passo seria realizar o teste de eficiência de iniciadores através de RT-qPCR utilizando diluições de 10x, em triplicata e usando análise de quantificação em curva padrão no software StepOne.

O resultado do teste de eficiência para cada par de iniciadores referente à curva padrão, plot de amplificação e temperatura de desnaturamento é apresentado na figura 1S do material suplementar e parâmetros alcançados foram resumidos na tabela 4. Como mostrado, todos os pares de iniciadores alcançaram eficiência maior que 90%, além disso, todos os produtos de qPCR obtiveram apenas um único pico quando analisado na curva de desnaturação, mostrando que só houve a amplificação de um único alvo. Aqueles que apresentaram dois picos, o segundo pico com menor T_m está relacionado com as últimas diluições, que devido a uma quantidade pequena de material, houve detecção de fluorescência referente à formação de dímeros de iniciadores do que amplificação do cDNA em si.

O T_m médio de todos os amplicons, que possuem tamanhos e quantidades similares de GC.(vide imagem 20), foi de 83,33°C com desvio padrão de 1,39, ou seja, apresentando pequena variação. Portanto, todos estes resultados mostraram que os pares de iniciadores confeccionados para seus respectivos alvos eram capazes e amplificar de maneira proporcional o cDNA referente à cada alvo e, portanto, estavam aptos para aferir expressão gênica de transcritos para validação de genes de maneira confiável.

Tabela 4. Parâmetros alcançados para pares de iniciadores em testes de eficiência desses. Representação de gene alvo, a porcentagem da eficiência obtida, a regressão linear (R^2), o número de diluições utilizado para obter a eficiência mostrada, as diluições que foram utilizadas, a temperatura de desnaturação média para cada alvo dentro das diluições utilizadas, a quantidade de RNA inicial usada para a primeira diluição, e a qPCR que foi obtida a eficiência desejada

eficiência de primers - curva padrão							
gene	eficiência	R^2	nº diluições	diluições usada	Tm (°C)	[RNA] (ng)	qPCR
B2M	90,1	1	5	x	82,08	1500	3º
HPRT	91,4	0,994	4	últimas	83,93	1500	4º
IL12B	97,7	0,955	5	x	84,52	1200	5º
VNN1	103,7	0,996	4	últimas	82,23	1500	3º
FOXQ1	92,86	0,998	4	primeiras	86,76	1200	5º
FCN1-1	99,7	0,996	5	x	82,53	1500	3º
SEC24C-1	102,3	0,982	5	x	84,17	1500	3º
SEC24C-2	101	0,97	4	primeiras	83,62	1500	5º
TNFSF18	105,4	0,984	5	x	83,92	1200	5º
CXCL9	90,2	0,994	5	x	81,71	x	12º
IFNL1	110	0,956	4	primeiras	82,07	x	10º
USP18	94,1	0,88	5	x	82,44	1500	4º

Foram utilizados os produtos de qPCR do teste de eficiência de iniciadores para visualizar amplificação de alvo e averiguar tamanho esperado em gel de Agarose 2,5% e o resultado é demonstrado na figura 25, em que foi utilizado uma das réplicas (que mais se assemelhou com a outra) referente a 1ª diluição utilizada para os testes, ou seja, aquela com maior concentração de RNA e a última diluição em que se alcançou 90% de eficiência, podendo ser a 4ª ou a 5ª, que havia menor concentração de RNA e o controle RT- (sem transcriptase reversa), que não havia cDNA, a fim de averiguar provável amplificação em gDNA contaminante ou visualizar dímeros de iniciadores que poderiam estar sendo amplificados.

Como mostrado na figura 28, a maioria dos produtos de qPCR amplificaram os alvos de seus respectivos genes e apresentaram amplificação proporcional na primeira (maior concentração de RNA) e última (menor concentração de RNA) diluições utilizadas, corroborando amplificação de alvo específico. Aqueles que não apresentaram banda em última diluição, pode ser devido a baixa amplificação justificada pela baixa concentração de molde e não pode ser visualizada no gel de Agarose, que possui pouca resolução, quando comparado pela detecção de fluorescência em qPCR, em que a sensibilidade de detecção do produto é mais acurado. Mas quando comparado com CTs apresentados no plot de amplificação das qPCRs respectivas para cada gene, há diferenças nítidas no ciclo que foi detectado a fluorescência para os dois extremos de diluição,

corroborando assim que houve amplificação em ciclos distintos das diferentes diluições, em que amplificação foi proporcional a quantidade de material.

Já as amostras que obtiveram bandas de intensidade semelhante tanto na primeira quanto última diluição, pode ser explicada talvez pela baixa resolução inerente do gel de Agarose, que geralmente foram vistos nos alvos que amplificam com mais facilidade, havendo grandes quantidades de material que não são tão discerníveis de se observar no gel, mas ampliações de diluições distintas podem ser vistas com mais acurácia no número de ciclos da qPCR necessário para detectar alvo.

Em conjuntos, os resultados referentes a padronização de pares de iniciadores, mostraram-se satisfatórios e confiáveis para dar prosseguimento à validação dos genes que se mostraram diferencialmente expressos no transcriptoma inicial.

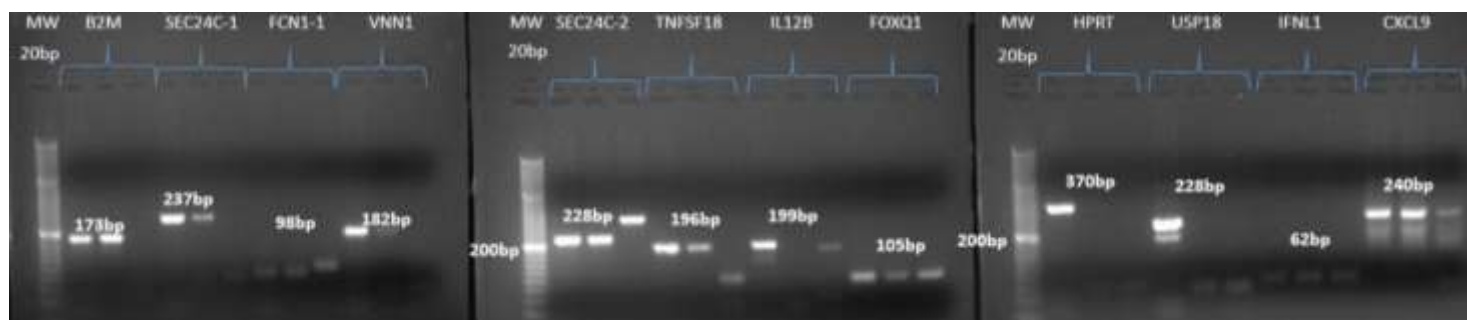


Figura 25. Produtos provenientes de qPCR possuem alvos com tamanho esperado e amplificaram proporcionalmente conforme sua diluição de cDNA. Resultado de qPCR de testes de eficiência de iniciadores mostrados em gel de Agarose 2,5%, sendo apresentados a primeira, última diluição e controle negativo sem cDNA (RT-), respectivamente, feitas para amplificar cada alvo.

5.9 ESTRATÉGIA PARA VALIDAÇÃO DE DEGS POR RT-QPCR

Com o intuito de verificar qual seria a forma mais aplicável e confiável para validação do transcriptoma por RT-qPCR, a etapa seguinte seria a montagem de uma estratégia para a realização das RT-qPCRs e mensuração da expressão gênica a fim de conferir se apresentaria um padrão compatível com os resultados apresentados no transcriptoma e que não fossem submetidos a uma variação elevada. Foi definido então que os genes seriam validados por triplicata biológica de cada doador, e que dentro dessas, seriam realizadas uma triplicata técnica para cada gene, com o objetivo de aumentar a validade estatística e apresentar dados verossímeis.

Além disso, seriam utilizados dois tipos de controles negativos: aquelas reações que tiveram como template amostras de RNA que não foram adicionadas RT (cDNA-) e água, com a finalidade de observar se prováveis ampliações nesses controles seriam referentes à contaminação com gDNA ou referentes a dímeros

de iniciadores, respectivamente. Como foi priorizado realizar a qPCR de uma mesma réplica biológica em uma única placa (com capacidade máxima de 96 reações), para excluir a chance de que diferença na expressão gênica de genes distintos serem decorrentes de falhas técnicas provenientes do aparelho ou de manipulação do operador na confecção das reações, os controles negativos seriam feitos em uma única réplica devido a falta de capacidade da placa. O modelo de como foi montado a placa de qPCR com seus respectivos submix (pares de iniciadores) e templates, é ilustrado na figura 26

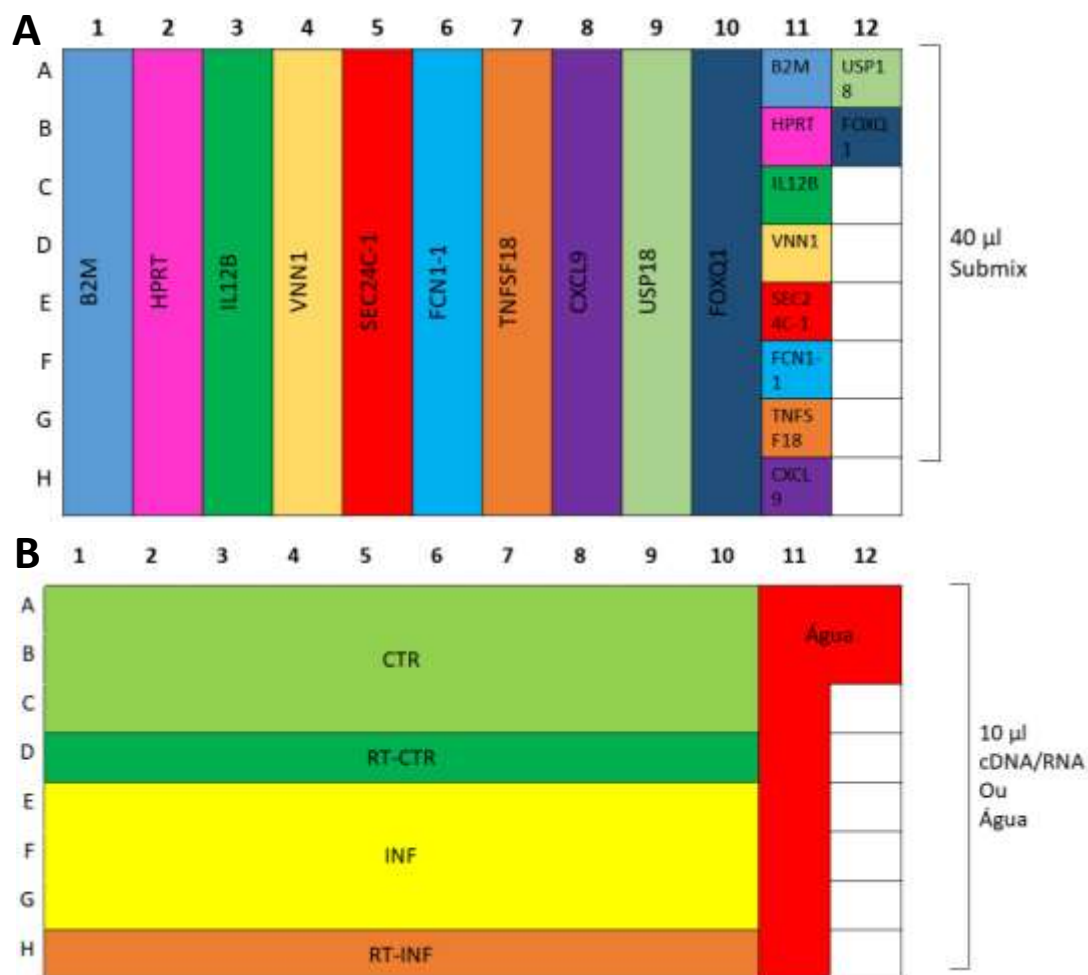


Figura 26. Esquema de estratégia para montagem de placa de RT-qPCR para validação de genes. a) Placa representando a distribuição dos alvos que seriam testados e b) mostrando a distribuição dos templates de cada doador que seriam utilizados: cDNA de DCs tanto controle (CTR) quanto infectadas (INF), RNA sem transcrição reversa de DCs controle (RT- CTR) e infectadas (RT-INF) e água.

5..10. TESTE DE CONCENTRAÇÃO INICIAL DE RNA

Depois de ser realizado a padronização dos iniciadores designados para cada gene e definida a estratégia para efetuar a validação da expressão gênica por qPCR, o próximo passo foi averiguar qual seria a quantidade inicial de RNA por reação de qPCR. Usando como base réplicas dos doadores já obtidos até o momento e a quantidade de RNA disponível em cada uma destas, em que os dados se encontram sintetizados na tabela 5, foi tomado como base a réplica que possuía a menor quantidade de RNA disponível, sendo nossa

amostra limitante (MA13 CTR). Foi verificado então haveria possibilidade de se realizar as qPCRs usando o mínimo de RNA possível para nenhuma amostra ser descartada.

Tabela 5. Réplicas de RNA provenientes de infecção de DCs dos doadores e suas respectivas características. Número de integridade do RNA (RIN), concentração de RNA obtida no bioanalyzer (ng), concentração de RNA estoque (ng), quantidade de RNA total disponível (ng).

Amostra	RIN	Concentração bioanalyzer (ng/ul)	concentração de RNA estoque (ng/ul)	RNA total (ng)
MA9CTR	7,7	0,242	34,4124	1617,3828
MA9INF	7,5	0,17	24,48	1150,56
MA7CTR		2,18	43,6	654
MA7INF	7,6	1,59	31,8	492,9
MA1CTR	10	212	212	1272
MA1INF	9,7	212	212	1272
MA8CTR	6,8	0,086	0,307142857	5,528571429
MA8INF		0,193	0,877272727	15,79090909
CL13CTR	8,6	0,284	0,624175824	7,49010989
CL13INF	7,2	0,048	0,96	16,32
CL6CTR		3,7	74	814
CL6INF	8,4	5,11	75,7037037	302,8148148
CL16CTR		0,698	28,31088	509,59584
CL16INF	7,5	1,33	40,5916	690,0572
YR3CTR	8,7	2,82	56,4	592,2
YR3INF	8,3	3,05	61	122
YR2CTR	10	127	127	1016
YR2INF	9,2	116	116	696
YR8CTR		0,87	2,558823529	33,26470588
YR8INF	5,6	2,23	44,6	446
CL4 CTR		2	2	54
CL4 INF	10	49	49	1323
CL5 CTR	9	53	53	318
CL5 INF	10	98	98	980
YR10 CTR		0,173	1,365789474	23,21842105
YR10 INF	5,8	0,315	4,295454545	77,31818182
YR1 CTR		4	4	104
YR1 INF		6	6	150
CL12 CTR	2,5	0,264	5,28	79,2
CL12 INF		0,14	2,8	47,6
MA5 CTR	4,3	0,024	0,085714286	3
MA5 INF	6,8	0,021	0,08	3,04

A fim de testar se poderia ser utilizado uma quantidade inicial que abarcasse todas as amostras, os próximos testes foram realizados usando a quantidade de 200 pg de RNA por reação, quantidade que se poderia ser utilizada a amostra limitante com a mesma quantidade para abranger todas as reações necessárias.

Com intuito de atestar também se amplificação seria eficiente com essa concentração escolhida inicialmente, como estratégia foi adotada utilizar os transcritos mais raros para esses testes subsequentes, ou

seja, aqueles que possuíam mais dificuldades para amplificar em PCRs anteriores. Para isso foram escolhidos os genes VNN1, FOXQ1, CXCL9. B2M foi usado como controle positivo para as qPCRs seguintes.

Foi realizado então uma qPCR teste com 0,2; 0,5 e 1 ng de RNA para verificar aplicação em alvos escolhidos em algumas dessas quantidades de material. De acordo com os resultados dos produtos de qPCR em gel de Agarose, que pode ser visualizado na figura 27, todos os alvos das condições infectados foram amplificados em todas as concentrações utilizadas de RNA, porém o maior empecilho na amplificação foi nas amostras controle, não sendo observado amplificação para alguns alvos ou quase imperceptíveis, como VNN1, FOXQ1 e CXCL9. Isso de certa forma já era esperado, visto que a abundâncias desses transcritos serem maiores sob infecção.

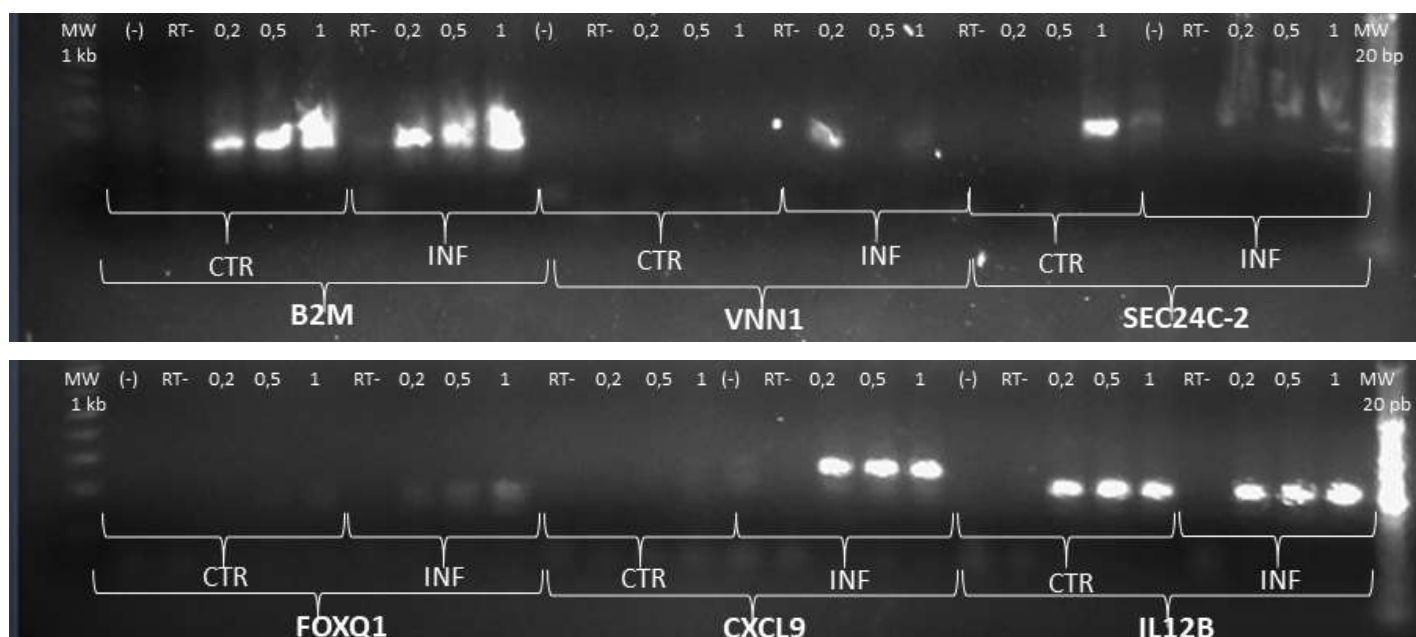


Figura 27. Amplificação de alvos em amostras controle e infectados com quantidades distintas de RNA para definir quantidade inicial de material. Resultados de qPCR apresentadas em gel Agarose 2,5% para os genes escolhidos para os testes de quantidade de RNA utilizados tanto nas condições de DCs infectadas (INF) pelo *T. cruzi* quanto controle (CTR) nas quantidades de 0,2; 0,5 e 1 ng de RNA por reação. Reações utilizando RT- como template foram utilizadas como controle negativo. (-) = controle negativo usando água como molde.

Devido a isso, outros testes subsequentes foram realizados utilizando quantidades maiores de RNA até que se observasse amplificação nesses genes escolhidos na condição controle, tendo em vista que havia amplificação nítida nas amostras infectadas. Então no próximo teste foi utilizado quantidades maiores de material: 0,25; 0,5; 1,5, 3, 6 e 9, para se observar amplificação em algum desses valores. Como IL12B apresentou boa amplificação em todos os testes realizados anteriormente, este foi descartado das análises subsequentes.

Os produtos de qPCR também foram visualizados em gel de Agarose 2,5% e os resultados são apresentados na figura 28. Houve então amplificação de todos os genes utilizando 9, 6, 3; 1,5; 0,5 e 0,25 ng de RNA com exceção do gene FOXQ1, que aparentemente havia uma pequena amplificação com 9 ng. Apesar disso, todos os outros genes poderiam ser testados com qualquer uma das concentrações utilizadas.

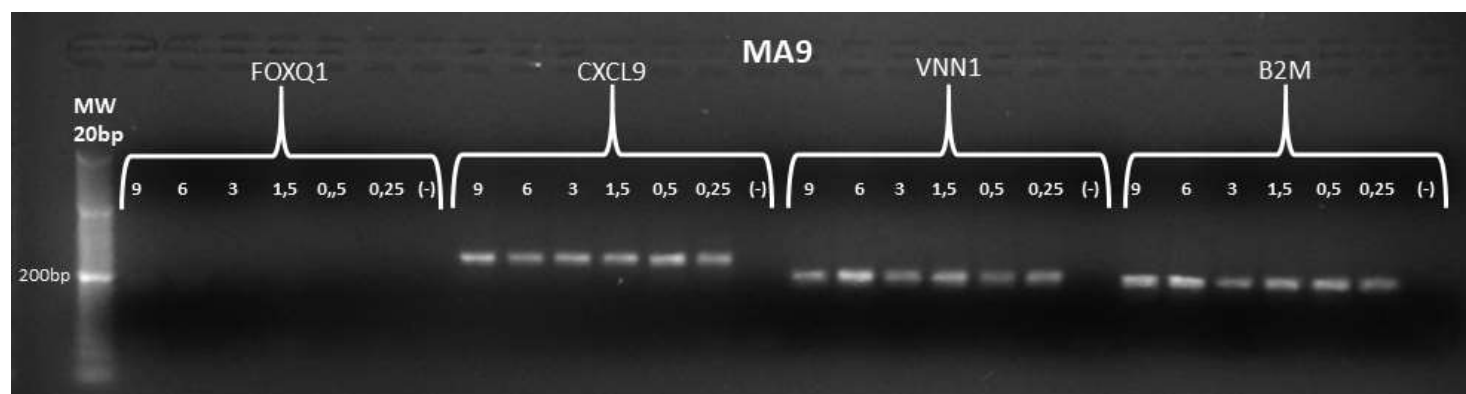


Figura 28. Amplificação de genes selecionados nas quantidades iniciais de RNA testadas. Resultados de qPCR apresentadas em gel Agarose 2,5% para os genes escolhidos para os testes de quantidade de RNA provenientes de DCs controle quantidades de 9, 6, 3; 1,5; 0,5 e 0,25 ng de RNA por reação. Reações utilizando RT- como template foram utilizadas como controle negativo (-).

Tendo em vista em que foi realizado um teste piloto em que se reduziu pela metade o volume (25 uL) final da reação de qPCR e também do material utilizando e se obteve os mesmo resultado quando comparados com o dobro do volume (50 uL), onde também se utilizava o dobro de material e visto que amplificação dos alvos mais raros eram detectados com quantidades de 1, 3 e 6 ng de RNA , se tornou atrativo miniaturizar o volume da reação a fim de diminuir a quantidade de RNA necessário por reação, e assim aproveitar de forma mais abrangente as amostras já obtidas.

Então foi determinado que as reações de qPCR seriam operadas com metade do volume utilizado inicialmente com todos os reagentes ajustados de maneira proporcional, assim como quantidade de template, em que foi utilizado 3 ng de RNA por reação, mesmo apesar de alvos amplificarem com valores menores, para garantir uma margem de segurança.

Como o teste foi realizado apenas com um doador (doador B) e ao ser realizado testes com RNA de doadores distintos mostrou-se que os mesmos alvos não amplificavam em quantidades menores, foi avaliado também a quantidade escolhida de 3 ng seria o suficiente para amplificar nos demais doadores. Pensando nisso foi realizado um outro teste em que se utilizou apenas para avaliar a amplificação de CXCL9 (transcrito mais difícil de ser visualizado entre os demais) na condição controle (situação com maior dificuldade de detectar esse transcrito) usando 6; 3; 1,5 e 0,75 de RNA para garantir que 3 ng de RNA seria o suficiente para amplificar alvos em todos os indivíduos independente de variabilidade genética

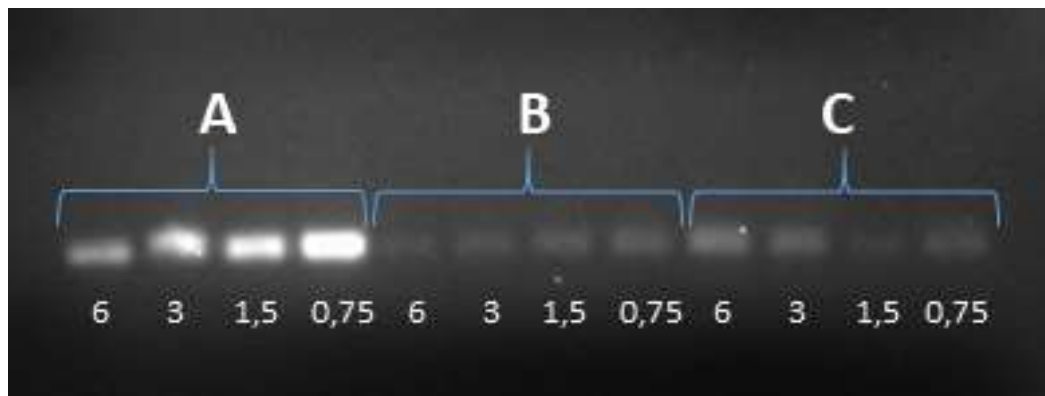


Figura 29. Amplificação de gene CXCL9 em diferentes quantidades de RNA inicial em todos os doadores. Amplificação de gene CXCL9 dentro dos 3 doadores (A, B e C) usando 6; 3; 1,5 e 0,75 ng de RNA.

De fato, foi observada uma discrepância muito grande na amplificação dos mesmos alvos sob as mesmas condições em doadores diferentes, que pode ser observado na figura 29, porém a quantidade de 3 ng de RNA era suficiente para amplificar em todos, mantendo-se assim essa quantidade definida para validação dos genes.

5.11. NOVA ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA

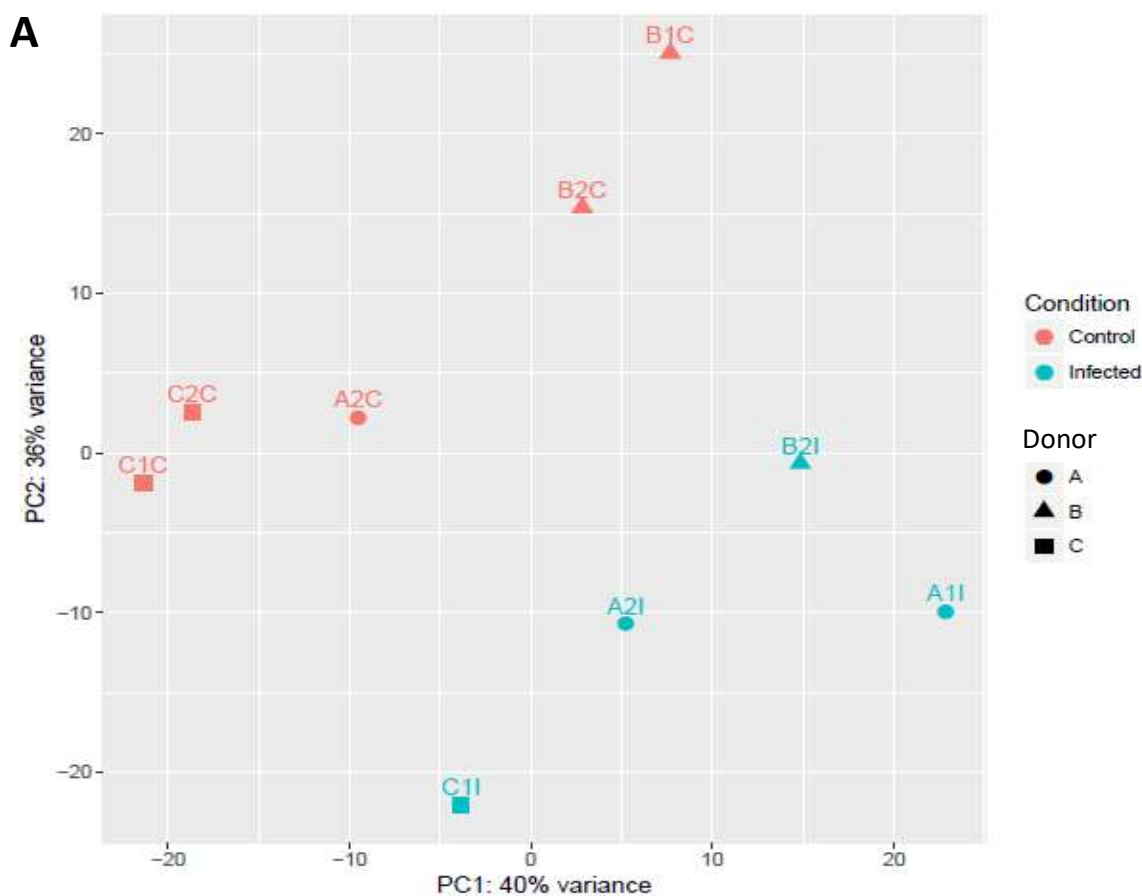
Tendo em vista que a análise fornecida pela empresa Novogen foi realizada individualmente para cada doador e não foi feita uma análise comparando-os entre si, também levando em consideração que há uma discrepância muito grande entre respostas imunes desenvolvidas por organismos distintos devido à diferenças genéticas, não seria atrativo analisá-los separadamente. Um reflexo disso é como indivíduos respondem à determinado agente infeccioso, que podem ter distinções significantes quando comparados e se essa resposta irá desencadear um quadro patológico ou não. Isso pode ser visto na doença de Chagas em que apenas 30% dos infectados desenvolvem para uma fase crônica, enquanto os demais conseguem ter uma resposta satisfatória a fim de controlar o patógeno e não desenvolver sintomatologia aparente que impactem na sua qualidade de vida.

Com o intuito de analisar as respostas de forma global e ver como as respostas gerais e comumente desencadeadas pelo *T. cruzi* durante a infecção de DCs se desenvolvem e como elas podem impactar o fluxo da patologia, realizamos uma análise global comparando todos os doadores, vendo então quais os DEGs que foram expressos em indivíduos distantemente relacionados sob o estímulo do mesmo patógeno, a fim de obter melhor entendimento sobre genes que comumente são induzidos por este agente.

Foi então requisitado outra análise utilizando os dados brutos obtidos das amostras que foram mandadas pela empresa e destinadas a bioinformata Tainá Raiol da FIOCRUZ – Brasília para refazer as análises e serem apresentadas de maneira mais abrangente e respresentasse a modulação do parasito dentro de uma população, não focando na particularidade de cada indivíduo.

Os resultados gerados por essa análise global utilizando o pacote DESeq 2 (mesmo utilizado em trabalho prévio) (Gil-Jaramillo, 2016) com $p_{adj} < 0,05$ geraram um total de 469 DEGs, sendo 439 supregulados e 30 infraregulados, em que as amostras infectadas dos 3 doadores se agrupam de forma geral próximas, do mesmo modo que possui o mesmo padrão visualizado para amostras controle, conforme pode ser visto no gráfico apresentado na figura 30.

Dos genes escolhidos para validação que estavam diferencialmente expressos individualmente em cada doador, 5 deles se mantiveram modulados de modo global dentro dos 3 doadores: TNFSF18, CXCL9, USP18, FOXQ1 e IFNL1. Por isso, os demais genes foram descartados da análise e a validação seria realizada com esses que se apresentaram em comum entre as duas análises e já haviam sido padronizados.



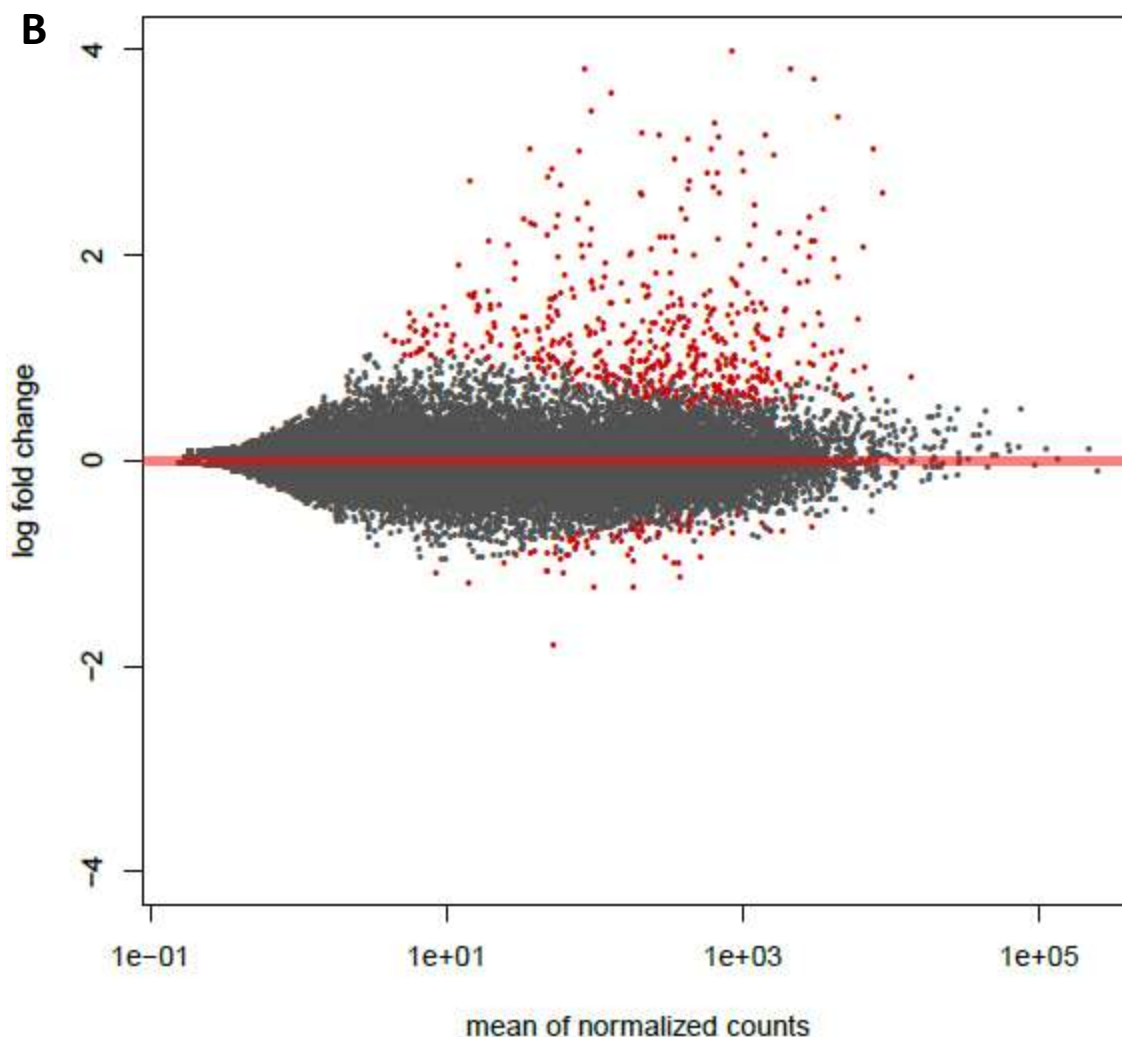


Figura 30. Análise global de doadores do transcriptoma da interação DCs com *T. cruzi*. a) Gráfico de PCA mostrando agrupamento das réplicas das amostras infectadas (I) e controles (C) dos doadores (A, B e C) e b) *volcano plot* mostrando expressão diferencial de genes detectados em log₂fold change. Em vermelho aqueles que apresentaram $p_{adj} < 0,05$

5.12. VALIDAÇÃO DE DEGS

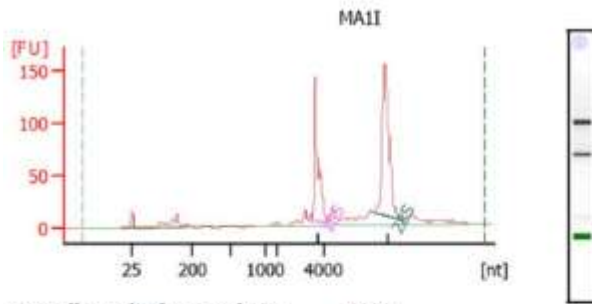
Já que um nova análise transcriptoma foi tomado como base, a estratégia anteriormente estabelecida foi modificada para atender as novas necessidades seguindo os mesmo critérios e exigências. Como os resultados provenientes da análise global do transcriptoma da infecção de DCs pelo *T. cruzi* dentro dos 3 doadores, apenas 5 genes dos 10 escolhidos se mantiveram diferencialmente expressos globalmente. Devido ao fato de 2 desses genes (IFNL1 e FOXQ1) exigirem quantidades exorbitantes de material para serem detectados por qPCR nas amostras controle, divergindo demasiadamente da quantidade necessária para os outros que eram amplificados com pouco material e isso acabar inviabilizando o uso das amostras já obtidas, foi então decidido realizar a validação dos genes deste novo transcriptoma com os inicialmente com os 3

genes restante em comum entre os transcriptomas individuais e globais (TNFSF18, CXCL9 e USP18) usando os genes B2M como referência, que foi visualizado como mais estável dentro das duas condições apresentadas.

Foi utilizando a mesma estratégia definida anteriormente para garantir a confiabilidade dos dados gerados. O esquema da nova estratégia adotada e ilustrado na figura 26.

Antes de realizar as validações em si, foi aferido primeiramente o nível de integridade do RNA das amostras disponíveis objetivando se trabalhar com um material íntegro a fim de garantir uma análise de qualidade. Para esse fim, as amostras de RNA foram analisadas mediante bioanalyzer para mensurar um número de integridade do RNA (RIN) através da quantificação bandas referentes as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal e sendo atribuído uma pontuação de 1 a 10

De acordo com esses resultados, ilustrados na figura 31, todas as amostras destinadas para validação de DEGs apresentaram uma alta qualidade devido ao fato de terem apresentados altos valores de RINs, estando todas as amostras acima de 7. Aquelas amostras que não foram possíveis obter um valor exato de RIN, foi observado padrão das duas bandas apresentadas no capilar, que foram similares ao observado para aquelas que obtiveram notas elevadas, mostrando integridade do RNA ribossomal, mostrando-se então com o aspecto satisfatório para dar continuidade a análise.

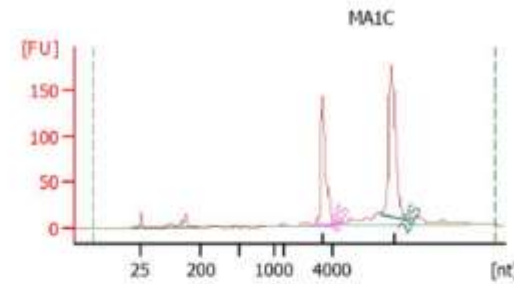


Overall Results for sample 9 : MA1I

RNA Area: 712.9
 RNA Concentration: 212 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
 RNA Integrity Number (RIN): 9.7 (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.70

Fragment table for sample 9 : MA1I

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	3,327	4,120	168.9	23.7
28S	6,062	7,277	247.1	34.7

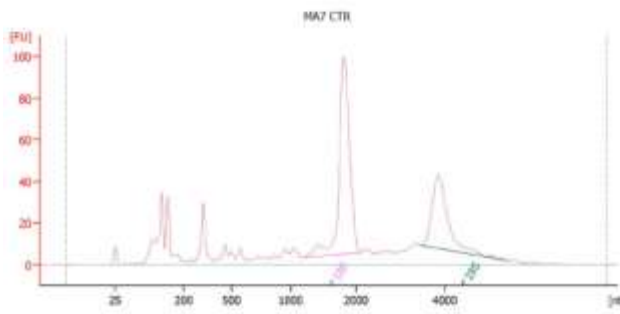


Overall Results for sample 10 : MA1C

RNA Area: 713.2
 RNA Concentration: 212 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 10 (B.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN:10

Fragment table for sample 10 : MA1C

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total
18S	3,115	4,151	180.5	25.3
28S	6,019	7,191	288.0	40.4

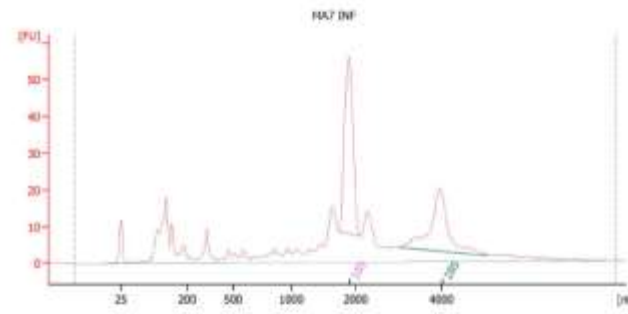


Overall Results for sample 11 : MA7 CTR

RNA Area: 853.7
 RNA Concentration: 2.180 pg/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0.5
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 11 : MA7 CTR

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,188	2,114	238.7	28.0
28S	3,496	5,376	199.7	23.4

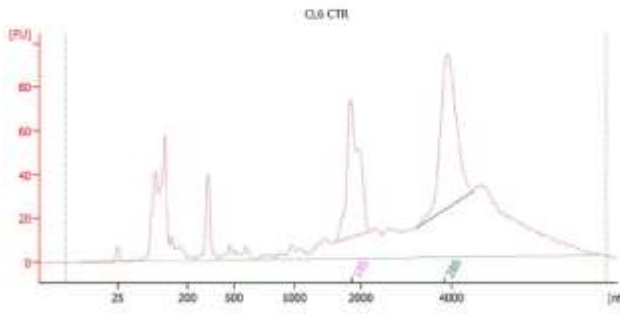


Overall Results for sample 1 : MA7 INF

RNA Area: 483.7
 RNA Concentration: 1.094 pg/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0.8
 RNA Integrity Number (RIN): 7.6 (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 7.00

Fragment table for sample 1 : MA7 INF

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,739	2,117	97.3	20.1
28S	2,990	5,166	60.7	12.5

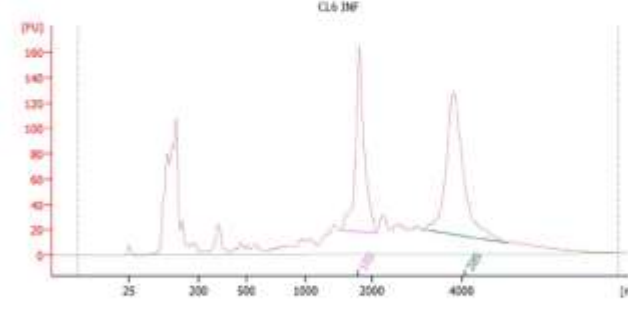


Overall Results for sample 7 : CL6 CTR

RNA Area: 1,440.7
 RNA Concentration: 3.007 pg/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.2
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN N/A

Fragment table for sample 7 : CL6 CTR

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,588	2,203	175.7	12.2
28S	3,218	4,476	217.9	15.1

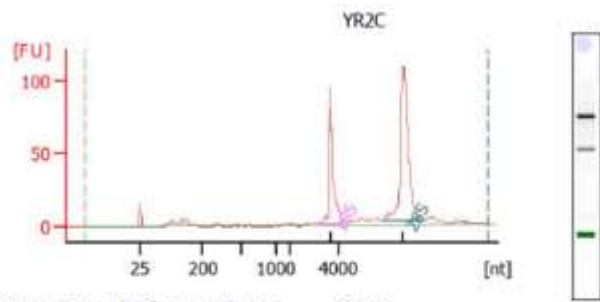


Overall Results for sample 8 : CL6 INF

RNA Area: 2,801.1
 RNA Concentration: 5.115 pg/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.3
 RNA Integrity Number (RIN): 8.4 (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 8.40

Fragment table for sample 8 : CL6 INF

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,519	2,193	293.1	10.5
28S	3,135	5,025	376.2	13.4

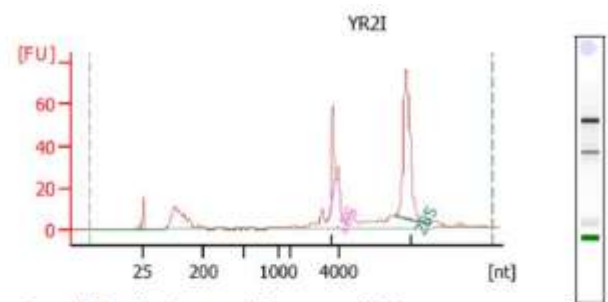


Overall Results for sample 4 : YR2C

RNA Area: 428.6
 RNA Concentration: 127 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2.0
 RNA Integrity Number (RIN): 10 (8.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN:10

Fragment table for sample 4 : YR2C

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	3,229	4,248	100.9	23.5
28S	5,809	7,452	200.2	46.7

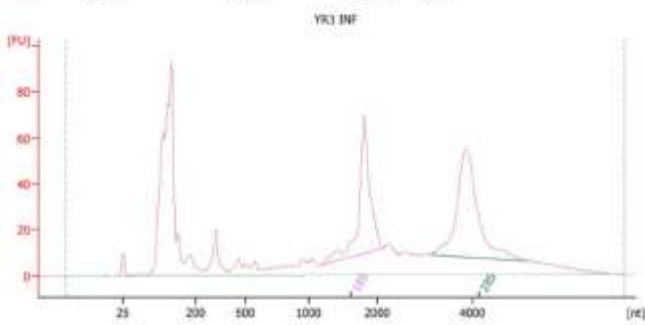


Overall Results for sample 3 : YR2I

RNA Area: 391.4
 RNA Concentration: 116 ng/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 3.8
 RNA Integrity Number (RIN): 9.2 (8.02.08)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.20

Fragment table for sample 3 : YR2I

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	3,600	3,848	32.4	8.3
28S	6,265	7,491	123.2	31.5

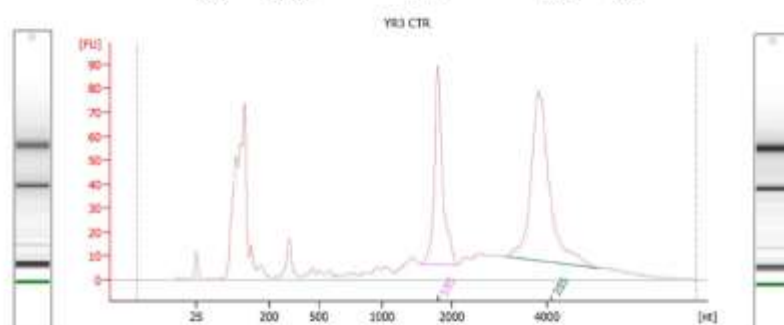


Overall Results for sample 6 : YR3 INF

RNA Area: 1,194.6
 RNA Concentration: 3,052 pg/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.2
 RNA Integrity Number (RIN): 8.3 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 8.30

Fragment table for sample 6 : YR3 INF

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,164	2,110	146.2	12.2

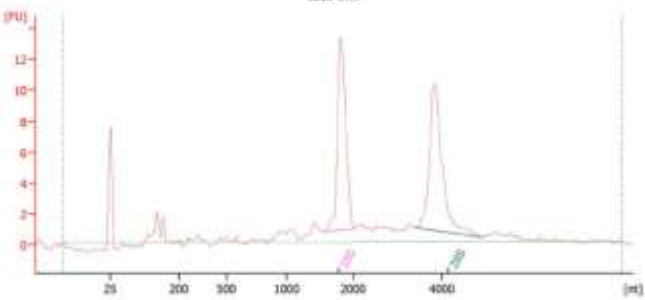


Overall Results for sample 5 : YR3 CTR

RNA Area: 1,022.5
 RNA Concentration: 2,817 pg/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.8
 RNA Integrity Number (RIN): 8.7 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 8.70

Fragment table for sample 5 : YR3 CTR

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,543	2,591	152.8	13.9

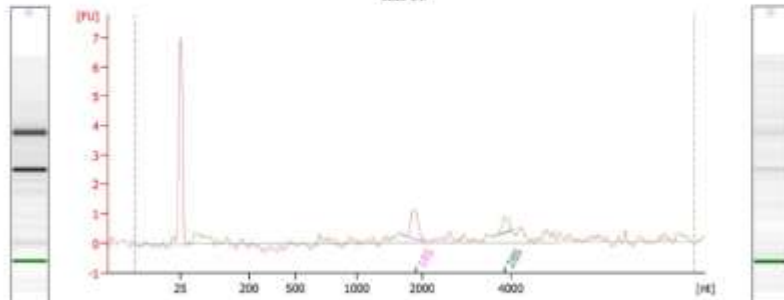


Overall Results for sample 10 : CL13 CTR

RNA Area: 87.8
 RNA Concentration: 254 pg/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.0
 RNA Integrity Number (RIN): 8.8 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 8.60

Fragment table for sample 10 : CL13 CTR

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,543	2,091	24.2	27.5
28S	3,498	4,889	24.6	27.3



Overall Results for sample 11 : CL13 INF

RNA Area: 14.9
 RNA Concentration: 48 pg/µl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0.4
 RNA Integrity Number (RIN): 7.2 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 7.20

Fragment table for sample 11 : CL13 INF

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,760	2,089	1.7	11.5
28S	3,707	4,012	0.4	4.3

Figura 31: Amostras de RNA proveniente dos doadores mostraram-se de boa qualidade. Análise de integridade de RNA através de bioanalyzer mostrando parâmetros mensurados e RIN de amostras.

Como pode ser visto na figura 32, os resultados referentes à validação de genes mostrou que TNFSF18 e USP18 tiveram um aumento de expressão sob a condição de infecção pelo *T. cruzi* por todos os doadores em conjunto e que portanto. Já o gene CXCL9 não apresentou diferença estatística, isso pode ser devido a uma réplica específica de um único doador que divergiu muito das demais. Portanto uma próxima estratégia a ser adotada é utilizar uma triplicata de cada doador ao invés de duplicata, para verificar se há uma diminuição do desvio padrão e se possa afirmar com certeza se a superexpressão do gene é significativa. Porém, de uma forma geral, a expressão gênica das condições controle e infectados dentro dos 3 doadores aferida por RT-qPCR correspondia com os resultados gerados pelo transcriptoma, concluindo assim que a técnica empregada é confiável e reflete os mesmos dados gerados por uma técnica mais robusta, como o transcriptoma. Isso confirma que os dados obtidos são verídicos por ser confirmado de forma independente por duas metodologias distintas. Portanto, poderia ser utilizada RT-qPCR para análises posteriores de outros genes e também por se tratar de uma tecnologia mais acessível e rentável, poderia ser utilizada para ampliar as análises para uma população amostral maior e verificar se esse comportamento se repete de uma forma mais ampla e consistente sob estímulo com parasito.

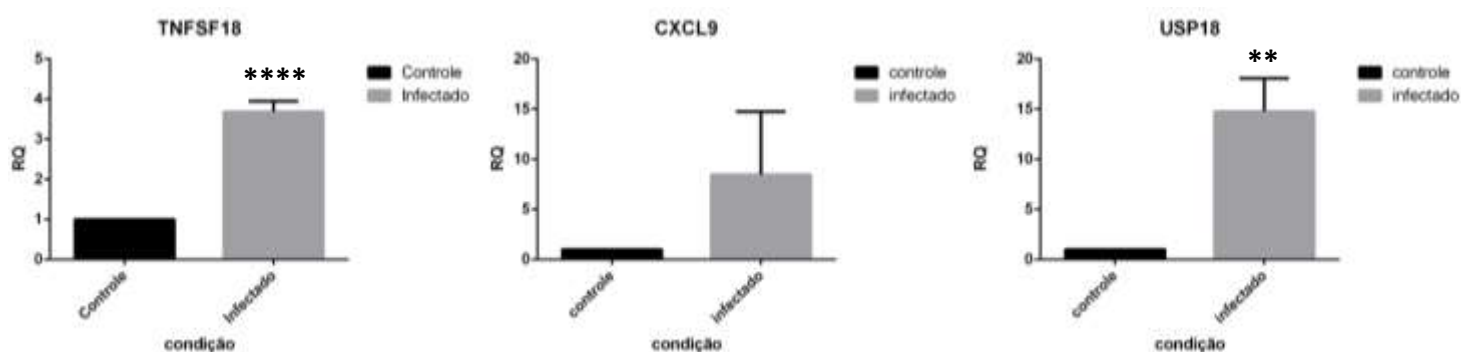


Figura 32. Superexpressão de TNFSF18, CXCL9 e USP18 sob infecção pelo *T. cruzi*. Genes diferencialmente expressos na condição controle quando comparados com infectados. Valor de $p < 0,01$ (), valor de $p < 0,001$ (****). Análise estatística utilizando teste T de Student. N = 6**

5.13. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Além da validação de genes diferencialmente expressos detectados pelo transcriptoma, foi analisado também se a supra ou infraregulação desses genes que foram analisados, por intermédio do nível de seus transcritos, refletia também a nível proteico apresentado nessas diferentes condições. A fim de avaliar isso, foi mensurada algumas citocinas, como IFN- γ , TNF, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-2, do sobrenadante oriundo das DCs infectadas e controle após o período de 12h para averiguar a presença e a abundância desses analitos através da técnica do CBA utilizando citometria de fluxo para aquisição dos dados. De acordo com a figura 33, a maioria das citocinas não apresentaram diferencia significativa de expressão comaprando grupo controle do infectado, com exceção de TNF. Não houve expressão de IL-12, nem mesmo na condição infectado das condições dentro dos doadores

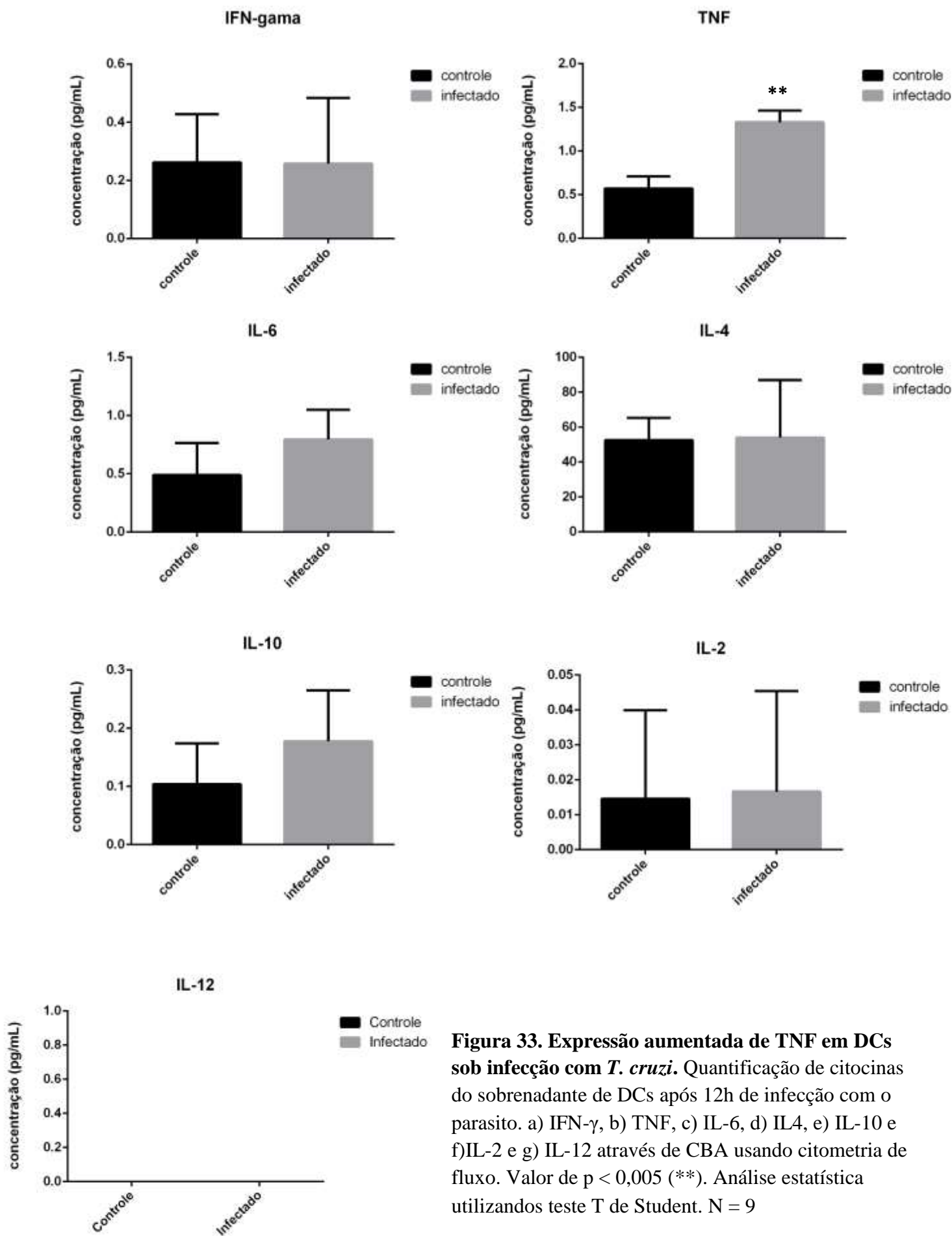


Figura 33. Expressão aumentada de TNF em DCs sob infecção com *T. cruzi*. Quantificação de citocinas do sobrenadante de DCs após 12h de infecção com o parasito. a) IFN- γ , b) TNF, c) IL-6, d) IL4, e) IL-10 e f) IL-2 e g) IL-12 através de CBA usando citometria de fluxo. Valor de $p < 0,005$ (**). Análise estatística utilizando teste T de Student. N = 9

Das citocinas foram analisadas neste estudo, apenas TNF e IL-10 se mostraram diferencialmente expressas dentro do transcriptoma após a interação, como pode ser visto na tabela 6, mostrando que nem sempre o nível de transcrito reflete o nível da proteína correspondente.

Tabela 6. Citocinas diferencialmente expressas no transcriptoma. Posição dos DEGs referentes às citocinas dentro do transcriptoma, símbolo referente ao gene, expressão relativa (log2fold change) e valor de p ajustado para cada gene.

ranking DEG	symbol	gene	log2FoldChange	padj
156	TNF	tumor necrosis factor	1.28357692716167	1.28480456143653e-05
189	IL27	interleukin 27	1.64688311899398	0.000126085929364045
301	IL1A	interleukin 1 alpha	1.04323033394448	0.00612679094602397
334	IL10	interleukin 10	0.989889596868533	0.00893591277261325
337	IL15	interleukin 15	1.12350861966616	0.00958808075056934
342	IL1B	interleukin 1 beta	1.13668226682441	0.0103217544497658

6. DISCUSSÃO

O número de DEGs detectados no estudo apresentado, quando comparado com outras análises prévias em que foi realizada infecção de células humanas com *T. cruzi*, é maior em DCs (469 DEGs) quando comparados com outros tipos celulares, em que há uma baixa modulação da expressão gênica do hospedeiro. Como por exemplo em fibroblastos (HFF) em que se detectou 106 genes supregulados após 24h de infecção e não havia nenhum DEG com $\log_2\text{fold change} > 2$ entre 2 e 6 h.p.i (Avalos et al., 2001) e 113 DEGs em 24 h.p.i com o mesmo tipo celular em outro estudo (Houston-Ludlam, Belew e El-Sayed, 2016) e em cardiomiócitos murinos em 12 h.p.i, que apresentou menos de 100 DEGs. Porém, a modulação de DCs se assemelha com a detecção de cerca de 300 DEGs em períodos maiores de interação (24-48 h.p.i) (Urban & Editor, 2011) e 420 DEGs em 48 h.p.i em cardiomiócitos (Goldenberg et al, 2010). Porém possui uma modulação baixa quando comparada com células epiteliais de linhagem humana (HeLa), onde apresentou 1255 DEGs em 6 h.p.i. (Chiribao et al, 2014). Isso reflete como células distintas dentro do mesmo hospedeiro podem ser moduladas diferentemente pelo mesmo patógeno, o que provavelmente pode ocorrer devido ao parasito conseguir causar uma modulação mais acentuada em células para que as torne mais viável a sua infecção, e silenciando células, como as imunes, que possam detectá-lo e tentar destruí-lo.

Além disso, foi visto também que a maioria dos genes induzidos por este patógeno são relacionados com interferon do tipo I (manuscrito em preparação), o que está em concordância com outras análises de transcritos sob infecção com o mesmo agente infeccioso, em que uma parcela considerável dos DEGs são induzidos por interferon (Avalos et al., 2001 e Houston-Ludlam, Belew e El-Sayed, 2016).

Os genes que foram detectados como diferencialmente expressos no transcriptoma realizado pelo nosso grupo e posteriormente validados e confirmados por apresentar supregulação quando DCs humanas são infectadas pelas formas infectivas do *T. cruzi*, correspondem com estudos anteriores em que já foi averiguado a supregulação desses genes sob condições diversas de infecções por patógenos distintos.

TNFS18 foi descoberto de modo independente por Gurney e colaboradores e Know e colaboradores em 1999 em humanos como sendo da superfamília dos fatores de necrose tumoral (TNF) após a descoberta do seu receptor em linfócitos T murinos sob o estímulo com dexametasona (DEX). Também foi observado que sua expressão está relacionada à resistência contra apoptose, mesmo que se assemelhando com a estrutura de outras proteínas da família de receptores de TNF, em que seu estímulo geralmente direciona a apoptose (Nocentini et al., 1997). Seu mRNA correspondente apresenta pouca expressão nos tecidos, mas há um aumento drástico quando as células são estimuladas com antígenos. Sua expressão e de seu receptor de forma concomitante em células inibe apoptose destas pela ativação de NF- κ B (Gurney et al., 1999). Seu receptor é expresso em células presentes nos linfonodos e em leucócitos periféricos e é superexpresso em PBMCs humanas, já o ligante é expresso em células endoteliais (Know et al., 1999). Ficou constatado assim que este

novo ligante para TNFSFR18 estaria relacionado com interação entre linfócitos T (Know et al., 1999) e células endoteliais e modula a sobrevivência desses linfócitos em tecidos periféricos (Gurney et al., 1999)

Hoje é sabido que APCs como macrófagos e DCs (Yu et al., 2003), e células endoteliais (Gurney et al., 1999 e Kwon et al., 1999) produzem TNFSF18 e também expressam o receptor para essa citocina, sugerindo uma regulação autócrina. Mas o tipo celular que possui expressão mais marcante do receptor para esta citocina são os linfócitos T, sendo que linfócitos Treg expressam este de maneira constitutiva e em linfócitos T efetores sob indução com anti-CD3 (McHugh et al., 2002, Gurney et al., 1999 e Kwon et al., 1999, Shimizu et al., 2002 e Nocentini et al., 1997).

Pelo fato de a estrutura do receptor para TNFSF18 possuir grande similaridade com outros receptores da família TNF (Nocentini et al., 1997), em que esses geralmente possuem um papel de co-estimulação de linfócitos T, especulou-se sobre a possibilidade de seu estímulo também possuir essa função. Isso foi confirmado ao verificar que a ligação ao seu agonista promove ativação de linfócitos T em conjunto com o reconhecimento de antígeno simulado por anti-CD3, tanto em linfócitos T CD4+ como em linfócitos T CD8+ (Shimizu et al., 2002, Ronchenti et al., 2004, Tone et al., 2003). Esse reconhecimento promove tanto a expansão de linfócitos T efetores como de linfócitos T reg (Ronchenti et al., 2004)

Foi visto que o estímulo do receptor para TNFSF18 impede a supressão mediada por linfócitos T regulatórios, visto pelo aumento de linfócitos T CD8+ e T CD4+, assim como a remoção de linfócitos Treg ocasionam desenvolvimento de doenças autoimunes, portanto o reconhecimento TNFSF18-TNFRSF18 tendo uma papel importante na diminuição da tolerância, promovendo a quebra da supressão de linfócitos T efetores pelo linfócitos Treg (Shimizu et al., 2002).

Sabe-se também que TNFSF18 é constitutivamente expresso em DCs, tanto maduras quanto imaturas, e que sua ligação ao seu receptor leva a ativação de NF- κ B e está envolvido na regulação de linfócitos Treg pelas DCs (Yu et al., 2003). DCs de animais deficientes em TNFSF18 são menos capazes de induzir expansão de linfócitos T regulatórios antígeno-específico *in vitro*, também sendo reduzido o número de linfócitos Treg e concomitante aumento de linfócitos T citotóxicos *in vivo* (Liao et al., 2014). Esses dados em conjunto mostram que TNFSF18 apesar de provocar supressão de linfócitos Treg, também é responsável pela sua expansão, juntamente com linfócitos T efetores. Talvez isso seja justificado pelo fato de no momento inicial da infecção a sua ação não seja requisitada para permitir a ativação de uma resposta das suas contrapartes efectoras. Porém quando a infecção for resolvida e a ação de linfócitos T efetores não for mais requisitada, os seus respectivos linfócitos T reg estariam presentes em grande número para desativá-los em tempo hábil para evitar hipersensibilidade tardia e gerar dano ao hospedeiro quando não há mais a presença do patógeno

No âmbito das respostas imunes, animais que são deficientes para o receptor de TNFSF18 possuem mais proteção contra colite induzida devido a uma redução da resposta imune inata e da ação de linfócitos T

efetores, além desse linfócitos apresentarem menor capacidade de causar colite quando transferido para animais imunodeficientes (Santucci et al., 2006), e que animais deficientes em TNFSF18 é responsável pelo recrutamento de monócitos para os sítios de infecção e sua subsequente diferenciação em macrófagos em modelo de colite, diminuindo o quadro clínicos desses organismos (Liao et al., 2014), mostrando assim que TNFSF18 possui um papel importante desencadeando processos inflamatórios

Em relação a infecção com patógenos, foi demonstrado que macrófagos infectados com Rhinovírus aumentam expressão de TNFSF18 (Rajput et al., 2018) e que macrófagos ativados com LPS e subsequentemente tratados com lipídeos derivados de algas com propriedades anti-inflamatórias, promoveu uma infraregulação dessa citocina (Robertson et al., 2015)

Em conjunto, esses dados mostram que DCs são capazes de aumentar a expressão de TNFSF18 sob infecção, como foi visto na infecção pelo *T. cruzi* e que esta citocina em um contexto amplo seria capaz de promover processos inflamatórios, como recrutamento de células para sítios de infecção como monócitos e poderia também desencadear uma atenuação da supressão de linfócitos T auxiliares e citotóxicos pelo linfócitos Treg e assim, aumentar a resposta contra o patógeno. O aumento de expressão de TNFSF18 condiz com o contexto das horas iniciais de uma infecção, visto que se há necessidade de promover uma resposta frente a aquele antígeno especificamente ligado ao patógeno em questão, que pode ser gerado através de uma atenuação da sua tolerância, a fim de montar uma resposta mais robusta frente aquele agente infeccioso

A quimiocina CXCL9, é um ligante (juntamente com CXCL10 E CXCL11) para o receptor CXCR3, expresso em linfócitos T ativados por DCs, enquanto sua expressão é ausente em linfócitos T virgens (Lotscher et al., 1996 e Loetscher et al., 1998). Viu-se que este receptor está intrinsecamente associados com linfócitos Th1 (Sallusto et al., 1998, Yamamoto et al., 2000 e Xie et al., 2003) e recentemente foi associado com linfócitos Th17 (Steinmetz et al., 2009), diferentemente do receptor expresso pelo subtipo Th2, CCR3 (Sallusto, Mackay e Lanzavecchia, 1997).

A expressão dos ligantes para CXCR3 é induzida pelo IFN- γ (Luster, Unkeless e Ravetch, 1985), assim como de CXCL9 (Farber, 1990, enquanto CXCL10 e CXCL11 podem ser induzido por IFN- α e IFN- β , respectivamente (Farber, 1997, Medoff et al., 2006) além de serem regulados por fatores transcricionais distintos (revisado em Groom e Luster, 2011).

Além disso, há diferenças de afinidade entre estes ligantes e seu receptor, havendo maior afinidade por CXCL11, seguida de CXCL10 e CXCL9 (Weng et al., 1998. Cox et al., 2001 e Cole et al., 1998 e Meyer et al., 2001). Portanto, por serem induzidos e regulados por fatores distintos, estas quimiocinas estão relacionadas com funções distintas apesar da aparente ação redundante devido a ligação em um mesmo receptor em comum, tendo então um padrão distinto para expressão dessas quimiocinas tanto referente a tempo quanto espaço devido a expressão por tipos celulares diferentes durante o curso de um processo imunológico.

A deficiência de CXCL9 acarreta na supressão da histopatologia causada por nefrite e melhora das funções renais quando comparada com animal que produz essa quimiocina, enquanto não há diferença no quadro patológico quando é suprimida a expressão de CXCL10 em um modelo de lúpus. (Menke et al., 2008)

Esta quimiocina é produzida principalmente por monócitos inflamatórios e em uma menor extensão por DCs, que é induzida por IFN- γ , se concentrando nos grandes vasos endoteliais (HEV) e promove a migração de leucócitos para os linfonodos, como células NK sob infecção viral (Wong et al., 2018) e migração de linfócitos T (Loester et al., 1996 e Campanella et al., 2008) e sua produção também é induzida em monócitos e mo-DCs sob infecção com o *Plasmodium berghei* (Sorensen et al., 2018), sendo um marcador e mediador do desenvolvimento da malária (Campanella et al., 2008, Miu et al., 2008). A expressão de CXCL9 é regulada pelo fator de transcrição IRF3 (James et al., 2018)

Já foi demonstrada também a indução da expressão de CXCL9 devido a infecção bacteriana como *Chlamydia trachomatis* (Lijek et al., 2018) e *Mycobacterium tuberculosis* (Joosten et al., 2018). Neste caso sua expressão é suportada por IL-17A e inibida por IL-27, por causar a supressão desta primeirade (Erdmann et al., 2018). A supraregulação de CXCL9 está envolvida na imunopatologia dessas enfermidades e a inibição da sua produção (Erdmann et al., 2018) ou bloqueio do seu respectivo receptor CXCR3 (Lijek et al., 2018) acarreta em uma melhora na imunopatologia das mesmas. (Menke et al., 2008). Acredita-se que isso seja devido à diminuição e recrutamento leucocitário para os sítios de infecção e assim uma consequente atenuação de uma hipersensibilidade tardia, diminuindo os danos dos tecidos e assim amenizando o quadro clínico

Assim a supraregulação de CXCL9 é razoável dentro da infecção de DCs pelo *T. cruzi* no momento inicial da interação entre estes, em que a detecção de um patógeno estimula a produção desta quimiocina a fim de recrutar linfócitos para o sítio de infecção, e então conseguem abandonar os órgãos linfoides após serem ativados por DCs nesse local e ser induzida a expressão de CXCR3, permitindo a migração destes linfócitos onde há uma grande concentração do seu ligante e consequentemente agir sobre as células infectadas.

O gene USP18 codifica uma proteína da família das deubiquitinases, ou seja, proteases capazes de clivar ligações de ubiquitina ou moléculas similares dos seus substratos (Ronau, Beckmann e Hochstrasser, 2016). Componentes que são ubiquitinados são destinados à degradação via proteassoma, ou seja, essas proteases teriam o papel então de regular a degradação de alguns componentes celulares dependendo do estímulo e poderiam evitar que fossem destruídas (Glickman e Ciechanover, 2002).

Já foi observado que a expressão desta deubiquitinase específica era induzida por estímulo com interferons do tipo I (Der et al., 1998), em que foi constatado que sua superexpressão estava atrelada a infecções virais, o que foi confirmado subsequentemente por diversos estudos (Zhang et al., 1999, Ritchie et al., 2002, Ritchie et al., 2004; Chen et al., 2016; Mladinich et al., 2017 e Nair et al., 2017). Sua expressão

também era induzida pelo estímulo com outros mediadores inflamatórios, como TNF- α e LPS, que apresentava seu fenótipo revertido por *knockdown* desse gene (MacParland et al., 2016).

Viu-se que USP18 é capaz de clivar ISG15 com especificidade, um polipeptídeo de cerca de 15kDa (Farrell, Broeze e Lengyel, 1979), conjugado a substratos intracelulares de maneira similar ao que ocorre com a ubiquitina, SUMO e Nedd8 (Loeb e Hass, 1992). Essa molécula também possuía uma sequência similar a ubiquitina devido à sua antigenicidade –cruzada com anticorpos alvejando esta proteína (Blomstrom et al., 1986 e Hass et al., 1987).

Foi observado também um aumento substancial na produção de ISG15 sob ação de interferons do tipo I (Farrell, Broeze Lengyel., 1979, Der et al., 1998), assim como sob estímulo de vírus (Yuan e Krug, 2001) e LPS (Li et al., 2001) e indetectável em células em estado de homeostasia (Blomstrom et al., 1986). Em adição, animais deficientes em USP18 apresentaram acúmulo substancial de proteínas conjugadas a ISG15 (Ritchie et al., 2002 e Ketscher et al., 2015), o que sugeriu uma co-relação deste substrato com a enzima UPS18, ambas suprarreguladas sob estímulo de interferons e/ou infecções (Malakhov et al., 2002). ISG15 também possui algumas funções já elucidadas dentro do sistema imune como agir como citocina, promovendo a ativação de células NK, linfócitos T e consequente produção de IFN- γ e permitir a maturação de DCs (D’cunha et al., 1996a)

Além disso, foi observado que alguns vírus possuem mecanismos para escapar do sistema imune evitando a conjugação das suas proteínas com ISG15 e assim estabelecer uma infecção. A ISGilação de proteínas virais, como NS1A do vírus da influenza (Zhao et al., 2010) e HPV16 L1 do papilomavírus humano (Durfee et al., 2010) acarretava uma diminuição da infectividade desses agentes infecciosos. Corroborando essas observações, também foi demonstrado que animais deficientes para ISG15, eram mais susceptíveis a infecções por diversos tipos de vírus (Lenschow et al., 2007)

O gene codificador de ISG15 já foi identificado em peixes, aves e mamíferos, porém não está presente em eucariotos unicelulares como leveduras (Potter et al., 1999), tampouco nematodos, plantas e insetos, não sendo detectado nem mesmo um ortólogo dentro desses grupos (Malakhov et al., 2002), sugerindo ser uma exclusividade que divergiu há pouco tempo na árvore filogenética e possuindo mecanismos de regulação distintos (Potter et al., 1999)

Hoje sabe-se que USP18 é uma alça negativa para regulação de respostas induzidas por IFN do tipo I, como IFN- α e IFN- β , visto que animais nocauteados para o gene que codifica essa proteína apresentaram hipersensibilidade à esses IFNs (Malakhova et al., 2006), ocorrendo demasiada fosforilação do fator de transcrição STAT 1, e apresentando alta fosforilação do fator de transcrição STAT1, responsável por expressar grande parte dos genes relacionados com a indução por IFN (ISGs) do tipo I (Malakhov et al., 2002), e assim tornando os animais resistentes a infecções com diversos tipos de vírus (Ritchie et al., 2004). USP18

bloqueia a interação de JAK com receptor de interferon, o que resulta na inibição na via JAK-STAT (Malakhov et al., 2002)

Porém essa hipersensibilidade ao IFN do tipo I acarreta em má formação severa do cérebro e diminuição da expectativa de vida (Ritchie et al., 2002). Apesar desses animais apresentarem um acúmulo de proteínas conjugadas com ISG15, a sua adição (Kim et al., 2006) ou clivagem de seus substratos, pode estar relacionadas (Ketscher et al., 2015) ou não com a regulação dessa via (Malakhova et al., 2006).

Em humanos com síndrome de pseudo TORCH, já foi identificadas mutações de perda de função no gene USP18 o que acarretava alta expressão de IFN I e conseqüentemente, sinais de inflamação no tecido cerebral. Este quadro foi amenizado com a indução de expressão de USP18 (Meuwissen et al., 2016).

A superexpressão de USP18 também foi constatada pela expressão exógena do PRR RIG-1 em aves, que não possuem o gene, mostrando também expressão de genes em comum induzidas por IFN (Chen et al., 2016). Tanto RIG-1 como outros genes da sua via foram identificadas como sendo moduladas pelo *T. cruzi* em nosso trabalho (manuscrito em preparação).

Tendo em vista que nosso trabalho mostrou a modulação de genes induzida pelo *T. cruzi* em DCs, que são APCs profissionais e cruciais para induzir uma resposta específica frente ao antígeno pela apresentação de antígenos e conseqüente ativação da imunidade adaptativa, talvez haja a necessidade das DCs serem expostas a uma quantidade razoável de antígenos, para que estimule sua ativação, e assim, possam ser apresentados para linfócitos T específicos.

Já foi demonstrado que a quantidade de antígenos disponíveis é um fator limitante para ativação de uma resposta imune (Aichele et al., 1995 e Henrickson et al., 2008). Da mesma forma a quantidade de complexos MHC-peptídeos apresentada aos linfócitos T. (Irvine et al., 2002 e Henrickson et al., 2008), principalmente em uma fase inicial de um processo infeccioso. Portanto, permitir um acúmulo para subseqüente apresentação desses antígenos parece ser indispensável para ultrapassar um limiar de tolerância e promover a efetivação de uma resposta frente a um antígeno. Então permitir a replicação do patógeno no hospedeiro no momento inicial da infecção seria uma estratégia plausível e um fator determinante para induzir a ativação efetiva de uma resposta imune

Isso foi confirmado por um estudo em que se observou que APCs como macrófagos da área marginal do baço, que são capazes de transferir antígenos para DCs nas zonas T (Sixt et al., 2005) no momento inicial de uma infecção viral, não são responsivos aos IFNs I, permitindo assim a replicação do vírus dentro dessas células, e esta proliferação estava relacionada com a superegulação de USP18. Do mesmo modo, animais deficientes para essa ubiquitinase, apresentavam baixa replicação viral nos macrófagos. Além disso, animais deficientes em USP18 e esse subtipo de macrófagos acarretou em atraso de resposta imune frente ao patógeno gerando em uma infecção disseminada e letal (Honke et al., 2011).

Este trabalho está em concordância com o que é observado também em DCs sob infecção viral, que utilizando vírus vivos e aptos a replicar dentro dessas células gerava, constatado pela detecção de formação de proteínas virais induziam uma resposta mais robusta de linfócitos T citotóxicos, principal tipo celular efetor contra patógenos intracelulares, quando comparadas com DCs infectadas com vírus inativados por radiação ultravioleta (Nonacs et al., 1992). Além disso, foi visto recentemente que um aumento de expressão resulta diminuição da autofagia (Xu et al., 2015), mecanismo reconhecido para promover destruição de patógenos que evadem do fagolisossomo ou conseguem ser internalizados pelas células hospedeira na ausência de fagocitose.

De acordo com todo este embasamento fornecido pela literatura científica acrescida dos resultados observados em nossas análises, podemos inferir que a superexpressão de USP18 dentro de um contexto das primeiras horas de infecção de DCs humanas pelo *T. cruzi*, um agente intracelular obrigatório é plausível e se mostra como uma estratégia importante para permitir a replicação deste patógeno dentro de APCs profissionais. Isso talvez possa ser ocasionado por torná-las tolerantes aos INFs que possuem promovem a destruição desse tipo de patógeno, a fim de permitir um acúmulo de antígenos até ultrapassar um limite que permitisse a ativação dessas células, e assim estas se tornariam aptas a ativar linfócitos T que fossem responsivos aos antígenos do parasito.

Isso poderia possibilitar a ativação de uma resposta mais robusta desencadeada pelo contato inicial e mais tardia, o que poderia ser um ponto de regulação temporal importante, permitindo que o sistema imune inato interpretasse a “ameaça” e conseguisse estabelecer um grau de periculosidade para o agente exógeno detectado, comparando de acordo com a capacidade de replicação do parasito dentro do organismo hospedeiro antes de “gastar” seus recursos com um agente provavelmente não patogênico ou com baixa patogenicidade dentro daquela situação.

Além disso, USP18 sendo um regulador negativo da resposta induzida por interferons do tipo I (os quais são estimulados pela detecção de patógenos intracelulares a fim de frear a replicação destes e de promover respostas contra agentes que geralmente são adaptados para driblar os mecanismos imunes clássicos para destruí-los no interior das células) pode ser considerado um mecanismo de extrema importância para evitar uma ativação maciça de resposta frente àquele antígeno e até mesmo desproporcional a patogenicidade do agente e assim gerar danos teciduais exarcebados e promover uma patologia por uma resposta desenfrada do hospedeiro e não pelo grau de periculosidade do agente infeccioso.

Visto que neste trabalho atual foi analisado apenas as horas iniciais de contato do patógeno com o hospedeiro, é importante ressaltar que esse não fornece subsídio suficiente para afirmar com certeza se a supregulação desta ubiquitinase que atua como regulador negativo é uma estratégia do próprio hospedeiro para regular a resposta imune ou se um mecanismo de escape do *T. cruzi* para adiar sua detecção e auxiliar no seu estabelecimento dentro da célula. Seria necessária uma análise de períodos mais tardios da infecção

para ver se este comportamento ainda se repete, pois se a supregulação de USP18 for sustentada por muito tempo mesmo com uma alta parasitemia, dificultando uma resposta, poderia acarretar em uma infecção disseminada e risco inerente ao hospedeiro para se entender com mais clareza como se dá a regulação da resposta e como esta é modulada pelo patógeno dentro da patologia.

Além disso, é crucial enfatizar que análises apresentadas aqui se limitam a níveis de transcritos referentes a genes condutores de proteínas que foram induzidos na DCs de humanos sob estímulo pelo *T. cruzi*, portanto não refletindo necessariamente a modulação das suas proteínas correspondentes, as quais são as que de fato realizam as ações dentro organismo e possuem o papel biológico. Uma abordagem importante que necessita ser testada é analisar se esses transcritos refletem em nível proteico, para assim se afirmar com veemência que a expressão diferencial desses genes possuem de fato essas funções dentro da infecção.

Isso pode ser visto por exemplo pela detecção de citocinas mensuradas do sobrenadante provenientes da infecção. No transcriptoma realizado, duas das citocinas mensuradas apareceram diferencialmente expressas (IL-10 e TNF). Como foi visto, TNF apresentou uma expressão aumentada na condição controle quando comparada com a infectada, o que é condizente com a análise dos transcritos. Porém IL-10 não teve diferença significativa.

Algumas prováveis explicações podem ser especuladas para esse resultado. As DCs além de produzirem IL-10 também expressa o receptor que a reconhece, portanto, a citocina disponível no meio poderia estar sendo consumida a medida que ligam aos seus respectivos receptores nas DC em uma velocidade maior do que é produzida, não gerando diferenças significativas, podendo promover uma regulação autócrina. Apesar de DCs também possuírem receptor para TNF, essas podem estar sendo produzidas em grande escala, permitindo seu acúmulo no meio, o que é condizente com uma condição de infecção onde quantidades maciças de mediadores pró-inflamatórios são produzidos.

Apesar de IL-10 ser uma citocina com efeitos negativos para possibilitar uma ativação de resposta pelas DCs, esta também é produzida sob condições de infecção, podendo sinalizar uma regulação negativa para atenuar uma ativação em massa e poder acarretar em danos ao hospedeiro que não pudessem ser controlados.

Além disso, outra explicação plausível seria que apesar da quantidade aumentada de transcritos referentes à IL-10, este poderia não estar sendo convertido para sua proteína correspondente ou o tempo em que foi mensurado não permitiu a sua conversão, devido a uma regulação pós-transcricional. Uma regulação pós-traducional poderia também ser possível, em que o mRNA poderia estar sendo convertido em proteínas, porém sua estabilidade fosse curta, não tendo tempo hábil para ser detectado.

Por mais que não tenha validade estatística, pois esse caso específico foi feito apenas com uma réplica de cada doador, ao contrário da demais que foi realizado uma triplicata, devido a falta de reações disponíveis

até o momento, o fato de não ter sido expresso IL-12 em nenhum dos doadores pode ser algo condizente dentro do estudo. Apesar de IL-12 ser uma citocina de extrema importância na resposta imune dentro da doença de Chagas por acarretar a diferenciação de linfócitos virgens em Th1 e as DC ser a principal fonte dessa citocina, não necessariamente implica que essa célula é incapaz de induzir essa diferenciação. O que é importante se levar em conta é que essa é uma das raras citocinas que são heterodiméricas, compostas pela subunidade IL-12p40 e IL-12p35, e neste ensaio foi mensurada a sua forma completa (IL-12p70), pois já foi visto que o reconhecimento de alguns PAMPs por TLRs distintos também reflete uma expressão diferencial dessa citocina, sendo que estímulo de TLR4 promove tanto a expressão de IL-12p35 como IL-12p40, enquanto estímulo de TLR2 promove apenas a expressão de IL-12p40, o que não promoveria a formação completa da citocina dependendo do TLR preferencialmente estimulado (Re & Strominger, 2001). Além do mais, outro estudo mostrou haver a necessidade de estímulo por meio de IFN- γ para induzir a expressão de IL-12p35, mesmo havendo estímulo com LPS, poli(I:C) e CD40 (Goriely et al., 2001), o que corrobora com os dados em que não houve aumento de expressão IFN- γ , o que pode explicar essa citocinas na sua forma bioativa não ter sido detectada.

7. CONCLUSÃO

Este estudo proporcionou pela primeira vez visualizar genes que até então não estavam relacionados com a infecção pelo *T. cruzi*, como TNFSF18, CXCL9 e USP18, abrindo novos horizontes para se estudar as relações diferentes e permitir estudos mais aprofundados nesses novos candidatos para entender a patologia. Este entendimento acerca da expressão gênica induzida pelo *T. cruzi* em DCs será decisivo para guiar nossos estudos daqui em diante, como também pode influenciar o estudo de outros grupos, que em conjunto permitirá um entendimento mais acurado sobre a doença e sua provável resolução.

Também mostrou que não necessariamente o nível de transcritos detectados após infecção é compatível com a quantidade das suas respectivas proteínas, apesar do nível de ambos em alguns genes ser correspondente, podendo haver uma regulação pós-transcricional ou pós-traducional, ou o tempo em que se foi analisado não foi o suficiente para a conversão do transcrito em sua proteína correspondente em alguns casos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787–793 (1996)
- Aderem A, Ulevitch RJ. 2000. Toll-símile receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406:782–87
- Aguillon JC, Ferreira L, Perez C, Colombo A, Molina MC, Wallace A, et al. Tc45, a dimorphic *Trypanosoma cruzi* immunogen with variable chromosomal localization, is calreticulin. *Am J Trop Med Hyg* (2000) 63(5–6):306–12.
- Alberti LA, Macedo AM, Chiari E, Andrews NW, Andrade LO. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. *Microbes Infect* (2010) 12(10):784–9.
- Aldridge, J.R., Jr et al. (2009) TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 5306–5311
- Almeida IC, Gazzinelli RT. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J Leukoc Biol* (2001) 70(4):467–77.
- Anderson, K.L., Perkin, H., Surh, C.D., Venturini, S., Maki, R.A., and Torbett, B.E. (2000). Transcription factor PU.1 is necessary for development of thymic and myeloid progenitor-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 164, 1855–186
- Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e3010
- Andrade LO, Andrews NW. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med* (2004) 200(9):1135–43. doi:10.1084/jem.20041408
- Andrews NW, Abrams CK, Slatin SL, Griffiths G. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* (1990) 61(7):1277–87.
- Andrews NW. Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. *Biol Res* (1993) 26(1–2):65–7.
- Andrews, N. W. 2000. Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell Biol.*
- Andrews, N. W., C. K. Abrams, S. L. Slatin, and G. Griffiths. 1990. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* 61:1277-1287.
- Angelini G, Gardella S, Ardy M, Ciriolo MR, Filomeni G, et al. 2002. Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1491–96
- Atwood JA III, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, et al. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* (2005) 309(5733):473–6.
- Azuma M. Role of the glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR)-GITR ligand pathway in innate and adaptive immunity. *Critical Reviews in Immunology.* 2010;30(6):547–557.
- Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Somoza, C. (1993). B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366, 76-79.

- Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* (2006) 177(6):3515–9.10.4049/jimmunol.177.6.3515
- Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392:565–568
- Baggiolini M., Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392 (1998), pp. 565-568
- Ballesteros-Tato, A. et al. (2010) Temporal changes in dendritic cell subsets, cross-priming and costimulation via CD70 control CD8⁺ T cell responses to influenza. *Nat. Immunol.* 11, 216–224 20
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767–811
- Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245–52
- Bartholomeu DC, Cerqueira GC, Leao AC, daRocha WD, Pais FS, Macedo C, et al. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (MASP) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res* (2009) 37(10):3407–17.10.1093/nar/gkp172
- Bartholomeu DC, de Paiva RM, Mendes TA, DaRocha WD, Teixeira SM. Unveiling the intracellular survival gene kit of trypanosomatid parasites. *PLoS Pathog* (2014) 10(12):e1004399.10.1371/journal.ppat.1004399
- Bartholomeu DC, Ropert C, Melo MB, Parroche P, Junqueira CF, Teixeira SM, et al. Recruitment and endolysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* (2008) 181(2):1333–44.10.4049/jimmunol.181.2.1333
- Bartholomeu DC, Ropert C, Melo MB, Parroche P, Junqueira CF, Teixeira SM, et al. Recruitment and endolysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* (2008) 181(2):1333–44. doi:10.4049/jimmunol.181.2.1333
- Bermejo DA, Amezcua Vesely MC, Khan M, Acosta Rodriguez EV, Montes CL, Merino MC, et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. *Immunology* (2011) 132(1):123–33. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03347.x
- Beucher M, Norris KA. Sequence diversity of the *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein family. *Infect Immun* (2008) 76(2):750–8.10.1128/IAI.01104-07
- Beutler, B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* 2004; 40: 845–859
- Bevan, M. J. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J. Immunol.*
- Bieber, T. (2010) Atopic dermatitis. *Ann. Dermatol.* 22, 125–137
- Blomstrom, D. C., Fahey, D., Kutny, R., Korant, B. D. & Knight, E. Jr. Molecular characterization of the interferon-induced 15-kDa protein. Molecular cloning and nucleotide and amino acid sequence. 1986. *J. Biol. Chem.* 261, 8811–8816
- Bonaldo, M.C., Souto-Padron, T., de Souza, W., Goldenberg, S., 1988. Cell±substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J. Cell Biol.* 106, 1349±58.
- Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigens to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on MHC class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 196:1627–38

- Bonney KM: Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite* 2014, 21:11
- Borkowski, T. A., Letterio, J. J., Farr, A. G. & Udey, M. C. A role for endogenous transforming growth factor β 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor β 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 184, 2417–2422 (1996).
- Borst P. Antigenic variation and allelic exclusion. *Cell* (2002) 109(1):5–8.10.1016/S0092-8674(02)00711-0
- Bosschaerts, T. et al. (2010) Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN- γ and MyD88 signaling. *PLoS Pathog.* 6, e1001045 15
- Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J. L. & Maliszewski, C. R. Generation of murine dendritic cells from Flt3ligandsupplemented bone marrow cultures. *Blood* 96, 3029–3039 (2000).
- Brener Z, Gazzinelli RT 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Int Arch Allergy Immunol* 114: 103-110.
- Brener, Z., 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 27, 347±82.
- Bretscher, P., and M. Cohn. 1970. A theory of self-nonsel self discrimination . *Science* (Wash. DC). 169:1042
- Burleigh, B., and N. W. Andrews. 1995. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.*
- Bursch, L.S., Wang, L., Igyarto, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaplan, D.H., and Hogquist, K.A. (2007). Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204, 3147–3156.
- Buscaglia CA, Campo VA, Frasch ACC, Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol* (2006) 4(3):229-36
- Caetano BC, Carmo BB, Melo MB, Cerny A, dos Santos SL, Bartholomeu DC, et al. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* (2011)
- Caetano BC, Carmo BB, Melo MB, Cerny A, dos Santos SL, Bartholomeu DC, et al. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* (2011) 187(4):190
- Camargo MM, Almeida IC, Pereira MES, Ferguson MAJ, Travassos LR, Gazzinelli RT 1997. GPI-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of pro-inflammatory cytokines by macrophages. *J Immunol*158: 5890-5901
- Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos LR, Gazzinelli RT 1997a. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity by IFN- γ -primed macrophages. *J Immunol* 159: 6131-6139.
- Camargo EP (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 6, 93–100.
- Cameron, M Pope, A Granelli-Piperno, R.M Steinman Dendritic cells and the replication of HIV-1. *J. Leukoc. Biol.*, 59 (1996), pp. 158-171
- Cameron, P.S Freudenthal, J.M Barker, S Gezelter, K Inaba, R.M Steinman Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4⁺ T cells. *Science*, 257 (1992), pp. 383-387

- Campanella GS, Tager AM, El Khoury JK, Thomas SY, Abrazinski TA, Manice LA et al. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 4814–4819.
- Campbell DA, Westenberger SJ, Sturm NR (2004) The determinants of Chagas Disease: Connecting Parasite and Host Genetics. *Curr Mol Med* 4: 549–562.
- Campbell, I.K. et al. (2011) Differentiation of inflammatory dendritic cells is mediated by NF- κ B1-dependent GM-CSF production in CD4 T cells. *J. Immunol.* 186, 5468–5477
- Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, et al. Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* (2001) 167(1):416–23.10.4049/jimmunol.167.1.416
- Campos MA, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, et al. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88 *J Immunol* (2004) 172(3):1711–8.10.4049/jimmunol.172.3.1711
- Cardoso, M. S., Reis-Cunha, J. L. & Bartholomeu, D. C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Front. Immunol.* 6, 659 (2016).
- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, et al. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.*180:1263–72
- Cella M, Sallusto F., Lanzavecchia A.(1997) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol* 9:10–16, pmid:9039784.
- Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia, and M. Colonna. 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 5:919–923. 37. Cella, M., F. Facchetti, A. Lanzavecchia, and M. Colonna. 2001. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40-ligand drive a potent TH1 polarization. *Nat. Immunol.* 5:919–923
- Celli S, Day M, Müller AJ, Molina-Paris C, Lythe G, and Bousso P (2012) How many dendritic cells are required to initiate a T-cell response? *Blood* 120:3945–3948.
- Celli, S. et al. (2011) Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nat. Med.* 17, 744–749
- Ceppek, K. L. et al. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the α E β 7 integrin. *Nature* 372, 190–193 (1994).
- Cestari I, Ramirez MI. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. *PLoS One*(2010) 5(3):e9721.10.1371/journal.pone.0009721
- Chagas C 1909. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, gen. s.sp., gente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec* 2015; 90: 33-43.
- Cheong, C. et al. (2010) Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209+ dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143, 416–429

Clayton J (2010) Chagas disease 101. *Nature* 465(7301): S4–S5. Clayton2010Chagas disease 101.Nature4657301S4S5

Coelho PS, Klein A, Talvani A, Coutinho SF, Takeuchi O, Akira S, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. *J Leukoc Biol*(2002) 71(5):837–44.

Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP et al. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 1998; 187: 2009–2021.

Coura JR, Albajar-Viñas P. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature outlook* 2010; XXX (supl):56-57

Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. 2001. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat. Immunol.* 2:203–9

Crosti MC, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, Rugarli C, Manfredi AA. 1998. Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J. Immunol.* 161:4467–71

D. Sharma, T.-D. Kanneganti, The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J. Cell Biol.* 213, 617–629 (2016)

d'Ostiani, C.F., G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci, P. Ricciardi-Castagnoli, and L. Romani. 2000. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 191:1661–1674. 9. Whelan, M., M.M. Harnett, K.M. Houston, V. Patel, W. Harnett, and K.P. Rigley. 2000. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J. Immunol.* 164:6453–6460

D'Cunha, J. et al. In vitro and in vivo secretion of human ISG15, an IFN-induced immunomodulatory cytokine. 1996. *J. Immunol.* 157, 4100–4108

de Lana, M., Marques, E., & Machado, D. M. (2010). *Biology of Trypanosoma cruzi and Biological Diversity. American Trypanosomiasis (First Edit).* Elsevier Inc.

de Lana, M., Marques, E., and Machado, D. M. (2010). *Biology of “Trypanosoma cruzi” and Biological Diversity, 1st Edn.* Amsterdam: Elsevier Inc

De Pablos LM, Osuna A. 2012. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. *Infect Immun* 80:2258–2264. 10.1128/IAI.06225-11.

De Trez, C. et al. (2009) iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS Pathog.* 5, e1000494

del Rio, M.-L., Rodriguez-Barbosa, J.-I., Kremmer, E., and Förster, R. (2007). CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.* 178, 6861–6866.

Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. 2001. Antigen specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193:233–38

Di Noia, J. M., G. D. Pollevick, M. T. Xavier, J. O. Previato, L. Mendoca-Previato, D. O. Sanchez, and A. C. Frasch. 1996. High diversity in mucin genes and mucin molecules in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 271:32078–32083.

dos Santos SL, Freitas LM, Lobo FP, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TA, Oliveira AC, et al. The MASP family of *Trypanosoma cruzi*: changes in gene expression and antigenic profile during the acute phase of experimental infection. *PLoS Negl Trop Dis* (2012) 6(8):e1779.10.1371/journal.pntd.0001779

Dresing, P. et al. (2010) A fluorescence reporter model defines “Tip- DCs” as the cellular source of interferon beta in murine listeriosis. *PLoS ONE* 5, e15567

Drexhage, H. A., Mullink, H., de Groot, J., Clarke, J. & Balfour, B. M. A study of cells present in peripheral lymph of pigs with special reference to a type of cell resembling the Langerhans cell. *Cell Tissue Res.* 202, 407–430 (1979).

Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.W., Park, C.G., et al. (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315, 107–111.

Eickhoff CS, Dunn BA, Sullivan NL, Hoft DF (2013) Comparison of the infectivity of *Trypanosoma cruzi* insect-derived metacyclic trypomastigotes after mucosal and cutaneous contaminative challenges. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 508–511.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*

Erdmann, H., Behrends, J., Ritter, K., Holscher, A., Volz, J., Rosekrands, I., Holscher, C. The increased protection and pathology in *Mycobacterium tuberculosis*-infected IL-27R-alpha-deficient mice is supported by IL-17A and is associated with the IL-17A-induced expansion of multifunctional T cells. 2018. *Mucosal Immunology* volume 11, pages 1168–

F. Sallusto, P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C.R. Mackay, S. Qin, A. Lanzavecchia Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.*, 28 (1998), pp. 2760-2769

Fainaru, O. et al. Runx3 regulates mouse TGF- β -mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation. *EMBO J.* 23, 969–979 (2004).

Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc γ receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol.* 1996;156:541–548.

Farber JM. A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5238–5242.

Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 246–257.

Fearon DT, Locksley RM. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272:50–53

Ferreira V, Valck C, Sanchez G, Gingras A, Tzima S, Molina MC, et al. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* (2004) 172(5):3042–50. doi:10.4049/jimmunol.172.5.3042

Fiocruz. (2015). Agencia Fiocruz: Doença de Chagas contraída por via alimentar é mais grave. Retirado de <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas-contra%C3%ADda-por-alimentar-%C3%A9-mais-grave>, acessado em 24/06/2017 às 21:19

Fithian, E. et al. Reactivity of Langerhans cells with hybridoma antibody. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 78, 2541–2544 (1981).

Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23–33.

Forster, A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Müller, E. Wolf, M. Lipp CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99 (1999), pp. 23-33

Frelinger, J. G., Hood, L., Hill, S. & Frelinger, J. A. Mouse epidermal Ia molecules have a bone marrow origin. *Nature* 282, 321–323 (1979).

Front Immunol, 4 (2013), p. 82

G.N. Gaulton, & J.C. Pratt (1994) Glycosylated phosphatidylinositol molecules as second messengers. *Semin. Immunol.* 6:97–104, pmid:8054541

Gallucci S.; Lolkema M.; Matzinger P. (1999). "Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells". *Nature Medicine*. 5: 1249–1255

Gazzinelli RT, Camargo MM, Almeida IC, Morita YS, Giraldo M, Acosta-Serrano A, Hieny S, Englund PT, Ferguson MAJ, Travassos LR, Sher A 1997. Identification and characterization of protozoan products that trigger the synthesis of IL-12 by inflammatory macrophages. *Chem Immunol* 68: 136-152.

Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* (2006) 6(12):895–906.

Gazzinelli RT, Ropert C, Campos MA. Role of the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev* (2004)

Geijtenbeek, T. B. H. et al. DC-SIGN, a dendritic cell specific HIV-1 binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587–597 (2000)

Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100:587-597.

Geissmann, F. et al. Transforming growth factor β 1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 187, 961–966 (1998).

Gil-Jaramillo N, Motta FN, Favali CB, et al. Dendritic cells: a double-edged sword in immune responses during Chagas disease. *Front Microbiol.* 2016;7:1076.

Ginhoux, F., Collin, M.P., Bogunovic, M., Abel, M., Leboeuf, M., Helft, J., Ochando, J., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Grisotto, M., et al. (2007). Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J. Exp. Med.* 204, 3133–3146.

Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S.A., et al. (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J. Exp. Med.* 206, 3115–3130.

Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubeau, M., Dai, X.-M., Stanley, E.R., Randolph, G.J., and Merad, M. (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat. Immunol.* 7, 265–273.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews*, v. 82, n. 2, p. 373–428, 2002.

Goriely, S., B. Vincart, P. Stordeur, J. Vekemans, F. Willems, M. Goldman, and D. De Wit. 2001. Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes. *J. Immunol.* 166:2141-2146.

Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, et al. 2001. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat. Immunol.* 2:882–88

Gravina HD, Antonelli L, Gazzinelli RT, Ropert C. Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* (2013)

Greter M, Helft J, Chow A, Hashimoto D, Mortha A, et al. 2012. GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* 36:1031–46

GUERMONPREZ ET AL. inducers of dendritic cell maturation and require TLR2. *J. Biol. Chem.* 276:25680–86

Guermanprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20:621–67

Guermanprez, P. & Amigorena, S. Pathways for antigen cross presentation. *Springer Semin. Immunopathol.* 26, 257–271 (2005).

Guermanprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. & Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 621–667 (2002)

Guilliams, M. et al. (2009) IL-10 dampens TNF/inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cell-mediated pathogenicity during parasitic infection. *J. Immunol.* 182, 1107–1118 14

Guo, H., Callaway, J.B., and Ting, J.P.-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* 2015; 21: 677–687

Gupta S, Wen JJ, Garg NJ. Oxidative stress in Chagas disease. *Interdiscip Perspect Infect Dis* (2009) 2009:190354.

Gutierrez FR, Mineo TW, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva JS. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2009) 104(Suppl 1):236–45.

Hacker, C. et al. Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nature Immunol.* 4, 380–386 (2003).

Hacker, C., Kirsch, R.D., Ju, X.-S., Hieronymus, T., Gust, T.C., Kuhl, C., Jorgas, T., Kurz, S.M., Rose-John, S., Yokota, Y., and Zenke, M. (2003). Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat. Immunol.* 4, 380–386.

Hall BF, Webster P, Ma AK, Joiner KA, Andrews NW. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. *J Exp Med* (1992) 176(2):313–25

Hall, B. F., P. Webster, A. K. Ma, K. A. Joiner, and N. W. Andrews. 1992. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. *J. Exp. Med.* 176:313-325

- Hammad, H. et al. (2010) Inflammatory dendritic cells – not basophils – are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J. Exp. Med.* 207, 2097–2111
- Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo K, Mahnke K, et al. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.*
- Hemmi, H. et al. Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor- β -dependent cells. *Int. Immunol.* 13, 695–704 (2001).33. Stoitzner, P., Tripp,
- Henrickson, S. E. et al. T cell sensing of antigen dose governs interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation. 2008. *Nature Immunol.* 9, 282–291
- HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*, v. 67, p. 425–79, 1998.
- HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A.; ROSE, I. A. Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *Journal of Biological Chemistry*, v. 256, n. 4, p. 1525–1528, 1981.
- Hertz C, Kiertcher S, Godowski P, Bouis D, Norgard M, Roth M, Modlin R. 2001. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-símile receptor 2. *J. Immunol.* 166:2444–50
- Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8 α + dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097–1100.
- Hoare, Cecil A., Wallace, Franklin G. Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates: a New Terminology. *Nature*, 1966; vol 212; 1385-1386
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313–18
- Hohl, T.M. et al. (2009) Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection. *Cell Host Microbe* 6, 470–481 16
- Holt, P. G., Haining, S., Nelson, D. J. & Sedgwick, J. D. Origin and steady-state turnover of class II MHCbearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways. *J. Immunol.* 153, 256–261 (1994).
- Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, et al. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med* 2007; 357: 1018–27.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., O'Garra, A. & Murphy, K. M. *J. Exp. Med.* 181, 713–721 (1995).
- Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tuettenberg, A., Steinbrink, K., and Jonuleit, H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol.* 2013; 4: 82
- Hubo, B. Trinschek, F. Kryczanowsky, A. Tuettenberg, K. Steinbrink, H. Jonuleit Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells
- Hunger, R. E. et al. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J. Clin. Invest.* 113, 701–708 (2004).
- Iijima, N. et al. (2011) Recruited inflammatory monocytes stimulate antiviral Th1 immunity in infected tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 284–289
- Iijima, N., Linehan, M. M., Saeland, S. & Iwasaki, A. Vaginal epithelial dendritic cells renew from bone marrow precursors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 19061–19066 (2007).

- Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM. 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including *Bacillus Calmette-Guerin* organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 178:479–88
- Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. 1990. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J. Exp. Med.* 172:631–40
- Inaba K, Schuler G, Witmer MD, Valinsky J, Atassi B, Steinman RM. 1986. The immunologic properties of purified Langerhans cells: distinct requirements for the stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 164:605–13
- Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, et al. 2000. The formation of immunogenic MHC class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J. Exp. Med.* 191:927–36
- Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, et al. 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J. Exp. Med.* 180:1849–60
- Inaba, K. et al. High levels of a major histocompatibility complex II–self peptide complex on dendritic cells from lymph node. *J. Exp. Med.* 186, 665–672 (1997)
- Inaba, K. et al. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leukocytes. *Cell. Immunol.* 163 148–156 (1995).
- Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R.M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176:1693.
- Inaba, K., R.M. Steinman, M. Witmer pack, H. Aya, M. Inaba, T. Sudo, S. Wolpe, and G. Schuler. 1992. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J. Exp. Med.* 175:1157.
- Irvine DJ, Purbhoo MA, Krogsgaard M, Davis MM. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature.* 2002;419:845–849
- J Banchereau, R.M Steinman. Dendritic cells and the control of immunity, *Nature*, 392 (1998), pp. 245-252
- J. Banchereau, R.M. Steinman Dendritic cells and the control of immunity
- J. Flier, D.M. Boorsma, P.J. van Beek, C. Nieboer, T.J. Stoof, R. Willemze, C.P. Tensen Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation. *J. Pathol.*, 194 (2001), pp. 398-405
- J.H. Choi, Y. Do, C. Cheong, H. Koh, S.B. Boscardin, Y.S. Oh, L. Bozzacco, C. Trumpfheller, C.G. Park, R.M. Steinman Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves. *J. Exp. Med.*, 206 (2009), pp. 497-505
- Janeway CA Jr . 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 54:1–13
- Janeway CA Jr . 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* 13:11–16
- Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216 (2002)

Jeannin P, Renno T, Goetsch L, Miconnet I, Aubry JP, Delneste Y, Herbault N, Baussant T, Magistrelli G, Soulas C, Romero P, Cerottini JC, Bonnefoy JY. 2000. OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. *Nat. Immunol.* 1:502–9

Jenkins, M. K., and Schwartz, R. H. (1987). Antigen-presentation by chemically-modified splenocytes induces T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J.*

Jenkins, M. K., Pardoll, D. M., Mizuguchi, J., Quill, H., and Schwartz, R. H. T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state. *Immunol. Rev.*, 95: 113–135, 1987.

Jenkins, M. K., Schwartz, R. H. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 165: 302-19

Ji, Q. et al. (2013) MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* 14, 254–261

Ji, Q. et al. (2013) MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* 14, 254–261

Jiang, W. et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375, 151–155 (1995).

Jiang, W., W.J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R.M. Steinman, and M.C. Nussenzweig. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature.* 375:151–155.

Joiner KA, daSilva WD, Rimoldi MT, Hammer CH, Sher A, Kipnis TL. Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertases. *J Biol Chem* (1988) 263(23):11327–35

Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med* (2010) 12:e29.10.1017/S1462399410001560

Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med* 2010

Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept

Kalinski, P., Hilkens, C. M., Sijnders, A., Sijndewint, F. G. & Kapsenberg, M. L. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J. Immunol.* 159, 28–35 (1997).

Kapsenberg M.L. , Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization

Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Rev. Immunol.* 3, 984–993 (2003).

Kashiwada, M., Pham, N.-L.L., Pewe, L.L., Harty, J.T., and Rothman, P.B. (2011). NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8a+ dendritic cell development. *Blood* 117, 6193–6197.

Katz, S. I., Tamaki, K. & Sachs, D. H. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 282, 324–326 (1979).

- Kelly, R. H., Balfour, B. M., Armstrong, J. A. & Griffiths, S. Functional anatomy of lymph nodes. II. Peripheral lymph-borne mononuclear cells. *Anat. Rec.* 190, 5–21 (1978).
- Kierszenbaum F, Knecht E, Budzko DB, Pizzimenti MC. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* (1974) 112(5):1839–44.
- Kilshaw, P.J. 1993. Expression of the mucosal T cell integrin alpha M290 beta 7 by a major subpopulation of dendritic cells in mice. *Eur. J. Immunol.* 23:3365–3368.
- Kim, K. I. et al. Ube1L and protein ISGylation are not essential for α/β interferon signalling. 2006 . *Mol. Cell Biol.* 26, 472–479
- Konecny, P., A. J. Stagg, H. Jebbari, N. English, R. N. Davidson, and S. C. Knight. 1999. Murine dendritic cells internalise *Leishmania major* promastigotes, produce IL-12 and stimulate primary T cell proliferation in vitro. *Eur. J. Immunol.*29:1803-1811
- Kool, M. et al. (2008) Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* 205, 869–882
- Kornfeld S, Mellman I. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* (1989) 5:483–525.10.1146/annurev.cb.05.110189.002411
- Kwon B., Yu K.-Y., Ni J., et al. Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *The Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(10):6056–6061. .
- Lafferty, K. J. & Cunningham, A. J. A. New analysis of allogeneic interactions. *J. Immunol.* 112, 436–437 (1975)
- Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.*1:311–16
- Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.*1:311–16
- Langlet, C. et al. (2012) CD64 expression distinguishes monocyte- derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J. Immunol.* 188, 1751–1760
- Lanzavecchia A, Sallusto F. 2001. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr. Opin. Immunol.* 13:291–98
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 233–258.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 233–258
- Leon, B. et al. (2007) Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26, 519–531
- Lewis, K.L., Caton, M.L., Bogunovic, M., Greter, M., Grajkowska, L.T., Ng, D., Klinakis, A., Charo, I.F., Jung, S., Gommerman, J.L., et al. (2011). Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. *Immunity* 35, 780–791.
- Liao G., Nayak S., Rgueiro J. R., et al. GITR engagement preferentially enhances proliferation of functionally competent CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *International Immunology.* 2010;22(4):259–270.

- Liao G., O’Keeffe M. S., Wang G., et al. Glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein ligand is requisite for optimal functioning of regulatory CD4⁺ T cells. *Frontiers in Immunology*. 2014;5, article 35
- Lin, H. et al. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* 320, 807–811 (2008).
- Lindquist, G. Shakhari, D. Dudziak, H. Wardemann, T. Eisenreich, M.L. Dustin, M.C. Nussenzweig Visualizing dendritic cell networks in vivo *Nat. Immunol.*, 5 (2004), pp. 1243-1250.205.
- Linsley, P. S. et al. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* 174, 561–569 (1991).
- Linsley, P. S. et al. Human B7–1 (CD80) and B7–2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1, 793–801 (1994).
- Linsley, P. S., Clark, E. A. & Ledbetter, J. A. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 5031–5035 (1990).
- Lipscomb, M. F., and B. J. Masten. 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol. Rev.* 82:97-130.
- Liu K, Iyoda T, Saternus M, Kimura Y, Inaba K, Steinman RM. 2002. Immune tolerance following delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J. Exp. Med.* 196:1091–7
- Liu YJ. 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106:259–6
- Liu, K. et al. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nature Immunol.* 8, 578–583 (2007).
- Loeb, K. R. & Haas, A. L. The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog *conjugates* to intracellular proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 7806–7813 (1992).
- Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I et al. Chemokine receptor specific for IP10 and Mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 184: 963–969.
- Loetscher M, Loetscher P, Brass N, Meese E, Moser B. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3696–3705.
- Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 1985; 315: 672–676.
- M Castillo-Riquelme, Chagas disease in non-endemic countries, *Lancet Glob Health*, 5 (2017), pp. e379–e380
- M.C. Dieu, B. Vanbervliet, A. Vicari, J.M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque, C. Caux Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.*, 188 (1998), pp. 373-386
- Macagno, A., M. Gilliet, F. Sallusto, A. Lanzavecchia, F.O. Nestle, and M. Groettrup. 1999. Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation. *Eur. J. Immunol.* 29:4037–4042
- Machy, P., K. Serre, and L. Leserman. 2000. Class I-restricted presentation of exogenous antigen acquired by Fcγ receptor-mediated endocytosis is regulated in dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 30:848–857

Malakhov, M. P., Malakhova, O. A., Kim, K. I., Ritchie, K. J. & Zhang, D. E. UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. 2002. *J. Biol. Chem.* 277, 9976–9981

Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, et al. 1999. CD8 α^+ and CD8 α^- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189:587–92

Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, and M. Moser. 1999. CD8 α and CD8 α subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189:587–592. 6. Pulendran, B., J.L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky, and C.R. Maliszewski. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:1036–1041. 7. Rissoan, M.-C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt, and Y.-J. Liu. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 283:1183–1186. 8.

Martins AV, Gomes AP, Gomes de Mendonça E, Rangel Fietto JL, Santana LA, de Almeida Oliveira MG, et al. Biology of *Trypanosoma cruzi*: an update. *Infection.* 2012;16:45–58.

Matzinger P (2002). "The Danger Model: A Renewed Sense of Self"(PDF). *Science.* 296: 301–305.

Matzinger P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12:991–1045

Mayer-Barber, K.D. et al. (2011) Innate and adaptive interferons suppress IL-1 α and IL-1 β production by distinct pulmonary myeloid subsets during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunity* 35, 1023–1034

McHugh R. S., Whitters M. J., Piccirillo C. A., et al. CD4⁺CD25⁺ Immunoregulatory T Cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* 2002;16(2):311–323-7613(02)00280-7.

Medoff BD, Wain JC, Seung E, Jakobek R, Means TK, Ginns LC et al. CXCR3 and its ligands in a murine model of obliterative bronchiolitis: regulation and function. *J Immunol* 2006; 176: 7087–7095.

Medzhitov R, Janeway C Jr. 2000. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343:338–44

Medzhitov R, Janeway CA Jr . 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9:4–9

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr . 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394–97

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA Jr . 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell.* 2:253–58

Medzhitov R. & Janeway, C. A., 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* Vol. 91, 295–298

Menke J, Zeller GC, Kikawada E, Means TK, Huang XR, Lan HY et al. CXCL9, but not CXCL10, promotes CXCR3-dependent immune-mediated kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1177–1189.

Merad M, Ginhoux F, Collin M. 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8:935–47

Merad, M. et al. Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nature Med.* 10, 510–517 (2004).

Merad, M. et al. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nature Immunol.* 3, 1135–1141 (2002).

Meredith, M.M. et al. (2012) Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *J. Exp. Med.* 209, 1153–1165

METCHNIKOFF, E. 1891. Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at Pasteur Institute in 1891. Dover, New York [republished in 1991]. 218 pp.

Meuwissen, M.E. et al. Human USP18 deficiency underlies type 1 interferonopathy leading to severe pseudo-TORCH syndrome. 2016. *J. Exp. Med.* 213, 1163–1174

Meyer M, Hensbergen PJ, van der Raaij-Helmer EM, Brandacher G, Margreiter R, Heufler C et al. Cross reactivity of three T cell attracting murine chemokines stimulating the CXC chemokine receptor CXCR3 and their induction in cultured cells and during allograft rejection. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2521–2527.

Michelsen KS, Aicher A, Mohaupt M, Hartung T, Dimmeler S, Kirschning CJ, Schumann RR. 2001. The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are Annu. Rev. Immunol. 2002;20:621-667.

Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L, Hontebeyrie-Joskowicz M, et al. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand J Immunol* (1988) 28(5):553–61.10.1111/j.1365-

Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 (suppl 1): 17–30.

Morel, S. et al. Processing of some antigens by standard proteasome but not by the immunoproteasome result in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12, 101?117 (2000).

Morillo, C. A. et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 373, 1295–1306 (2015).

Morillo, C. A. et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 373, 1295–1306 (2015).

Moser, M., and K.M. Murphy. 2000. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat. Immunol.* 1:199–205. 3. Kalinski, P., C.M. Hilkens, E.A. Wierenga, and M.L. Kapsenberg. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today.* 20:561–567. 4. Liu, Y.J., N. Kadowaki, M.C. Risoan, and V. Soumelis. 2000. T cell activation and polarization by DC1 and DC2. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 251:149–159. 5.

Muniz, J., and A. Borriello. 1945 .Estudo sobre a acao litica de diferentes soros sobre as formas de cultura e sanguicolas do *S. cruzi*. *Rev. Bras . Biol.* 5(4) :563 .

Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett* (1992) 33(1):35–40.10.1016/0165-2478(92)90090-B

Murphy, K.M. (2013). Transcriptional control of dendritic cell development. *Adv. Immunol.* 120, 239–267.

Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. 2000. Differential expression and regulation of toll-símile receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 164:5998–6004

Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena, and A. Mantovani. 2000. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 164:5998

Naik, S. H. et al. Cutting edge: generation of splenic CD8⁺ and CD8⁻ dendritic cell equivalents in Fms-símile tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J. Immunol.* 174, 6592–6597 (2005).

Naik, S.H. et al. (2006) Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat. Immunol.* 7, 663–671

Nakano, H. et al. (2009) Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat. Immunol.* 10, 394–402

Narasimhan, J., Potter, J. L. & Haas, A. L. Conjugation of the 15-kDa interferon-induced ubiquitin homolog is distinct from that of ubiquitin. *J. Biol. Chem.* 271, 324–330 (1996).

Narni-Mancinelli, E. et al. (2011) Inflammatory monocytes and neutrophils are licensed to kill during memory responses in vivo. *PLoS Pathog.* 7, e1002457

Nat. Rev. Immunol., 3 (2003), pp. 984-993

Nature, 392 (1998), pp. 245-252

Nishiguchi M, Matsumoto M, Takao T, Hoshino M, Shimonishi Y, Tsuji S, Begum NA, Takeuchi O, Akira S, Toyoshima K, Seya T. 2001. Mycoplasma fermentans lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by Toll-símile receptor 2: role of N-terminal hydrophobic portion in its multiple functions. *J. Immunol.* 166:2610–16

Nocentini G., Giunchi L., Ronchetti S., et al. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997;94(12):6216–6221.

Nogueira, N. 1974 . The escape of *T. cruzi* from the vacuolar system of macrophages *J. Cell Biol.* 63 :245 a (Abstr .) .

Nogueira, N., C. Bianco, and Z. Cohn. 1975. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 142:224.

Norbury, C. C., Chambers, B. J., Prescott, A. R., Ljunggren, H. G. & Watts, C. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 27, 280–288 (1997).

Norbury, C. C., Hewlett, L. J., Prescott, A. R., Shastri, N. & Watts, C. Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* 3, 783–791 (1995).

Novak, N. et al. (2004) FcεpsilonRI engagement of Langerhans cell-símile dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-símile dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 949–957

Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity.* 2004;21:279–288

Ohshima Y, Tanaka Y, Tozawa H, Takahashi Y, Maliszewski C, Delespesse G. 1997. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J. Immunol.* 159:3838–48

Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* (2004) 173(9):5688–96. doi:10.4049/jimmunol.173.9.5688

Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M. A. & Manz, M. G. Flt3 in regulation of type-I interferon producing and dendritic cell development. *Ann. NY Acad. Sci.* 1106, 253–261 (2007).

Organizacion Panamericana de la Salud. Estimacion cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Americas. Montevideo, Uruguay:Organizacion Panamericana de la Salud, 2006

Osterholzer, J.J. et al. (2009) Accumulation of CD11b+ lung dendritic cells in response to fungal infection results from the CCR2-mediated recruitment and differentiation of Ly-6Chigh monocytes. *J. Immunol.* 183, 8044–8053

Padilla AM, Simpson LJ, Tarleton RL. Insufficient TLR activation contributes to the slow development of CD8+ T cell responses in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* (2009) 183(2):1245–52. doi:10.4049/jimmunol.0901178

Paiva CN, Feijo DF, Dutra FF, Carneiro VC, Freitas GB, Alves LS, et al. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Clin Invest* (2012) 122(7):2531–42.10.1172/JCI58525

Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem J* (2008) 410(2):359–68.10.1042/BJ20071138 [

Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Martinez A, Radi R. *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. *Antioxid Redox Signal* (2013) 19(7):723–34. doi:10.1089/ars.2012.4618

Piacenza L, Zago MP, Peluffo G, Alvarez MN, Basombrio MA, Radi R. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. *Int J Parasitol* (2009) 39(13):1455–64.

Pierre, P., Turley, S.J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R.M., and Mellman, I. *Nature*. 1997; 388: 787–792

Plantinga, M. et al. (2013) Conventional and monocyte-derived CD11b+ dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* 38, 322–335

Plantinga, M. et al. (2013) Conventional and monocyte-derived CD11b+ dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* 38, 322–335

Primeiro estudo a usar monócitos e PBMCs depletadas de linfócitos provenientes do sangue de HUMANOS para gerar DCs com GM-CSF e IL-4.

Primeiro trabalho a criar um método para purificar LCs da epiderme e descobrir que GM-CSF é responsável pela maturação dessas células, fazendo com que sejam capazes de ativar linfócitos T em MLRs, enquanto outras citocinas testadas não tiveram a mesma ação (IL-1 alfa,2,3,4, IFN, TNF, M-CSF, G-CSF)

Procópio DO, Teixeira MM, Camargo MM, Travassos LR, Ferguson MAJ, Almeida IC, Gazzinelli RT 1999. Differential inhibitory mechanism of cyclic AMP on TNF- α and IL-12 synthesis by macrophages exposed to microbial stimuli. *British J Pharmacology*

Quill, H., Schwartz, R. H. 1987. Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: Specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J. Immunol.* 138: 3704–12 26.

Ramirez G, Valck C, Molina MC, Ribeiro CH, Lopez N, Sanchez G, et al. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. *Immunobiology*(2011) 216(1–2):265–73. doi:10.1016/j.imbio.2010.04.001

Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M. & Muller, W. A. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity*

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010; 375: 1388-402.

Rathinam, C., Geffers, R., Yu` cel, R., Buer, J., Welte, K., Mo` ro` y, T., and Klein, C. (2005). The transcriptional repressor Gfi1 controls STAT3-dependent dendritic cell development and function. *Immunity* 22, 717–728.

Re, F. & Strominger, J. L. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 276, 37692–37699 (2001).

Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Thery C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi- Castagnoli P, Amigorena S. 1999. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189:371–80

Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Thery, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli, and S. Amigorena. 1999. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I–restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189:371–380.

Reis e Sousa C, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, et al. 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40L-independent production of IL-12 by dendritic cells and their re-distribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 186:1819–29

Reis e Sousa C. 2001. Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity* 14:495–98

Reis e Sousa C: Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity* 2001, 14:495-498.

Reis e Sousa C: Toll-Símile receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol* 2004, in press

Reis e Sousa, C., Stahl, P. D. & Austyn, J. M. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J.Exp. Med.*178, 509–519 (1993).

Rescigno M, Borrow P. 2001. The host-pathogen interaction: new themes from dendritic cell biology. *Cell* 106:267–70

Ritchie, K. J., Hahn, C. S., Kim, K. I., Yan, M., Rosario, D., Li, L., de la Torre, J. C. & Zhang, D. E Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection. 2004 . *Nat Med* 10, 1374–1378

Rivollier, A. et al. (2012) Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J. Exp. Med.* 209, 139–155

Rodriguez A, Samoff E, Rioult MG, Chung A, Andrews NW. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J Cell Biol* (1996) 134(2):349–62. doi:10.1083/jcb.134.2.349

Rodriguez, A., A. Regnault, M. Kleijmeer, P. Ricciardi-Castagnoli, and S. Amigorena. 1999. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* 1:362–368.

Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Eibl B, et al. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood: an improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* 196:137–51

RONAU, J. A.; BECKMANN, J. F.; HOCHSTRASSER, M. Substrate specificity of the ubiquitin and Ubl proteases. *Cell Research*, v. 26, n. 4, p. 441–456, 2016.

Ronchetti S., Nocentini G., Riccardi C., Pandolfi P. P. Role of GITR in activation response of T lymphocytes. *Blood*. 2002;100(1):350–352.

Ronchetti S., Zollo O., Bruscoli S., et al. Frontline: GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *European Journal of Immunology*. 2004;34(3):613–622.

Rovere P, Sabbadini MG, Vallinoto C, Fascio U, Zimmermann VS, Bondanza A, Ricciardi-Castagnoli P, Manfredi AA: Delayed clearance of apoptotic lymphoma cells allows cross-presentation of intracellular antigens by mature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 66 :345 –349,1999

Rubio, M. 1956 . Actividad litica de sueros normales sobre formas de cultivo y sanguineas de *Trypanosoma cruzi*. *Bol. Chil. Paras.* 4:62 .

S. Sozzani, P. Allavena, G. D'Amico, W. Luini, G. Bianchi, M. Kataura, T. Imai, O. Yoshie, R. Bonecchi, A. Mantovani Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties, *J. Immunol*, 161 (1998), pp. 1083-1086

S. Sozzani, P. Allavena, G. D'Amico, W. Luini, G. Bianchi, M. Kataura, T. Imai, O. Yoshie, R. Bonecchi, A. Mantovani Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.*, 161 (1998), pp. 1083-1086

Sallusto F, Lanzavecchia A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 179:1109–18

Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, et al. 1999. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur. J. Immunol.* 29:1617–25

Sallusto F., Lanzavecchia, A., Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.*, 179 (1994), pp. 1109–1118

Sallusto, F., A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 179:1109–18

Sallusto, F., A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 179:1109–18

Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182:389–400

Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182:389–400

Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial product

Santucci L., Agostini M., Bruscoli S., et al. GITR modulates innate and adaptive mucosal immunity during the development of experimental colitis in mice. *Gut*. 2007;56(1):52–60. doi: 10.1136/gut.2006.091181

- Satpathy, A.T. et al. (2012) Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J. Exp. Med.* 209, 1135–1152
- Savina, A. & Amigorena, S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.* 219, 143–156 (2007).
- Schenkman S, Ferguson MAJ, Heise N, Cardoso de Almeida ML, Mortara RA, Yoshida N 1993. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 59: 293-304
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102 (suppl 1): 75–85.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102 (suppl 1): 75–85.
- Schuurhuis DH, Laban S, Toes RE, Ricciardi-Castagnoli P, Kleijmeer MJ, et al. 2000. Immature dendritic cells acquire CD8(+) cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli. *J. Exp. Med.* 192:145–50
- Schwartz, R. H. T cell clonal anergy. *Curr. Opin. Immunol.*, 9: 351–357, 1997
- Seder, R. A., Paul, W. E., Davis, M. M., Fazekas de St & Groth, B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.* 176, 1091–1098 (1992)
- Segura, E. et al. (2009) Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 20377–20381
- Segura, E. et al. (2013) Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* 38, 336–348
- Serbina, N.V. et al. (2003) TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19, 59–70
- Sere, K. et al. (2012) Two distinct types of Langerhans cells populate the skin during steady state and inflammation. *Immunity* 37, 905–916
- Shi Y, Zheng W, Rock KL. 2000. Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:14590–95 Rovere P, Vallinoto C, Bondanza A,
- Shimizu J., Yamazaki S., Takahashi T., Ishida Y., Sakaguchi S. Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunology*. 2002;3(2):135–142
- Shortman, K. & Naik, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature Rev. Immunol.* 7, 19–30 (2007)
- Sibley, L. D., and N. W. Andrews. 2000. Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic* 1:100-106.
- Siddiqui, K.R. et al. (2010) E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis. *Immunity* 32, 557–567
- Silva GK, Gutierrez FR, Guedes PM, Horta CV, Cunha LD, Mineo TW, et al. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* (2010)

- Sorensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA et al. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1999; 103: 807–815
- Sorensen TL, Trebst C, Kivisakk P, Klaege KL, Majmudar A, Ravid R et al. Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. *J Neuroimmunol* 2002; 127: 59–68
- Sosoniuk E, Vallejos G, Kenawy H, Gaboriaud C, Thielens N, Fujita T, et al. Trypanosoma cruzi calreticulin inhibits the complement lectin pathway activation by direct interaction with L-ficolin. *Mol Immunol* (2014) 60(1):80–5. doi:10.1016/j.molimm.2014.03.014
- Stanley, E. R. et al. Biology and action of colonystimulating factor-1. *Mol. Reprod. Dev.* 46, 4–10 (1997).
- Steinman RM (2011) Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* 30:1–22
- Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137, 1142–1162 (1973)
- Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I. & Inaba, K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 191, 411–416 (2000).
- Steinman, R.M., and Z.A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137:114
- Steinman, R.M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M.C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 685–711 (2003).
- Steinmetz OM, Turner JE, Paust HJ, Lindner M, Peters A, Heiss K et al. CXCR3 mediates renal Th1 and Th17 immune response in murine lupus nephritis. *J Immunol* 2009; 183: 4693–4704.
- Strobl, H. et al. TGF- β 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. *J. Immunol.* 157, 1499–1507 (1996).
- Sturm N, Campbell DA (2010) Alternative lifestyles: The population structure of Trypanosoma cruzi. *Acta Trop* 115: 35–43. population structure of Trypanosoma cruzi genetics. *Genetics* 171: 527–543.
- Sturm N, Campbell DA (2010) Alternative lifestyles: The population structure of Trypanosoma cruzi. *Acta Trop* 115: 35–43.
- Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA (2003) Evidence for multiple hybrid groups in Trypanosoma cruzi. *Int J Parasitol* 33: 269–279.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* (2010) 140(6):805–20.
- Tang, A., Amagai, M., Granger, L. G., Stanley, J. R. & Udey, M. C. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361, 82–85 (1993).
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M: Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev* 1992, 5:400e419
- Tardieux I, Nathanson MH, Andrews NW. Role in host cell invasion of Trypanosoma cruzi-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. *J Exp Med* (1994) 179(3):1017–22. doi:10.1084/jem.179.3.1017
- Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to Trypanosoma cruzi infection. *Nature* (1992) 356(6367):338–40. doi:10.1038/356338a0

Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature* (1992) 356(6367):338–40.10.1038/356338a0

Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol* (2007) 19(4):430–4. doi:10.1016/j.coi.2007.06.003

Tarleton RL. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Semin Immunopathol* (2015) 37(3):233–8.10.1007/s00281-015-0481-9

Tarleton RL. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* (1990) 144(2):717–24

Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol* (2007) 19(4):430–4.10.1016/j.coi.2007.06.003

This study reports for the first time that the integrin CD103 (also known as α E-integrin, part of the α E β 7-integrin heterodimer) expressed on the cell surface of T cells can bind the adhesion molecule E-cadherin on epithelial cells.

Thomas MC, Fernandez-Villegas A, Carrilero B, Maranon C, Saura D, Noya O, et al. Characterization of an immunodominant antigenic epitope from *Trypanosoma cruzi* as a biomarker of chronic Chagas' disease pathology. *Clin Vaccine Immunol* (2012)

Thoma-Uszynski, S., S.M. Kiertscher, M.T. Ochoa, D.A. Bouis, M.V. Norgard, K. Miyake, P.J. Godowski, M.D. Roth, and R.L. Modlin. 2000. Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. *J. Immunol.* 165:3804–3810.

Thompson CB. 1995. New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity* 3:531–39

Tibayrenc M 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 28: 85-104.

Tibayrenc M, Ayala FJ 1991. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today* 7: 228-232..

Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Nat Acad Sci USA* 83: 115-119.

Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Nat Acad Sci USA* 83: 115-119.

Trocoli Torrecilhas AC, Tonelli RR, Pavanelli WR, da Silva JS, Schumacher RI, de Souza W, et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes Infect* (2009) 11(1):29–39.10.1016/j.micinf.2008.10.003

Tyler K. M., Engman D. M.. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* 31:472–481

Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811–15

Vaena de Avalos S, Blader IJ, Fisher M, Boothroyd JC, Burleigh BA. Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. *J Biol Chem* (2002) 277(1):639–44. doi:10.1074/jbc.M109037200

Valck C, Ramirez G, Lopez N, Ribeiro CH, Maldonado I, Sanchez G, et al. Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by *Trypanosoma cruzi* calreticulin. *Mol Immunol*(2010) 47(7–8):1516–21. doi:10.1016/j.molimm.2010.01.019

Valladeau, J. et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71–81 (2000)

van den Berg, W.B. and Miossec, P. (2009) IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 549–553

Villadangos, J.A., and Shortman, K. (2010). Found in translation: the human equivalent of mouse CD8+ dendritic cells. *J.Exp. Med.* 207, 1131–1134.

Villalta, F., and Kierszenbaum, F. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 736, 39-44.

Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. 2001. Regulation of Toll-símile receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 166:249–55

Visintin, A., A. Mazzoni, J. H. Spitzer, D. H. Wyllie, S. K. Dower, and D. M. Segal. 2001. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 166:249. 36.

Visintin, A., A. Mazzoni, J.H. Spitzer, D.H. Wyllie, S.K. Dower, and D.M. Segal. 2001. Regulation of Toll-símile receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 166:249–255.

Wakim, L. M., Waithman, J., van Rooijen, N., Heath, W. R. & Carbone, F. R. Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science* 319, 198–202 (2008).

Wakim, L.M. et al. (2008) Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science* 319, 198–202

Walport, M. J. Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344, 1058–1066 (2001).

WALUNAS TL, LENSCHOW DJ, BAKKER CY, LINSLEY PS, FREEMAN GJ, GREEN JM, THOMPSON CB, AND BLUESTONE JA. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1: 405–413, 1994.

WALUNAS TL, LENSCHOW DJ, BAKKER CY, LINSLEY PS, FREEMAN GJ, GREEN JM, THOMPSON CB, AND BLUESTONE JA. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1: 405–413, 1994.

Walunas, T.L., D.J. Lenschow, C.Y. Bakker, P.S. Linsley, G.J. Freeman, J.M. Green, C.B. Thompson, and J.A. Bluestone. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* 1:405–413

Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., and Colonna, M. (2012). IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* 13, 753–760.

Weng Y, Siciliano SJ, Waldburger KE, Sirotna-Meisher A, Staruch MJ, Daugherty BL et al. Binding and functional properties of recombinant and endogenous CXCR3 chemokine receptors. *J Biol Chem* 1998; 273: 18288–18291.

WHO. Control of Chagas disease. Second report of the WHOExpert Committee. Technical report series no 905. Geneva: World Health Organization, 2002

Wilkinson SR, Meyer DJ, Taylor MC, Bromley EV, Miles MA, Kelly JM. The Trypanosoma cruzi enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *J Biol Chem* (2002) 277(19):17062–71. doi:10.1074/jbc.M111126200

Wilkinson SR, Obado SO, Mauricio IL, Kelly JM. Trypanosoma cruzi expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002)

Witmer-Pack, M. D., W. Olivier, J. Valinsky, G. Schuler, and R. M. Steinman. 1987. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 166:1484.

Witmer-Pack, M. D. et al. Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic (op/op) mouse. *J. Cell Sci.* 104, 1021–1029 (1993).

Wollenberg, A. et al. (1996) Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J. Invest. Dermatol.* 106, 446–453

Wong P, Severns CW, Guyer NB, Wright TM. A unique palindromic element mediates gamma interferon induction of mig gene expression. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 914–922.

Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci* (2003) 116(Pt 17):3611–22. doi:10.1242/jcs.00666

World Health Organization. (2016). World Health Organization: Chagas disease. Retirado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>, acessado em 23/06/17 às 12:11.

Xie JH, Nomura N, Lu M, Chen SL, Koch GE, Weng Y et al. Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 771–780.

Xu D., Zhang T., Xiao J., Zhu K., Wei R., Wu Z., Meng H., Li Y., Yuan J. (2015) Modification of BECN1 by ISG15 plays a crucial role in autophagy regulation by type I IFN/interferon. *Autophagy* 11:617–628

Yamamoto J, Adachi Y, Onoue Y, Adachi YS, Okabe Y, Itazawa T et al. Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effector populations within circulating CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 568–574

Yewdell, J., Norbury, C. & Bennink, J. Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants and vaccines. *Adv. Immunol.* (in the press).

Yokochi, T., Holly, R. D. & Clark, E. A. Lymphoblastoid antigen (BB-1) expressed on Epstein–Barr virus-activated B cell blasts, B lymphoblastoid lines, and Burkitt's lymphomas. *J. Immunol.* 128, 823–827 (1982).

Yrliid, U., M. Svensson, C. Johansson, and M.J. Wick. 2000. Salmonella infection of bone marrow-derived macrophages and dendritic cells: influence on antigen presentation and initiating an immune response. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27:313–320.

Yuan, W. & Krug, R. M. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. 2001. *EMBO J.* 20, 362–371

Zaba, L.C. et al. (2009) Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 129, 79–88

Zhan Y, Carrington EM, van Nieuwenhuijze A, Bedoui S, Seah S, et al. 2011. GM-CSF increases crosspresentation and CD103 expression by mouse CD8⁺ spleen dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 41:2585–95

Zhan, Y. et al. (2010) Resident and monocyte-derived dendritic cells become dominant IL-12 producers under different conditions and signaling pathways. *J. Immunol.* 185, 2125–2133

Zhao, C., Denison, C., Huibregtse, J. M., Gygi, S. & Krug, R. M. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. 2005. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 10200–10205

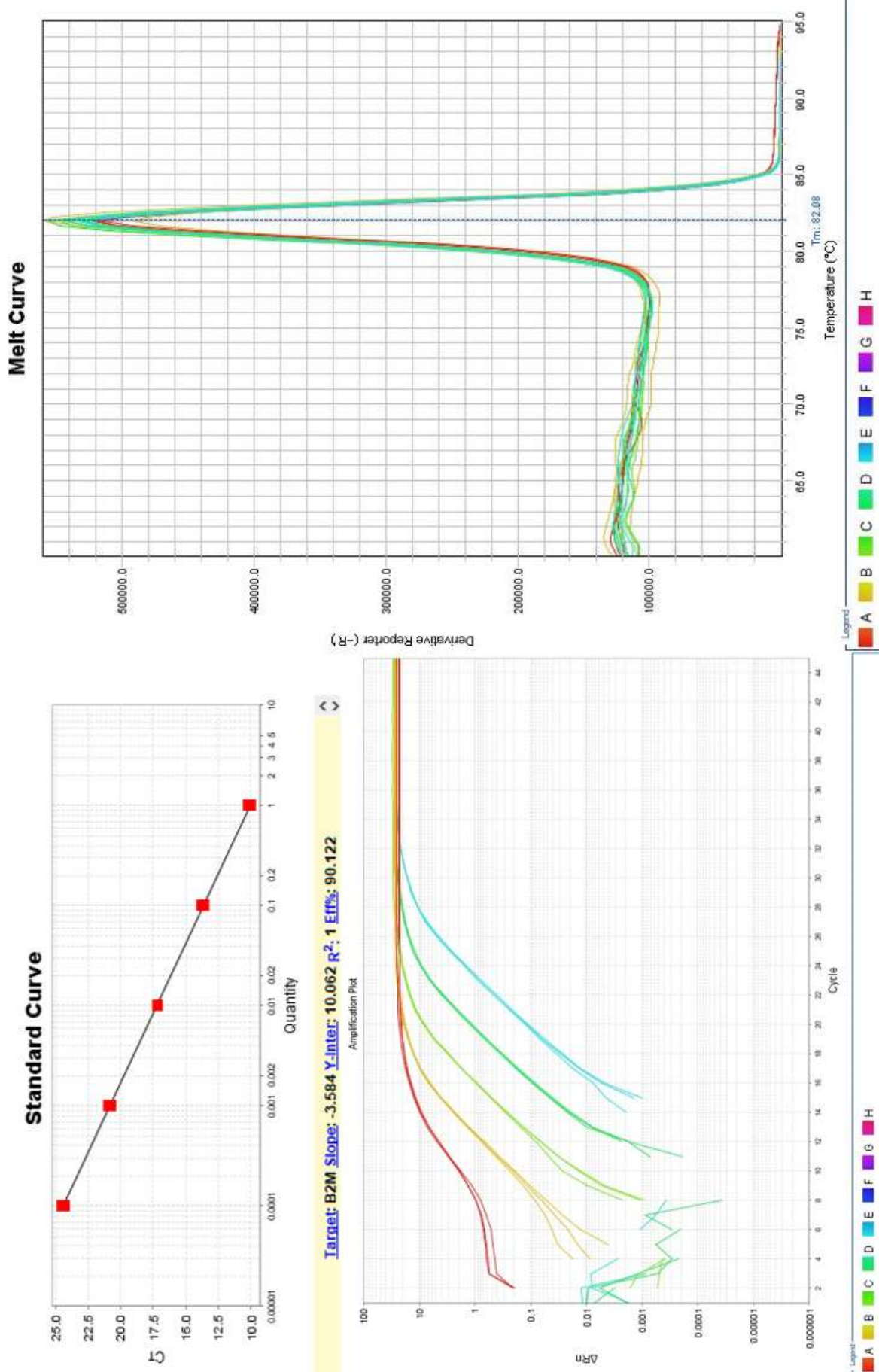
Zigmond, E. et al. (2012) Ly6C(hi) Monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen- presenting cells. *Immunity* 37, 1076–1090

Zigmond, E. et al. (2012) Ly6C(hi) Monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen- presenting cells. *Immunity* 37, 1076–1090

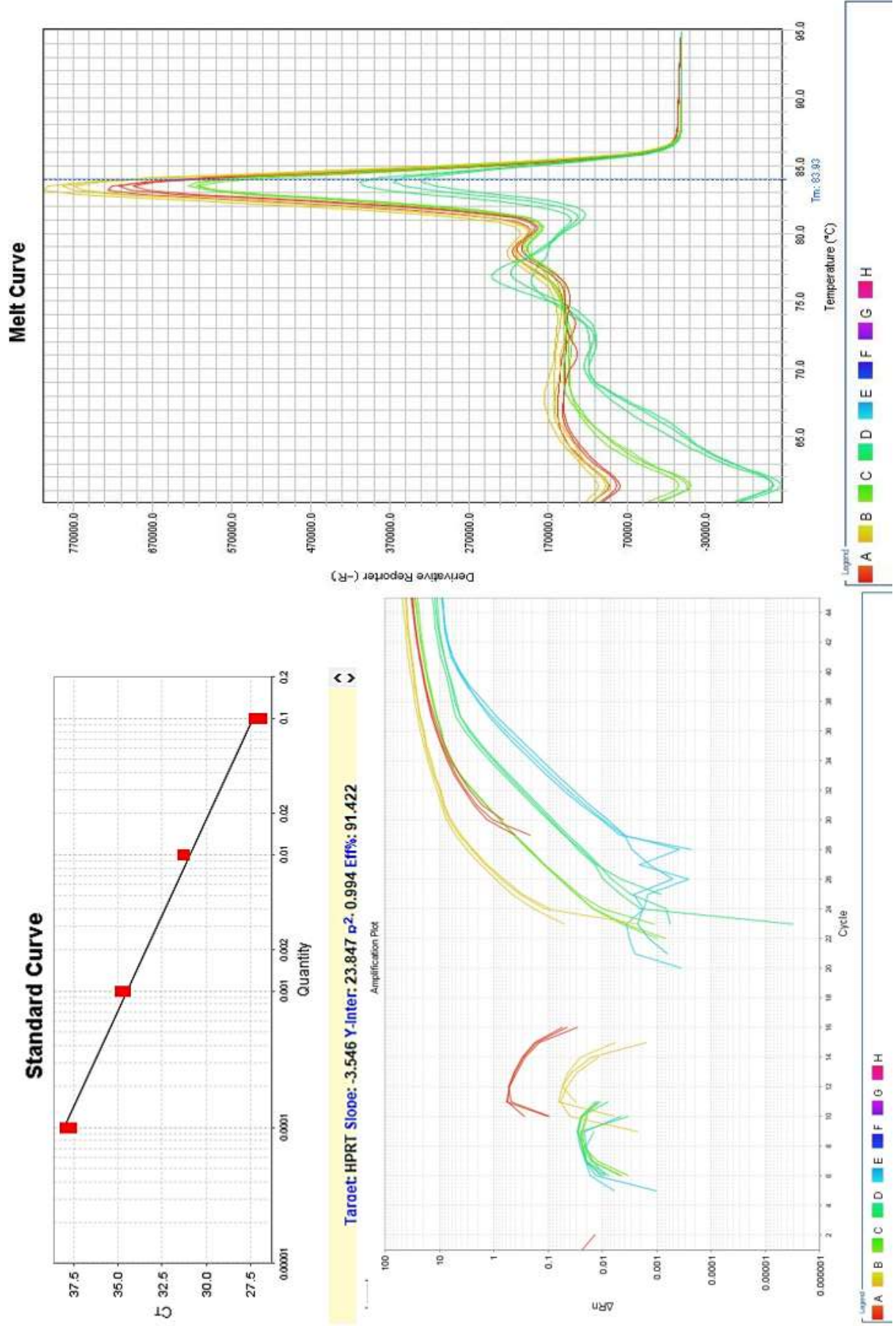
Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., et al., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 1051–1054

9. MATERIAL SUPPLEMENTAR

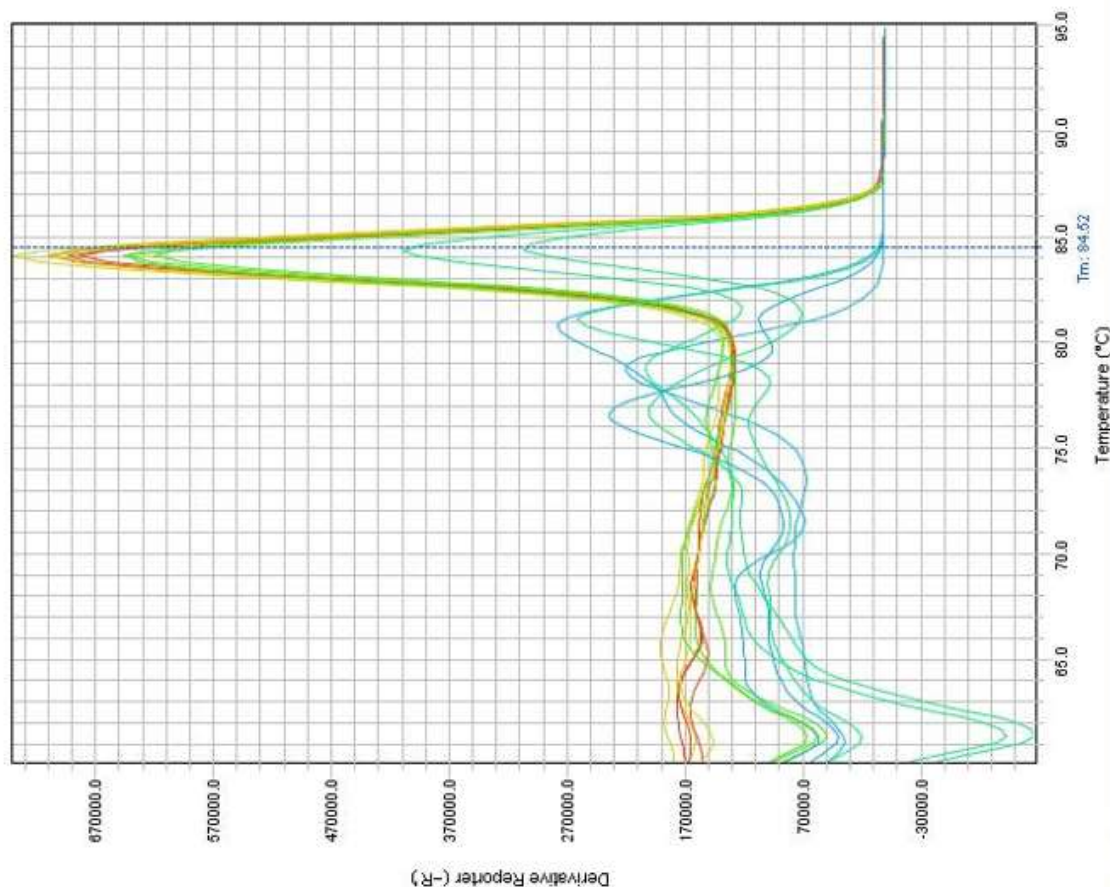
a) B2M



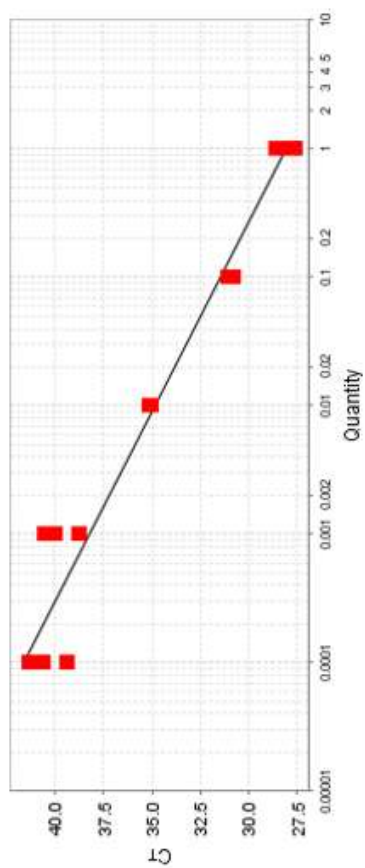
10. HPRT



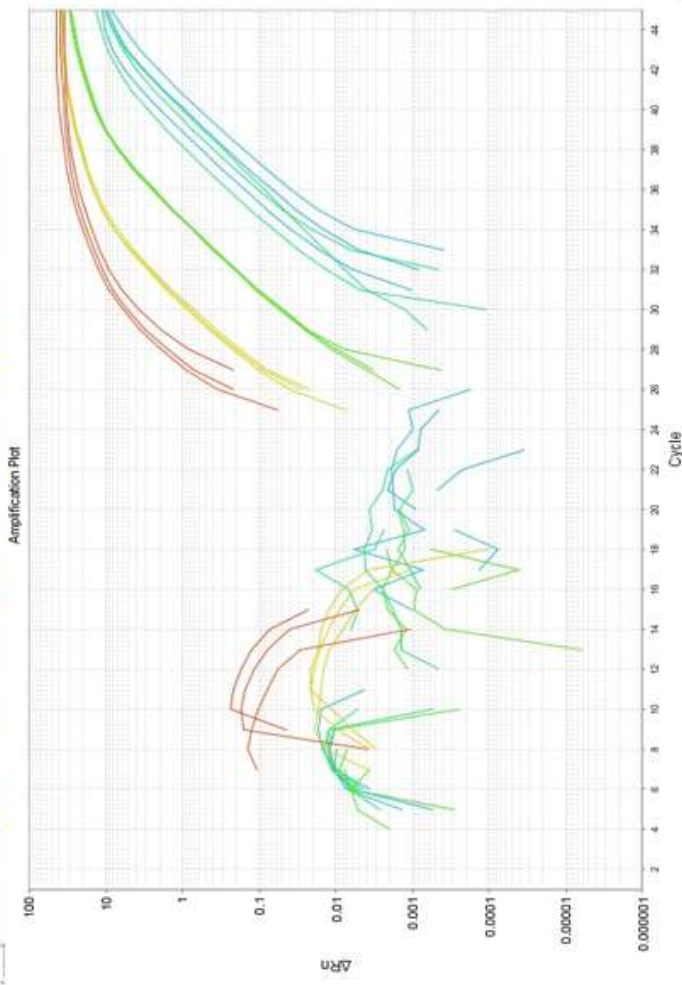
Melt Curve



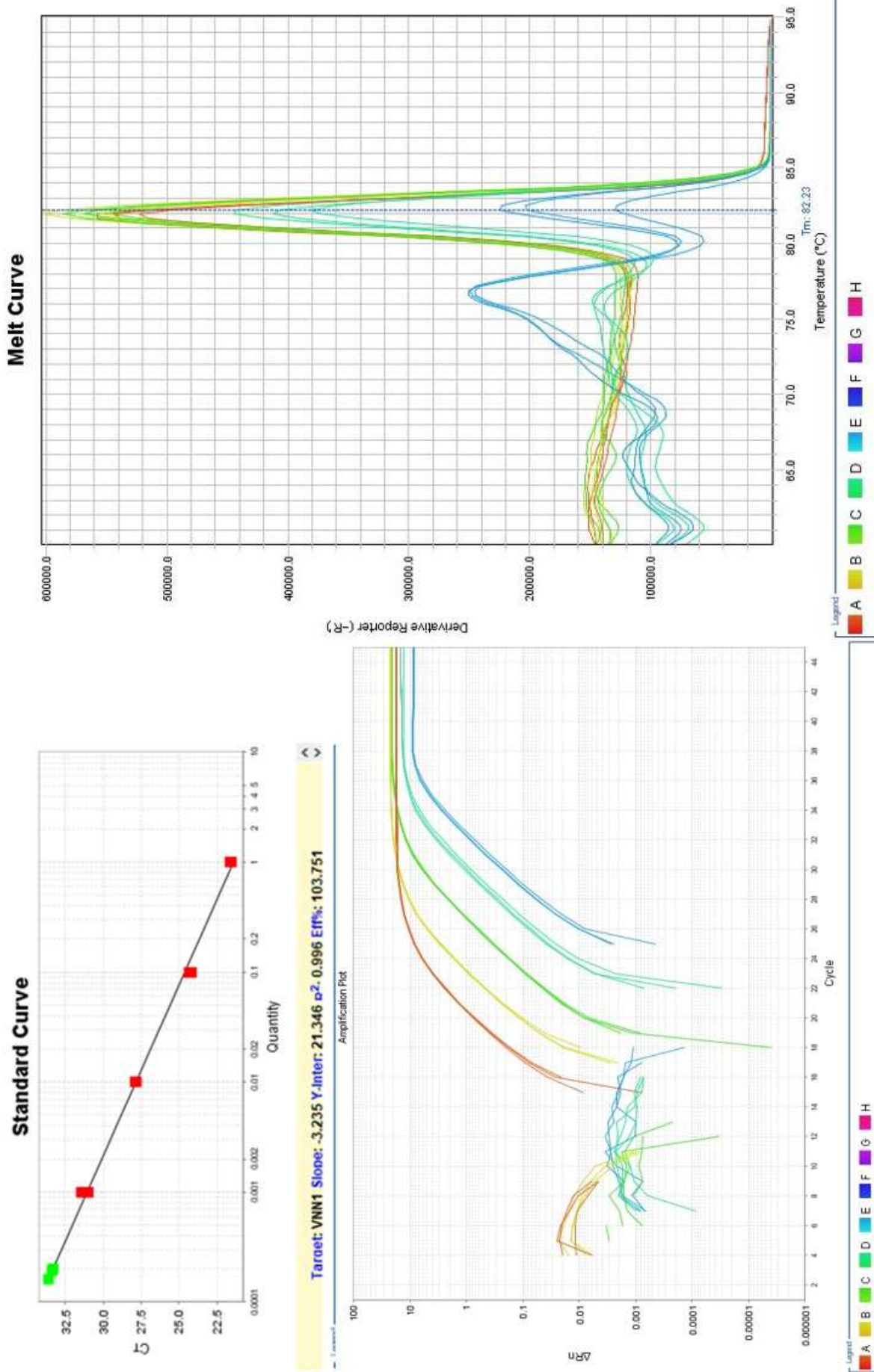
Standard Curve



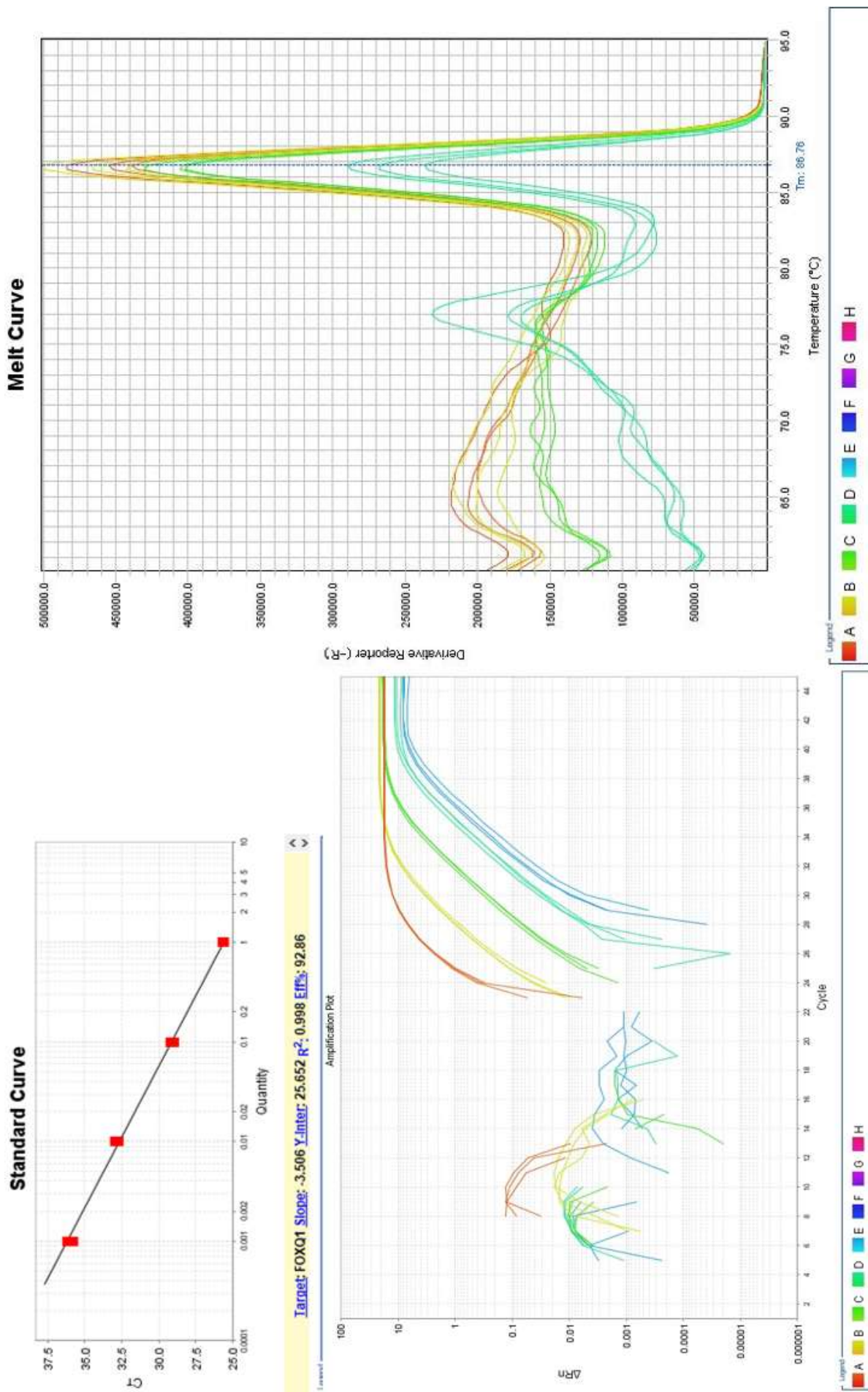
Target: IL12B Slope: -3.379 Y-Inter: 28.081 r^2 : 0.955 Eff%: 97.668



12. VNN1

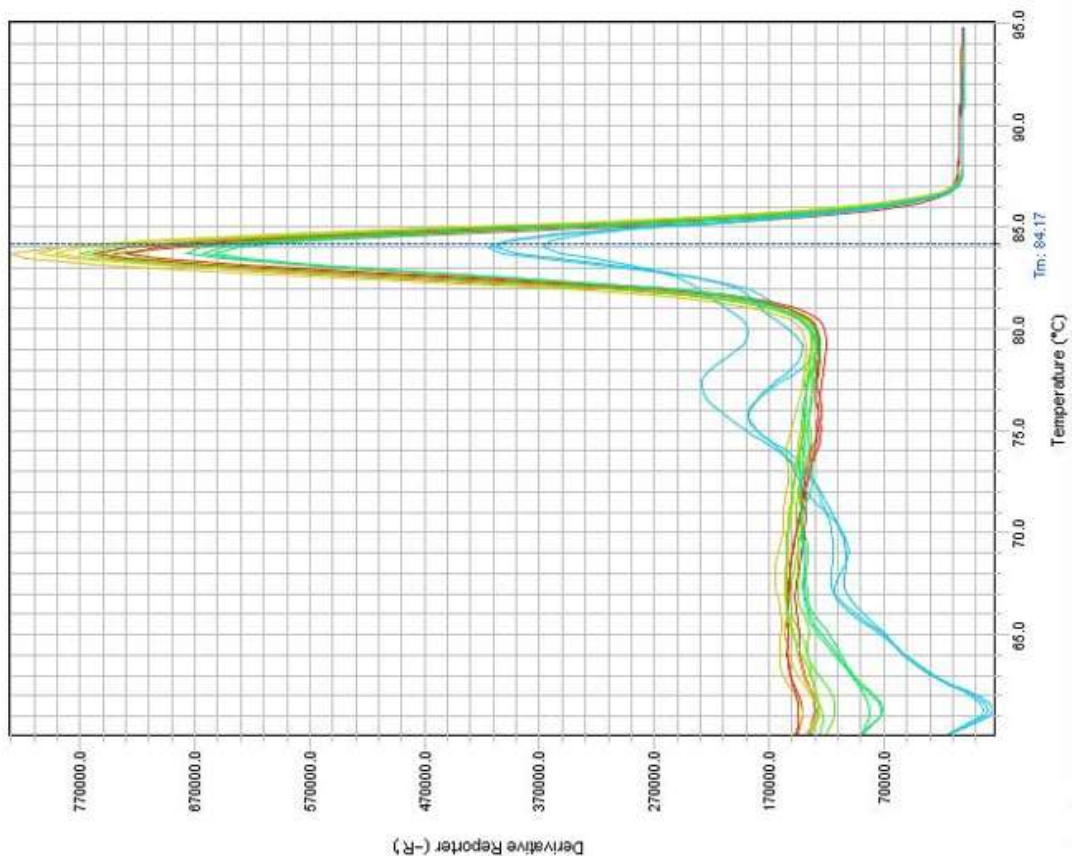


13. FOXQ1

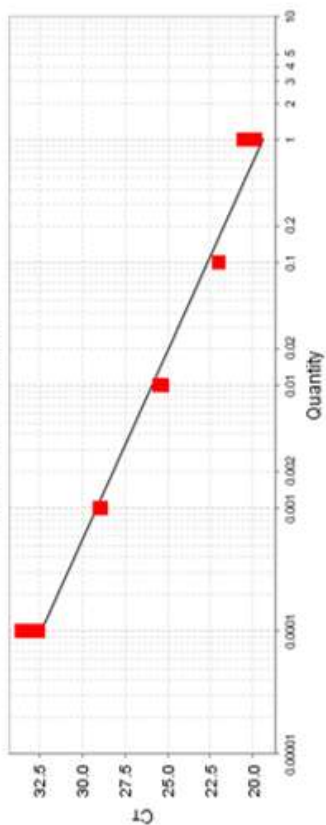


14. SEC24C-1

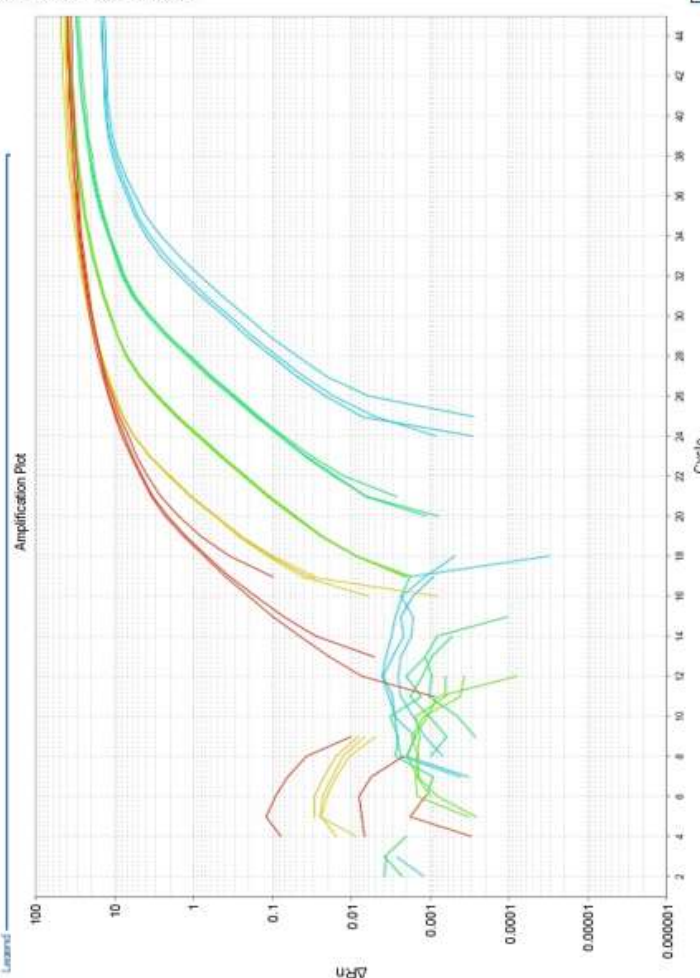
Melt Curve

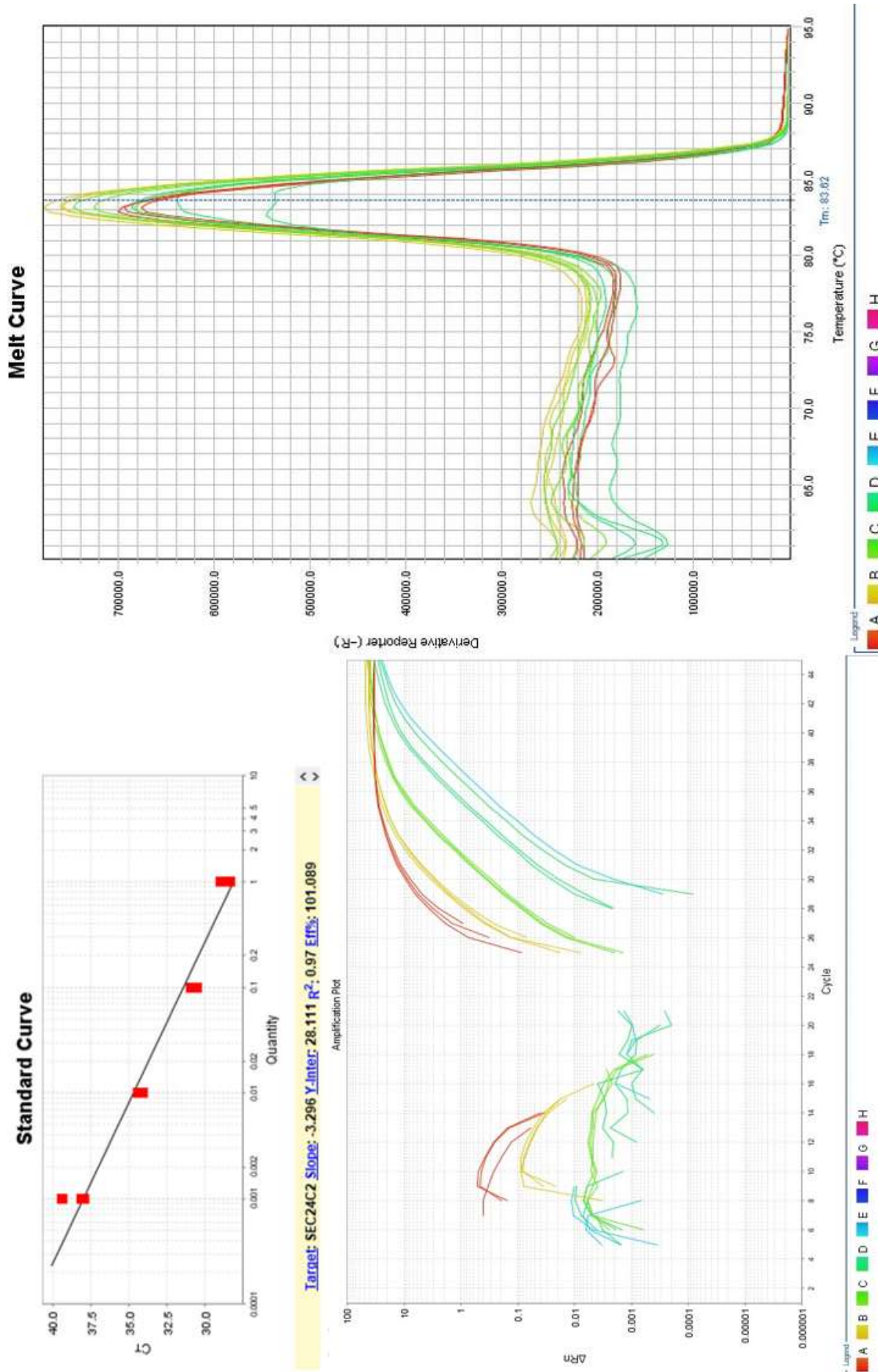


Standard Curve



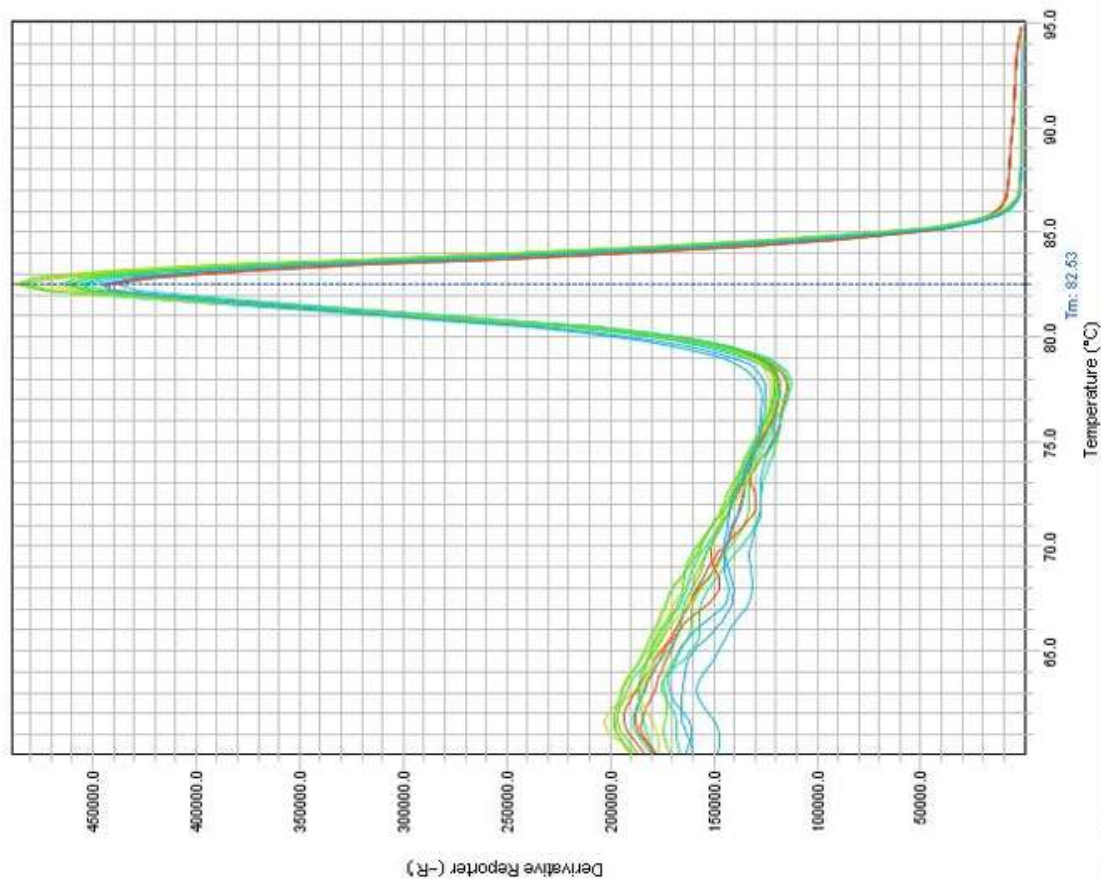
Target: SEC24C(1) Slope: -3.268 Y-Inter: 19.357 r^2 : 0.982 Eff%: 102.301



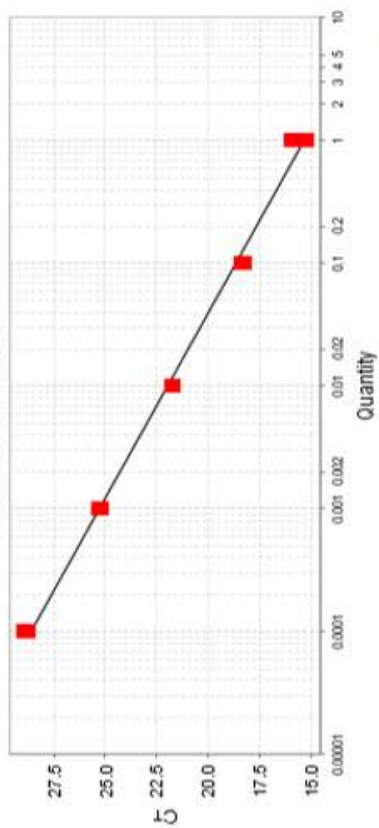


16. FCN1-1

Melt Curve

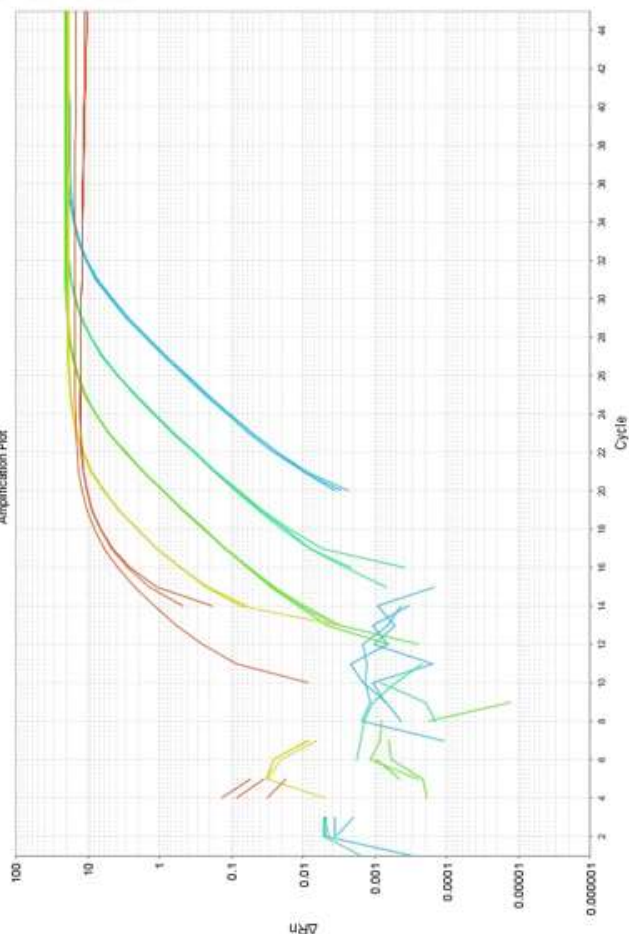


Standard Curve



Target: FCN1(1) Slope: -3.329 Y-inter: 15.298 R^2 : 0.996 Eff%: 99.706

Amplification Plot

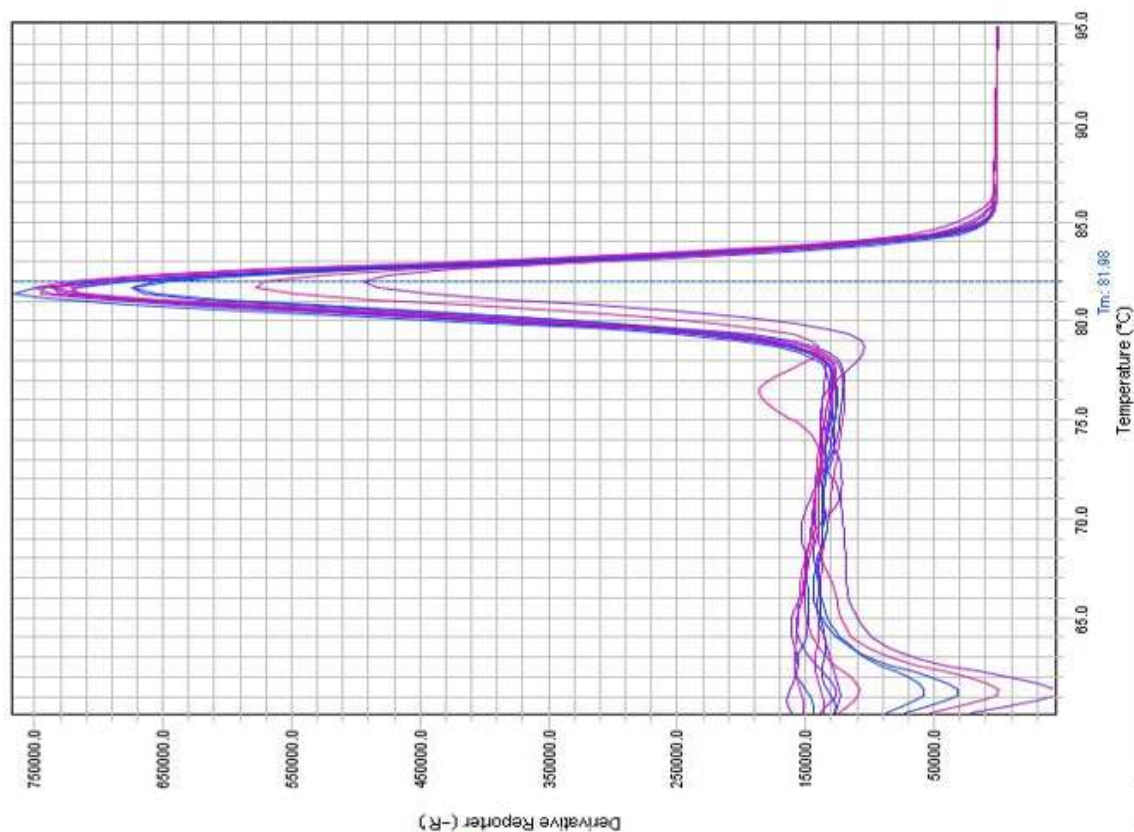


Legend

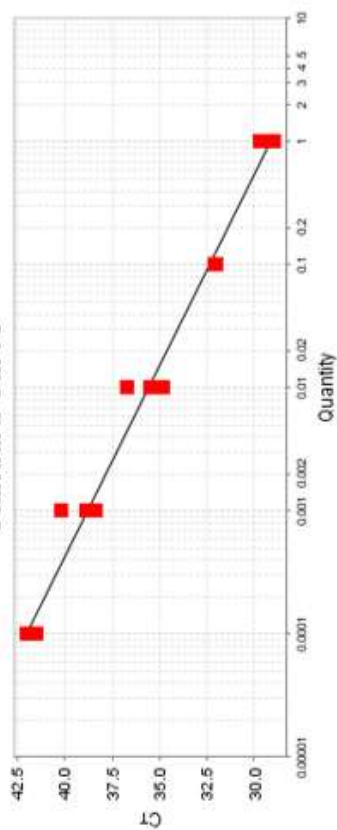
- A
- B
- C
- D
- E
- F
- G
- H

17. TNFSF18

Melt Curve

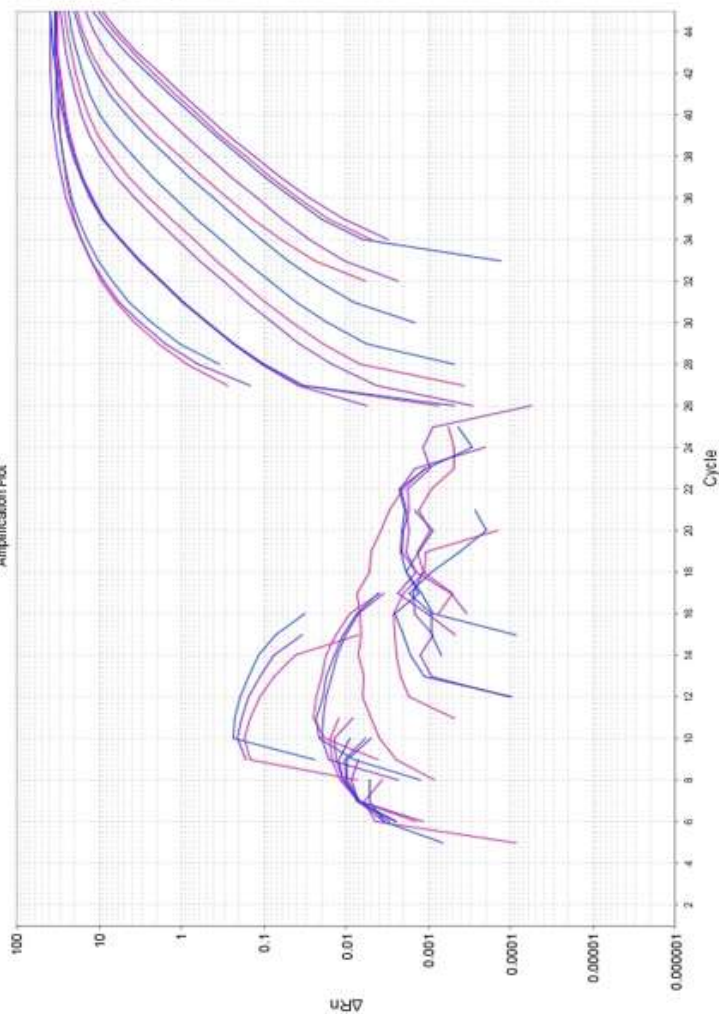


Standard Curve



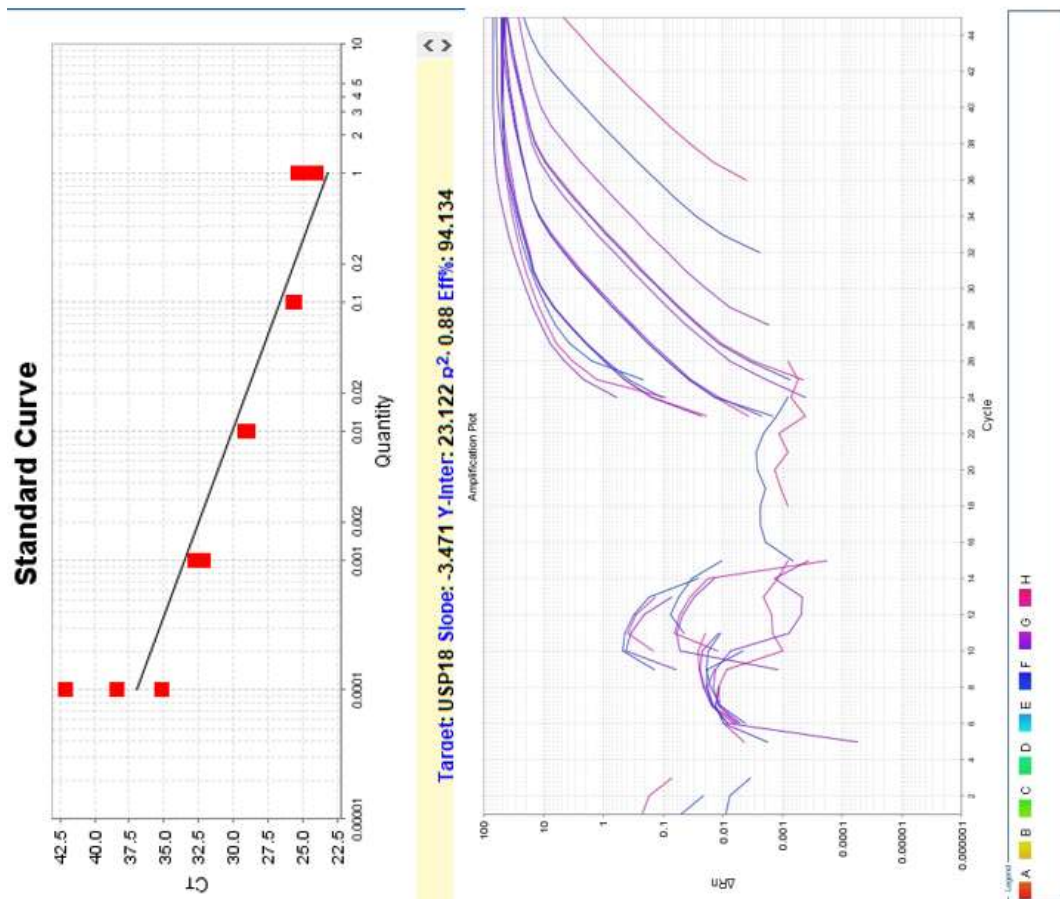
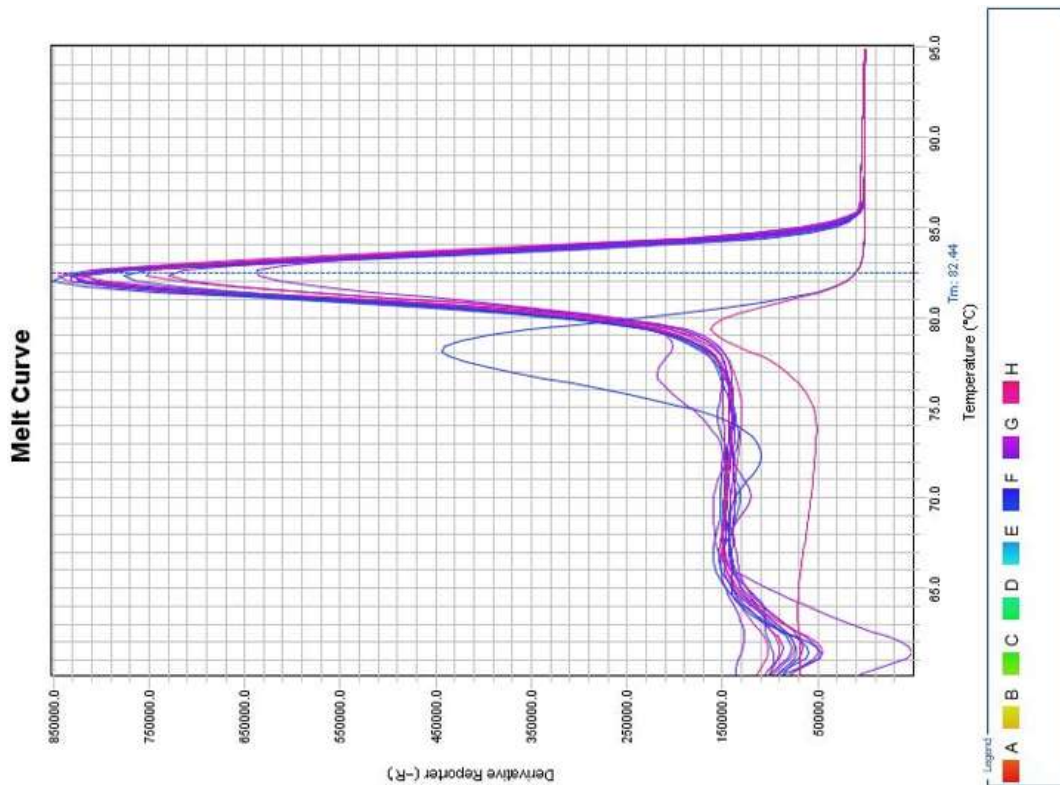
Target: TNFSF18 Slope: -3.199 Y-Inter: 29.17 R²: 0.984 Eff%: 105.389

Amplification Plot

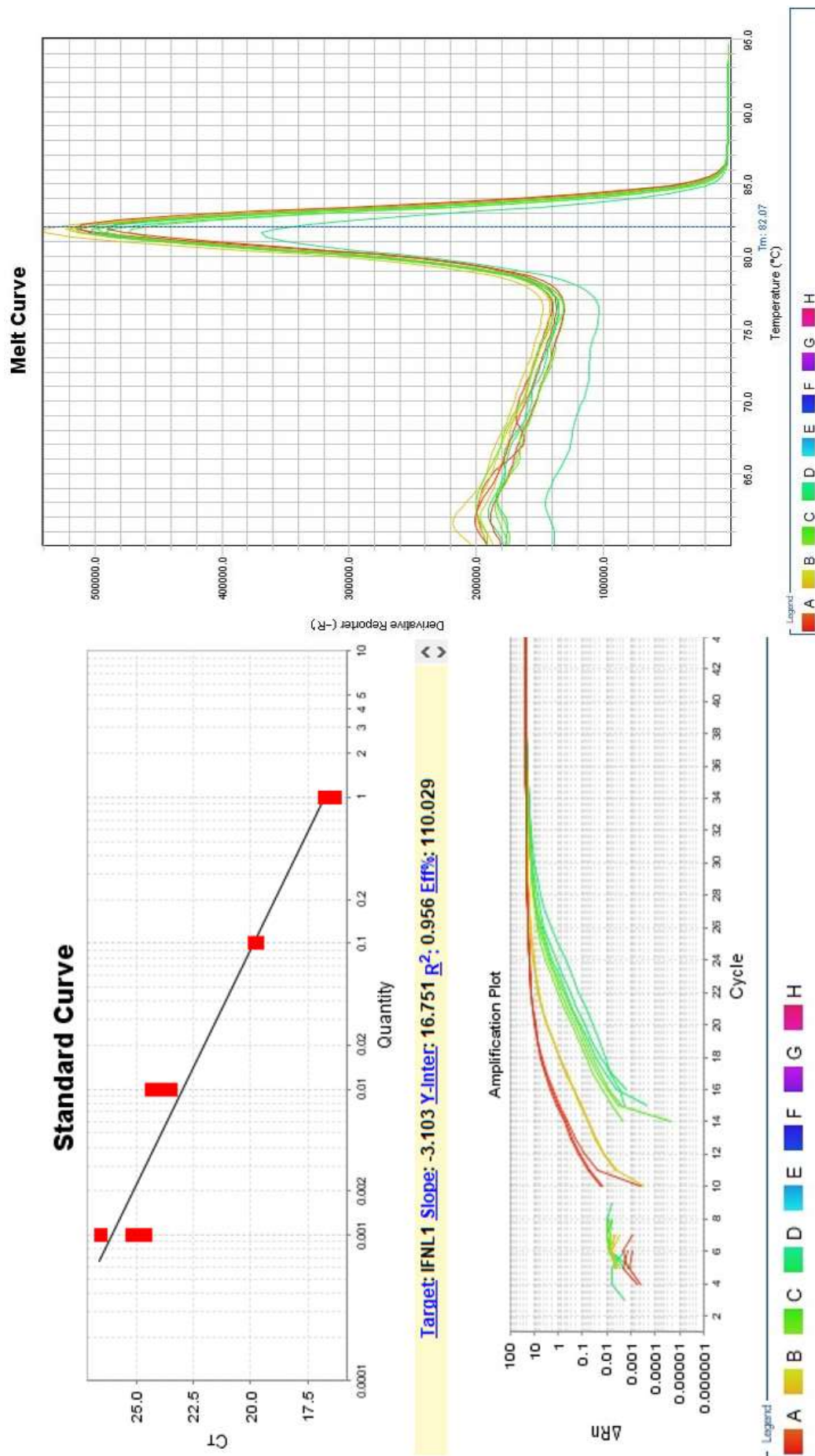


Legend
 A B C D E F G H

Legend
 A B C D E F G H



19. IFNL1



20. CXCL9

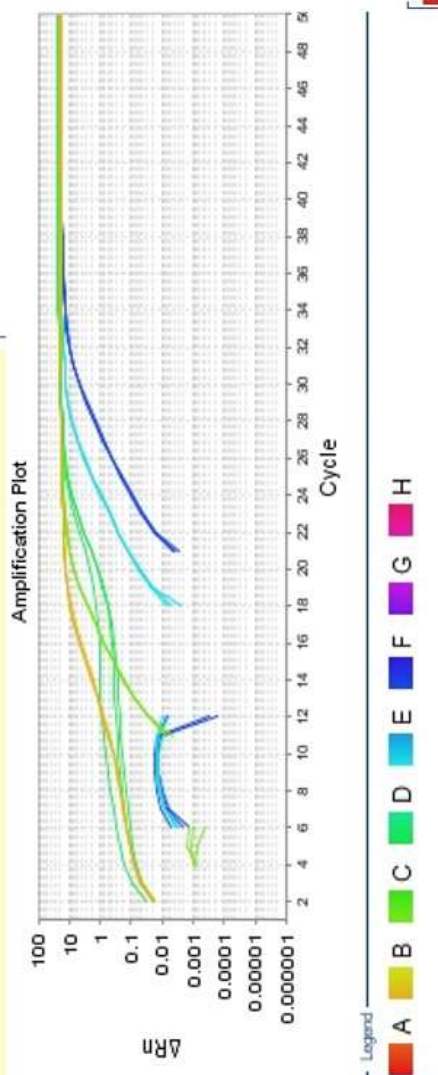
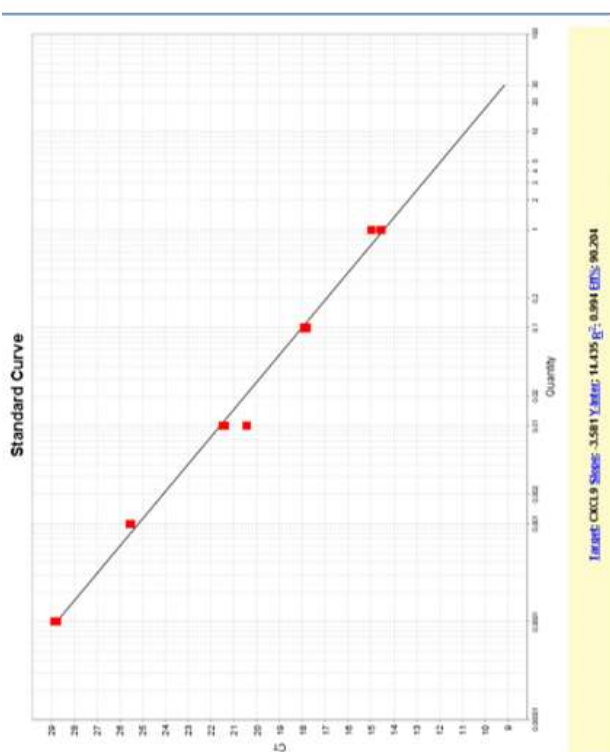
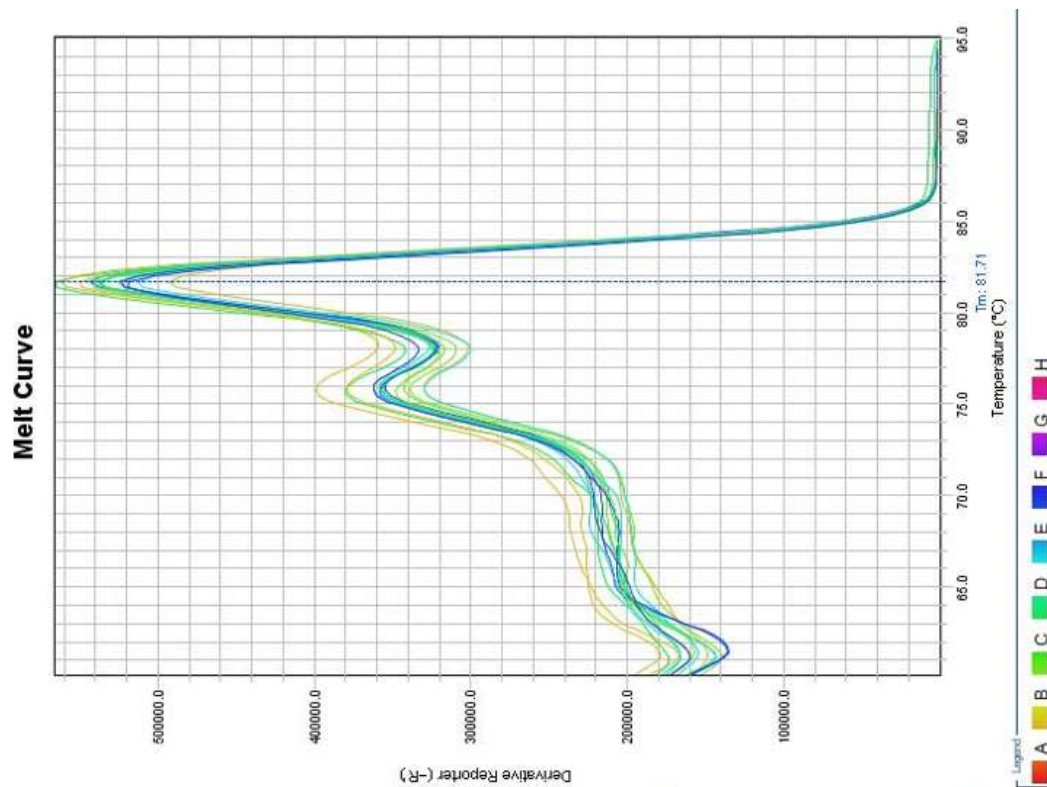


Figura 1S. Obtenção de eficiência acima de 90% dos pares de iniciadores selecionados para validação de genes por qPCR. Gráficos referentes à curva de amplificação de diferentes diluições de cDNA utilizando os pares de iniciadores para cada alvo (painel superior esquerdo), à detecção de fluorescência dos alvos ao longo dos ciclos para cada diluição (painel inferior esquerdo) e às curvas de desnaturação obtidas para cada diluição mostrando a temperatura em que se obteve a separação da metade das fitas amplificadas e liberação de fluorescência.