

Humberto Doriguêto Gravina

Utilização diferencial dos TLR2 e TLR9 pelas células do eixo
fagocítico mononuclear durante a infecção aguda por *T. cruzi*

Orientadora: Dra. Catherine Ropert

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Belo Horizonte, 09/02/2015

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Humberto Doriguêto Gravina

Utilização diferencial dos TLR2 e TLR9 pelas células do eixo
fagocítico mononuclear durante a infecção aguda por *T. cruzi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica e Imunologia do
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
como parte das exigências para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Dra. Catherine Ropert

Co-orientador: Dr. Alfredo Miranda de Góes

Belo Horizonte, 09/02/2015

*“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento
e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade
coletiva por toda a humanidade.”*

Marie Curie

DEDICO,

“AOS MEUS AVÓS E FAMILIARES”

“AOS MEUS PAIS JOÃO CARLOS E ÂNGELA MARIA”

“AOS MEUS IRMÃOS FABIANA E MARCUS BRÁULIO”

“ÀS SOBRINHAS GIOVANNA E ISABELE”

“AOS TIOS ONOFRE E MARILENE”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e torceram pela conclusão de uma importante etapa em minha vida, por toda presença e confiança.

Ao povo brasileiro, à Universidade Federal de Minas Gerais, aos membros do Departamento de Bioquímica e Imunologia, em especial aos professores e funcionários, pela estrutura e ensino de qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento e concessão da bolsa.

À minha orientadora Dra Catherine Ropert, que com muito esforço e sabedoria dedicou seu tempo e conhecimento a minha formação profissional, intelectual e pessoal.

À Aline e ao Hugo por compartilharem com amizade o aprendizado em nosso grupo de pesquisa.

Ao Prof. Alfredo pela co-orientação, ensinamentos e suporte. A todos os membros do LICM1 e LICM2 que dividiram o mesmo ambiente de estudo, aprendizado e trabalho.

Ao Prof. Dawidson, à Profa. Maria Elena e ao Prof. Jader pelo apoio, amizade em momentos de dúvidas e dificuldades.

Aos membros do LPCM do CPqRR, em especial à Dra Silvane e ao Dr Policarpo por disponibilizarem sua infraestrutura e pelo auxílio na execução dos experimentos e infecções.

À secretaria do Departamento de Bioquímica e Imunologia, em especial à Celise e ao Orlando por todo o apoio.

Ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS-FIOCRUZ) e à plataforma de citometria de fluxo do René Rachou, em especial à Tiza e à Simone, pelo auxílio na realização deste trabalho.

Ao Jasper Katz e ao grupo *Tree Star* pela oferta do programa *FlowJo Software*.

Ao Prof. Sérgio Costa e aos membros do biotério do CPqRR, em especial à Fernanda, à Katia, à Ana Carolina e à Vera, pela oferta e cuidado com os animais.

Aos companheiros de disciplinas e Bases I e Bases II, com os quais partilhei as salas de aula, conhecimento e horas de estudo.

Ao Prof. Ricardo e aos membros do LAIM, em especial ao Dr. Marco Ataíde, à Dra. Fabiana e à Clécia, que foram essenciais nos meus primeiros passos no doutorado.

Aos membros da banca que gentilmente aceitaram participar desta defesa pelos bons conselhos.

Aos meus pais, João Carlos e Ângela Maria, pelo amor, suporte emocional e financeiro nos tempos difíceis.

Ao Marcus Bráulio e à Fabiana, meus irmãos de sangue e alma que sempre estiveram ao meu lado. Ao Alexssander e às pequenas Giovanna e Isabele, minhas sobrinhas e afilhadas.

Aos meus avós e familiares que foram o berço para o meu desenvolvimento.

Ao Procópio, aos tios Onofre e Marilene e famílias pela acolhida com carinho em suas casas e na cidade de BH.

Ao Rômulo e à família Zagnoli pela amizade e pelos anos de bom convívio.

Aos amigos com quem morei em BH: Alexandre, Eduardo, Antônio, Saulo, Wagner, Maycon pela amizade, boa convivência e inúmeras gargalhadas.

Aos amigos, entre muitos que cativei em BH: Paula, Amanda, Fernanda, Ivana, Pedro, Aline, Vanessa, Sílvio, Filipe, Simon e Dora pela força, torcida, amizade e conselhos.

Aos eternos irmãos de Viçosa: Douglas, Helimar, Lucas, Marlon e Dênis pela amizade perseverante.

À Lilica, ao Yure e ao Leonidas por todo companheirismo e carinho.

A Deus, pela oportunidade de vida e possibilidade de cumprir mais uma etapa em convívio com grandes pessoas.

Vocês são peças importantes que compõem quem sou, sem as quais não chegaria até aqui.

Muito obrigado!!!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – <i>Modelo de diferenciação de DCs, monócitos e macrófagos murinos.</i>	10
FIGURA 2 – <i>Sinalização típica dos TLRs em diferentes tipos celulares.</i>	16
FIGURA 3 – <i>Rede sinalizatória gatilhada por TLRs.</i>	22
FIGURA 4 – <i>“Cross-talk” entre fatores de transcrição gatilhados por TLRs.</i>	27
FIGURA 5 – <i>Mecanismos básicos de cooperação entre sinais de TLRs.</i>	39
FIGURA 6 – <i>Curvas de parasitemia e sobrevivência de animais deficientes.</i>	50
FIGURA 7 – <i>Resposta pró-inflamatória de camundongos TLR deficientes.</i>	52
FIGURA 8 – <i>Efeito dos agonistas de TLRs sobre a resposta pró-inflamatória.</i>	54
FIGURA 9 – <i>Resposta pró-inflamatória de camundongos Mal/TIRAP deficientes.</i>	56
FIGURA 10 – <i>Identificação de células do eixo fagocítico mononuclear no baço.</i>	58
FIGURA 11 – <i>Expressão de TLRs em esplenócitos de animais infectados.</i>	60
FIGURA 12 – <i>Produção ex vivo de TNF- α e IL-12 por esplenócitos.</i>	62
FIGURA 13 – <i>Efeito de agonistas sobre a produção de citocinas por esplenócitos.</i>	65
FIGURA 14 – <i>Resposta inflamatória de monócitos a agonistas de TLRs.</i>	68
FIGURA 15 – <i>Monócitos Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} esplênicos.</i>	72
FIGURA 16 – <i>Papel de IL-12 e TLRs na resposta inflamatória de monócitos.</i>	77
FIGURA 17 – <i>Efeito de agonistas de TLRs sobre a expressão de TLR2 em monócitos.</i>	81
FIGURA 18 – <i>Modulação da sinalização em Mo-Ly6C^{hi/lo}</i>	84
FIGURA 19 – <i>Modelo de cooperação entre células que utilizam TLRs.</i>	90
FIGURA 20 – <i>Rede sinalizatória de TLRs em camundongos.</i>	99
FIGURA 21 – <i>Balanço citocínêmico modulado por TLRs.</i>	101
FIGURA 22 – <i>Estratégia de gating de esplenócitos.</i>	127

LISTA DE TABELAS

TABELA I: <i>Perfis de respostas inflamatórias (Th) em camundongos.</i>	6
TABELA II: <i>Assinatura molecular para imunofenotipagem celular.</i>	11
TABELA III: <i>Relação entre sinalização e perfis citocinêmicos.</i>	28
TABELA IV: <i>Efeito dos agonistas de TLR sobre o número de monócitos TLR2^{hi}.</i>	73
TABELA V: <i>Número de monócitos esplênicos em camundongos deficientes.</i>	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT=PKB: proteína cinase B	MyD88: fator de diferenciação mieloide 88
AP-1: proteína ativadora-1	M ϕ : macrófago
CD: grupo de diferenciação (<i>cluster differentiation</i>)	NF- κ B: fator nuclear- κ B
cDC: DC “clássica”	NO: óxido nítrico
CREB: proteína ligante ao elemento de resposta ao cAMP	PAMP: padrão molecular associado a patógeno
CpG DNA: oligodeoxinucleotídeo CpG	PBS: tampão fosfato salino
DC: célula dendrítica	PI3K: fosfoinosítideo-3-cinase
d.p.i.: dias pós-infecção	PMN: polimorfonuclear
IFN: interferon	PRR: receptor de reconhecimento de padrão molecular
Ig: imunoglobulina	RPMI: meio “ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ”
I κ B: κ B inibitório	SFB: soro fetal bovino
IKK: cinase do I κ B	TAK-1: cinase-1 ativada por TGF- β
IL: interleucina	<i>T. cruzi</i> : <i>Trypanosoma cruzi</i>
IRAK: cinase associada ao receptor de IL-1	TCD8 ⁺ : linfócito T citotóxico CD8 positivo
IRF: fator regulatório de interferon (IFN)	Th: linfócito T auxiliador (<i>T helper</i>)
Ly6C: glicoproteína linfocítica relacionada ao antígeno 6C	TIR: domínio do receptor Toll/Interleucina-1
MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno	TLR: receptor semelhante a toll
Mal/TIRAP: adaptador semelhante a MyD88	TNF- α : fator de necrose tumoral- α
MHCII: complexo principal de histocompatibilidade II	TRAF: fator associado ao receptor de TNF (TNFR)
Mo: monócito	TRIF: adaptador contendo domínio TIR indutor de IFN- β
Mo-DC: DC derivada de monócito	
Mo-M ϕ : M ϕ derivado de monócito	

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
SUMÁRIO	X
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>INFECÇÃO POR <u>TRYPANOSOMA CRUZI</u> E A DOENÇA DE CHAGAS</i>	1
1.2 <i>SISTEMA IMUNE E PERFIS DE RESPOSTAS CITOCINÊMICAS</i>	4
1.3 <i>CÉLULAS DO EIXO FAGOCÍTICO MONONUCLEAR</i>	7
1.4 <i>RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES (PRRS)</i>	12
1.4.1 <i>RECEPTORES NLRS, RLRs, ALRS, CLRS, CGAS E STING</i>	13
1.4.2 <i>RECEPTORES SEMELHANTES A TOLL (TLRS)</i>	13
1.4.2.1 <i>SINALIZAÇÕES DESENCADEADAS POR TLRS</i>	14
1.4.2.1.1 <i>SINALIZAÇÃO DEPENDENTE DE MYD88</i>	17
1.4.2.1.2 <i>SINALIZAÇÃO DEPENDENTE DE TRIF</i>	18
1.4.2.1.3 <i>SINALIZAÇÃO POR MAP CINASES (MAPKS)</i>	19
1.4.2.1.4 <i>SINALIZAÇÃO POR PI3KS</i>	20
1.4.2.2 <i>REDE TRANSCRICIONAL GATILHADA POR TLRS</i>	23
1.4.2.3 <i>REGULAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE TLRS</i>	29
1.4.2.4 <i>TLRS COMO ELICITADORES DA RESPOSTA IMUNE</i>	33
1.4.2.4.1 <i>FUNÇÃO IMUNOESTIMULADORA DO TLR9</i>	34
1.4.2.4.2 <i>FUNÇÃO IMUNOMODULADORA DE TLR2</i>	35
1.4.2.5 <i>INTERAÇÕES ENTRE SINAIS GATILHADOS POR TLRS</i>	36
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS	41
3.1 <i>OBJETIVO GERAL</i>	41
3.2 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 <i>ÉTICA EM ESTUDOS COM ANIMAIS</i>	42
4.2 <i>CAMUNDONGOS E CUIDADOS ESSENCIAIS</i>	42
4.3 <i>INFECÇÃO EXPERIMENTAL E CÁLCULO DA PARASITEMIA</i>	43
4.4 <i>COLETA DE SANGUE E EUTANÁSIA</i>	44
4.5 <i>OBTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DE ESPLÊNOCITOS</i>	44

4.6	<i>FENOTIPAGEM DE ESPLÊNOCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO</i>	44
4.7	<i>ANÁLISES DA EXPRESSÃO DE TLR2 E MARCADORES DE SUPERFÍCIE</i>	45
4.8	<i>ANÁLISES DA EXPRESSÃO DE TLR9 E PRODUÇÃO DE CITOCINAS</i>	45
4.9	<i>PARÂMETROS AVALIADOS EM CITOMETRIA DE FLUXO</i>	46
4.10	<i>PRODUÇÃO DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO (NO)</i>	47
4.11	<i>TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE MACRÓFAGOS</i>	47
4.12	<i>REAGENTES</i>	47
4.13	<i>ANÁLISES ESTATÍSTICAS</i>	48
5.	RESULTADOS	49
5.1	<i>TLRS E ADAPTADORES INFLUENCIAM A INFECÇÃO POR <u>T. CRUZI</u></i>	49
5.2	<i>A COOPERAÇÃO ENTRE TLRS DIRECIONA A RESPOSTA INFLAMATÓRIA</i>	51
5.2.1	<i>A DEPLEÇÃO DE TLRS DESREGULA O PERFIL PRÓ-INFLAMATÓRIO</i>	51
5.2.2	<i>A INFECÇÃO PROMOVE PRIMING PRÓ-INFLAMATÓRIO</i>	53
5.2.3	<i>O EIXO SINALIZATÓRIO TLR2: MAL/TIRAP REGULA A INFLAMAÇÃO</i>	55
5.3	<i>ESPLÊNOCITOS QUE EXPRESSAM TLRS</i>	57
5.3.1	<i>FENOTIPAGEM DE FAGÓCITOS MONONUCLEARES ESPLÊNICOS</i>	57
5.3.2	<i>EXPRESSÃO DE TLRS EM FAGÓCITOS MONONUCLEARES</i>	59
5.4	<i>TLRS CONTROLAM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE ESPLÊNOCITOS</i>	61
5.4.1	<i>IMUNOPREDILEÇÃO DE MACRÓFAGOS E DCS POR TLRS</i>	61
5.4.2	<i>RESPONSIVIDADE DE ESPLÊNOCITOS A AGONISTAS DE TLRS</i>	63
5.4.3	<i>PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR MONÓCITOS LY6C^{HI/LO}TLR2^{HI}</i>	66
5.4.3.1	<i>RESPOSTA DE MONÓCITOS AO AGONISTA DE TLR2</i>	66
5.4.3.2	<i>RESPOSTA DE MONÓCITOS AO AGONISTA DE TLR9</i>	66
5.5	<i>MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE MONÓCITOS</i>	70
5.5.1	<i>A INFECÇÃO ALTERA A POPULAÇÃO MONOCÍTICA NO BAÇO</i>	70
5.5.2	<i>A POPULAÇÃO DE MONÓCITOS NO BAÇO É MODULADA POR TLRS</i>	73
5.5.3	<i>FATORES QUE AFETAM OS MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS</i>	75
5.5.3.1	<i>DEPLEÇÃO DE TLRS E OS MO-TLR2^{HI}</i>	75
5.5.3.2	<i>MICROAMBIENTE INFLAMATÓRIO E OS MO-TLR2^{HI}</i>	76
5.5.4	<i>AGONISTAS DE TLR MODULAM EXPRESSÃO DE TLR2 EM MONÓCITOS</i>	79
5.5.5	<i>MAL/TIRAP E A SINALIZAÇÃO GATILHADA POR TLRS EM MONÓCITOS</i>	83
6.	DISCUSSÃO	86
6.1	<i>IMUNIDADE INATA NA INFECÇÃO POR <u>T. CRUZI</u></i>	86
6.1.1	<i>O EFEITO COOPERATIVO ENTRE TLRS E A INFLAMAÇÃO</i>	86
6.1.2	<i>POTENCIAL PRÓ-INFLAMATÓRIO DE TLR2 E TLR9</i>	87
6.1.3	<i>POTENCIAL IMUNOMODULADOR DE TLR2</i>	88

6.2	<i>MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO POR T. CRUZI</i>	91
6.2.1	<i>A INFECÇÃO REMODELA A CELULARIDADE DO BAÇO</i>	91
6.2.2	<i>MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES</i>	94
6.2.3	<i>UTILIZAÇÃO DE SINALIZAÇÕES DIFERENCIAIS</i>	95
7.	CONCLUSÃO	100
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS	103
9.	BIBLIOGRAFIA	104
10.	ANEXOS	125
10.1.	<i>ARTIGOS PUBLICADOS</i>	125
10.1.1.	<i>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2016</i>	125
10.1.2.	<i>MBIO, 2015</i>	125
10.1.3.	<i>PLOS ONE, 2013</i>	125
10.1.4.	<i>PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES, 2012</i>	125
10.2	<i>DIVULGAÇÃO NA GLOBAL MEDICAL DISCOVERY</i>	125
10.3	<i>DIVULGAÇÃO NA WORLD BIOMEDICAL FRONTIERS</i>	126
11.	FIGURA SUPLEMENTAR	127

RESUMO

GRAVINA, Humberto Doriguêto, D.Sc., Universidade Federal de Minas Gerais, fevereiro de 2015. **Utilização diferencial dos TLR2 e TLR9 pelas células do eixo fagocítico mononuclear durante a infecção aguda por *T. cruzi*.** Orientadora: Dra Catherine Ropert. Co-Orientador: Dr Alfredo Miranda Goes.

Este trabalho destaca o uso diferencial de TLRs por células da imunidade inata durante a organização da resposta contra o *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Para tal, utilizamos a citometria de fluxo como ferramenta para prospecção e imunofenotipagem de células responsivas a TLRs. Avaliamos também, a produção de citocinas inflamatórias em resposta a agonistas de TLR2 e TLR9 (Pam3Cys e CpG DNA, respectivamente), individualmente ou em combinação. Primeiramente, evidenciamos o envolvimento do TLR9 no estabelecimento de um perfil pró-inflamatório com citocinas típicas Th1, o qual foi associado à atividade de células dendríticas clássicas (cDCs). Em contraste, o TLR2 foi associado à indução de um perfil modulado de citocinas pró e anti-inflamatórias, principalmente relacionado à atividade de monócitos (Mo_s) e macrófagos clássicos (cMφs). Neste contexto, identificamos populações esplênicas de cDCs-MHCII^{hi}CD11c^{hi}, cMφs-F4/80^{hi}CD11b^{lo} e dois tipos de Mo_s-F4/80^{lo}CD11b^{hi}MHCII^{lo}CD11c⁺Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi}. cDCs e cMφs foram naturalmente encontrados no baço de animais sadios e sintetizaram durante a infecção: IL-12 de forma TLR9 dependente e TNF-α de forma TLR2 dependente, respectivamente. Independentemente do agonista, os monócitos se mostraram importantes fontes de citocinas pró e anti-inflamatórias durante a infecção. os Mo-Ly6C^{hi} clássicos produziram citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e TNF-α), enquanto os Mo-Ly6C^{lo} não-clássicos sintetizaram IL-10 e TNF-α. Acreditamos que o recrutamento da molécula adaptadora MyD88 seja o passo fundamental no papel pró-inflamatório de TLRs, enquanto que a função modulatória do TLR2 seja decorrente da ativação diferencial de vias controladas por Mal/TIRAP. Em suma, a cooperação entre receptores se mostrou fundamental na elicitação da resposta ao *T. cruzi*, interferindo em diferentes interações celulares, ao modular: a celularidade dos órgãos linfoides, a expressão de receptores, a utilização de vias de sinalização e, conseqüentemente, os perfis citocinêmicos.

ABSTRACT

GRAVINA, Humberto Doriguêto, D.Sc., Universidade Federal de Minas Gerais, February 2015. **Differential utilization of TLR2 and TLR9 by phagocytic mononuclear axis cells during *T. cruzi* infection.** Adviser: Dra Catherine Ropert. Co-adviser: Dr Alfredo Miranda Goes.

This work highlights the differential use of TLRs by innate immune cells as a central mechanism in the organization of the response against the *T. cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. To this, we had used flow cytometry as a prospecting tool to identify TLR-responsible cells. Also, we had evaluated the inflammatory cytokine synthesis in response to a unique or combined stimulation by TLR2 and TLR9 agonists (Pam3Cys and CpG DNA, respectively). At first, we noted the involvement of TLR9 in the establishment of a proinflammatory cytokine profile, typical Th1, which was associated with classical dendritic cell (cDC) activity. Then, TLR2 was correlated with a modulated pro- and anti-inflammatory cytokine profile promoted basically by monocytes (Mo) and classical macrophages (M ϕ). In this regard, we identified splenic cDC-MHCII^{hi}CD11c^{hi}, cM ϕ -F4/80^{hi}CD11b^{lo}, and two types of Mo-F4/80^{lo}CD11b^{hi}MHCII^{lo}CD11c⁺Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi}. cDCs and M ϕ s were naturally found in the spleen of healthy animals and they synthesized during the infection: IL-12 after TLR9-triggering and TNF- α in a TLR2 dependent way, respectively. Independently on the agonist in medium, the monocyte sets had been shown as sources of pro- and anti-inflammatory cytokines. Mo-Ly6C^{hi} produced proinflammatory cytokines (IL-12 and TNF- α) while Mo-Ly6C^{lo} synthesized IL-10 and TNF- α . We believe that the adaptor molecule MyD88 recruitment is the fundamental step on the proinflammatory role of TLRs while the TLR2 modulatory function is due to the activation of a signaling pathway regulated by Mal/TIRAP. In summary, the cooperation between TLRs was essential to control the *T. cruzi* replication and involves distinct types of cellular interactions, by modulating: the cellularity of lymphoid organs, receptor expression, use of signaling pathways, and cytokinetic profiles.

1. INTRODUÇÃO

1.1 INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* E A DOENÇA DE CHAGAS

Estima-se que o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), agente etiológico da “doença de Chagas”, infecte cerca de 7-8 milhões de pessoas, principalmente em quase todos os países da América do Sul e Central (OMS). Este protozoário de flagelo único, pertencente à família Trypanosomatidae da ordem Kinetoplastidae, é caracterizado por possuir um cinetoplasto (organela que contém DNA, localizada no interior de uma longa mitocôndria). Sua transmissão ocorre em transfusões de sangue, transplantes de órgãos, gestação, ingestão de alimentos contaminados e por via vetorial. Nesta última, o *T. cruzi* é transmitido a mais de 100 espécies de mamíferos durante o repasto sanguíneo do triatomíneo fêmea, conhecido popularmente como barbeiro. Em humanos, esta via corresponde a cerca de 80% dos casos de infecções. Os principais vetores que transmitem o protozoário ao homem pertencem aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, da subfamília Triatominae, família Reduviidae e ordem Hemiptera. No Brasil, a principal espécie relatada à transmissão do *T. cruzi* é o *Triatoma infestans* (Rassi et al., 2010; Brener, 1973). Enquanto se alimentam, os insetos eliminam fezes contaminadas com formas parasitárias tripomastigotas metacíclicas flageladas. Em resposta a uma irritação local, o próprio hospedeiro vertebrado carrega os parasitas das fezes do vetor a uma região lesionada da pele, sendo que a ferida deixada pelo barbeiro durante sua alimentação é o principal acesso à corrente sanguínea. Assim que invade o hospedeiro, o parasita infecta diversos tipos celulares, principalmente macrófagos, células epiteliais, fibras musculares e neurônios. No citoplasma destas células, ele ganha forma amastigota de pouca motilidade, a qual é capaz de proliferar por divisão binária e diferenciar-se novamente em formas tripomastigotas. Por sua vez, os tripomastigotas rompem a membrana celular e são capazes de infectar outras células ou podem ser ingeridos por novos insetos, fechando o ciclo infeccioso no hospedeiro vertebrado (Pinto et al., 1999; de Souza et al., 2010; Brener, 1973).

A “doença de Chagas” ou tripanossomíase americana possui três fases distintas: aguda, indeterminada e crônica. A fase aguda é de curta duração, podendo se estender de uma semana a um mês após a infecção, e na maioria das vezes é assintomática (Rassi et al., 2010). Em alguns casos, há sintomas associados à parasitemia e ao parasitismo tecidual. A parasitemia elevada deflagra a ativação do sistema imune inato causando febre, dores, inchaço no local da picada (conhecido como chagoma) e de gânglios, além de promover uma expansão policlonal de linfócitos T e B

(Rassi et al., 2010; Sardinha et al., 2006). Por sua vez, o parasitismo desencadeia alterações morfológicas principalmente em órgãos constituídos por tecidos nervosos e musculares (lisos e estriados), o que resulta em hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e, às vezes, meningoencefalite, miocardite e disfunções renais (de Meis et al., 2009; Lemos et al., 2013). Logo após a fase aguda, inicia-se a etapa intermediária da infecção, a qual é caracterizada por níveis ínfimos de parasitemia que podem durar décadas. Esta condição crônica assintomática é considerada uma evasão imunológica. Neste ponto, a baixa parasitemia não elicit o sistema imune de forma robusta, mas desencadeia a produção basal e modulada de citocinas pró e anti-inflamatórias, além de promover uma resposta adaptativa moderada (Rassi et al., 2010; Aoki et al., 2012; Gazzinelli and Denkers, 2006). Os parasitas são encontrados principalmente no interior dos neurônios e de fibras musculares lisas, esqueléticas e cardíacas (cardiomiócitos) do hospedeiro, propagando e perpetuando a infecção. A replicação do parasita desencadeia um aumento progressivo no tamanho dos órgãos constituídos pelos tecidos infectados, o que promove poucos sinais e agrava continuamente a doença em cerca de 20-30% dos casos (Coura and Borges-Pereira, 2010; Rassi et al., 2010). A fase crônica se desenvolve com a elevação dos picos de parasitemia e parasitismo, desencadeando uma nova ativação robusta do sistema imune. Os órgãos infectados comprometem-se com patologias associadas, como: cardiomegalia, miocardite, arritmias, falha congestiva do coração, infiltrado linfocítico, degeneração neuronal, denervação, megacólon e megaesôfago. Algumas complicações podem surgir no hospedeiro debilitado, incapacitando-o ou levando à morte (Coura and Borges-Pereira, 2010).

A “doença de Chagas” evolui em um processo infeccioso inflamatório crônico, variável de acordo com a infectividade e virulência da cepa (Aoki et al., 2012; Talvani et al., 2000; Michailowsky et al., 1998; Alvares et al., 2014), como ocorre em diversas infecções parasitárias (Gazzinelli and Denkers, 2006). Diversas cepas do *T. cruzi* foram isoladas e classificadas segundo a morfologia, infectividade, virulência e patogenicidade (de Souza, 1999; de Freitas et al., 2006; Zingales et al., 2009). Em modelos de infecções com as cepas Y, Tulahuen ou colombiana, níveis variáveis de citocinemia controlam a replicação parasitária, os quais são caracterizados por uma produção inicial de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 (Ex: IL-12, IFN- γ e TNF- α). Subsequentemente, há uma liberação de citocinas anti-inflamatórias (Ex: IL-10) como mecanismo de controle da resposta imune (Abrahamsohn and Coffman, 1996; Cardillo et al., 1996; Aliberti et al., 1996; Teixeira et al., 2002). O balanço da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias durante a infecção é desencadeado pelo sistema imune

inato, refletindo um perfil equilibrado entre respostas Th1/Th2, o que é fundamental para o desenvolvimento da imunidade adaptativa a posteriori. Camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* possuem um perfil de resposta aguda com uma intensa e balanceada citocinemia (Abrahamsohn and Coffman, 1996; Aliberti et al., 1996; Cardillo et al., 1996), enquanto que a cepa Colombiana, considerada altamente miotrófica cardíaca e pouco replicativa, escapa facilmente do reconhecimento pelo sistema imune, permitindo-lhe estabelecer uma fase crônica tissular da doença e afetar a contratilidade das fibras musculares cardíacas (Roman-Campos et al., 2009). Em nosso trabalho, avaliamos a infecção aguda de camundongos pela cepa Y, pois esta possui um padrão de citocinemia bem caracterizado, representando um excelente modelo para o estudo da modulação da inflamação.

O controle da replicação parasitária, principalmente nos primeiros estágios da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* é realizado por diversas células da imunidade inata, em especial as fagocíticas (Sardinha et al., 2006). Estas células expressam diversas proteínas de reconhecimento que interagem com moléculas sintetizadas pelo parasita (de Souza et al., 2010). Na fase crônica, o sistema imune adaptativo auxilia na destruição dos parasitas no fígado por mecanismos que envolvem a fagocitose mediada pelas imunoglobulinas IgGs e ação de citocinas pró-inflamatórias, principalmente o IFN- γ produzido por linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ (Sardinha et al., 2010).

1.2 SISTEMA IMUNE E PERFIS DE RESPOSTAS CITOCINÊMICAS

O sistema imune de mamíferos é dividido em duas partes complementares: inato e adaptativo. A imunidade inata atua pelo amplo reconhecimento de microorganismos e é composta: pelas células do sistema fagocítico mononuclear (Mo_s, Mφs e DCs), granulócitos (eosinófilos, basófilos e neutrófilos polimorfonucleares), mastócitos, NKs, linfócitos B1 e Tγδ (TCRγδ); pelos receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs); e por fatores solúveis (citocinas, proteínas do complemento e imunoglobulinas, principalmente IgM (Mori et al., 2013; Crozat et al., 2009)). Por outro lado, a imunidade adaptativa é promovida por um conjunto de células clonais capazes de reconhecer antígenos, seletivamente, e produzir metabólitos ativos e anticorpos com alta especificidade (principalmente IgG), gerando memória imunológica protetora. Dentre as células da imunidade adaptativa estão os linfócitos B2 e Tαβ (TCRαβ – TCD4⁺ e TCD8⁺) (Mori et al., 2013). Por ser extremamente “plástica”, a interface entre imunidades inata e adaptativa ainda é foco de estudos e controvérsias.

A geração do repertório de células linfoides (B, T e NK) e mieloides (células fagocíticas mononucleares, granulócitos, mastócitos, eritrócitos e outros elementos figurados) que promovem a imunidade nos diferentes órgãos dos mamíferos é feita em um processo progressivo de derivação celular denominado hematopoiese, no qual células precursoras pluripotentes diferenciam-se em determinados tipos celulares (Granick et al., 2012; Rose et al., 2012). A manutenção da celularidade ocorre nos órgãos linfoides primários, como a medula óssea e timo, onde células jovens proliferativas reorganizam continuamente a natureza de sua expressão proteica e metabólica, assumindo certo grau de maturação e adquirindo potencial migratório (Granick et al., 2012). Diversos estímulos solúveis delineiam o desenvolvimento em linhagens celulares específicas, dentre eles: os componentes do próprio sistema imune (citocinas pró e anti-inflamatórias, proteínas do complemento, anticorpos,...) e as moléculas estranhas ao organismo (antígenos, agonistas de PRRs,...) (Baldrige et al., 2010, 2011; MacNamara et al., 2011).

Em condições normais de saúde, o sistema imune encontra-se em um estado de equilíbrio dinâmico (*steady-state* – estado estacionário ou homeostasia). Os estímulos neste estado, incluindo os níveis basais de citocinas, permitem a diferenciação de células tolerantes a antígenos próprios, que preservam potencial imunogênico. Ou seja, as células hematopoiéticas se tornam aptas a reconhecer uma eventual exposição a agonistas de PRRs, garantindo-lhes a função de sensores de infecções (Granick et al.,

2012). A quebra do “estágio de latência” da homeostasia é gatilhada por sinais endógenos e exógenos, disponibilizados em condições inflamatórias (infecções e inflamações estéreis), o que potencializa uma intensa liberação de citocinas. Conseqüentemente, ocorre proliferação e ativação de células efetoras, desencadeando uma alta taxa de morte celular por apoptose (Baldrige et al., 2010, 2011; Joffre et al., 2009; Maneu et al., 2014; Megías et al., 2013).

Os agonistas de TLRs (*toll like receptors*) são exemplos de moduladores que quebram a latência e promovem o desenvolvimento e migração de células hematopoiéticas, a fim de eliminar o agente que iniciou a resposta (Yáñez et al., 2013a). Um processo que envolve diversas cinases e moléculas adaptadoras, como o MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) (Yáñez et al., 2009). De acordo com o TLR envolvido e perfil citocinêmico do meio, diferentes células podem ser ativadas, inclusive linhagens especializadas contra o agente invasor, como as células apresentadoras de antígenos (APCs) do eixo fagocítico mononuclear.

As APCs, principalmente DCs, atuam conforme reconhecem micro-organismos invasores pelo uso de PRRs e desencadeiam uma resposta inflamatória. Por isto as DCs são consideradas as principais regentes da imunidade durante o processo inflamatório, determinando inclusive os limites entre tolerância e imunogenicidade (Joffre et al., 2009; Hou et al., 2008). Além disto, diferentes padrões sistêmicos de respostas adaptativas podem ser desencadeados conforme os linfócitos T helper (Th) CD4⁺ se desenvolvem (Tabela I). Estes linfócitos, inicialmente Th0 (em homeostasia), adotam um dos perfis Th1, Th2, Th3, Th17 ou Treg (Mori et al., 2013) segundo a orientação diferencial promovida pelas APCs.

Em suma, a imunidade em homeostasia se caracteriza pelo estado de regulação mútua entre níveis basais de citocinas consideradas pró e anti-inflamatórias (entre elas: IFN- γ , IL-12, TNF- α / IL-10 e TGF- β , respectivamente). Em condições inflamatórias, o aumento da síntese de citocinas também deve ser balanceado para que haja uma ativação do sistema imune de forma protetora e não exacerbada (Croizat et al., 2009). Este equilíbrio pró e anti-inflamatório (IL-12/IL-10) se relaciona intimamente com a razão Th1/Th2 e é determinante para as interações entre as células dos sistemas imunes inato e adaptativo, como ocorre durante a infecção pelo *T. cruzi* (Aoki et al., 2012; Tarleton, 1991, 2007).

TABELA I: Perfis de respostas inflamatórias (Th) em camundongos.

Perfil Th	Citocinas indutoras	Citocinas produzidas	Fator de transcrição	Induz	Inibe	Efeito biológico
Th0	IL-2	IL-2	ERK1/2 STAT5 Myc			-“Naive” -Proliferação -Ativa PI3K/AKT/mTOR
Th1	IL-12 IFN- γ	IFN- γ IL-2 TNF- α IL-10	T-bet STAT-1 STAT-4	IgG2a IgG3	IgG1 IgG2b IgA IgE	-Imunidade mediada por células; -Inflamação; -Autoimunidade.
Th2	IL-4 IL-2	IL-4 IL-5 IL-6 IL-10 IL-13	Gata-3 STAT-6	IgG1 IgE IgG4*	IgG2a IgG2b IgG3 IgA	-Imunidade mediada por anticorpos; -Asma e alergia; -Evita inflamação excessiva.
Th3	TGF- β IL-4 IL-10	TGF- β IL-10	Foxp3	IgA		-Imunidade de mucosas; -Responde a antígeno não próprio e não patogênico.
Th17	TGF- β IL-6 IL-23	IL-17 IL-21 IL-22	ROR $\gamma\delta$			-Contra bactérias e fungos; -Autoimunidade.
Treg	TGF- β IL-2 IL-12	TGF- β IL-35 IL-10	Foxp3	IgA IgG2b	IgG3	-Tolerância imunológica; -Homeostase; -Regulação da resposta imune.

*em humanos

1.3 CÉLULAS DO EIXO FAGOCÍTICO MONONUCLEAR

Nos últimos anos, inúmeros estudos têm se voltado ao entendimento da origem e função das células do sistema fagocítico mononuclear, eixo de formação de Mo_s , $M\phi_s$ e DCs, as quais possuem características mieloides (capazes de realizar fagocitose, produção de citocinas e apresentação de antígenos) (van Furth and Cohn, 1968; Auffray et al., 2009; Hettinger et al., 2013). Este conjunto de células compõe a base da imunidade inata utilizando uma série de sensores que ativam vias de sinalização e mecanismos especializados de defesa do hospedeiro, culminando na produção de metabólitos com atividades antimicrobianas e orquestragem da resposta imune adaptativa. Em mamíferos adultos, a diferenciação destas células se dá principalmente na medula óssea em resposta a mediadores solúveis da imunidade, incluindo citocinas e fatores de crescimento (Mori et al., 2013). Quando atingem um certo grau de diferenciação, as células infiltram na corrente sanguínea e são recrutadas em órgãos linfoides secundários, como baço e linfonodos, onde sofrem maturação e ativação em resposta aos estímulos do meio aos quais estão expostas (Zhang et al., 2004). Devido à origem comum, as diferentes células deste sistema possuem características fenotípicas e funcionais semelhantes e juntas atuam na homeostasia, promoção e regulação de várias condições patológicas, inclusive infecções parasitárias (Sheel and Engwerda, 2012).

A fenotipagem celular dentro do eixo fagocítico mononuclear é complexa devido à plasticidade de conversão de células precursoras em uma gama de derivadas. Por outro lado, as proteínas em suas membranas plasmáticas variam essencialmente em níveis de expressão durante o processo de diferenciação celular, permitindo correlacionar por citometria de fluxo o estágio de maturação com funções típicas de cada célula. A utilização de uma combinação de diferentes proteínas como marcadores de superfície (Tabela II) permite-nos distinguir cada tipo celular, principalmente em análises de suspensões celulares heterogêneas, como é o caso dos esplenócitos (Rose et al., 2012; Tan and O'Neill, 2007). As integrinas CD11b, CD11c, MHCII, F4/80 e Ly6C (Gr-1), por exemplo, são comumente utilizadas em estudos do sistema fagocítico mononuclear de camundongos (Rose et al., 2012). O CD11b/CD18 é um heterodímero amplamente expresso em monócitos, macrófagos, granulócitos, NKs, linfócitos T ativado e B-1, enquanto que o CD11c/CD18 é expresso em DCs, NKs e linfócitos T ativado. Ambas as proteínas de superfície se ligam a CD54 (ICAM-1), iC3b e fibrinogênio (Fagerholm et al., 2013; Immig et al., 2014). Por sua vez, o MHCII expresso em DCs, monócitos, macrófagos e células B é essencial à função

apresentadora de antígenos a linfócitos TCD4⁺ (Holling et al., 2004). O F4/80 expresso principalmente por macrófagos maduros é essencial as suas funções, porém, ele também pode ser encontrado em monócitos e algumas DCs (Lin et al., 2005). O Ly6C, uma glicoproteína regulada por IFN- γ , é expresso em monócitos, macrófagos, neutrófilos, células T e NKs e pode atuar no desenvolvimento e na maturação de linfócitos (Peng et al., 2009). Na prática, os principais marcadores utilizados para identificação de DCs maduras são o CD11c e o MHCII, para os monócitos são utilizados o Ly6C e o CD11b e para os macrófagos, F4/80 e CD11b (Rose et al., 2012). Em geral, o CD11c é considerado um ótimo marcador para identificação de DCs, porém, somente em associação a outros marcadores, pois outras células também o expressam. Por outro lado, DCs também podem expressar CD11b, mas em níveis inferiores aos encontrados nos monócitos (Rose et al., 2012). Portanto, ao comparar níveis de expressão de diferentes marcadores pode-se identificar e caracterizar cada célula. Entretanto, deve-se tomar cuidado com a variação temporária da expressão dos marcadores, as quais podem ser alteradas no processo de ativação celular por mecanismos regulatórios sem que haja uma real diferenciação celular, seja por degradação ou por *turnover* de vesículas.

Conforme apresentado na Figura 1, a célula tronco hematopoiética (HSC) dá origem à primeira célula precursora comprometida exclusivamente com o eixo fagocítico mononuclear, a célula progenitora de monócitos/macrófagos e DCs (MDP). A MDP é encontrada somente na medula óssea e possui o potencial de se diferenciar em uma célula progenitora de DCs (CDP) (Onai et al., 2007, 2013; Naik et al., 2007; Liu et al., 2009; Naik et al., 2006) ou em uma célula progenitora de monócitos/macrófagos (cMoP) (Hettinger et al., 2013). A célula proliferativa CDP é encontrada exclusivamente na medula óssea e é capaz de dar origem a uma gama de DCs ao diferenciar-se na DC plasmocitóide (pDC) ou na pré-cDC. Ambas encontradas na medula óssea, sangue e baço. A pré-cDC gera cDCs, que são classificadas quanto à expressão de CD8 α ou de CD4 α (CD8 α ⁺; CD4 α ⁺; CD8 α ⁻CD4 α ⁻) (Onai et al., 2013; Naik et al., 2007; Liu et al., 2009; Shortman and Heath, 2010; Naik et al., 2006). Paralelamente, a célula proliferativa cMoP, inicialmente identificada na medula óssea, mas também encontrada no baço, tem a capacidade de diferenciação em dois tipos de monócitos, o clássico Ly6C^{high} e o não-clássico Ly6C^{low}. Estes podem se diferenciar em monócitos inflamatórios, macrófagos (Mo-M ϕ) ou em DCs (Mo-DCs) (Richards et al., 2013). Assim como para os monócitos, os macrófagos murinos também são divididos em duas populações típicas com base na expressão de Ly6C: Mo-M ϕ Ly6C^{high} clássico e Mo-M ϕ Ly6C^{low} não-clássico, ambos expressando a glicoproteína F4/80 em alta

concentração, mas CD11b em baixa expressão. Acredita-se que a maior parte dos macrófagos de camundongos é originada a partir dos monócitos. Entretanto, progenitores embrionários do saco vitalíneo e do fígado fetal também são capazes de gerar macrófagos (YS-M ϕ) com capacidade autoproliferativa em linhagem independente de monócitos (Hettinger et al., 2013). Além disto, diversos estudos *in vitro* deixaram claro que os monócitos também podem se diferenciar em DCs, porém a demonstração *in vivo* é um pouco mais complexa, pois existe uma heterogeneidade na composição dos monócitos e de acordo com tempo de desenvolvimento celular e o microambiente em que as células são estimuladas, diferentes tipos de monócitos ativados ou uma gama de DCs podem surgir (Drutman et al., 2012; Laborde et al., 2007). Foi demonstrado que ambos os tipos de monócitos possuem capacidade de diferenciação em DCs inflamatórias e regulatórias, dentre elas, as Tip-DCs (derivada de Mo-Ly6C^{hi}) e as MSCDs (derivada de Mo-Ly6C^{lo}). Geralmente, tem sido demonstrado que os monócitos Ly6C^{hi} são capazes de diferenciar em monócitos inflamatórios, Tip-DCs (Mo-DCs inflamatórias) e M ϕ s clássicos do tipo M1 (residentes ou inflamatórios). Por sua vez, os monócitos Ly6C^{lo} se diferenciam em Mo-DCs tolerogênicas e em M ϕ s não-clássicos do tipo M2 (Schmid et al., 2012; Domínguez and Ardavín, 2010; Auffray et al., 2009; Ueno et al., 2007). Dentre as Mo-DCs estão as DC-SIGN⁺, CX3CR1⁺Ip e as Tip-DCs (Richards et al., 2013). Fato importante, os monócitos e suas células filhas, principalmente as Tip-DCs, são excelentes fontes de iNOS e TNF- α , fatores essenciais na eliminação de micro-organismos invasores (Schmid et al., 2012; Lima et al., 1997).

As células derivadas de monócitos têm origem em órgãos linfoides primários, secundários ou sofrem diferenciação *in vitro*. Por isto, diversos estudos divergem quanto à classificação de monócitos inflamatórios, Mo-DCs e Mo-M ϕ , uma vez que o padrão de marcação destas células por citometria de fluxo varia de acordo com o local de obtenção das mesmas (Swirski et al., 2009; Rose et al., 2012). Entretanto, Mo_s, M ϕ s e DCs podem ser distinguidos basicamente pela expressão diferencial de F4/80, CD11b, CD11c e MHCII (Swirski et al., 2009; Rose et al., 2012). Além disto, fatores inflamatórios produzidos após contato com um antígeno induzem alteração de expressão de inúmeras moléculas na superfície das células, indicando ativação. Portanto, é fundamental considerar o “tempo” pós-estimulação para verificar a real diferenciação ou maturação celular (Drutman et al., 2012; Laborde et al., 2007).

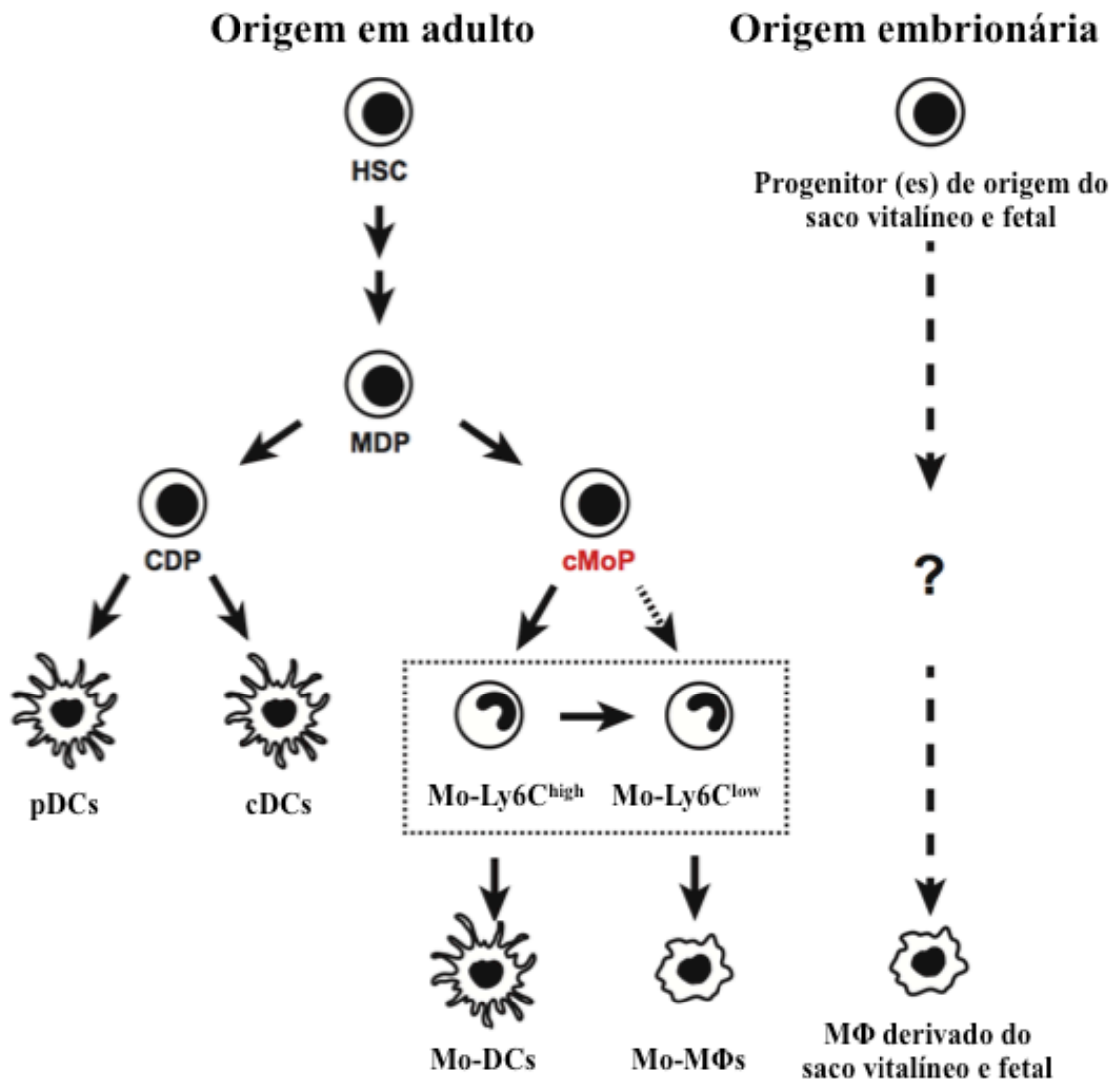


FIGURA 1 – Modelo de diferenciação de DCs, monócitos e macrófagos murinos.

Na medula óssea, a célula tronco hematopoiética (HSC) dá origem à progenitora de DCs e monócitos/macrófagos (MDP), que por sua vez gera a progenitora comum de DCs (CDP) ou a progenitora comum de monócitos (cMoP). A CDP gera a DC plasmocitóide (pDC) e as DCs clássicas (cDCs). A cMoP tem o potencial de produzir os dois tipos de monócitos (Ly6C^{low} e Ly6C^{high}). Monócito Ly6C^{high} pode converter em monócito Ly6C^{low}, a conversão contrária ainda é questionada. Ambos os monócitos originam macrófagos derivados de monócitos (Mo-MΦ) ou DCs derivadas de monócitos (Mo-DC). Entretanto, progenitores do saco vitalino e do fígado fetal geram macrófagos que são mantidos independentemente de monócitos, em homeostasia. As setas pontilhadas mostram vias de diferenciação que precisam ser melhor esclarecidas [adaptado de (Hettinger et al., 2013)].

TABELA II: Assinatura molecular para imunofenotipagem celular.

População	Assinatura molecular
HSC (LSK)	*Lin (CD3 CD19 NK1.1 Ly6G) ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺ CD117 ⁺ CD115 ⁻ Ly6A/E ⁺
MDP	*Lin ⁻ CD117 ⁺ CD115 ⁺ CD135 ⁺ Ly6C ⁻ CD11b ⁻ **c-Kit ^{hi} CD135 ⁺ CD11b ⁻ MHCII ⁻ CD11c ⁻ /CX3CR1 ⁺ CXCR1 ⁺
cMoP	*Lin ⁻ CD117 ⁺ CD115 ⁺ CD135 ⁻ Ly6C ⁺ CD11b ⁻ MHCII ⁻ CD11c ⁻
CDP	*Lin ⁻ CD117 ⁺ CD115 ⁺ CD135 ⁺ Ly6C ⁻ CD11b ⁻ **c-Kit ^{lo} MHCII ⁻ CD11c ⁻ CX3CR1 ⁺
pré-cDC	**CD115 ^{-/lo} Ly6C ⁻ CD11b ⁺ MHCII ^{hi} CD11c ^{hi} CD43 ⁻
pMo	*Lin ⁻ CD117 ⁻ CD115 ⁺ CD135 ⁻ Ly6C ⁺ CD11b ⁻
Mo Ly6C ^{hi}	*Lin ⁻ CD117 ⁻ CD115 ⁺ CD135 ⁻ Ly6C ^{hi} CD11b ⁺ CD43 ⁻ **F4/80 ^{lo} MHCII ^{lo} CD11c ⁻
Mo Ly6C ^{lo}	*Lin ⁻ CD117 ⁻ CD115 ⁺ Ly6C ^{lo} CD11b ⁺ CD135 ⁻ CD43 ⁺ **F4/80 ^{lo} MHCII ^{lo} CD11c ^{lo}
Mo-Mφ (Fígado/Baço)	*Lin ⁻ F4/80 ^{lo} CD11b ^{hi}
Mφ (Fígado/Baço)	*Lin ⁻ F4/80 ^{hi} CD11b ^{lo} **MHCII ^{-/lo} CD11c ^{-/lo}
Mφ peritoneal	*Lin ⁻ CD115 ^{hi} Ly6C ⁻ F4/80 ^{hi} CD11b ^{hi}
YS-Mφ	*F4/80 ⁺⁺ CD11b ⁺
cDCs	*Lin ⁻ Ly6C ⁻ CD11b ⁺ MHCII ^{hi} CD11c ^{hi} **Ly6G ⁻ Ly6C ^{-/+} MHCII ^{hi} CD11c ⁺⁺⁺ B220 ⁻ CD45RA ⁻ (CD8α ⁺ , CD4α ⁺ ou CD8α ⁻ CD4α ⁻)
pDCs	*CD115 ⁻ CD135 ⁺ CD317 ⁺ Ly6C ⁺ CD11b ^{lo} **Gr-1 ⁺ Ly6G ⁺ Ly6C ^{-/+} F4/80 ^{-/+} CD11b ⁻ MHCII ^{lo} CD11c ^{lo} B220 ⁺ CD45RA ⁺
DC-SIGN ⁺ (Mo-DC)	*CD115 ⁻ Ly6G ⁻ Ly6C ⁻ F4/80 ^{lo} CD11b ⁺ CD11c ^{hi} CD209a/DC-SIGN ⁺
CX3CR1 ⁺ lp (Mo-DC)	*CD14 ⁺ CD11b ⁺ CD11c ^{hi/int} CX3CR1 ^{hi/int} CD103 ⁻
Tip-DCs (Mo-DC)	*Ly6G ⁻ Ly6C ⁺ CD11b ⁺ CD11c ^{int} CX3CR1 ⁺ CCR2 ⁺ TNF-α ⁺ iNOS ⁺ **Gr-1 ⁺ Ly6G ⁺ Ly6C ⁻ F4/80 ⁻ CD11b ⁺ CD11c ⁺ TNF-α ⁺⁺ iNOS ⁺⁺
M-MDSCs (tumor)	*CD115 ⁺ Ly6G ⁻ Ly6C ^{hi} F4/80 ^{lo} CD11b ⁺ CCR2 ⁺ **Gr-1 ⁺⁺ Ly6G ⁻ Ly6C ⁺⁺⁺ F4/80 ⁺⁺ CD11b ⁺⁺ CD11c ⁺ TNF-α ⁺ iNOS ⁺⁺⁺
BMDC	**Gr-1 ⁺ Ly6G ^{-/+} Ly6C ^{-/+} F4/80 ^{-/+} CD11b ⁺ CD11c ⁺ TNF-α ⁺ iNOS ⁺
Precursor de PMN	*Lin ⁻ CD117 ⁺ CD115 ^{lo} CD135 ⁻ Ly6C ⁺ CD11b ⁻
PMN	*SSC ^{hi} Ly6G ⁺ CD11b ⁺ (CD3 CD19 NK1.1) ⁻
T cells	*CD3 ⁺ (CD19 NK1.1 Ly6G) ⁻
B cells	*CD19 ⁺ (CD3 NK1.1 Ly6G) ⁻
NK cells	*NK1.1 ⁺ (CD3 CD19 Ly6G) ⁻

HSC (LSK): células tronco hematopoiéticas; MDP: progenitora de monócitos/macrófagos e DCs; cMoP: progenitora de monócitos/macrófagos; CDP: progenitora de DCs; pMo: monócito proliferativo; Mo-Mφ: macrófago derivado de monócito; Mo-DC: DC derivada de monócito; YS-Mφ: macrófago derivado do saco vitalíneo; cDC: DC convencional; pDC: DC plasmocitóide; M-MDSC: célula supressora derivada mieloide-monocítica; BMDC: DC derivada da medula óssea; PMN: polimorfonucleares (Neutrófilos). *(Hettinger et al., 2013; Richards et al., 2013); **(Schmid et al., 2012).

1.4 RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES (PRRS)

Alguns grupos de pesquisa já utilizavam o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano como adjuvante para atuar como pré-ativador da imunidade desde a década de 50 (Jennings, 1995). Porém, somente em 1989, Janeway chamou a atenção para o entendimento sobre o reconhecimento imunogênico ao dizer que o sistema imune adaptativo não era suficiente para promover uma resposta específica eficiente, mas dependia de outros sinais para a ativação dos linfócitos B e T (Janeway, 2013). Quase 10 anos se passaram até que: em 1996, Jules Hoffmann identificasse os receptores Toll na imunidade de *Drosophila melanogaster* contra infecções fúngicas (Lemaitre et al., 1996); em 1997, Janeway e Medzhitov demonstrassem que o TLR4 estava envolvido na imunidade inata de mamíferos (Medzhitov et al., 1997); e em 1998, Beutler indicasse o TLR4 como receptor do LPS, evidenciando a importância dos TLRs de mamíferos no reconhecimento antimicrobiano (Poltorak et al., 1998). A partir dos anos 2000, o grupo do Dr. Akira produziu camundongos deficientes em diferentes TLRs, permitindo a caracterização de ligantes e sinalizações (Takeuchi and Akira, 2001).

Hoje, sabemos que as células do sistema imune inato, incluindo as do eixo fagocítico mononuclear, são sensíveis a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e a danos (DAMPs) (Kawai and Akira, 2011). Este reconhecimento é realizado por PRRs expressos nas membranas celulares ou solúveis no citosol. Os TLRs ainda são os PRRs melhor caracterizados. Além deles, os NLRs (*nod-like receptors*), RLRs (*rig-like receptors*), CLR (c-type lectin receptors), ALRs (*aim-like receptors*) e os receptores de ácidos nucleicos intracelulares (cGAS – *cyclic GMP-AMP synthase* – e STING – *stimulator of interferon genes*) integram o painel de receptores de reconhecimento imunológico inato (Krishnan et al., 2007; Trinchieri and Sher, 2007; Franchi et al., 2009b; Kawai and Akira, 2008; Loo and Gale, 2011; Hansen et al., 2011; Ishikawa et al., 2009; Wu et al., 2013).

A ativação de um receptor gatilha uma ou mais cascatas de sinalizações, promovendo a transcrição de grupos gênicos e desencadeando mecanismos moleculares complexos que envolvem: ativação de proteases, produção de citocinas, quimiocinas e outros metabólitos. Em adição, as cascatas dos diferentes PRRs comunicam entre si formando uma rede de sinalização intracelular que envolve moléculas adaptadoras, cinases e fatores de transcrição, caracterizando um sistema integrado de regulação da ativação celular (Lee et al., 2012). Assim, o somatório do desempenho de cada receptor determina a função que a célula exercerá durante um processo inflamatório (Takeuchi and Akira, 2010). Fato importante, as células do sistema imune utilizam cada receptor

de forma diferencial, tornando-as especializadas em determinadas funções e estabelecendo relações entre célula/PRR/função. Em adição, os patógenos geralmente apresentam mais de um agonista que ativam PRRs distintos. Portanto, a ativação do sistema imune em resposta à invasão microbiana é um processo complexo que considera tanto o tipo, número e concentração de agonistas presentes no meio, quanto a celularidade, expressão de receptores e interação entre eles (Trinchieri and Sher, 2007).

1.4.1 Receptores NLRs, RLRs, ALRs, CLRs, cGAS e STING

Dentre as diferentes classes de receptores, os NLRs compõem as plataformas proteicas intracelulares conhecidas como inflamassomos, cuja ativação depende da clivagem da protease Caspase-1. Esta, por sua vez, é responsável pela conversão de pró-IL-1 β em IL-1 β e síntese de citocinas envolvidas com a inflamação estéril (Franchi et al., 2009a). Os cristais de ácido úrico formados em doenças autoimunes, como gota e artrite, são exemplos de DAMPs reconhecidos pelos NLRs que promovem intensa inflamação nas articulações e produção de fatores pró-inflamatórios, como IL-1 e TNF- α (Orenge et al., 2009, 2008). Por sua vez, os RLRs e ALRs são receptores intracelulares envolvidos no reconhecimento viral, sendo que os ALRs também estão envolvidos com a ativação de inflamassomos (Hansen et al., 2011; Kawai and Akira, 2008). Os CLRs são receptores de membranas especializados no reconhecimento de carboidratos, principalmente a manose, que compõem a parede celular de bactérias, fungos e micobactérias (Takeuchi and Akira, 2010). STING (MITA, MPYS ou ERIS) e o receptor/enzima cGAS têm sido considerado elementos sensores de DNA citosólico e de mensageiros secundários sintetizados a partir de nucleotídeos trifosfatados ATP e GTP (como os dinucleotídeos cíclicos bacterianos – diguanilato/diadenilato monofosfato (c-di-GMP/c-di-AMP) ou de mamíferos – guanilato/adenilato monofosfato (c-GAMP)) (Wu et al., 2013; Dempsey and Bowie, 2015). A ativação de STING e cGAS resulta na produção de IFNs do tipo I e quimiocinas como a CXCL10, principalmente durante infecções intracelulares (Ishikawa et al., 2009).

1.4.2 Receptores semelhantes a Toll (TLRs)

Os TLRs foram os primeiros PRRs descritos no reconhecimento de um amplo espectro de moléculas derivadas de micro-organismos (vírus, bactérias, micobactérias, fungos e parasitas) e são expressos por uma variedade de células da imunidade, incluindo: linfócitos B, mastócitos, polimorfonucleares e células do sistema fagocítico mononuclear (Kawai and Akira, 2011). Estes receptores são proteínas transmembrana do tipo I constituídas por três domínios: uma região rica em repetições de leucina

(LRR), um domínio transmembrana e um domínio citosólico TIR (*toll/interleukin-1 receptor*). Distintos pela localização subcelular, os TLRs são expressos na membrana plasmática (TLRs 1, 2, 4, 5, 6 e 10) ou na membrana endolisossomal (TLRs 3, 7, 8, 9, 11, 12 e 13). Até o momento, são caracterizados 10 TLRs em humanos e 13 em camundongos envolvidos no reconhecimento de PAMPs. O TLR10 é inativo em camundongos devido a uma inserção retroviral e os TLR11, 12 e 13 não são expressos em humanos (Takeuchi and Akira, 2010). Cada TLR detecta classes distintas de moléculas derivadas da degradação ou do metabolismo microbiano. Os TLR1, 6 e 10 formam heterodímeros com o TLR2, ampliando a possibilidade de reconhecimento de um maior número de moléculas, dentre elas: lipopeptídeos e glicoproteínas, como o glicosilfosfatidilinositol (GPI) e o zimosan (Oliveira-Nascimento et al., 2012; Mulla et al., 2013). O TLR4 reconhece LPS de bactérias gram-negativas, polissacarídeos e alguns componentes do hospedeiro. O TLR5 é ativado por flagelina, o TLR3 por RNAs de fita dupla, como o poli-I:C, e os TLR7 e 8 por RNAs de fita simples. Os motivos CpG DNA não metilados são agonistas do TLR9 (Takeda et al., 2003). O reconhecimento de ligantes endógenos por TLRs e outros PRRs tem sido relacionado com autoimunidade e com a regulação da inflamação em doenças infecciosas e não-infecciosas (Trinchieri and Sher, 2007).

1.4.2.1 Sinalizações desencadeadas por TLRs

Uma vez que o ligante (PAMP) é reconhecido pelo ectodomínio do TLR iniciam-se os eventos de sinalização que culminam na síntese diferencial de agentes antimicrobianos. Contudo, a polaridade da sinalização por TLRs em diferentes tipos celulares é conseguida em parte pelo uso alternativo e combinatório de adaptadores, proteínas acessórias, cinases e fatores de transcrição, conforme esquematizado nas Figuras 2 e 3. Inicialmente, o sinal gerado é transduzido pelo domínio citosólico TIR do receptor para um conjunto de cinco possíveis adaptadores intracelulares que também contêm o domínio TIR: 1. MyD88; 2. Mal/TIRAP (*myD88-adaptor-like* ou *TIR domain-containing adaptor protein*); 3. TRIF/TICAM-1 (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β* ou *TIR domain-containing adaptor molecule-1*); 4. TRAM/TICAM-2 (*TRIF-related adaptor molecule* ou *TIR domain-containing adaptor molecule-2*); 5. SARM (*sterile α - and armadillo-motif-containing protein*) (Takeda and Akira, 2004; O'Neill and Bowie, 2007). Em seguida, as cascatas bioquímicas conduzem e potencializam o sinal através do citoplasma por um conjunto de cinases e proteínas acessórias citoplasmáticas, dentre elas: IRAKs (*IL-1 receptor-associated kinases*),

TRAFs (*TNF receptor (TNFR)-associated factors*), TAK-1 (*TGF- β -activated kinase-1*), TABs (*TAK-binding proteins*) e TBK-1 (*TRAF-family-member-associated NF- κ B-activator-binding kinase-1*) (Doyle and O'Neill, 2006). De acordo com a utilização combinatória destas proteínas acessórias e cinases, a sinalização culmina na ativação do complexo de cinases associadas ao κ B inibitório (*I κ B kinases* ou IKKs) e MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) (Kawai and Akira, 2007). Consequentemente, ocorre a ativação de um conjunto de fatores de transcrição, dentre eles: NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), membros da família dos IRFs (*interferon (IFN)-regulatory factors*) (Kawai and Akira, 2007), AP-1 (*activator protein-1*) e CREB (*cAMP response element-binding protein*) (Li et al., 2010b). Por sua vez, estes fatores de transcrição ativados translocam-se ao núcleo onde modulam a transcrição gênica.

Dentre as vias desencadeadas por TLRs existem duas principais: a via dependente de MyD88 e a via dependente de TRIF. As funções de Mal/TIRAP e TRAM são associadas ao recrutamento *upstream* de MyD88 e TRIF, respectivamente (Takeda and Akira, 2004; O'Neill and Bowie, 2007). Em adição, outras vias podem ser ativadas, como a sinalização por MAPKs e a via das PI3Ks (*phosphoinositide 3-kinases*).

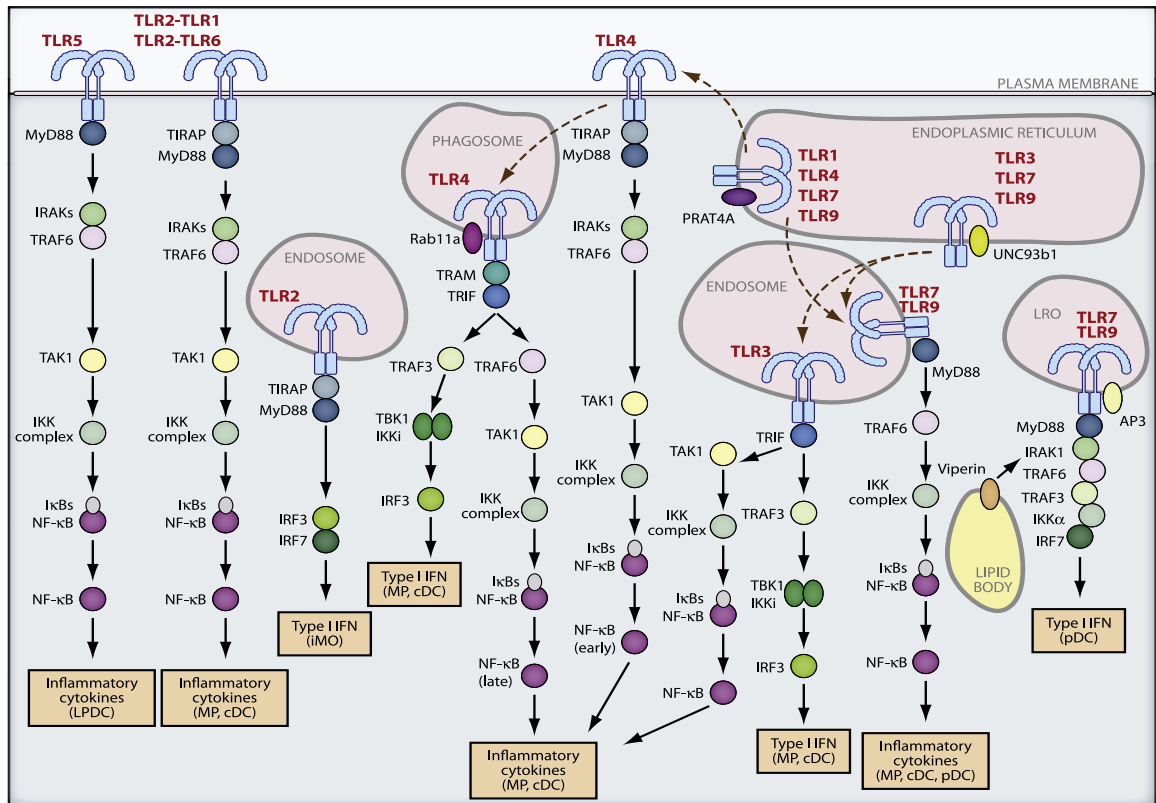


FIGURA 2 – Sinalização típica dos TLRs em diferentes tipos celulares.

Os TLRs reconhecem PAMPs e participam da primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos, atuando na inflamação, regulação imune, sobrevivência e proliferação celular. Os TLR1, 2, 4, 5, 6 e 11 localizam-se na superfície celular e os TLR3, 7, 8 e 9 no compartimento endossomo/lisossomo. A ativação de TLRs é transduzida ao domínio citoplasmático TIR do receptor que se associa às moléculas adaptadoras (MyD88, Mal/TIRAP, TRAM, TRIF e SARM). Com a ativação de MyD88 ou MyD88:Mal/TIRAP são recrutados em sequência: IRAK-4 e IRAK-1; TRAF6; TAK-1; o complexo $IKK\alpha\beta\gamma$ e/ou MAPKs (JNK, p38 e ERK); os fatores de transcrição NF- κ B, AP-1 e CREB, culminando na síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias. Com a ativação de TRIF:TRAM são recrutados em sequência: TRAF3; o complexo $IKK\epsilon$:TBK-1; os fatores de transcrição IRF3 e IRF7, culminando principalmente na síntese de IFNs do tipo I. LPDC = DC da lâmina própria; MP = macrófagos; iMO = monócito inflamatório; cDC = DC convencional; pDC = DC plasmocitóide (Kawai and Akira, 2011).

1.4.2.1.1 Sinalização dependente de MyD88

MyD88 é uma molécula adaptadora que foi descrita em 1990 como uma proteína induzida durante a diferenciação terminal de precursores mieloides M1D⁺ em resposta a IL-6 ('88' refere-se ao número do gene de MyD88 na lista dos genes induzidos) (Warner and Núñez, 2013; O'Neill and Bowie, 2007). Em 1994, foi demonstrada uma homologia entre as sequências aminoacídicas (domínio TIR) de MyD88 com domínios citoplasmáticos dos receptores de IL-1 em mamíferos e do tipo Toll em *Drosophila*, indicando uma importância imunológica para a molécula (Hultmark D, 1994). Em 1997, foi comprovado seu envolvimento na via de sinalização do receptor de IL-1 (IL-1R1) dependente de IRAKs e NF-κB (Wesche et al., 1997; Muzio et al., 1997). Porém, foram os estudos envolvendo animais deficientes em MyD88 que demonstraram a real importância desta proteína na imunidade envolvendo a sinalização dos TLRs. Os animais MyD88^{-/-} apresentaram dificuldade em organizar uma resposta imune eficiente, pois tinham níveis reduzidos de citocinas pró e anti-inflamatórias em resposta aos ligantes de TLRs e desencadearam uma alta mortalidade associada à susceptibilidade do hospedeiro a diversas infecções bacterianas (Scanga et al., 2004), fúngicas (Yáñez et al., 2009), virais (Zhou et al., 2005) e parasitárias (Scanga et al., 2002; de Veer et al., 2003; Drennan et al., 2005; Báfica et al., 2006). Por outro lado, MyD88 também foi relacionado à quebra da imunotolerância em associação com o fator de transcrição Foxp3 expresso em linfócitos T. Na ausência de Foxp3, ocorrem doenças inflamatórias autoimunes, as quais não são vistas em animais duplo-deficientes em Foxp3 e MyD88. Isto indica que o efeito da ausência global de MyD88 oferece proteção parcial contra doenças autoimunes, uma vez que ele interfere nos gradientes de quimiocinas que recrutam células efetoras T e DCs (Rivas et al., 2012). Portanto, esta molécula tem importância nos principais mecanismos de resposta do hospedeiro, no controle da replicação microbiana e na manifestação de sintomas durante processos inflamatórios (Kawai and Akira, 2010).

Conforme apresentado na Figura 2, MyD88 se liga diretamente aos TLR5, 7, 8, 9 e 11, mas utiliza Mal/TIRAP como uma ponte para seu recrutamento pelos TLR1, 2, 4 e 6. Portanto, MyD88 é a principal molécula adaptadora envolvida na sinalização dos TLRs, predizendo uma comunicação entre receptores, com exceção do TLR3 (Oliveira-Nascimento et al., 2012; Krishnan et al., 2007). Este adaptador é uma proteína composta por um domínio de morte (DD), um domínio intermediário (ID) e um domínio TIR. Sua interação direta ou indireta (via Mal/TIRAP) com os TLRs é feita por interações

homotípicas dos domínios TIR-TIR e com IRAK-4 pela ligação entre domínios DD (O'Neill and Bowie, 2007). A ligação dos domínios TIR do receptor e do adaptador induz uma justaposição de MyD88:IRAK-4:IRAK1:IRAK2, permitindo que IRAK-4 fosforile IRAK-1. A ativação das IRAKs envolve fosforilação auto e cruzada, permitindo a associação de IRAK-1 com TRAF6, o qual recruta TAB-1, TAB-2 e TAK-1. Neste ponto, as enzimas ubiquitinantes UEV1A (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*) e UBC13 (*ubiquitin-conjugating enzyme 13*) modificam por poliubiquitinação e ativam TRAF6 e TAK-1. Em seguida, a cinase TAK-1 fosforila o complexo IKK (IKK α :IKK β :IKK γ ; sendo que IKK γ = NEMO [*NF- κ B essential modifier*]) e, paralelamente, ativa as MAPKs p38 e JNK. O complexo IKK $\alpha\beta\gamma$ fosforila a subunidade inibitória κ B (I κ B) do fator de transcrição NF- κ B, a qual é degradada. A porção livre e ativa do NF- κ B transloca-se ao núcleo, permitindo a ativação gênica (Fig. 3A) (McGettrick and O'Neill, 2004; Kawai and Akira, 2007; Takeda and Akira, 2004).

A utilização do adaptador Mal/TIRAP por TLRs é um ponto chave na sinalização diferencial por MyD88, pois ao assessorar a ligação entre receptor e MyD88, Mal/TIRAP permite uma abertura para modulação do sinal a ser gerado. Além de possuir um motivo TIR, Mal/TIRAP é composto por um motivo de ligação ao fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) (ponto de interação com a via da cinase PI3K) e sítios de fosforilação e de clivagem por Caspase-1 (sítios regulatórios de interações com cinases, fosfatases e proteases). Por último, Mal/TIRAP possui um domínio putativo de ligação ao TRAF6 inserido no domínio TIR, considerado um ponto regulatório (O'Neill and Bowie, 2007; Oliveira-Nascimento et al., 2012; Krishnan et al., 2007).

1.4.2.1.2 Sinalização dependente de TRIF

Conforme apresentado nas Figuras 2 e 3A, o recrutamento de TRIF também diversifica a sinalização dos TLRs, o que é exclusivo aos TLR3 e TLR4. O TLR3 recruta este adaptador diretamente, independentemente de TRAM, Mal/TIRAP ou MyD88. Por sua vez, o TLR4 utiliza TRAM como ponte de recrutamento de TRIF. Curiosamente, TLR4 é o único TLR capaz de sinalizar pelas duas vias alternativas, Mal/TIRAP:MyD88 ou TRAM:TRIF, e utilizar as cinco moléculas adaptadoras (Fitzgerald et al., 2001; Krishnan et al., 2007). Assim como Mal/TIRAP, a proteína TRIF possui um domínio TIR e um domínio de recrutamento de TRAF6, porém distintos. Quando o ligante é reconhecido pelo receptor, o TLR recruta TRIF por interações intracelulares TIR-TIR. Por sua vez, TRIF pode associar-se ao TRAF6 e ao complexo IKK $\alpha\beta\gamma$, induzindo a ativação de NF- κ B, ou alternativamente ao TRAF3 e ao

complexo TBK-1:IKKi (iKK ϵ), induzindo a ativação dos fatores de transcrição IRF3:IRF3 (induz IFN- β) e IRF3:IRF7 (induz IFN- α/β) (fase tardia da resposta imune) (O'Neill and Bowie, 2007). Em geral, a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e IRFs está associada à produção de citocinas inflamatórias (IFN- γ , IL-12 e TNF- α) e de IFNs do tipo I, respectivamente (Zhang et al., 2013). Além dos dois domínios mencionados acima, TRIF ainda possui um terceiro domínio conhecido como RHIM (*receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif*) (O'Neill and Bowie, 2007). Em um terceiro caso de sinalização, TRIF pode associar-se à RIP-1 (*receptor-interacting protein 1*) pela interação com RHIM. RIP-1 ativa a via que envolve FADD (*FAS-associated death domain*), facilitando a apoptose por ativação da Caspase-8 (O'Neill and Bowie, 2007).

A inibição da internalização de TLR4 em macrófagos não impacta sobre a ativação de NF- κ B, mas suprime a fosforilação de IRF3, portanto, a internalização de TLR4 é um ponto crucial para ativação da via TRAM:TRIF e indução de produção de IFNs do tipo I. Por isto foi proposto um modelo onde MyD88 e TRIF não se ligam ao mesmo tempo, mas sim sequencialmente de forma coordenada em torno da endocitose do receptor (Kagan et al., 2008; Chiang et al., 2012). No que diz respeito ao quinto adaptador SARM, foi descrito seu papel como inibidor da sinalização via TRIF nas cascatas de TLR3 e TLR4 (O'Neill and Bowie, 2007). Em homeostasia, a molécula SARM encontra-se em baixas concentrações, porém a ativação dos TLRs gera um efeito de *feedback*, aumentando sua expressão. Este adaptador liga-se diretamente a TRIF, bloqueando sua interação com outras moléculas sinalizantes (O'Neill and Bowie, 2007).

1.4.2.1.3 Sinalização por MAP cinases (MAPKs)

As MAPKs são serina/treonina/tirosina cinases que compõem uma cascata de fosforilação sequencial tripla e têm fatores de transcrição como alvo final. MAP3Ks (MAPKKKs ou MEKKs) fosforilam MAP2Ks (MAPKKs ou MEKs), que fosforilam MAPKs. Estas enzimas são ativadas por estímulos extracelulares e atuam em mecanismos ligados à sobrevivência celular, proliferação e produção de metabólitos ativos (Bardwell, 2016; Nakahara et al., 2006; Manna and Stocco, 2011; Hui et al., 2007), principalmente em condições patológicas (Kim and Choi, 2010). Em mamíferos, as enzimas Tpl-2, MEKK1/2/3/4, Raf-1A/B, c-Mos, DLK, MLK2, ASK, TAO1/2 e TAK-1 são exemplos de MAP3Ks. Dentre as MAP2Ks temos: MEK1/2, MKK3/6, MKK4/7 e MEK5, as quais fosforilam, respectivamente, os quatro grupos de MAPKs: ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*), isoformas p38 (p38 α , β , γ e δ),

JNK1/2/3 (*c-Jun amino (N)-terminal kinases 1/2/3*) e ERK5. Além destas MAPKs convencionais existem as MAPKs atípicas ERK3/4, ERK7 e NLK (*Nemo-like kinase*) (Cargnello and Roux, 2011; Qi and Elion, 2005).

Diferentes cinases compõem a rede de ativação de MAPKs, porém TAK-1 é o cerne da sinalização clássica induzida por agonistas de TLRs, o que culmina na liberação dos fatores de transcrição AP-1 e CREB (Fig. 3A). TAK-1 fosforila diretamente p38 e JNK além de ativar o complexo IKK. Em paralelo, IKK β e Tpl-2/p105 podem atuar como MAP3Ks, induzindo a ativação de ERK1/2 (Li et al., 2010b; An et al., 2002b; Tomczak et al., 2006; Dumitru et al., 2000). A liberação de CREB depende somente da ativação de ERK1/2 e p38, enquanto que a liberação de AP-1 depende da indução das três MAPKs ERK1/2, p38 e JNK. Esta ativação de CREB e AP-1 é regulada direta ou indiretamente por outras MAP2Ks, entre elas: MSK1/2 (*mitogen- and stress-activated kinases*), RSKs (*p90 ribosomal S6 kinases*) e MNKs (*MAPK-interacting kinases*) (Li et al., 2010b).

1.4.2.1.4 Sinalização por PI3Ks

Há uma relação entre TLRs e os receptores membranais de fatores de crescimento e de hormônios (Ex.: PDGF, EGF, insulina, FGFs, IGF-1, HGF e NGF), pois estes compartilham componentes sinalizantes. Os receptores de fatores de crescimento e de hormônios controlam o crescimento, proliferação e sobrevivência celular através de um domínio tirosina cinase intracelular que promove ativação de proteínas G e fosfolipase C γ (PKC γ) (Koyasu, 2003; Zhang and Liu, 2002; Uings, 2000; Soung et al., 2010). A PKC γ cliva o fosfolípido PIP₂, presente na lâmina interna da membrana plasmática, gerando os mensageiros secundários inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), que estão envolvidos no metabolismo celular de cálcio (Lemmon and Schlessinger, 2010). Paralelamente, assim como os TLRs, os receptores tirosina cinases podem ativar PI3Ks e, sequencialmente, as cinases Ras e Raf:MEKs:MAPKs (Zhang and Liu, 2002; Lemmon and Schlessinger, 2010; Zaru et al., 2007), culminando na regulação da atividade de NF-kB, CREB e IRF7 (Fig. 3B) (Lemmon and Schlessinger, 2010; Koyasu, 2003; Guiducci et al., 2008).

Em mamíferos, a sinalização de TLRs tem sido relacionada apenas com as enzimas da classe IA das quatro classes de PI3Ks existentes. As demais atuam sobre o metabolismo celular por meio de mensageiros secundários intracelulares. As PI3Ks da classe IA são enzimas heterodiméricas constituídas por uma porção regulatória (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β ou p85 γ) e uma porção catalítica (p110 α , p110 β , p110 δ) (Koyasu,

2003; Guiducci et al., 2008). Quando ativadas, elas desencadeiam a liberação dos fosfolípidos PIP₂ e PIP₃ (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfatado) e recrutamento da cinase Akt (*protein kinase B* - PKB) (Guiducci et al., 2008). Resumidamente, PI3K fosforila PIP₂ na posição 3 do anel inositol gerando PIP₃. PIP₃ se liga e ativa Akt e outras cinases, como PDK1 e PKC. Por sua vez, Akt fosforila diversos componentes celulares associados à sobrevivência e crescimento celular, como os fatores indutores de apoptose (Bad, Bax, Bim, Foxo...), o que os inibe ou leva a sua degradação. Akt ativa sequencialmente Rheb, o complexo mTOR e S6K, que se ligam ao Ribossomo, facilitando a tradução e permitindo o crescimento celular. Akt fosforila GS3K (*glycogen synthase kinase-3*), uma enzima relacionada à regulação da transcrição de genes associados ao metabolismo de carboidratos mediada pela fosforilação de Tau (Li et al., 2010b; Koyasu, 2003). Por último, Akt regula a ativação de CREB, IRFs, NF-κB e AP-1 (Tullai et al., 2011).

As enzimas PI3K interagem com domínios intracelulares nos TLR2, 3 e 5 ou com adaptadores, principalmente MyD88 e Mal/TIRAP (Guiducci et al., 2008). Quando Mal/TIRAP se conecta à subunidade regulatória de PI3K (p85α) e PIP₂, há indução da produção de PIP₃, fosforilação de Akt e ativação de NF-κB. A ativação de NF-κB na via de TLR2/6:PI3K depende de Mal/TIRAP, o qual não é essencial na via TLR2/1:PI3K (Santos-Sierra et al., 2009; Cremer et al., 2011).

Uma célula que se mostrou eficiente em responder via PI3K é a pDC humana. Após estimulação por CpG (via TLR9), pDCs regulam a translocação de IRF7 e produção de IFN do tipo I via PI3K. Além disto, o complexo PI3K:mTOR:p70S6K afeta diretamente a interação entre TLR9 e MyD88 (Guiducci et al., 2008).

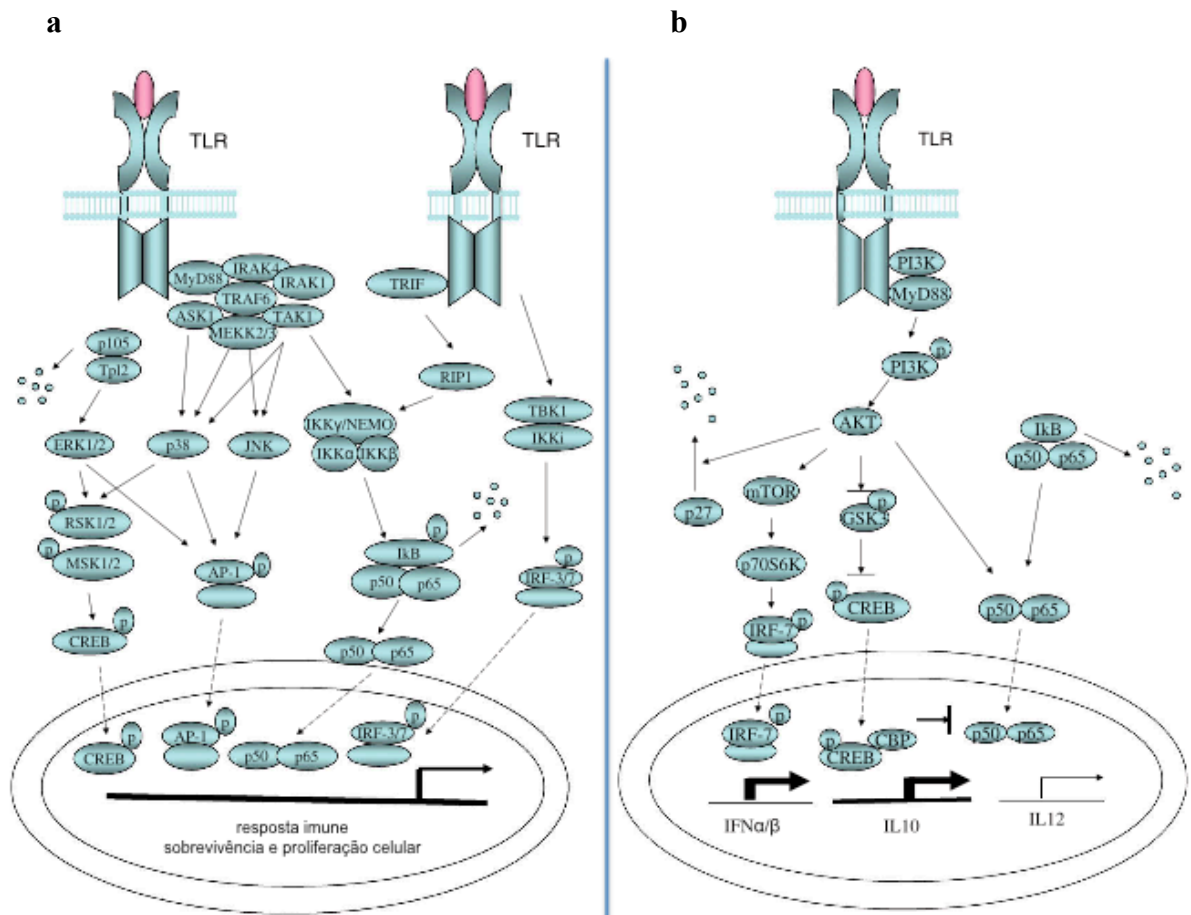


FIGURA 3 – Rede sinalizatória gatilhada por TLRs.

a) A ativação de TLRs via MyD88 leva ao recrutamento de TRAF6 e cinases (TAK-1, MEKK2/3 e ASK1). TAK-1 leva à ativação do complexo IKK $\alpha\beta\gamma$ e das MAPKs p38 e JNK. Em paralelo, as cinases Tpl2, MEKK2/3 e ASK1 ativam ERK1/2, p38-JNK e p38, respectivamente. Por sua vez, ERK1/2 e p38 ativam CREB e AP-1. JNK ativa somente AP-1. A sinalização TRIF ativa IRF3:IRF7 e NF- κ B. Estes fatores regulam a transcrição de genes inflamatórios e genes envolvidos na proliferação e sobrevivência celular.

b) A via PI3K inicia com a interação da enzima com TLRs e adaptadores. PI3K regula a sinalização através de Akt: A inativação de GSK-3 por PI3K:Akt permite ligação de CREB-CBP ao DNA, aumentando a transcrição do gene de IL-10. A transcrição do gene de IL-12 é inibida pela diminuição da associação de NF- κ B com CBP. PI3K:Akt fosforila mTOR:S6K, levando à fosforilação de IRF7 e aumentando a produção de IFNs do tipo I. A via PI3K:Akt também está envolvida na proliferação e sobrevivência celular ao induzir a degradação do inibidor do ciclo celular p27 (Li et al., 2010b).

1.4.2.2 Rede transcricional gatilhada por TLRs

TLRs sinalizam tipicamente por MyD88:IRAK4:IRAK1:TRAF6:TAK1, IKK $\alpha\beta\gamma$:NF- κ B e MAPKs, mas podem desencadear sinais alternativos, como as vias dependentes de TRIF ou PI3K. Além disto, outras vias afetam direta ou indiretamente a sinalização dos TLRs, dentre elas: Jak/STAT (*janus kinase/signal transducers and activators of transcription*), ITAM (*tyrosine-based activation motif*), ITIM (*tyrosine-based inhibition motif*), vias do sistema do complemento e demais PRRs (Hu et al., 2007; Kawai and Akira, 2011; Hajishengallis and Lambris, 2010). A rede de sinalização gatilhada por TLRs é complexa devido à possibilidade de recrutamento alternativo de receptores, adaptadores e moléculas sinalizantes e devido à comunicação entre vias que se complementam e autorregulam. Neste âmbito, o uso combinatório de isoformas de fatores de transcrição (NF- κ B [Proteínas Rel], Ap-1 [Proteínas Jun/Fos], CREB e IRFs) funciona como fator chave para a ativação gênica diferencial desencadeada pelos TLRs (Li et al., 2010b; Banerjee and Gerondakis, 2007; Tullai et al., 2011).

Dentre os fatores de transcrição ativados por TLRs, a família NF- κ B é constituída por proteínas homo ou heterodiméricas que possuem o domínio RHD (*Rel-homology domain*), o qual se liga às sequências de DNA com sítios κ B (5'-GGGRNNYYCC-30; R, purina; Y, pirimidina; N, qualquer nucleotídeo) presentes em promotores e *enhancers* de vários genes. Em mamíferos, existem cinco membros da família NF- κ B: RelA (p65), RelB, C-Rel, p105 (NF- κ B1; um precursor de p50) e p100 (NF- κ B2; um precursor de p52). O heterodímero RelA (p65)/p50 é o mais comumente mobilizado por IKK $\alpha\beta\gamma$ na sinalização dos TLRs. Durante a homeostasia, as funções de NF- κ B são inibidas devido a seu sequestro por proteínas I κ B. Porém, o fator é liberado e ativado com a degradação do inibidor mediada pela fosforilação por TAK-1. A família I κ B é composta por sete proteínas com repetições de anquirina: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, I κ B ζ e I κ BNS, sendo que I κ B α , I κ B β , I κ B γ e I κ B ϵ se encontram no citoplasma, prevenindo a translocação de NF- κ B. No núcleo, Bcl-3, I κ B ζ e I κ BNS interagem com NF- κ B e regulam a transcrição (Kawai and Akira, 2007; Ghosh and Karin, 2002; Hayden and Ghosh, 2008).

A família AP-1 é caracterizada por um domínio zíper de leucina (bZIP) e é composta pelas proteínas Jun, Fos, ATF (*activation transcription factor*) e uma subfamília Maf. Elas se ligam a diferentes elementos palindrômicos de DNA presentes em promotores e *enhancers*, sendo o TRE (*TPA-responsive element* – TGATCA) o principal deles. Diferentes dímeros de AP-1 se ligam a outros elementos, como o CRE

(*cAMP response element* – TGACGTCA), MARE (*MAF-recognition element* – TGCTGACTCAGCA) e ARE (*antioxidant-response element* – a/gTGACnnnGC). As MAPKs fosforilam as proteínas da família AP-1, ativando um complexo de transcrição dimérico constituído frequentemente por homodímeros Jun-Jun ou heterodímeros Jun-Fos (Chinenov and Kerppola, 2001; Eferl and Wagner, 2003).

A terceira família de fatores de transcrição ativados por TLRs é composta por CREB, CREM (*cAMP response element modulator*) e ATF-1, os quais reconhecem o elemento de sequência de DNA octanucleotídeo CRE e, em alguns casos, o motivo CGTCA (Mayr and Montminy, 2001). Assim como AP-1, a família CREB é caracterizada pela estrutura dimérica bZIP (zíper de leucina), porém apresenta dois domínios estruturais conhecidos como KID (*kinase inducible domain*) e Q2 (*glutamine-rich domain*). O domínio Q2 interage com o TFIID (*transcription factor IID*), um regulador do reconhecimento da sequência TATA box em diversos promotores. O domínio KID interage com CBP (*CREB-binding protein*) e p300, os quais são co-ativadores transcricionais com atividade acetiltransferase de histonas e remodeladora de cromatina. CREB é ativado pela fosforilação por MAPKs (principalmente ERKs) ou por sinalização dependente de cAMP e Ca²⁺, o que promove sua ligação ao DNA e a componentes da maquinaria da transcrição, permitindo a leitura dos genes de IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , cicloxigenase e fatores envolvidos na proliferação e crescimento celular. A função de CREB é regulada por fosfatases (Mayr and Montminy, 2001; Wen et al., 2010).

As três famílias NF- κ B, AP-1 e CREB formam o centro regulatório da transcrição gênica desencadeada por TLRs e promovem indução diferencial de perfis citocinêmicos e fatores de estresse, determinando a resposta inflamatória adotada por cada célula (Krishnan et al., 2007). CpG DNA (via TLR9) estimula macrófagos e DCs de camundongos via MAPKs JNK1/2 e p38, induzindo fosforilação de AP-1 (c-Jun e ATF-2) e produção de TNF- α e IL-12 (Hacker et al., 1998). Por outro lado, Pam₃CSK₄ (via TLR2) estimula DCs e leva à indução de AP-1 (c-Fos), produção elevada de IL-10 e baixos níveis de IL-12 (Dillon et al., 2004; Krishnan et al., 2007). A ativação alternativa de isoformas AP-1 é realizada de acordo com as cinases que os fosforilam, dentre elas: TAK-1, Tpl2 e as MAPKs (JNK, p38 e ERK1/2). Assim como o exemplo de AP-1, as isoformas de NF- κ B e CREB também podem ser alternativamente ativadas, ampliando a diversidade dos sinais gerados por TLRs. Além disto, há competição pelo uso de AP-1 e CREB, pois estes possuem similaridade estrutural e seus elementos de ligação no DNA possuem identidade sequencial (Tullai et al., 2011; Banerjee and

Gerondakis, 2007). Em geral, a ativação de AP-1 e NF- κ B tem sido relacionada com um perfil citocinêmico voltado a Th1, enquanto que a ativação concomitante dos três fatores de transcrição direciona a um perfil de resposta com padrão Th2, inclusive com aumento da síntese de IL-10 de forma IFN- γ regulada (Wen et al., 2010; Carlezon et al., 2005; Mayr and Montminy, 2001). Neste contexto, a enzima GSK3 tem sido relatada como elemento chave no recrutamento de CREB, NF- κ B e AP-1. Esta enzima é uma serino/treonina cinase, constitutivamente ativa em células quiescentes, capaz de reprimir uma série de genes, principalmente aqueles que possuem sítios de ligação para os fatores de transcrição mencionados acima. Quando a célula é ativada pela via PI3K-Akt, esta enzima é inibida, permitindo ativação de genes reguladores de processos metabólicos (Ex.: síntese de glicogênio, controle da proliferação, sobrevivência e diferenciação celular) (Doble, 2003; Frame and Cohen, 2001; Jope and Johnson, 2004). GSK3 fosforilada também permite a liberação de CREB e AP-1, produção de IL-10 e inibe a síntese de IL-12 (Fig. 3B) (Li et al., 2010b).

A quarta família de fatores de transcrição ativados por TLRs compreende a família IRF, a qual é composta por nove membros: IRF1, IRF2, IRF3, IRF4 (LSIRF, PIP ou ICSAT), IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 (ICSBP) e IRF9 (ISGF3 γ). Os IRFs possuem um domínio conservado de ligação ao DNA, com cerca de 120 resíduos de aminoácidos formando um motivo amino-terminal hélice-volta-hélice, capaz de se ligar ao elemento ISRE (*IFN-stimulated response element* ou IRF-E). Com exceção de IRF1 e IRF2, estas proteínas apresentam um domínio regulatório carboxi-terminal homólogo a SMAD (*mothers against decapentaplegic homologue*) (Honda and Taniguchi, 2006). A ativação de IRFs está intimamente ligada ao reconhecimento de ácidos nucleicos, aos TLRs endossomais (TLR3, 7, 8 e 9), ao TLR4 endocitado e à proteína STING integrada à membrana do retículo endoplasmático rugoso (RE). TLR4 internalizado e TLR3 sinalizam pelo eixo TRIF:TBK-1:IKKi (ativando IRF3, IRF7, NF- κ B e ATF-2/c-Jun) enquanto STING fosforila as cinases TBK-1 e IKKi, independentemente de TRIF (ativando IRF3, IRF7 e NF- κ B) (Ishikawa et al., 2009). Em algumas DCs, os TLRs endossomais (TLR7/8 ou TLR9) podem ativar IRF1, IRF5 e IRF7 de forma MyD88 dependente, induzindo a produção de IFN- β (O'Neill and Bowie, 2007).

A família IRF foi inicialmente relacionada com a síntese de IFNs do tipo I, porém, ela está envolvida em diversos mecanismos da regulação do sistema imune. Quatro fatores (IRF1, IRF3, IRF5 e IRF7) foram implicados como reguladores positivos na transcrição dos genes de IFNs do tipo I, considerado um mecanismo de especialização celular durante reconhecimento de infecções intracelulares,

principalmente virais. Os altamente homólogos IRF3 e IRF7 atuam como reguladores-chave, enquanto que IRF1 e IRF5 não são essenciais à expressão gênica (Haller et al., 2006; Jensen and Thomsen, 2012). IRF3 é constitutivo no citoplasma, mas deve haver um *feedback* positivo mediado por IFN- α/β para causar aumento da expressão de IRF7, o que lhe permite apresentar atividade biológica significativa. Em geral, o homodímero IRF3:IRF3 estimula a síntese de quimiocinas (CXCL10), o heterodímero IRF3:IRF7 estimula a síntese de IFN- β e o homodímero IRF7:IRF7 estimula a síntese de IFN- α (Honda and Taniguchi, 2006; Kawai and Akira, 2006).

A secreção de IFN- β (via IRF3, NF- κ B e AP-1) indica um processo infeccioso intracelular. Para isto, IRF3 fosforilado forma um homo ou heterodímero com IRF7 e transloca-se ao núcleo, onde interage com os co-ativadores CBP ou p300. O holocomplexo formado se liga ao DNA, remodelando a cromatina por meio de atividade histona-acetiltransferase. Em um estágio parácrino, o IFN I secretado se liga ao receptor de interferon do tipo I (IFNAR) de células não infectadas, ativando a via Jak:STAT, estimulando o aumento da expressão de IRF7 e culminando na produção de IFN- α/β (via IRF3, IRF7, NF- κ B e AP-1) (Haller et al., 2006; Jensen and Thomsen, 2012). Em um caso atípico, pDCs expressam constitutivamente altos níveis de IRF7, independentemente da ativação prévia de IRF3, o que as torna especializadas na produção rápida de grandes quantidades de IFN do Tipo I (IFN- α) em resposta a ligantes de TLR7/8 e TLR9 e sob assessoramento de IRF5. Nestas células, IRAK-1 fosforila IRF7 através da interação direta com o complexo MyD88:IRAK-1:TRAF6, o que depende de E3 ubiquitina ligase (Kawai and Akira, 2006).

Inicialmente, esperava-se que ocorresse uma convergência de função entre receptores distintos, uma vez que todos os TLRs ativam basicamente NF- κ B, molécula fundamental na ativação de uma gama de genes da imunidade. Inclusive o TLR3 é capaz de ativar NF- κ B por vias próprias, demonstrando um consenso a todos os TLRs. Porém, hoje sabemos que a ativação alternativa de AP-1, CREB e IRFs delinea a diversificação dos padrões de produção de citocinas, mecanismos de sobrevivência e de proliferação celular (Fig. 4 e Tabela III). Em regra geral, o uso de MyD88 pelos receptores de IL-1 e TLRs induz NF- κ B, AP-1 e CREB e, conseqüentemente, a produção de citocinas com perfil Th1 e Th2 (IFN- γ e interleucinas pró e anti-inflamatórias). O uso de TRIF por TLR3 e TLR4 induz a síntese de IFNs do tipo I de forma IRF dependente (Tabela III) (Wesche et al., 1997; Medzhitov et al., 1998; Burns et al., 1998; O'Neill and Bowie, 2007).

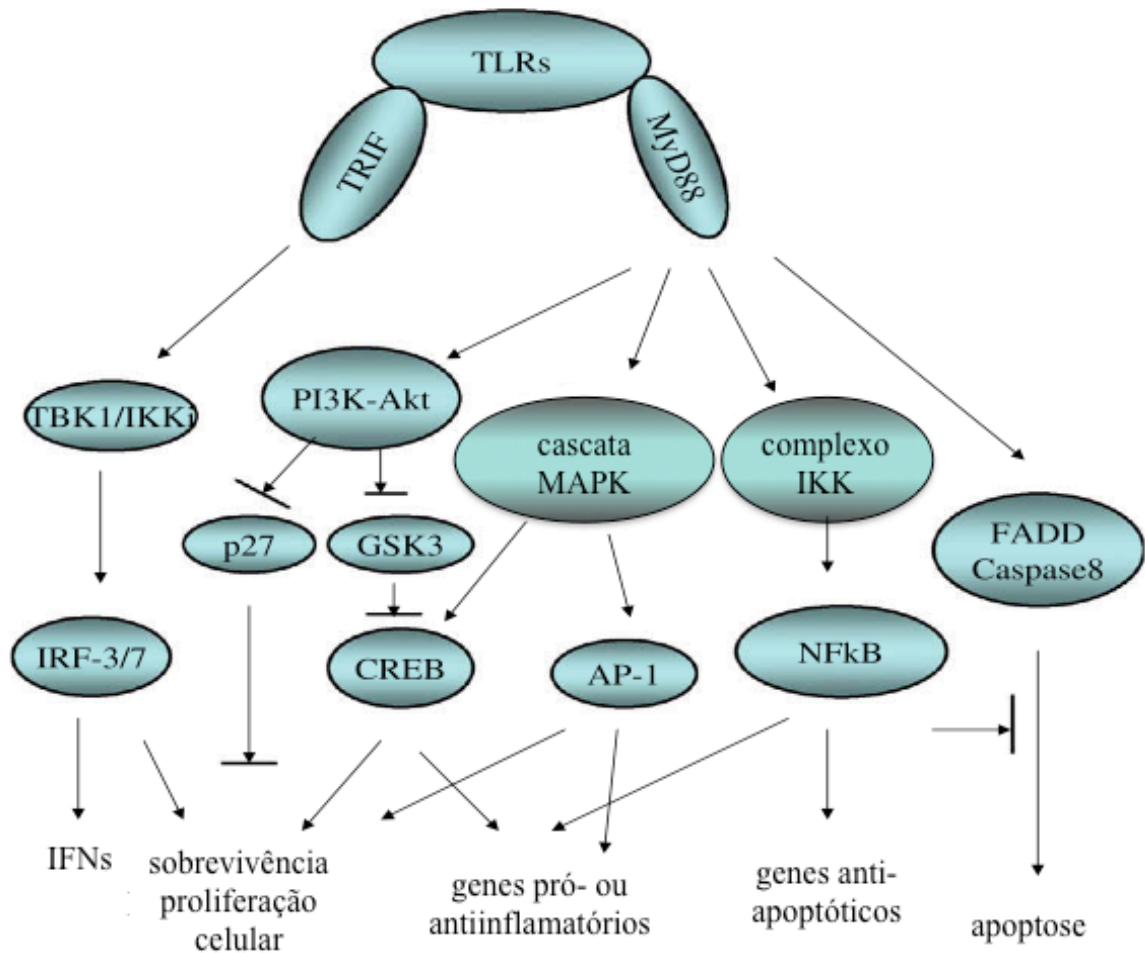


FIGURA 4 – “Cross-talk” entre fatores de transcrição gatilhados por TLRs.

MyD88 e TRIF são os principais adaptadores de TLRs. TRIF está envolvido na ativação de IRF3 e na produção de IFN do tipo I. IRF1, 3, 5 e 7 são potenciais reguladores positivos da proliferação celular e sobrevivência. MyD88 ativa as vias de PI3K, MAP3Ks, complexo IKK e FADD:Caspase 8. PI3K conduz à ativação de CREB e degradação de p27, contribuindo para a proliferação e/ou sobrevivência celular. A ativação de MAP3Ks induz a sinalização de MAPKs, o que eventualmente ativa os fatores de transcrição AP-1 e CREB. A ativação do complexo IKK resulta na translocação de NF-κB ao núcleo. A rede integrada NF-κB, AP-1, CREB e IRFs está envolvida na transcrição de genes que controlam o destino celular, bem como a inflamação. FADD:Caspase 8 induz apoptose, que é antagonizada por uma sinalização via NF-κB (Li et al., 2010b).

TABELA III: *Relação entre sinalização e perfis citocinêmicos.*

Receptor	Adaptadores	Cinases	Fator de transcrição	Citocinas	Perfil de resposta
Todos os TLRs, exceto TLR3	MyD88 ou Mal:MyD88 (Fase Rápida)	IKK $\alpha\beta\gamma$ MAPK	NF-kB AP-1	IFN- γ IL-12 TNF- α pró-IL-1 β	Pró-inflamatória (Th1)
Todos os TLRs, exceto TLR3	MyD88 Mal:MyD88	IKK $\alpha\beta\gamma$ MAPK	NF-kB AP-1 CREB	IL-10	Anti-inflamatória (Th2)
TLR7 TLR9	MyD88	IKK MAPK	cJun:ATF-2 p50:IRF5 p50:IRF7 IRF5:IRF7	IL-12:TNF- α IL-12:TNF- α IFN- β IFN- α	Th1
TLR2/1,6	MyD88:Mal	IKK MAPK	p65/p50 (NF-kB) p65/IkB ζ	IP-10:TNF- α IL-6	Th2
TLR3 TLR4	TRIF:TRAF6 (Fase Tardia)	IKK $\alpha\beta\gamma$ MAPK	NF-kB AP-1	IFN- γ IL-12 TNF- α pró-IL-1 β	Th1
TLR3 TLR4	TRIF:TRAF3	TBK-1 IKK ϵ	NF-kB* AP-1* IRF3	IFN- β IP-10	IFNs tipo I
TLR3 TLR4	TRIF:TRAF3	TBK-1 IKK ϵ	NF-kB* AP-1* IRF7	IFN- α	IFNs tipo I
TLR4	MyD88 (em pDC)	TRAF3	NF-kB* AP-1* IRF7	IFN- α	IFNs tipo I
TLR2** TLR3 TLR5	MyD88 **Mal	PI3K:Akt	IRF3/7 CREB/CBP	IFN- $\alpha\beta$ (em pDC) [IL-10] \updownarrow [IL-12] \downarrow	IFNs tipo I Th2 #Regula negativamente TLR2, 4, 5 e 9 #Inibe GKS3 #Sobrevivência #Crescimento celular

(Jensen and Thomsen, 2012; Kawai and Akira, 2007; Krishnan et al., 2007; Li et al., 2010b). *Fatores de transcrição ativados por outras vias.

1.4.2.3 Regulação das vias de sinalização de TLRs

O desafio de controlar o sinal gatilhado por estímulos externos (via TLRs) é influenciado por diversos mecanismos regulatórios que interferem positiva ou negativamente sobre a disponibilidade de moléculas sinalizantes. Segundo Kondo, existem três tipos básicos de regulação negativa da sinalização dos TLRs: dissociação de complexos adaptadores, degradação de proteínas sinalizantes e regulação transcricional (Kondo et al., 2012). Em adição, Anwar descreve diferentes mecanismos, dentre eles: remoção dos receptores da superfície, atenuação da expressão de adaptadores e moléculas sinalizantes, degradação mediada por ubiquitinação-proteossomo de proteínas sinais, remodelamento de cromatina e expressão de reguladores negativos dominantes (Anwar et al., 2013).

O controle da expressão de receptores, adaptadores e outras moléculas sinalizantes é o primeiro plano regulatório dos sinais dos TLRs. Em adição, as células preterem a expressão de um receptor em detrimento de outro, como é o caso das DCs em relação ao TLR9 e monócitos/macrófagos em relação ao TLR2 (Krug et al., 2001). Esta predileção se estende às outras moléculas envolvidas na sinalização: adaptadores, cinases, fatores de transcrição e proteínas acessórias (Kawai and Akira, 2011). Em suma, para que uma célula responda a um agonista ela deve ser capaz de reconhecê-lo e, por isto, deve expressar um receptor correspondente, além de ser capaz de ativar uma cascata de sinalização funcional. Dependendo do estágio de diferenciação/maturação, a ativação celular por fatores endógenos e exógenos promove mudança da transcrição gênica, culminando na variação da expressão de moléculas sinalizantes (Baldrige et al., 2010; Stamm et al., 1999). Inclusive, a presença de um agonista de TLR pode promover um efeito *feedback* na expressão do próprio ou de outros receptores da imunidade. Por exemplo, DCs apresentam um aumento de expressão de TLR2 e TLR4 em resposta ao HIV-1 e coinfeções (Herna et al., 2011). Macrófagos murinos superexpressam TLR9 após ativação de TLR4, NF- κ B e MAPKs (ERK e p38) (An et al., 2002a). Macrófagos reduzem a expressão de TLR9 em resposta à ativação do TLR2 durante infecção por *Leishmania major* (Srivastava et al., 2013).

O acesso a agonistas também interfere na ativação celular, pois os TLRs são expressos diferencialmente em regiões subcelulares, variando entre RE, Golgi, endossomos, lisossomos, membrana plasmática e vesículas celulares. Por isto o tráfego intracelular de receptores é fundamental para suas funções. Na ausência de UNC93, uma proteína relacionada com o direcionamento de receptores para o endossomo, as

células têm dificuldade em estabelecer um perfil pró-inflamatório (Schamber-Reis et al., 2013). Por outro lado, o *turnover* de vesículas intracelulares permite internalização ou exposição de receptores à superfície celular. Mecanismo comumente relatado a TLR2 e TLR4 (Barton and Kagan, 2009). Quando um TLR internalizado não se expõe a seus agonistas, a resposta celular é amenizada. Porém, é mais duradoura quando o receptor é internalizado associado a seu ligante. A internalização de TLRs também está envolvida no processo de degradação de receptores (Underhill et al., 1999; Wang et al., 2007). A degradação de proteínas sinais por autofagia em proteossomos é outro mecanismo eficiente de inibição da função de TLRs. Por exemplo, IRAK1 e IRAK4 promovem a fosforilação e degradação de Mal/TIRAP mediada por poliubiquitinação:proteossomo (Dunne et al., 2010), um mecanismo induzido por *Brucella sp.* (Sengupta et al., 2010).

O segundo plano de regulação dos sinais de TLRs se dá no âmbito transcricional, pois a transcrição é um processo altamente regulado por diversos elementos *cis* (*enhancers*, promotores, sequências modulatórias...) e *trans* (proteínas da maquinaria de transcrição...) (Shlyueva et al., 2014; Palazon et al., 2014). Por sua vez, o recrutamento de fatores de transcrição com funções modificadoras de histonas distintas (Ex.: acetilação e metilação) determina padrões de remodelamento de cromatina. O próprio NF- κ B atua como um pivô na tolerância a agonistas de TLRs, isto porque ele recruta enzimas com atividade repressora de deacetilação de histonas (Ghosh and Karin, 2002; Hayden and Ghosh, 2008). O ATF-3 é outro fator que facilita a deacetilação de histonas, promove empacotamento da cromatina e dificulta o acesso de fatores de transcrição a regiões promotoras do DNA (Li et al., 2010a; St Germain et al., 2010).

A divergência na sinalização dos TLRs inicia com a utilização diferencial de receptores e adaptadores e se estende com a modificação de adaptadores e proteínas sinalizantes intermediárias. Esta divergência determina o recrutamento alternativo dos fatores de transcrição que irão parer com NF- κ B. Neste contexto, TRAF6 é um exemplo de alvo regulatório importante, pois converge as vias MyD88, Mal/TIRAP e TRIF, permitindo fosforilação de diferentes MAPKs (ERK1/2, JNK e p38). TRAF6 poliubiquitinada associa com TAB1:TAB2 e TAK-1, ativa rapidamente NF- κ B e AP-1 e induz a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (ativação rápida). TRAF6 não ubiquitinada associa-se com IRF5, promovendo uma produção tardia de citocinas pró e anti-inflamatórias (ativação tardia) e IFNs do tipo I (via TLRs endossomais e TRIF). TRAF6 não ubiquitinada também associa-se a TRAF3, recruta IRF7 e desencadeia produção de IFN- α (O'Neill and Bowie, 2007).

O uso de moléculas co-estimulatórias ou inibitórias é o terceiro plano regulatório da ativação dos TLRs. Diversos fatores co-estimulatórios são requeridos para a ativação dos TLRs, carreando ou facilitando o reconhecimento de seus ligantes (Ex.: CD14, MD2, CD36, LBP, TRIL e HMGB1), promovendo o dobramento (*folding*) dos receptores (Ex.: Chaperonas PRAT4A e GRP94), facilitando o tráfego de TLRs endossomais (Ex.: UNC93B1 e AP3), promovendo processamentos pós-traducionais (Ex.: Proteases catepsinas e AEP), entre outros mecanismos (Lee et al., 2012). Em contrapartida, as moléculas regulatórias negativas promovem bloqueio, dissociação de complexos adaptadores e degradação de moléculas sinalizantes. A proteína variante de MyD88 (MyD88s), Tollip, e a cinase IRAK-M são exemplos de reguladores negativos que atuam sobre IRAK1, principalmente em macrófagos e monócitos (Jeong and Lee, 2011; Anwar et al., 2013; Kondo et al., 2012). A molécula variante de TRAM com domínio GOLD (TAG - *TRAM adaptor with Golgi dynamics*) é um exemplo de inibidor que compete com TRAM por TRIF (Palsson-McDermott et al., 2009). A porção solúvel de TLR2, liberada constantemente por monócitos sanguíneos, em associação com uma porção de CD14, também solúvel, promove redução da produção de quimiocinas e citocinas (Ex.: IL-8 e TNF- α) (LeBouder et al., 2003).

A transcrição também é alvo de regulação negativa por ação de microRNAs e RNases, pois microRNAs promovem o silenciamento gênico de mRNAs específicos ao direcioná-los como substrato para degradação por RNases. miR-155, miR-146a, miR-148a/b, miR-152 são exemplos de reguladores negativos das funções de TLRs (Zhang and Li, 2013). Assim como as moléculas inibitórias, algumas enzimas também promovem a ruptura da sinalização de forma reversível (Ex.: cinases e fosfatases; medeiam o grau de fosforilação das proteínas sinalizantes) ou irreversível (Ex.: ubiquitinases/proteossomos; medeiam degradação de proteínas). As MAPKs são exemplos de cinases que controlam a fosforilação dos fatores de transcrição, enquanto as fosfatases PP1, PP2A, PP2B, PP2C e DUSP inativam MAPKs e fatores de transcrição por *feedback* negativo (Qi and Elion, 2005; Cargnello and Roux, 2011).

O quarto plano regulatório da ativação dos TLRs se dá pela comunicação cruzada entre sinais de TLRs e vias alternativas. Por exemplo, TLRs estimulam (via MyD88) a síntese de pró-IL-1 β , o qual deve ser clivado pela Caspase-1 (via NLRs) para ser secretado em sua forma ativa. O IL-1 β secretado é reconhecido pelo receptor IL-1R, o qual também sinaliza via MyD88, promovendo um efeito *feedback* positivo (Creagh and O'Neill, 2006; Kawai and Akira, 2006). Além disto, a ativação de integrinas por fatores solúveis (imunocomplexos) é outro exemplo relacionado à regulação negativa de

TLR4 em macrófagos devido à produção de PGE₂ via receptor FCγRIIb (CD32) (Zhang et al., 2009). A ativação de integrinas também promove a regulação negativa da função do TLR9 em macrófagos com participação de Sik, degradação de MyD88 e TRIF via Cbl-b (Han et al., 2010), além de silenciar mRNAs induzidos por TLR9 em DCs através do aumento de expressão do microRNA-146a (Bai et al., 2012).

A interação entre adaptadores que contêm domínios TIR (MyD88, Mal/TIRAP, TRIF, TRAM e SARM) é outro ponto de extrema importância para a modulação da sinalização desencadeada por TLRs. Enquanto, MyD88 e TRIF funcionam como eixo sinalizatório central, as moléculas Mal/TIRAP, TRAM e SARM são tidas como recrutadoras, sinalizantes e reguladoras, podendo inclusive apresentar atividades independentes de MyD88 e TRIF. Por exemplo, Mal/TIRAP não é essencial para a sinalização de TLR2, como foi inicialmente proposto (Kenny et al., 2009), e regula negativamente a produção de IFN-β mediada por TLR3:TRIF (Siednienko et al., 2010). TRIF emergiu como regulador crítico da sinalização de MyD88 (Hirotsu et al., 2005; Ouyang et al., 2007), enquanto a degradação de TRAF3 regula as sinalizações MyD88 e TRIF-dependentes, pois ativa a via MyD88 e suprime a via TRIF (Kagan et al., 2008). Por fim, a sinalização via TRIF, RIP1 e TRAF6 é regulada negativamente por Mal/TIRAP, ST2L, TRIAD3A e SOCS1 (Deng et al., 2000; Verstak et al., 2009; Takeda and Akira, 2004; Kondo et al., 2012).

1.4.2.4 TLRs como elicitadores da resposta imune

Cada TLR pode gatilhar cascatas sinalizantes distintas, culminando na ativação combinatória de fatores de transcrição que delineiam a resposta celular. Um fator importante a se considerar na ativação diferencial de TLRs é sua distribuição em localizações subcelulares, uma vez que os receptores se dividem em dois grupos básicos: os de superfície e os endolisossomais. Isto permite que as células da imunidade discriminem certos padrões moleculares microbianos: aqueles liberados no meio que são facilmente reconhecidos por receptores de superfície e as moléculas derivadas da degradação dos micro-organismos, principalmente ácidos nucleicos, que são reconhecidas por receptores intracelulares (Chaturvedi and Pierce, 2009). Estes grupos de TLRs divergem na capacidade de reconhecimento, permitindo à célula organizar respostas diferenciadas contra patógenos que possuem mecanismos invasivos distintos (Kawai and Akira, 2006).

A eficiência da resposta imune depende também da prontidão da célula em responder aos agonistas de TLRs, o que leva em conta a capacidade de interação receptor-ligante. Células quiescentes encontram-se em um estágio neutro de ativação, porém, quando sofrem a quebra de seu estágio de latência, promovem uma intensa reorganização metabólica e de seu citoesqueleto. Conseqüentemente, movimentam seus componentes intracelulares, incluindo os TLRs, através do tráfego de vesículas (Baldrige et al., 2010; Manukyan et al., 2009). Em homeostasia, o TLR4 localiza-se no Golgi de monócitos humanos, enquanto que o TLR2 é expresso em endossomos precoces, endossomos tardios/lisossomos, mas não no Golgi ou RE. Posteriormente a uma ativação celular, ambos são amplamente expressos na membrana plasmática (Brandt et al., 2013; Uronen-hansson et al., 2004). Por outro lado, os TLR7 e TLR9 são exclusivamente sequestrados no RE de células não estimuladas e rapidamente trafegam para os endolisossomos após estimulação. Esta translocação de receptores endolisossomais é dependente da proteína de localização do RE (UNC 93B1) (Caetano et al., 2011; Schamber-Reis et al., 2013). Portanto, a posição e a movimentação de TLRs nas células durante o processo de ativação celular são alvos de mecanismos regulatórios. Inclusive a internalização de receptores durante o *turnover* de vesículas é fundamental para a função dos TLRs (Chaturvedi and Pierce, 2009).

Em geral, tem sido visto um forte perfil pró-inflamatório quando são ativados TLRs endossomais, principalmente aqueles que sinalizam diretamente por MyD88 (caso do TLR9). TLRs de membrana que recrutam moléculas adaptadoras

intermediárias possuem perfis moderados, inclusive apresentam atividade regulatória associada a um grau de atividade pró-inflamatória (caso do TLR2) (Bafica et al., 2005; Wenink et al., 2009). TLR2 e TLR9 representam dois padrões distintos de indução de respostas imunes, os quais podem interagir formando um sistema ainda mais complexo. (Ghosh et al., 2006). Esclarecer os mecanismos envolvidos neste sistema representa um avanço no olhar sobre as bases da ativação celular durante um processo inflamatório, o que nos permite pensar em sua manipulação com objetivos terapêuticos e científicos.

1.4.2.4.1 Função imunoestimuladora do TLR9

O TLR9 é um receptor endossomal que reconhece motivos CpG DNA não-metilados e sinaliza diretamente via MyD88, culminando na ativação rápida de NF- κ B (Leifer et al., 2004; Kawai and Akira, 2007). As células especializadas em responder por este receptor caracterizam-se pela intensa síntese de citocinas, atribuindo-lhes um alto potencial pró-inflamatório (Bafica et al., 2005; Colonna, 2007). Dentre as principais citocinas relacionadas ao TLR9, temos o IL-12 e os IFNs do tipo I, essenciais no estabelecimento de respostas agudas eficientes contra a invasão microbiana (Aliberti et al., 1996; Gautier et al., 2005; Tchaptchet et al., 2012; Miyagi et al., 2007). Além disto, o IL-12 liberado estimula a expansão clonal de linfócitos T produtores de IFN- γ (Okamura et al., 1998; Trinchieri, 2003; Miyagi et al., 2007; Tchaptchet et al., 2012). A alta produção de IL-12 e IFN- γ caracteriza o TLR9 como um forte indutor de resposta tipo Th1 (Franklin et al., 2009; Bafica et al., 2005).

As DCs (cDCs, Mo-DCs e pDCs) são as principais células especializadas no reconhecimento de patógenos por TLR9. cDCs têm sido intimamente relacionadas com a produção de IL-12, inclusive por células de animais saudáveis (Novak et al., 2010; Kadowaki et al., 2001; Hanagata, 2012) e pDCs têm sido caracterizadas como “bombas” produtoras de citocinas (Ex.: IL-12 e IFNs do tipo I) via TLR9:MyD88:IRF7 após estimulação com CpG DNA (Krug et al., 2001). pDCs também são especialistas em responder a agonistas de TLR3 via TRIF e PI3K (síntese de IFNs do tipo I) (Guiducci et al., 2008; Swiecki et al., 2011). Mo-DCs são fontes de IL-12, TNF- α , iNOS e da citocina anti-inflamatória IL-10 (Pulendran et al., 2010; Zhan et al., 2010; Cuellar et al., 2008; Domínguez and Ardavin, 2010). Monócitos e macrófagos normalmente expressam níveis inferiores de TLR9 em relação às DCs (An et al., 2002a).

Inicialmente, os micro-organismos e até mesmo o DNA autógeno, no caso de doenças auto-imunes, devem ser degradados nos lisossomos para que haja a liberação

dos agonistas de TLR9 (Wolf et al., 2011; Kasperkovitz et al., 2011; Hanagata, 2012). Este mecanismo de degradação e processamento indica uma relação íntima entre potencial de reconhecimento via TLR9, fagocitose e capacidade de apresentação de antígenos (Heit et al., 2003). Processos que são especializações de células apresentadoras de antígenos, como as DCs (Hemmi et al., 2003; Simmons et al., 2010). Assim, vemos que o TLR9 é parte fundamental da natureza das células “regentes da imunidade”, as quais são requeridas rapidamente em infecções agudas. Em contrapartida, sua ativação deve ser altamente regulada para que não haja uma exarcebção da resposta, como ocorre em algumas condições patológicas (Kondo et al., 2012; Anwar et al., 2013). Neste âmbito, TLR9 é regulado negativamente por diversos fatores, como pela integrina CD11b (Bai et al., 2012), e modulado pela sinalização de outros receptores, como o TLR2 (Simmons et al., 2010).

1.4.2.4.2 Função imunomoduladora de TLR2

Expresso na membrana plasmática, endossomos precoces e endossomos tardios/lisossomos, principalmente de monócitos e macrófagos, o TLR2 é eficiente no reconhecimento de diferentes classes de moléculas lipoproteicas derivadas do metabolismo microbiano, principalmente moléculas liberadas no meio extracelular (Kawai and Akira, 2007; Flo et al., 2001; Wang et al., 2000; Liu et al., 2001). Diferentemente de outros TLRs, o TLR2 é funcionalmente ativo quando forma heterodímeros com TLR1, TLR6 ou TLR10 (em humanos) e associa-se a diversos correceptores, o que o torna eficaz em detectar um amplo espectro de agonistas, além de gerar uma abertura para a modulação de suas funções (van Bergenhenegouwen et al., 2013; Oliveira-Nascimento et al., 2012). De fato, a heterodimerização de TLR2 permite o reconhecimento de lipoproteínas de micoplasmas e de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Geralmente, lipopeptídeos diacilados interagem com TLR2/6, enquanto lipopeptídeos triacilados interagem com TLR2/1 (van Bergenhenegouwen et al., 2013; Oliveira-Nascimento et al., 2012).

Quanto à função de TLR2, tem sido demonstrado que o receptor possui ambas as propriedades pró e anti-inflamatórias, porém, as bases moleculares desta sinalização diferencial ainda não estão claras (Kiura et al., 2011). À princípio, a habilidade do TLR2 em formar heterodímeros com TLR1 ou TLR6 foi considerada fundamental neste processo (Zhang et al., 2011; Curtiss et al., 2012). Tanto que um modelo propõe que a sinalização pró-inflamatória de TLR2 estaria ligada ao complexo TLR2/1, enquanto que a sinalização modulatória estaria associada ao complexo TLR2/6 (Zhang et al., 2011;

Curtiss et al., 2012; Perrin-Cocon et al., 2012). Outros fatores interferem na atividade do TLR2, como o recrutamento diferencial de moléculas adaptadoras (Ex.: MyD88, Mal/TIRAP e TRIF) (Redecke et al., 2004). Este receptor utiliza tradicionalmente Mal/TIRAP como ponte para o recrutamento de MyD88 (Verstak et al., 2009), porém, vias alternativas independentes de Mal/TIRAP e MyD88 têm sido caracterizadas: como a via PI3K (Santos-Sierra et al., 2009) e uma via dependente TRIF (Aubry et al., 2012). As peculiaridades da rede de sinalização do TLR2 conferem uma complexidade sobre suas funções inflamatórias e reguladoras, condizente com a variedade de papéis exercidos pelas células que expressam este receptor (Redecke et al., 2004).

A função imunorreguladora de TLR2 tem como efeito principal a elevação dos níveis de IL-10 e redução dos níveis de IL-12. Curiosamente, a redução de IL-12 está associada a um aumento de produção de IFNs do tipo I (Wenink et al., 2009). Para tal, diversos mecanismos têm sido relacionados, como: uso do adaptador Mal/TIRAP (comum a TLR2 e TLR4), fosforilação de CREB (Mellett et al., 2011; Hu et al., 2006), ativação prolongada de ERK e indução de c-Fos (AP-1) (Agrawal et al., 2006; Dillon et al., 2004). Outros mecanismos regulatórios envolvem a expressão de receptores e a manipulação de vias de sinalização, MAPKs e fatores de transcrição (Zhang et al., 2012). Por exemplo, Chamorro demonstrou que o aumento da expressão de TLR2 está associado com uma redução da atividade pró-inflamatória de DCs tolerogênicas (Chamorro et al., 2009). Além disto, DCs derivadas de monócitos humanos demonstraram que o TLR2 é um potente indutor de IL-10 após reconhecimento do zimosan de fungos, por um mecanismo que promove inibição de NF- κ B e ativação de CREB associada com a translocação do coativador de CREB (CBP) (Alvarez et al., 2009). Segundo Mellett, Mal/TIRAP pode ser o sinalizante que dita o balanço de ativação de genes pró e anti-inflamatórios (Mellett et al., 2011) e, provavelmente, é regulado por sua degradação (Sengupta et al., 2010). Mal/TIRAP é capaz de ligar ao IRF7 e regular negativamente a produção de IFN- β induzida por TLR3:TRIF (Siednienko et al., 2010). Em contrapartida, o IRF7 regula negativamente a ativação de TLR2:Mal/TIRAP em DCs esplênicas (Owens et al., 2012; Kenny et al., 2009). Alternativamente, Mal/TIRAP pode conectar TLR2 à PI3K levando à polarização de fagócitos (Santos-Sierra et al., 2009).

1.4.2.5 Interações entre sinais gatilhados por TLRs

A maioria dos patógenos apresenta mais de um agonista de TLR, portanto, a estimulação simultânea ou sequencial por dois ou mais receptores representa a real

situação nas interações entre as células do hospedeiro e os micro-organismos (Kawai and Akira, 2010, 2011). Neste contexto, um TLR pode assumir diferentes funções em células distintas e diferentes TLRs podem gatilhar funções distintas em uma mesma célula, de acordo com o estágio de ativação celular e expressão dos componentes da sinalização (Kawai and Akira, 2010). Em consequência, a estimulação combinatória de TLRs resulta na produção diferencial de produtos ativos que desenvolvem a cooperação entre TLRs e, posteriormente, entre células da imunidade (Fig. 5). Isto explica, em parte, os diversos padrões de respostas imunes contra a extensa gama de espécies de micro-organismos existentes (Takeuchi and Akira, 2010). Patógenos que possuem processos infecciosos similares elicitam padrões típicos de respostas eficientes. Por exemplo, a pDC é uma célula especializada no reconhecimento de ácidos nucleicos pelos TLR3, 7 e 9 e na produção de IL-12 e IFNs do tipo I, principalmente após exposição a vírus (Grouard et al., 1997; Ueno et al., 2007; Kvale et al., 2007).

Quando dois ou mais agonistas atuam sobre uma célula, o *cross-talk* entre as vias de sinalização pode gatilhar sinais efetores únicos ou múltiplos, responsáveis pela comunicação intercelular e promoção de respostas inflamatórias (Trinchieri and Sher, 2007; Kawai and Akira, 2011). Uma célula simultaneamente responsiva a dois agonistas sofre: sinergia/adição (efeito de amplificação de uma função) ou antagonismo/inibição (efeito de diminuição ou perda de função). No âmbito sistêmico, a interação entre sinais de TLRs pode gerar efeitos complexos, como: complementariedade de funções (funções peculiares de cada receptor contribuem para respostas diferenciadas), imunopredileção (um receptor assume a função em detrimento de outro) ou tolerância (efeito secundário de hiporesponsividade causada pela supressão ou inibição de função após ativação prévia da célula) (Trinchieri and Sher, 2007).

Um tipo de interação entre TLRs envolve as vias de sinalização de MyD88 e TRIF (Banerjee and Gerondakis, 2007). MyD88 promove ativação de NF- κ B e AP-1, enquanto TRIF ativa IRF3/7, potencializando a produção de IFNs do tipo I (Tabela III) (Jensen and Thomsen, 2012; Kawai and Akira, 2007; Krishnan et al., 2007; Li et al., 2010b). A produção de IL-12 por DCs também é potencializada quando as células são simultaneamente estimuladas por agonistas que ativam MyD88 e TRIF (TLR4 e TLR3, respectivamente) (Gautier et al., 2005; Napolitani et al., 2005; Roelofs et al., 2005). Em contrapartida, não foi visualizado sinergia quando utilizados agonista de TLR2 em combinação com agonista de outro receptor que sinaliza via TRIF, mas sim verificou-se uma produção moderada ou ausente de IL-12 (Gautier et al., 2005; Bekeredjian-Ding et

al., 2006). Resultado similar ao que ocorreu quando foram associados agonistas de TLR2 e TLR9 (Bafica et al., 2005, 2006).

A associação entre TLRs tem sido demonstrada em diversos estudos, principalmente em ensaios *in vitro* com DCs e macrófagos (Ouyang et al., 2007; Krummen et al., 2010; Mäkelä et al., 2009). Durante infecções por *Streptococcus pneumoniae*, a síntese de citocinas depende do efeito cooperativo entre TLR2, TLR4 e TLR9 via MyD88 (Lee et al., 2007). Em resposta à pneumonia bacteriana Gram-negativa, a indução máxima das citocinas IL-23 e IL-17 requereu TLR4 e TLR9 (Bhan et al., 2010). Agonistas de TLR2 e TLR4 são encontrados em *Aspergillus fumigatus* (Chai et al., 2011), *Escherichia coli* e *Porphyromonas gingivales* (Dobrovolskaia et al., 2003). Além disto, foi demonstrado o envolvimento dos receptores TLR7 e TLR9 no lúpus eritematoso sistêmico (Celhar et al., 2012) e dos TLR11 e TLR12 em infecções com o *Toxoplasma gondii* (Koblansky et al., 2013). No entanto, ainda é necessário investigar as interações entre TLRs sob a luz da comunicação intra e intercelular e avaliar os impactos sobre a resposta imune e a replicação do patógeno.

A cooperação entre os TLR2 e TLR9 representa um exemplo peculiar de otimização da resposta do hospedeiro em diversas infecções bacterianas, virais e parasitárias, como apresentado em estudos feitos com *Staphylococcus aureus* (Holle et al., 2013), *Herpes simplex* (Sato et al., 2006), *Mycobacterium tuberculosis* e com *T. cruzi*. Animais TLR2/TLR9 duplo deficientes mostraram uma maior susceptibilidade ao *T. cruzi* que os animais deficientes somente em TLR2 ou TLR9 (Bafica et al., 2006). No estudo com *M. tuberculosis*, os TLR2 e TLR9 apresentaram um efeito sinérgico na produção de IL-12 por DCsCD11c⁺ esplênicas, porém um efeito antagônico na produção de IFN- γ por linfócitos T, principalmente TCD4⁺ (Bafica et al., 2005).

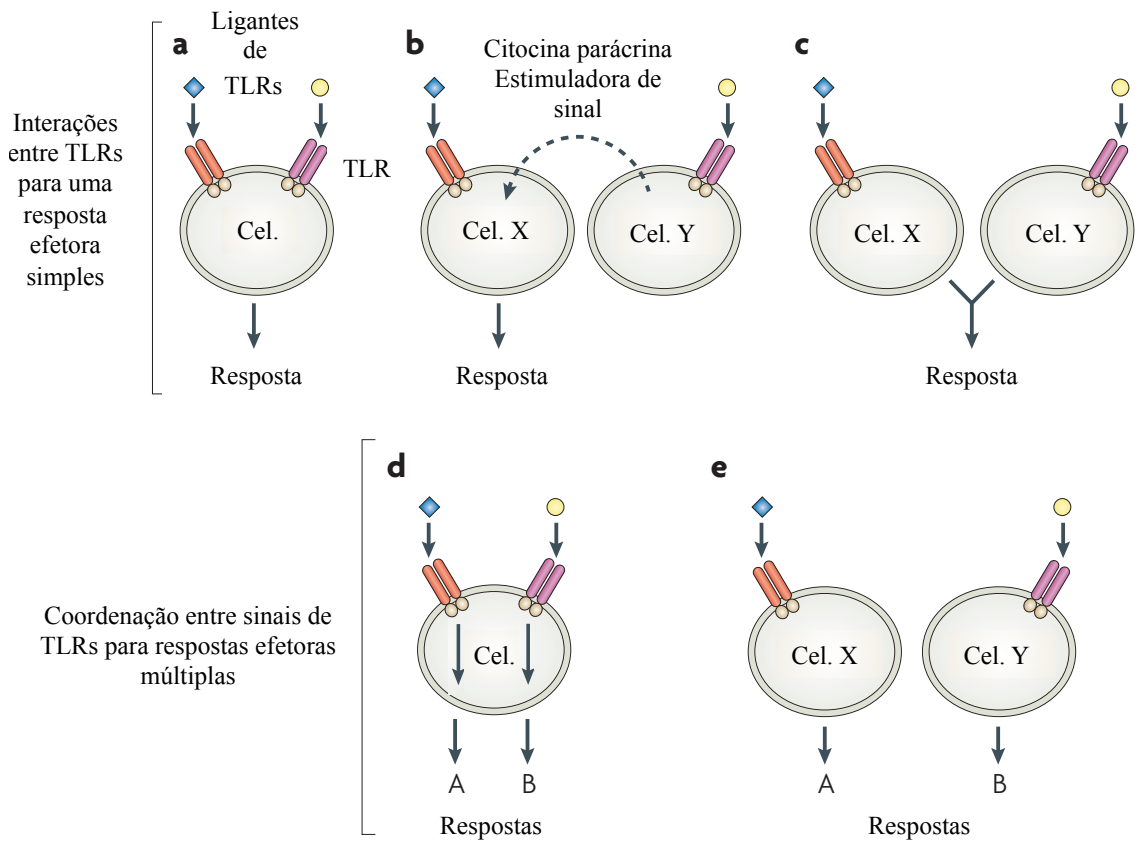


FIGURA 5 – Mecanismos básicos de cooperação entre sinais de TLRs.

As interações entre TLRs podem gerar respostas efetoras simples ou múltiplas:

- a) Sinais múltiplos de TLRs geram resposta efetora única na célula.
- b) Citocina produzida por célula Y em resposta a ligante 1 potencializa a resposta da célula X induzida por ligante 2.
- c) Efeito aditivo de resposta gerado por diferentes estímulos sobre diferentes células.
- d) Respostas independentes geradas por sinais distintos de TLRs sobre a mesma célula.
- e) Respostas independentes geradas por sinais distintos de TLRs sobre duas células.

[Adaptado de (Trinchieri and Sher, 2007)].

2. JUSTIFICATIVA

O sistema imune de mamíferos é capaz de promover diferentes níveis de respostas direcionadas contra um agente invasor. Porém, comporta de forma singular conforme reconhece similaridades estruturais em moléculas expressas pela gama de agentes infecciosos aos quais pode ser exposto. Este reconhecimento é realizado pelos receptores da imunidade inata, os quais foram descritos há cerca de vinte anos à frente da barreira contra infecções, influenciando o balanço entre imunogenicidade e tolerância imunológica. Atualmente, eles têm sido considerados como potenciais alvos de adjuvantes em vacinas e são foco na imunoterapia. Inclusive, seus ligantes estão sendo utilizados em ensaios clínicos contra alergias e em tratamentos antitumorais.

As células do sistema imune utilizam os TLRs de modo desigual, uma vez que o mesmo receptor pode desencadear sinais diferentes e, conseqüentemente, padrões inflamatórios divergentes. Em adição, tem sido demonstrado que os micro-organismos expressam dois ou mais componentes estruturais reconhecidos pelos TLRs, levando à ideia de cooperação entre eles, que se estende às células que os utilizam. O grande desafio tem sido compreender como a rede de interações gatilhadas por receptores orienta as células do sistema imune a atuar distintamente contra grupos de patógenos.

No caso do *T. cruzi*, a cooperação entre TLRs condiciona uma resposta imune marcada pela intensa produção de citocinas com perfil balanceado Th1/Th2, o que é evidenciado no modelo de infecção com a cepa Y e oportuno para estudos de fenômenos imunomodulatórios. Além disto, os perfis citocinêmicos variam de acordo com a presença de diferentes agonistas de TLRs e os parâmetros de virulência, como parasitemia e mortalidade, refletem as alterações nos níveis de expressão dos receptores nos diferentes tipos celulares (Bafica et al., 2006; Kayama and Takeda, 2010).

Ao caracterizar as células que expressam TLR2 e TLR9 e desafiando-as com agonistas de TLRs, buscamos desvendar mecanismos inflamatórios e modulatórios mediados pelo uso distinto de receptores durante a infecção aguda pela cepa Y. Para isto, investigamos três perguntas principais: *1) Como diferentes células são ativadas pelo mesmo TLR? *2) Como uma célula pode ser ativada por diferentes TLRs, isoladamente ou em combinação? *3) Como a interação entre células da imunidade delinea a resposta imune? O entendimento do papel dos receptores da imunidade inata no processo inflamatório é fundamental para a elaboração de novas estratégias que utilizem combinações de agonistas de TLRs na imunoterapia, no uso como adjuvantes e em procedimentos científicos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a utilização de TLR2 e TLR9 por células fagocíticas mononucleares (DCs, monócitos e macrófagos) e a cooperação entre receptores do sistema imune inato durante a infecção aguda por *Trypanosoma cruzi*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1) Analisar a influência de TLR2, TLR9, Mal/TIRAP e MyD88 sobre parâmetros de virulência (parasitemia e mortalidade) do parasita em animais deficientes.

3.2.2) Caracterizar o envolvimento de TLRs na elicitação da resposta pró-inflamatória:

- Mensurar citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IFN- γ e TNF- α) no soro e em cultura de esplenócitos de animais TLR2^{-/-} e TLR9^{-/-} (por ELISA);
- Mensurar IL-12 e TNF- α em cultura de esplenócitos de animais TLR2^{-/-} e TLR9^{-/-} estimulados *in vitro* com agonistas de TLRs (por ELISA);
- Mensurar IL-12, IFN- γ e óxido nítrico (NO) em cultura de esplenócitos de animais TLR2^{-/-} e Mal/TIRAP^{-/-} (por ELISA).

3.2.3) Identificar células do eixo fagocítico mononuclear esplênicas, capazes de responder a agonistas de TLR2 e TLR9 em animais infectados:

- Avaliar a expressão *ex vivo* de TLRs em monócitos, macrófagos e DCs (por citometria de fluxo);
- Avaliar a produção *ex vivo* de TNF- α e IL-12 por esplenócitos de camundongos TLR2^{-/-} e TLR9^{-/-} (por citometria de fluxo);
- Avaliar a produção *in vitro* de TNF- α , IL-12 e IL-10 por esplenócitos de camundongos TLR2^{-/-} e TLR9^{-/-} estimulados com agonistas de TLR2 e TLR9 (por citometria de fluxo).

3.2.4) Investigar a imunomodulação mediada por monócitos inflamatórios esplênicos:

- Avaliar os efeitos de agonistas de TLR2 e TLR9 (isoladamente ou em combinação) e da deficiência em TLR2, TLR9, Mal/TIRAP e IL-12 sobre o número, expressão de TLR2 e perfil citocinêmico das populações de monócitos;
- Caracterizar vias sinalizatórias e o papel de Mal/TIRAP na síntese de citocinas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÉTICA EM ESTUDOS COM ANIMAIS

Os experimentos com animais foram realizados de acordo com a legislação brasileira, conforme especificado no guia de cuidados com animais do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais. Autorização dada pelo protocolo 83/2012.

4.2 CAMUNDONGOS E CUIDADOS ESSENCIAIS

Camundongos machos com um mês de idade e peso aproximado de 22g foram utilizados em todos os procedimentos experimentais. Os animais das linhagens selvagens (WT - C57BL/6 e Swiss) e deficientes (IL-12^{-/-}, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-}, Mal/TIRAP^{-/-} e MyD88^{-/-}) foram fornecidos pelo biotério central do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) e pelo biotério particular do Prof. Dr. Sérgio Costa Oliveira (UFMG). Os camundongos TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-} foram gerados pelo Dr. Shizuo Akira da Osaka University (Osaka, Japan). Todos os animais deficientes foram retrocruzados com animais C57BL/6 por no mínimo oito gerações (background C57BL/6). Desde o nascimento até a eutanásia, eles foram separados em grupos conforme sua linhagem e mantidos em gaiolas microisoladoras, dispostas em prateleiras identificadas, contendo maravalha limpa e acesso a água filtrada e ração autoclavada *ad libitum*. Após desmame, os animais foram acondicionados no Biotério de Experimentação Animal do CPqRR (Fundação Oswaldo Cruz / Av. Augusto de Lima, 1715 / Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). O CPqRR possui um setor aclimatizado com ventilação, iluminação, temperatura e alimentação controlados recriando um ambiente propício para criação destes animais. No âmbito experimental, a utilização de animais WT foi de fundamental importância para se avaliar a real representatividade da composição celular do baço e avaliar a influência de componentes do sistema imune sobre a indução da resposta durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, como: expressão de constituintes celulares e produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Em contrapartida, a utilização de animais deficientes em determinados componentes do sistema imune, como citocinas (IL-12), receptores TLR (TLR2 e TLR9) e moléculas adaptadoras (Mal/TIRAP e MyD88), nos permitiu avaliar o efeito da ausência de cada molécula sobre a resposta imune global, permitindo caracterizar a importância de cada componente durante a infecção. Nos procedimentos experimentais, a contenção dos camundongos foi feita sobre uma superfície gradeada para realização da infecção e aplicação dos anestésicos

via i.p.. Para tal, segura-se a cauda do animal com a mão direita para que, com a mão esquerda se possa segurar a pele da nuca do animal (logo abaixo das orelhas) prendendo-a entre o indicador e o polegar. A seguir, a calda do animal é colocada entre o 4º e o 5º dedos. O camundongo é imediatamente virado de patas para cima para injeção. Nestes procedimentos, a agulha é introduzida no quadrante inferior direito ou esquerdo do abdômen (evitando a linha média) em direção à região cefálica.

4.3 INFECÇÃO EXPERIMENTAL E CÁLCULO DA PARASITEMIA

Os camundongos WT Swiss foram infectados via i.p. com 50.000 parasitas durante as passagens de manutenção da cepa Y de *T. cruzi*. Os camundongos WT C57BL/6 e deficientes foram infectados com 100 formas tripomastigotas sanguíneas para a experimentação animal. Em suma, o sangue de três animais infectados (+/- 0,1 mL/animal) foi adicionado a eppendorfs preenchidos com 0,1 mL de heparina; a suspensão foi diluída com 1 mL de PBS; os parasitas foram contados em 50 campos por microscopia ótica; após cálculo de parasitemia e de diluição, foram aplicadas injeções com 50.000 ou 100 parasitas via i.p. por animal.

Cálculo de parasitemia (Brenner, 1962):

$$\text{Parasitemia} = \frac{\text{número de parasitas} \times \text{fator de correção do microscópio (Fc=80)}}{\text{Volume aplicado na câmara}}$$

Volume aplicado na câmara

Ex: Se em 50 campos temos 10 parasitas

$$\Rightarrow 10(\text{par.}) \times 80(\text{Fc}) / 5 (\mu\text{L}) = 160 \text{ par.}/\mu\text{L};$$

Então, em 5 μL temos 800 parasitas.

>>Para 100 parasitas/animal;

$$100(\text{par.}) \times 5(\mu\text{L}) / 800(\text{par.}) = 0,625 \mu\text{L}; \text{ aplicar } 0,625 \mu\text{L} / \text{ animal.}$$

>>Para 50.000 parasitas/animal;

$$50.000(\text{par.}) \times 5(\mu\text{L}) / 800(\text{par.}) = 312,5 \mu\text{L}; \text{ aplicar } 312,5 \mu\text{L} / \text{ animal.}$$

A parasitemia e a sobrevivência dos camundongos WT C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-}, MyD88^{-/-} e Mal/TIRAP^{-/-} foram avaliadas no decorrer de 12 ou 40 dias de infecção, respectivamente.

4.4 COLETA DE SANGUE E EUTANÁSIA

Para coleta de sangue e posterior eutanásia, os camundongos foram anestesiados conforme recomendado pelo comitê de ética. Administramos os anestésicos por via i.p.: xilazina (12 mg/kg) e quetamina (70 mg/kg). Os animais foram dispostos em superfície lisa, tiveram a veia caudal lancetada por incisão com bisturi e o sangue coletado em eppendorfs. Logo em seguida, foi realizada a eutanásia por deslocamento cervical para posterior coleta do baço conforme detalhado a seguir. Sobre uma superfície lisa, segura-se o crânio do animal com uma mão (logo abaixo da orelha) e com a outra mão segura-se a cauda, puxa-se de forma firme a cauda do animal em direção oposta ao crânio de forma a romper a junção encéfalo-espinhal do sistema nervoso central. O sangue coletado dos animais foi utilizado para extração de soro e dosagem de citocinas por ELISA.

4.5 OBTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DE ESPLÊNOCITOS

O baço (órgão linfóide secundário) nos forneceu esplenócitos para os ensaios *ex vivo* e *in vitro*. Por citometria de fluxo, avaliamos a constituição e a proporção das células nos baços de animais saudáveis e infectados e verificamos o papel dos componentes da imunidade (Ex.: TLRs) em cada linhagem celular, inclusive após estimulação com os agonistas de TLR2 e TLR9 (Pam3Cys e CpGDNA). Para todos os experimentos, os baços dos animais foram macerados com êmbolos de seringas em placas de 12 poços contendo 1 mL de meio RPMI. As suspensões celulares foram pipetadas, separadas da cápsula esplênica e centrifugadas por 10 min a 700g / 4°C. Os *pellets* de células foram ressuspensos e incubados com tampão de lise de hemácias (ACK) por 10 min no gelo. Em seguida, as suspensões foram recentrifugadas e ressuspensas em meio RPMI. Estas células foram plaqueadas e utilizadas em ensaios de citometria de fluxo e de ELISA. Para tal, foram plaqueadas 2×10^6 células/poço em placas de 96 poços contendo RPMI+SFB10%. Os estímulos foram incubados em um volume final de 0,2 mL/poço.

4.6 FENOTIPAGEM DE ESPLÊNOCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Nos ensaios *ex vivo* de citometria de fluxo, a marcação dos esplenócitos foi realizada logo após a extração ou após incubação por 12h sem estimulação. Nos ensaios *in vitro*, as células foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços e incubadas por 12h / 37°C em meio RPMI-SFB10% contendo brefeldina A (1 µg/mL) contendo estímulos. A brefeldina não foi usada em ensaios de expressão de proteínas (principalmente TLRs). Os estímulos utilizados foram: CpG DNA (1 µg/mL), Pam3Cys (1 µg/mL), LPS (1

$\mu\text{g/mL}$) ou CpG DNA ($1 \mu\text{g/mL}$) + Pam3Cys ($1 \mu\text{g/mL}$). Para a fenotipagem celular, os esplenócitos foram identificados conforme a expressão de proteínas de superfície marcadas com anticorpos conjugados aos seguintes fluoróforos (Ly6C-eFluor 450, CD11c-Alexa Fluor 488, CD11b-PE-Cy7, CD8-PerCPCy5.5 e MHCII-APC ou F4/80-APC (eBioscience)). Para tal, as placas foram centrifugadas por 10 min a $700g / 4^\circ\text{C}$ e ressuspendidas em $50 \mu\text{L/poço}$ com dois diferentes coquetéis de anticorpos (I- Ly6C, CD11b, CD11c, CD8 e MHCII ou II- Ly6C, CD11b, CD11c, CD8 e F4/80) diluídos em PBS(1X)/SFB(2%). Em seguida, as placas foram mantidas a 4°C por 20 min, na ausência de luz, recentrifugadas e as células foram lavadas em um volume total de $0,2 \text{ mL/poço}$ (3x) com PBS(1X)/SFB(2%). Por último, as células foram fixadas com $0,1 \text{ mL}$ de solução de paraformaldeído (2%).

4.7 ANÁLISES DA EXPRESSÃO DE TLR2 E MARCADORES DE SUPERFÍCIE

Para avaliar a expressão de TLR2, o anticorpo monoclonal anti-TLR2-PE (eBioscience) foi adicionado simultaneamente com os anticorpos para marcação extracelular dos esplenócitos. Os experimentos foram feitos distintamente da marcação de citocinas e o uso de animais deficientes em TLR2 serviu como controle negativo para ligação de anticorpos; estratégia que nos permitiu definir a população positiva versus negativa.

4.8 ANÁLISES DA EXPRESSÃO DE TLR9 E PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Para avaliar a expressão de TLR9 e síntese de citocinas foi realizada a marcação intracelular logo após a marcação extracelular. Após as células serem marcadas com anticorpos para proteínas de superfície, elas foram permeabilizadas seguindo as instruções do kit (Fix/Perm kit; BD Biosciences), e incubadas com os anticorpos específicos para IL-10-PE (BD Biosciences – Pharmingen), IL-12-PE, TNF- α -PE ou TLR9-Biotina (eBioscience). Resumidamente, após a incubação por 20 min com os anticorpos de superfície, as células foram lavadas três vezes com PBS(1X)/SFB(2%). Em seguida, foram incubadas por 10 min com $100 \mu\text{L}$ de tampão *Cytofix/Cytoperm* para permeabilização inicial e lavadas (2x) com tampão *PermWash*. Os anticorpos diluídos em solução *PermWash* foram adicionados sobre as células e as placas foram mantidas a 4°C por 20 min, na ausência de luz. As células foram lavadas com tampão *PermWash* (2x) e fixadas com $0,1 \text{ mL}$ de solução de paraformaldeído (2%). Nos ensaios de expressão de TLR9, foi necessária uma etapa adicional de incubação por 10 min das células com estreptavidina-PE, entre a adição do anticorpo anti-TLR9-Biotina e a fixação com paraformaldeído. Todas as incubações foram realizadas em 4°C e na ausência de luz (condições mantidas até a aquisição dos dados). Nos ensaios que

avaliaram os efeitos da sinalização desencadeada por TLR2 sobre a produção de citocinas, os inibidores dos componentes das vias de sinalização foram adicionados sobre as células de animais selvagens 30 min antes da incubação com Pam3Cys4. As concentrações dos inibidores foram: Ly94002 (inibidor de PI3K (20 μ M)); AKTi (inibidor de AKT (10 μ M)); TAKi (inibidor de TAK (200nM)); Bay11-7082 (inibidor de I κ B/NF- κ B (20 μ M)); PD95049 (inibidor de ERK (MAPK) (40 μ M)).

4.9 PARÂMETROS AVALIADOS EM CITOMETRIA DE FLUXO

A aquisição dos dados de citometria de fluxo foi feita pelo analisador celular *LSRFortessa* (BD Biosciences – Immunocytometry Systems) usando o “*BD FACSDiva™ Software*” (BD Biosciences) e analisados pelo “*FlowJo Software (Tree Star)*”. Durante a análise dos dados, foram avaliadas as proporções celulares, os níveis de expressão dos marcadores celulares e de TLR2 e a produção das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-12. Utilizamos a citometria de fluxo como principal ferramenta para obtenção de dados deste trabalho, os quais foram analisados basicamente pela avaliação de três tipos de parâmetros (Número de Células Totais, Frequência e Intensidade de Fluorescência Média). Além destes parâmetros, o tamanho (FSC-A) e a granulosidade (SSC-A) das células também fornecem informações relevantes e podem ser expressos em hitogramas e *plots*. Por definição:

- Número de Células Totais (expresso em # de células / 10⁶ eventos adquiridos) (apresentação em gráficos) – valor absoluto referente ao número de eventos (no caso células) marcados positivamente para determinado parâmetro ligado a fluoróforo específico. (Ex: número de células TLR2^{hi} dentre 10⁶ eventos adquiridos). Um valor absoluto pode ser analisado por testes de médias, comparando tipos distintos de tratamentos.

- Frequência (expressa em %) (apresentação em gráficos e *plots*) – valor relativo ao número de eventos (no caso células) marcados positivamente para determinado parâmetro ligado a fluoróforo específico (Ex: porcentagem de células IL-10⁺, IL-12⁺, TNF- α ⁺ ou TLR2⁺ dentre 10⁶ eventos adquiridos). O valor obtido comporta-se como um valor absoluto e pode ser analisado por testes de médias, comparando tipos distintos de tratamentos.

- Intensidade de Fluorescência Média (expressa em MFI) (apresentação em gráficos, *dot plots* e hitogramas) – valor relativo à intensidade de marcação média de um parâmetro (anticorpo específico para uma proteína de interesse ligado a fluoróforo) em determinado evento (célula). Cada evento de uma unidade amostral possui um valor

arbitrário de MFI, assim, a média dos valores atribuídos a um elevado número de eventos adquiridos corresponde ao MFI total da amostra e pode ser analisado por testes de médias, comparando tipos distintos de tratamentos.

Em citometria de fluxo, podemos atribuir uma significância estatística de altíssima precisão a valores atribuídos a cada parâmetro devido ao elevado número de eventos coletados para cada unidade amostral (10^6 eventos). Portanto, cada valor obtido comporta-se de forma absoluta. Porém, para confirmar a exatidão dos resultados, demonstrando sua importância biológica, devem ser feitas repetições experimentais para garantir a correta e estatisticamente significativa interpretação dos dados.

4.10 PRODUÇÃO DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO (NO)

As citocinas (IL-12, IFN- γ e TNF- α) presentes em amostras de soro e no sobrenadante de cultura de esplenócitos de animais infectados com *T. cruzi* foram mensuradas pelo ensaio imunoenzimático ELISA. Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes dos kits BD OptEIA™ (Franklin Lakes, NJ, USA) e Duoset ELISA R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA). Em adição, o nitrito (óxido nítrico - NO) foi mensurado nas culturas de esplenócitos pela reação de Griess. As culturas de esplenócitos foram estimuladas com agonistas de TLRs por 48h para dosagem de IL-12, TNF- α e NO, e por 72h para dosagem de IFN- γ .

4.11 TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE MACRÓFAGOS

Os camundongos TLR9^{-/-} foram injetados por via intraperitoneal com 10^7 WT macrófagos do exsudato peritoneal como descrito anteriormente (Ford et al., 2012). Cinco dias depois, os camundongos foram infectados com *T. cruzi* (100 formas tripomastigotas sanguíneas por animal). Os baços foram coletados 7 d.p.i. e o fenótipo celular foi analisado conforme descrito na seção de análise por citometria de fluxo.

4.12 REAGENTES

Os reagentes utilizados foram obtidos da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA), exceto aqueles especificados a seguir. A sequência CpG DNA (TCGACGTTTGGATCGGT) utilizada é similar à encontrada no genoma do *T. cruzi* (Bartholomeu et al., 2008), foi sintetizada em um esqueleto fosforotioato e comprada do grupo *Coley Pharmaceutical* (Wellesley, MA, USA). O Pam3Cysk4 foi obtido da *InvivoGen* e os inibidores de sinalização da *Cell Signaling Technology Inc.*

4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A significância estatística dos dados foi determinada pelo teste de médias t de Student não pareado ou pela análise de variância (ANOVA) com pós-teste de médias Bonferroni. Os experimentos foram realizados com média \pm SD de 4 animais. * $p < 0,05$ ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ indicam significância estatística entre os valores obtidos. Para garantir a exatidão da resposta biológica é necessário que cada experimentação seja repetida isoladamente, no mínimo 2-3 vezes, para minimizar o efeito de qualquer fator externo à experimentação. Por sua vez, cada experimento deve conter um número de unidades amostrais homogêneas (mínimo de 4 animais) capazes de caracterizar a resposta obtida sobre o parâmetro avaliado.

Número total de células, frequência e MFI seguem um tipo de resposta quantitativa contínua, ou seja, resultam de uma mensuração, cujos valores formam um intervalo de números reais. Neste tipo de resposta, os dados são geralmente resumidos na forma de médias, variâncias e suas derivações. Com o objetivo de saber se os grupos comparados diferem ou não em relação à resposta de interesse, podemos estimar as médias destes parâmetros e compará-las por testes de médias, dentre eles, o teste t de Student não pareado. Na avaliação de nossos resultados o teste t nos supriu quanto ao nível de significância estatística que demandamos, além de ser um tipo de análise comumente utilizado em experimentos de citometria de fluxo. Quando necessário e possível realizamos a ANOVA dos dados e aplicamos o pós-teste Bonferroni.

5. RESULTADOS

5.1 TLRs E ADAPTADORES INFLUENCIAM A INFECÇÃO POR *T. cruzi*

A descoberta do envolvimento dos receptores da imunidade inata no reconhecimento imunológico impulsionou o entendimento sobre como os diferentes padrões de respostas inflamatórias são elicitados frente aos inúmeros estímulos aos quais um indivíduo pode ser exposto. No contexto desta revolução, tem sido visto que o recrutamento diferencial de receptores e moléculas sinalizantes desencadeia processos inflamatórios divergentes. Por isto, investigamos o envolvimento dos receptores TLR2 e TLR9 e das moléculas adaptadoras Mal/TIRAP e MyD88 na elaboração da resposta imune durante a fase aguda da infecção com *T. cruzi*.

Após infecção experimental com 100 formas tripomastigotas da cepa Y, o pico de parasitemia foi detectado entre o sexto e décimo segundo dia pós-infecção (d.p.i.) e o início da mortalidade iniciou a partir do décimo d.p.i. (Fig. 6). Quando avaliamos o efeito da depleção de receptores e adaptadores sobre estes parâmetros de virulência, observamos que os animais TLR9^{-/-} e MyD88^{-/-} apresentaram elevadas parasitemias em relação ao grupo selvagem (WT C57BL/6) (Fig. 6A), correlacionando com uma maior mortalidade dos animais deficientes (Fig. 6B). Por outro lado, os animais TLR2^{-/-} e Mal/TIRAP^{-/-} apresentaram parasitemias inferiores (Fig. 6A) e menor mortalidade (Fig. 6B). De fato, os animais TLR2^{-/-} e Mal/TIRAP^{-/-} resistiram à infecção, contrastando com a alta suscetibilidade dos animais TLR9^{-/-} e MyD88^{-/-} (Fig. 6B). Estes dados mostram que TLR9 e MyD88 foram essenciais para o controle da replicação do *T. cruzi*, enquanto que TLR2 e Mal/TIRAP apresentaram função complementar na resposta imune durante a fase aguda da infecção, potencialmente imunorreguladora.

Portanto, o perfil de resposta imune durante a infecção por *T. cruzi* foi caracterizado pela dicotomia no uso de TLRs e adaptadores. Um exemplo de estratégia possivelmente comum em outros processos inflamatórios.

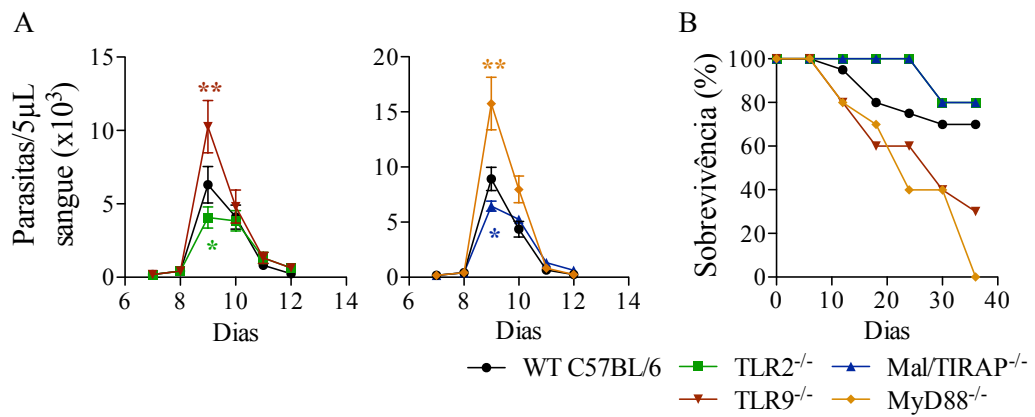


FIGURA 6 – Curvas de parasitemia e sobrevivência de animais deficientes.

A, Parasitemia em camundongos selvagens (WT C57BL/6) e deficientes (TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-}, Mal/TIRAP^{-/-} e MyD88^{-/-}) nos primeiros dias de infecção experimental com 100 formas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*;

B, Mortalidade de animais na fase aguda de infecção com *T. cruzi*.

*P<0,05 e **P<0,01 indicam significância estatística entre os grupos de animais selvagens *versus* deficientes pela análise de médias com o teste t de Student.

Dados representativos de dois experimentos independentes.

5.2 A COOPERAÇÃO ENTRE TLRs DIRECIONA A RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Conforme apresentado na Figura 6, os TLR2 e TLR9 afetaram diferencialmente os parâmetros de virulência do parasita, interferindo na suscetibilidade à infecção. Por isto, investigamos o papel dos receptores no processo inflamatório.

5.2.1 A depleção de TLRs desregula o perfil pró-inflamatório

A liberação de citocinas pró-inflamatórias segue o primeiro pico de parasitemia na fase aguda da infecção e elas são responsáveis pelo controle da replicação do *T. cruzi*. A fim de avaliar o envolvimento de TLRs na fase inicial da elicitação da resposta pró-inflamatória, mensuramos a presença de IL-12/IL-23p40, IFN- γ e TNF- α no soro de animais TLR deficientes no sétimo dia de infecção e em cultura de esplenócitos (Fig. 7).

Por ELISA, detectamos a subunidade proteica p40, a qual compõe as citocinas IL-12 e IL-23. Acreditamos que esta subunidade correspondeu à IL-12 neste estudo, pois a produção de IFN- γ acompanhou a liberação de IL-12/IL-23p40. Somente IL-12 induz síntese significativa de IFN- γ (Sieve et al., 2010). A deficiência em TLR9 correlacionou com uma diminuição acentuada dos níveis de IL-12/IL-23p40 e IFN- γ no soro e em cultura, implicando o receptor como fator imunoestimulador da resposta Th1 (Fig. 7A). Em paralelo, os níveis de TNF- α mantiveram-se elevados nas mesmas condições, sugerindo que o TLR9 não é essencial para sua síntese (Fig. 7B).

Quando avaliamos o envolvimento de TLR2 na produção de citocinas, observamos que ele atuou na liberação de TNF- α , uma vez que houve redução de cerca de 40% da citocina no soro e em cultura de esplenócitos de animais TLR2^{-/-} infectados. Esta relação entre TLR2 e TNF- α denotou uma função pró-inflamatória ao receptor (Fig. 7B). Em paralelo, o aumento significativo na liberação de IFN- γ e IL-12/IL-23p40 na ausência de TLR2 evidenciou a função imunorreguladora do receptor (Fig. 7A).

Por sua vez, os níveis de citocinas no soro e em cultura de esplenócitos de camundongos TLR4^{-/-} foram similares aos do grupo controle selvagem, indicando que este receptor não foi essencial para a produção das citocinas avaliadas (Fig. 7A e B).

Estes dados ressaltaram o envolvimento diferencial de TLR2 e TLR9 na liberação de TNF- α , IL-12 e IFN- γ . Por isto, acreditamos que a cooperação entre receptores conduziu ao balanceamento do perfil citocinêmico que caracteriza a progressão da resposta inflamatória contra o *T. cruzi*.

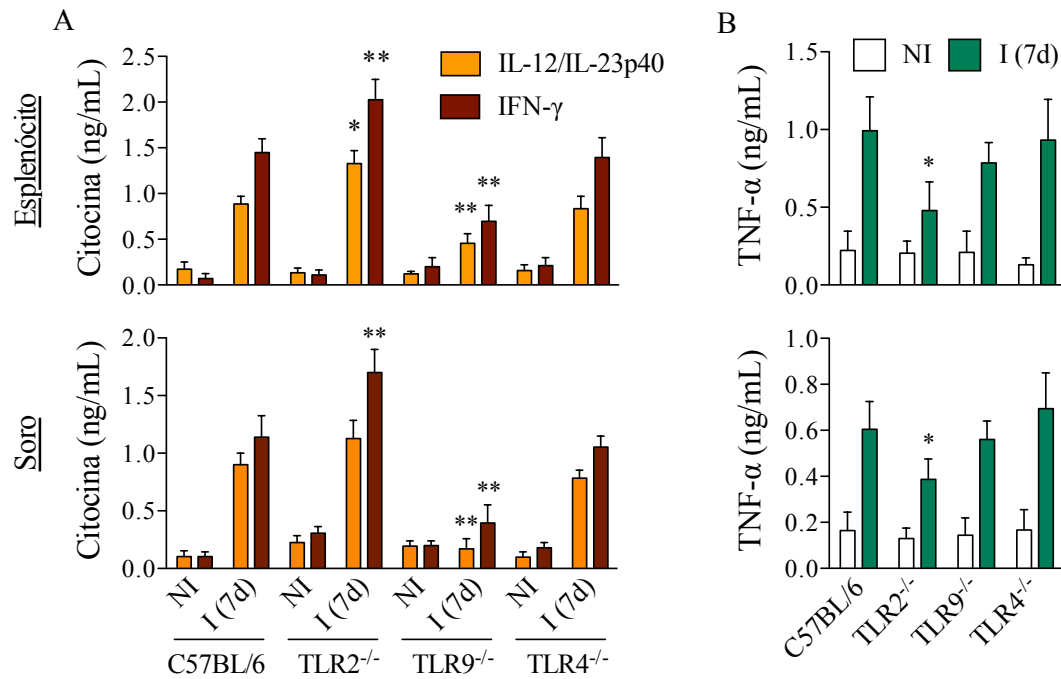


FIGURA 7 – Resposta pró-inflamatória de camundongos TLR deficientes.

A, Níveis de IL-12/IL-23p40 e IFN- γ em cultura de esplenócitos (48 e 72h, respectivamente) e soro de animais WT C57BL/6, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} e TLR9^{-/-} não infectados (NI) ou após 7 d.p.i. (I (7d));

B, Níveis de TNF- α em cultura de esplenócitos (48h) e soro de animais WT, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} e TLR9^{-/-} após sete dias de infecção.

*P<0,05 e **P<0,01 indicam significância estatística pela análise de médias com o teste t de Student ou pela ANOVA seguida do teste de Bonferroni entre os níveis de citocinas de células de animais infectados, deficientes *versus* WT.

Os dados representam dois experimentos independentes (média \pm SD de 4 animais).

5.2.2 A infecção promove priming pró-inflamatório

Em seguida, comparamos a capacidade de liberação de citocinas pró-inflamatórias por esplenócitos de animais deficientes após estimulação com os agonistas de TLR2 (Pam3Cys), TLR4 (lipopolissacarídeo – LPS) e TLR9 (CpG DNA).

Primeiramente, verificamos que as células dos animais infectados produziram níveis elevados de IL-12 e TNF- α em relação às células dos animais não infectados, nas mesmas condições. Em adição, a liberação espontânea de citocinas por esplenócitos de animais infectados foi potencializada *in vitro* na presença de agonistas de TLRs, caracterizando o efeito *priming* inflamatório induzido pela infecção (Fig. 8A).

Neste contexto, os esplenócitos de animais selvagens infectados liberaram cerca de 5 vezes mais IL-12 quando estimulados com CpG DNA, demonstrando a importância do TLR9 no estabelecimento e amplificação da resposta Th1. Da mesma forma, a relação do TLR2 com a síntese de TNF- α foi confirmada quando as células infectadas foram estimuladas com Pam3Cys, pois houve um aumento de 2 vezes na liberação da citocina. Entretanto, não houve variação significativa na produção das citocinas na presença de LPS, corroborando que o TLR4 não foi fundamental para sua síntese (Fig. 8A).

Em seguida, avaliamos os efeitos da depleção de TLRs sobre o *priming* inflamatório. Observamos que na ausência de TLR2, houve uma elevada liberação de IL-12 por esplenócitos infectados, principalmente quando estimulados por CpG DNA. Além disto, houve uma compensação na produção de TNF- α induzida por CpG DNA, indicando que o TLR2 assumiu a produção de TNF- α ao inibir TLR9. Isto evidencia o papel imunomodulador do TLR2 (Fig. 8B).

Em contraste, houve uma baixa liberação de IL-12 na ausência de TLR9, mesmo na presença de Pam3Cys e LPS, demonstrando que a produção desta citocina foi intimamente ligada à presença do receptor durante a infecção por *T. cruzi* (Fig. 8C). Isto sugere que a alta susceptibilidade dos camundongos TLR9^{-/-} à infecção esteve diretamente associada à escassez da síntese de IL-12, citocina essencial para estabelecer o perfil pró-inflamatório que orquestra o sistema imune no controle da replicação do *T. cruzi*.

Em suma, a dicotomia na síntese de citocinas por diferentes agonistas evidenciou que o mecanismo de cooperação entre receptores controlou a resposta inflamatória durante a infecção.

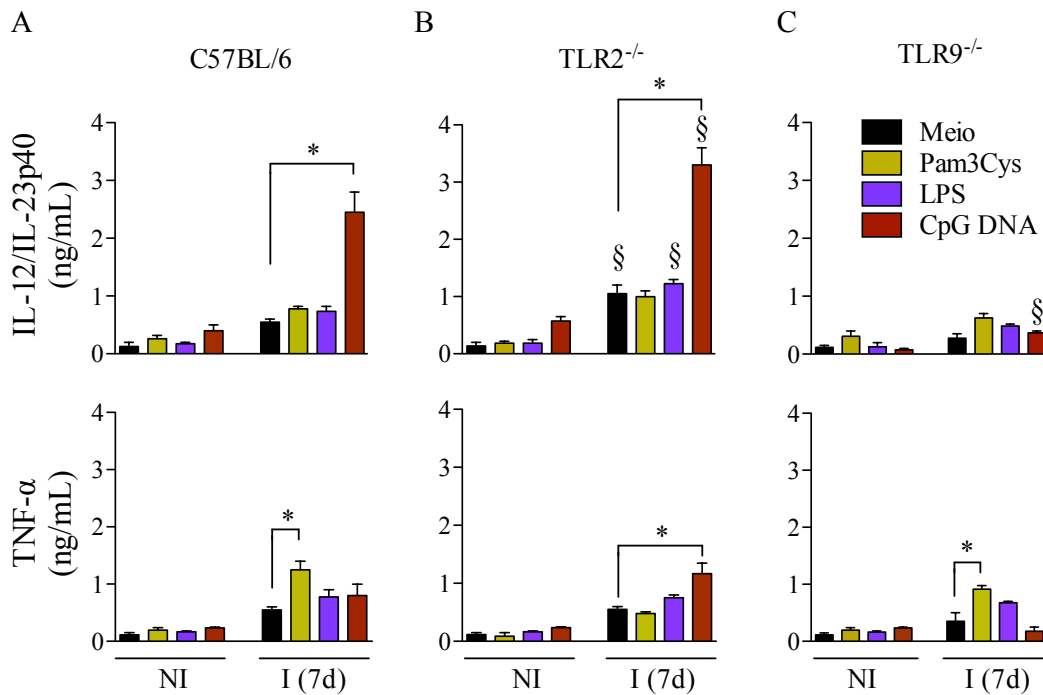


FIGURA 8 – Efeito dos agonistas de TLRs sobre a resposta pró-inflamatória.

A liberação de IL-12/IL-23p40 e TNF- α por esplenócitos de camundongos infectados com *T. cruzi* (7 d.p.i.) foi mensurada, por ELISA, após incubação com agonistas de TLRs por 48h. Pam3Cys (1 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL) e CpG DNA (1 μ g/mL).

A, Níveis de citocinas no sobrenadante de cultura de células de animais WT C57BL/6;

B, Níveis de citocinas no sobrenadante de cultura de células de animais TLR2^{-/-};

C, Níveis de citocinas no sobrenadante de cultura de células de animais TLR9^{-/-}.

*p<0,05 indica significância estatística pela ANOVA e teste de Bonferroni.

§P<0.05 indica significância estatística pelo teste t de Student entre os níveis médios de citocinas de células de animais infectados nas mesmas condições de estímulos, deficiente *versus* WT.

Dados representativos de dois experimentos independentes (Média \pm SD de 4 animais).

5.2.3 O eixo sinalizatório TLR2:Mal/TIRAP regula a inflamação

Assim como ocorreu com os receptores, os adaptadores da sinalização de TLRs (MyD88 e Mal/TIRAP) afetaram de forma divergente a virulência do *T. cruzi* (Fig. 6). Apesar de bem conhecido o papel de MyD88 na produção de citocinas inflamatórias gatilhada por TLRs, a participação de Mal/TIRAP não é totalmente esclarecida. Inicialmente reconhecido como recrutador de MyD88, outras funções têm sido atribuídas a Mal/TIRAP, incluindo a função moduladora da sinalização dos TLRs. Portanto, investigamos o envolvimento deste adaptador sobre a liberação de citocinas (IL-12 e IFN- γ) e do metabólito ativo (óxido nítrico – NO), os quais são essenciais no controle da replicação parasitária.

Desta forma, observamos que os esplenócitos de camundongos deficientes em TLR2 e Mal/TIRAP apresentaram níveis elevados das citocinas e de NO em comparação com os animais selvagens, indicando que o eixo sinalizatório TLR2:Mal/TIRAP possui um potencial imunorregulador sobre a produção de produtos pró-inflamatórios durante a fase aguda da infecção (Fig. 9).

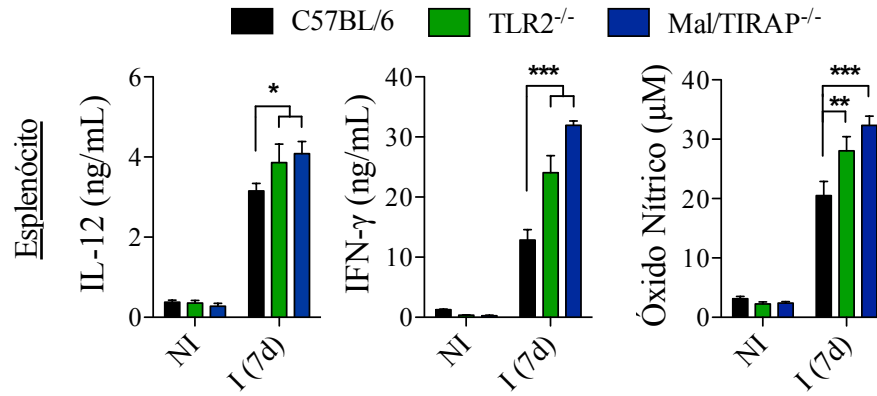


FIGURA 9 – Resposta pró-inflamatória de camundongos *Mal/TIRAP* deficientes.

Níveis de IL-12/IL-23p40, IFN- γ e NO (após 48, 72 e 48h, respectivamente) em cultura de esplenócitos de animais WT C57BL/6, TLR2^{-/-} e Mal/TIRAP^{-/-} infectados (7 d.p.i.).

*P<0,05 **P<0,01 e ***P<0,001 indicam significância estatística pela ANOVA seguida do teste de Bonferroni.

Os dados representam dois experimentos independentes (média \pm SD de 4 animais).

5.3 ESPLÊNOCITOS QUE EXPRESSAM TLRs

A celularidade dos diferentes órgãos do sistema imune determina os níveis e qualidade de produção de citocinas durante um processo inflamatório. Por isto, buscamos identificar dentre as células do eixo fagocítico mononuclear no baço, aquelas que expressam os receptores TLR2 e TLR9 e sintetizam citocinas durante a infecção.

5.3.1 Fenotipagem de fagócitos mononucleares esplênicos

A identificação de monócitos, macrófagos e DCs foi realizada em ensaios de citometria de fluxo pela análise da expressão diferencial das proteínas de membrana: F4/80, CD11b, MHCII, CD11c e Ly6C. Para tal, os esplenócitos de animais com até sete dias de infecção foram extraídos e caracterizados conforme estratégia apresentada na Figura 10 e Figura Suplementar 22. Resumidamente, as células de interesse foram selecionadas nas interpolações de tamanho *versus* granulosidade (FSC-A x SSC-H e FSC-A x SSC-H) (Fig. 10A) e analisadas quanto à expressão dos marcadores citados acima. A interpolação (CD11c x MHCII) identificou células dendríticas “clássicas” (cDC-MHCII^{hi}CD11c^{hi}) (Fig. 10B), enquanto que a interpolação (CD11b x F4/80) identificou monócitos (Mo-F4/80^{lo}CD11b^{hi}) e macrófagos “clássicos” (cMφ-F4/80^{hi}CD11b^{lo}) (Fig. 10C). Uma forma alternativa, mais completa, de identificar monócitos inflamatórios (Mo-CD11b^{hi}MHCII^{lo}CD11c⁺Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi}) foi feita pela interpolação (MHCII x CD11b) seguida de (CD11c x Ly6C) (Fig. 10D).

Verificamos a presença de cDCs, cMφs e Mo_s no baço dos camundongos saudáveis. Porém, o padrão da composição celular foi alterado durante a infecção com a cepa Y do *T. cruzi*, havendo uma redução da frequência de cDCs (de 1,4 para 0,8%) e um aumento da frequência de cMφs (de 1,9 para 2,5%) e de Mo_s (de 6,8 para 16,2%) (Fig. 10B e C). Logo, houve um remodelamento de celularidade esplênica induzida pela infecção. Além disto, os monócitos inflamatórios estiveram entre as principais células emergentes no baço de animais agudamente infectados (Fig. 10D) e foram classificados em dois grupos conforme a expressão de Ly6C: Mo-F4/80^{lo}CD11b^{hi}MHCII^{lo}CD11c⁺Ly6C^{hi} e Mo-F4/80^{lo}CD11b^{hi}MHCII^{lo}CD11c⁺Ly6C^{lo} (Fig. 10D e E). Chamamos esta emergência celular de “recrutamento”, a qual pode ser devido à diferenciação *in situ* de células precursoras ou por migração de células diferenciadas em estágios pré-esplênicos oriundas da medula óssea e sangue. Os monócitos inflamatórios, cDCs e cMφs residentes apresentaram níveis distintos de expressão dos marcadores de superfície (Fig. 10E).

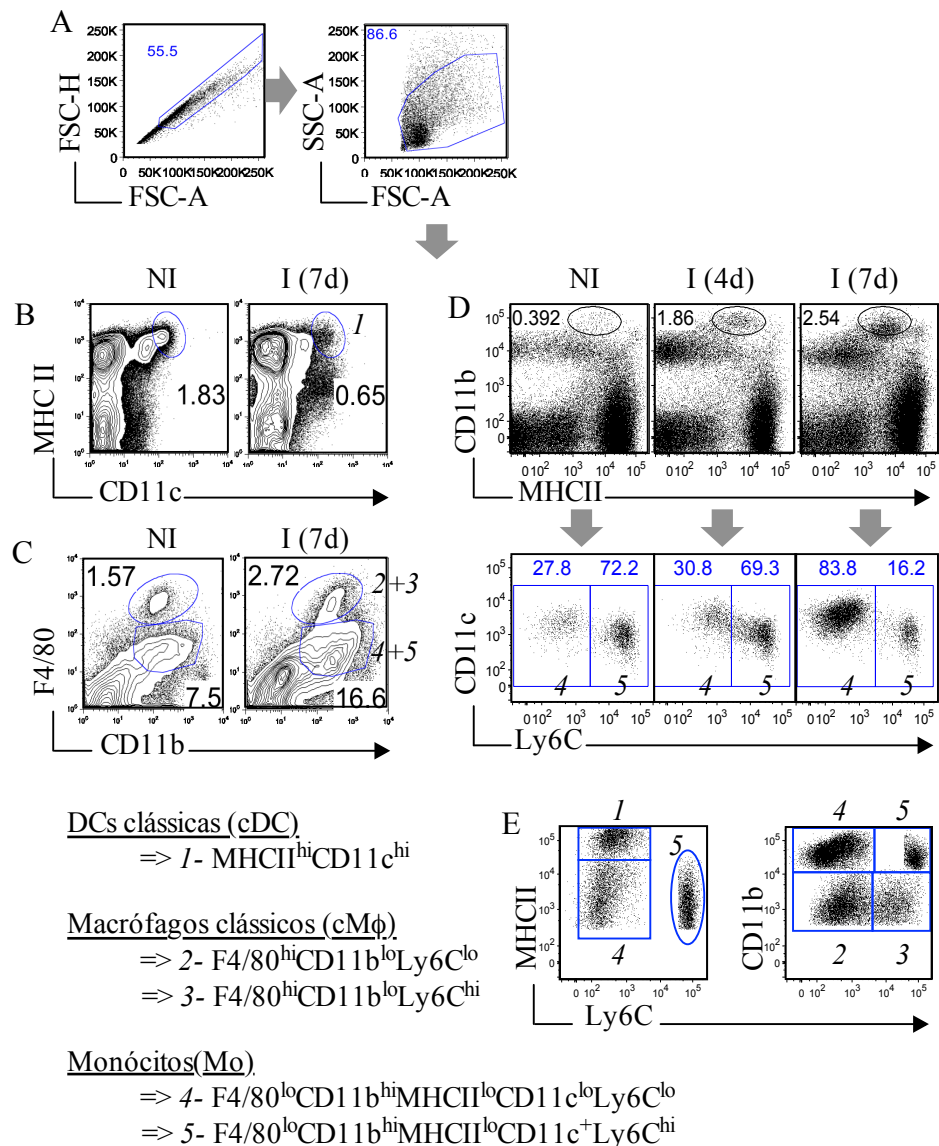


FIGURA 10 – Identificação de células do eixo fagocítico mononuclear no baço.

A expressão diferencial de marcadores de superfície identificou monócitos, macrófagos e células dendríticas no baço de animais saudáveis e infectados (0, 4 e 7 d.p.i.).

A, Os *gates* no primeiro (FSC-A x FSC-H) e segundo (FSC-A x SSC-A) *dot plots* eliminam debris e dupletos, permitindo a seleção de células como:

B, DCs “clássicas” (cDC-MHCII^{hi}CD11c^{hi});

C, Monócitos (Mo-F4/80^{lo}CD11b^{hi}) e macrófagos “clássicos” (cMφ-F4/80^{hi}CD11b^{lo});

D, Os *gates* nas interpolações (MHCII x CD11b) e (Ly6C x CD11c) selecionam Mo-Ly6C^{hi/lo} (CD11b^{hi}MHCII^{lo}CD11c⁺) e excluem demais populações (Ex.: linfócitos T e B, cDCs, cMφs, precursores [cMoP, pre-cDC]);

E, Os *gates* nas interpolações (Ly6C x MHCII) e (Ly6C x CD11b) mostram a expressão diferencial de marcadores em cDCs, cMφs-Ly6C^{hi/lo} e Mo-Ly6C^{hi/lo}.

5.3.2 Expressão de TLRs em fagócitos mononucleares

Um importante efeito do *priming* inflamatório durante infecções envolve a modulação de expressão de receptores da imunidade e, conseqüentemente, o grau de maturação/ativação celular. Por isto, comparamos as expressões dos TLR2 e TLR9 em diferentes populações celulares do eixo fagocítico mononuclear esplênico de camundongos saudáveis e infectados com *T. cruzi*.

Ao avaliar os níveis de expressão dos receptores em cDCs (MHCII^{hi}CD11c^{hi}) e cMφs (F4/80^{hi}CD11b^{lo}), observamos níveis elevados de TLR2 em cMφs e de TLR9 em cDCs, demonstrando a importância destes receptores para cada tipo celular. Ambas as células expressaram TLRs constitutivamente, porém, os níveis de expressão dos receptores sofreram alterações durante a infecção. De fato, a expressão de TLR9 aumentou em cDCs e diminuiu nos cMφs, o que indica possíveis regulações positiva e negativa de funções, respectivamente. Quanto aos níveis do TLR2, não detectamos diferença significativa de expressão em macrófagos na fase inicial da infecção. Entretanto, o aumento da expressão de TLR2 em cDCs sugeriu que o receptor apresenta função nestas células (Fig. 11A).

Os monócitos também têm expressão constitutiva de TLRs. De fato, as células CD11b^{hi}MHCII^{lo} corresponderam à principal população esplênica que expressou os mais elevados níveis de TLR2, o que foi confirmado com a utilização de animais deficientes neste receptor. Além disto, as duas populações esplênicas de monócitos inflamatórios (CD11b^{hi}MHCII^{lo}CD11c⁺Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi}) produziram TNF-α quando estimuladas com Pam3Cys, demonstrando vias funcionais de TLRs (Fig. 11B).

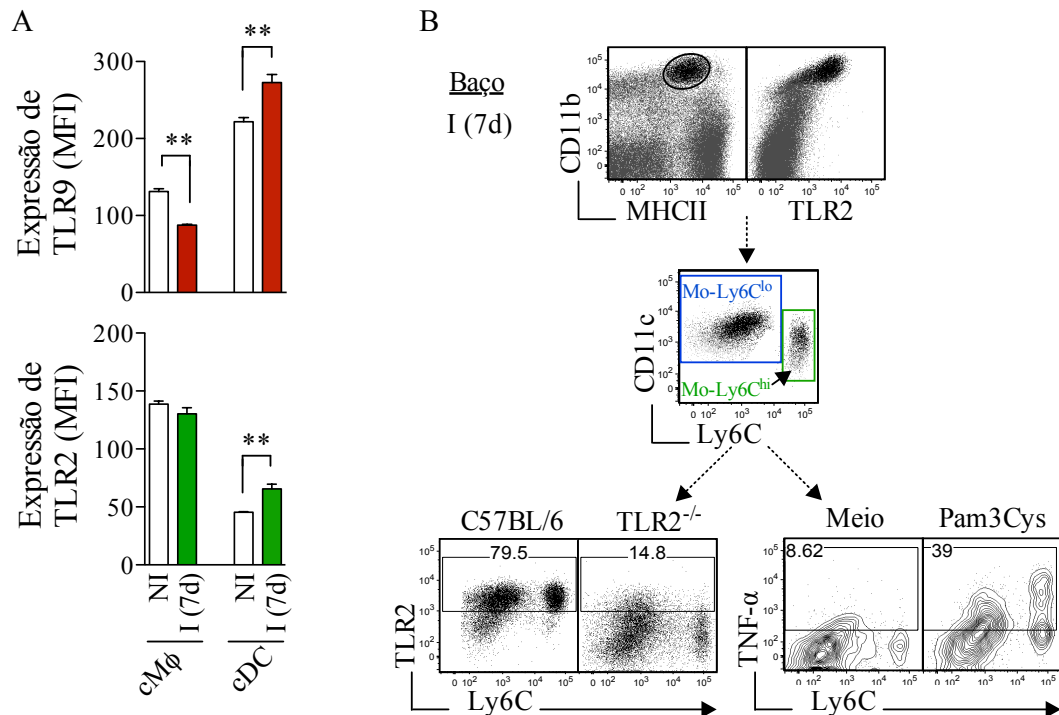


FIGURA 11 – Expressão de TLRs em esplenócitos de animais infectados.

A, A intensidade de fluorescência média (MFI) indica o nível de expressão de TLR2 e TLR9 em cMφs-F4/80^{hi}CD11b^{lo} e cDCs-MHCII^{hi}CD11c^{hi} de animais WT C57BL/6 infectados (7 d.p.i.);

B, As interpolações (MHCII ou TLR2 x CD11b) seguidas de (Ly6C x CD11c) selecionam duas populações de monócitos inflamatórios (CD11b^{hi}MHCII^{lo}CD11c⁺Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi}) responsivas ao agonista de TLR2 (TNF-α⁺).

p<0,01 e *p<0,001 indicam significância estatística pela análise de médias com o teste t de Student.

Dados representativos de dois experimentos independentes (Média ± SD de 4 animais).

5.4 TLRS CONTROLAM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE ESPLÊNOCITOS

As células do eixo fagocítico mononuclear são potentes produtoras de citocinas em resposta à ativação de TLRs. Por isto, avaliamos por citometria de fluxo, a capacidade de produção espontânea (*ex vivo*) de TNF- α e IL-12 por esplenócitos de animais infectados com *T. cruzi* (7 d.p.i.). Em seguida, avaliamos a produção induzida (*in vitro*) das citocinas em resposta aos agonistas de TLR.

5.4.1 Imunopredileção de macrófagos e DCs por TLRs

Ao comparar a capacidade de produção de IL-12, observamos um aumento significativo da porcentagem de cDC-IL-12⁺ em camundongos WT infectados, com cerca de 14% das cDCs comprometidas com a produção da citocina. Em paralelo, não houve alteração da porcentagem de cM ϕ -IL-12⁺. Isto sugere que as cDCs foram fontes de IL-12 neste modelo. Em adição, os cM ϕ s produziram TNF- α , pois houve um aumento na porcentagem de cM ϕ -TNF- α ⁺ no baço de animais infectados (~14%), enquanto não houve variação no teor de cDC-TNF- α ⁺. Ao avaliar os monócitos, não detectamos a contribuição na síntese, *ex vivo*, de IL-12 ou TNF- α . Assim, concluímos que durante a infecção aguda por *T. cruzi*, as cDCs e os cM ϕ s foram fontes importantes para a manutenção dos níveis de IL-12 e TNF- α , respectivamente (Fig. 12A-B).

Em seguida, avaliamos o envolvimento dos TLR2 e TLR9 na síntese de TNF- α e IL-12 (Fig. 12C-D), pois ambos os receptores são comumente expressos em cDCs e cM ϕ s. Observamos que a depleção de TLR9 impactou sobre a produção de IL-12 por cDCs, reduzindo sua capacidade de resposta durante a infecção. O que não ocorreu na ausência de TLR2. Além disso, não houve produção de IL-12 por cM ϕ s de animais TLR9^{-/-} (Fig. 12C). Isto demonstrou que a especialização no uso de TLR9 por cDCs foi fundamental para a produção de IL-12, e conseqüentemente, sobre o *priming* pró-inflamatório Th1 durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Paralelamente, houve uma redução na frequência de cM ϕ s-TNF- α ⁺ na ausência do TLR2, o que não foi visto na ausência de TLR9. Além disso, não houve produção de TNF- α por cDCs de animais TLR2^{-/-} (Fig. 12D). Isto demonstrou que a especialização no uso de TLR2 por cM ϕ s foi fundamental na produção de TNF- α e vinculada ao papel pró-inflamatório do receptor.

Logo, os TLR9 e TLR2 são críticos para a produção de IL-12 por cDCs e de TNF- α por cM ϕ s, respectivamente. Esta polarização na síntese de citocinas pró-inflamatórias evidenciou que a predileção por receptores é um ponto determinante na cooperação entre diferentes células.

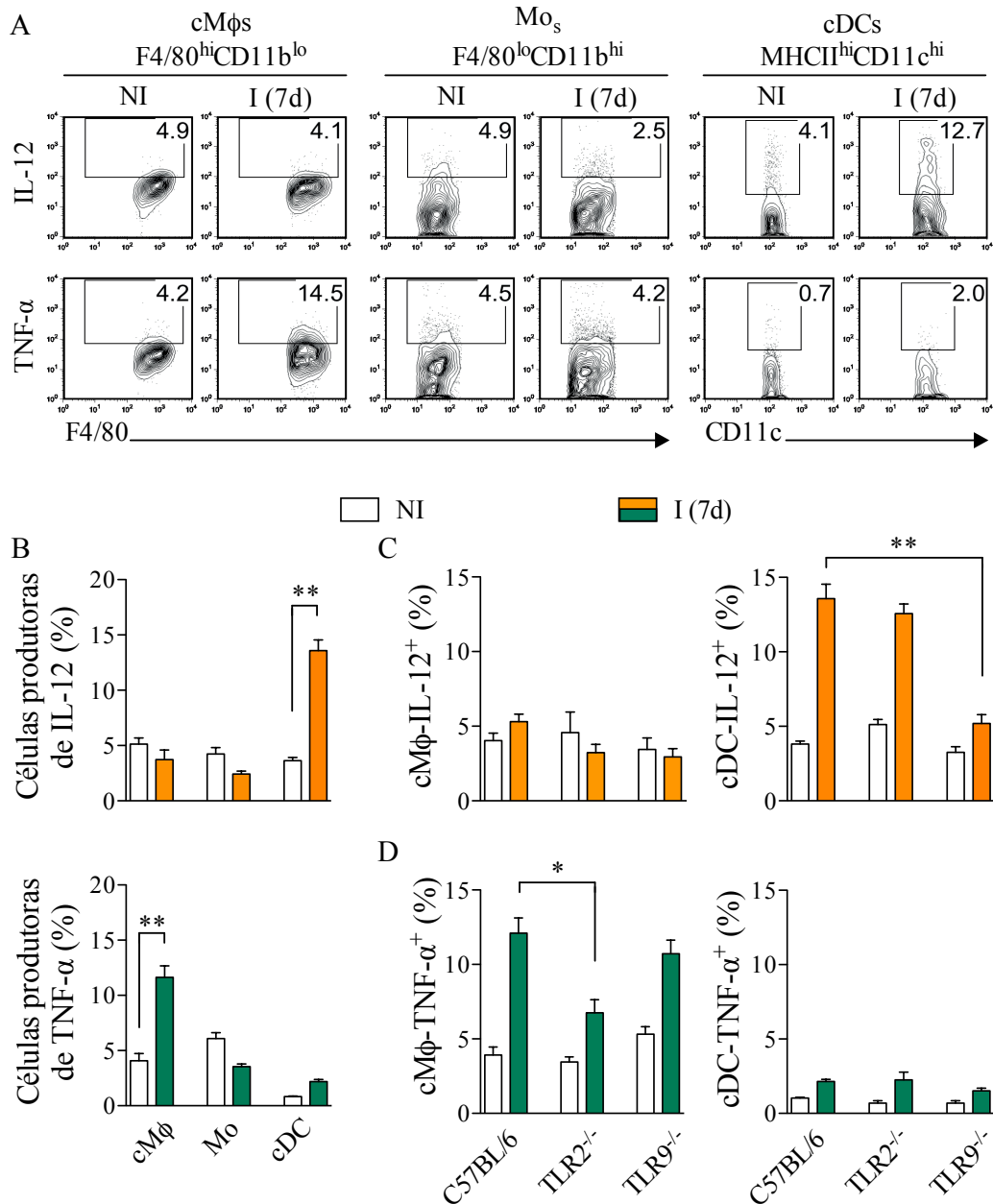


FIGURA 12 – Produção ex vivo de TNF- α e IL-12 por esplenócitos.

A, Contour plots representando a marcação intracelular de citocinas em esplenócitos de camundongos WT C57BL/6 infectados (7 d.p.i.);

B, Frequências de esplenócitos produtores de IL-12 e TNF- α de animais WT infectados;

C, Frequências de cMφs-IL-12⁺ e cDCs-IL-12⁺ no baço de animais WT, TLR2^{-/-} e TLR9^{-/-} infectados;

D, Frequências de cMφs-TNF- α ⁺ e cDCs-TNF- α ⁺ no baço de animais WT, TLR2^{-/-} e TLR9^{-/-} infectados.

*p<0,05 e **p<0,01 indicam ignificância estatística pela ANOVA e teste de Bonferroni.

Dados representativos de dois experimentos independentes (média \pm SD de 4 animais).

5.4.2 Responsividade de esplenócitos a agonistas de TLRs

Em seguida, comparamos por citometria de fluxo, a capacidade de resposta de cDCs, M ϕ s e Mo $_s$ aos agonistas de TLRs para confirmar a relação entre célula, receptor e produção de citocinas durante a infecção por *T. cruzi*.

Primeiramente, observamos um aumento da frequência de cM ϕ e Mo-(F4/80^{lo}CD11b^{hi}) de animais saudáveis e infectados sintetizando TNF- α após estimulação com Pam3Cys e LPS, ressaltando a funcionalidade da via dos TLRs nestas linhagens. Em adição, os Mo $_s$ demonstraram capacidade de produção de IL-12 em resposta ao LPS, via receptor não relacionado à dicotomia TLR2/TLR9 (Fig. 13A). Paralelamente, cerca de 40% das cDCs se comprometeram com a produção de IL-12 após estimulação com CpG DNA, destacando sua predileção por TLR9. Além disso, a infecção induziu um aumento da frequência de cDC-IL12⁺ (Fig. 13B). Estes dados confirmaram a relação entre cM ϕ :TLR2:TNF- α e entre cDCs:TLR9:IL-12, além de mostrar que os Mo $_s$ produzem citocinas em resposta aos agonistas de TLRs.

Em contraste, houve uma redução drástica no teor de M ϕ s e Mo $_s$ responsivos ao agonista de TLR9 durante a infecção, pois o CpG DNA induziu uma menor porcentagem de células a produzir TNF- α e IL-12 em animais infectados quando comparado aos saudáveis. De fato, a quantidade de monócitos hábeis reduziu em até 70% com a infecção (Fig. 13B). Esta hiporresponsividade foi peculiar ao TLR9, pois a infecção não alterou as frequências de Mo $_s$ /cM ϕ s capazes de responder aos agonistas de TLR2 e TLR4 (Fig. 13A). O mesmo fenômeno ocorreu com as células de animais TLR2 deficientes estimuladas com CpG DNA, excluindo que o TLR2 tenha papel modulador sobre a resposta do TLR9 (não mostrado).

O aumento da responsividade de cDCs e a diminuição de cM ϕ s ao agonista de TLR9 correlacionaram com as variações desiguais das expressões do receptor nestas células (Fig. 11A). Logo, o TLR9 se mostrou um marcador do estado inflamatório das cDCs, enquanto foi regulado negativamente em Mo/cM ϕ . Isto impactou diretamente sobre a capacidade de produção de citocinas e relacionou o *priming* inflamatório induzido pela infecção como sendo um potencial de especialização de cDCs mediado pela expressão do receptor.

Neste contexto, hipotetizamos que o controle das respostas de TLR9 nas linhagens de Mo/cM ϕ s envolvesse o microambiente inflamatório, mais especificamente, a ativação de cDCs. Para testar esta hipótese, purificamos cM ϕ s de camundongos peritoneais WT C57BL/6 (>90% de células F4/80⁺) e os transferimos para animais TLR9^{-/-} (Rec TLR9^{-/-}), cuja atividade inflamatória das cDCs foi consideravelmente

reduzida. Cinco dias depois, infectamos camundongos WT, TLR9^{-/-} e Rec TLR9^{-/-} e coletamos seus esplenócitos no sétimo dia de infecção. Primeiramente, confirmamos que cDCs de animais Rec TLR9^{-/-} foram incapazes de produzir IL-12 em resposta ao CpG DNA. Em seguida, ao comparar as frequências de cMφs-IL-12⁺ em animais WT e Rec TLR9^{-/-}, vimos que a hiporresponsividade dos cMφs de camundongos WT I ao CpG DNA foi revertida nos Rec TLR9^{-/-} I. De fato, foram encontrados cerca de 18% de cMφs-IL-12⁺ em camundongos Rec TLR9^{-/-} I, 11% em Rec TLR9^{-/-} NI e 7% em WT I (Fig. 13C). Quando a mesma transferência de cMφs selvagens foi realizada em camundongos TLR2^{-/-}, os quais possuem atividade pró-inflamatória das cDCs, a hiporresponsividade ao agonista de TLR9 por cMφs não foi restaurada (dado não mostrado).

De acordo com estes dados, a transferência adotiva de macrófagos selvagens para camundongos TLR9^{-/-} permitiu que os cMφs recuperassem a resposta ao agonista de TLR9 (visualizada pela produção de IL-12) na ausência da atividade inflamatória das cDCs. Portanto, estabelecemos uma correlação entre o estado inflamatório de cDCs com a capacidade dos cMφs em responder ao agonista do TLR9 durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

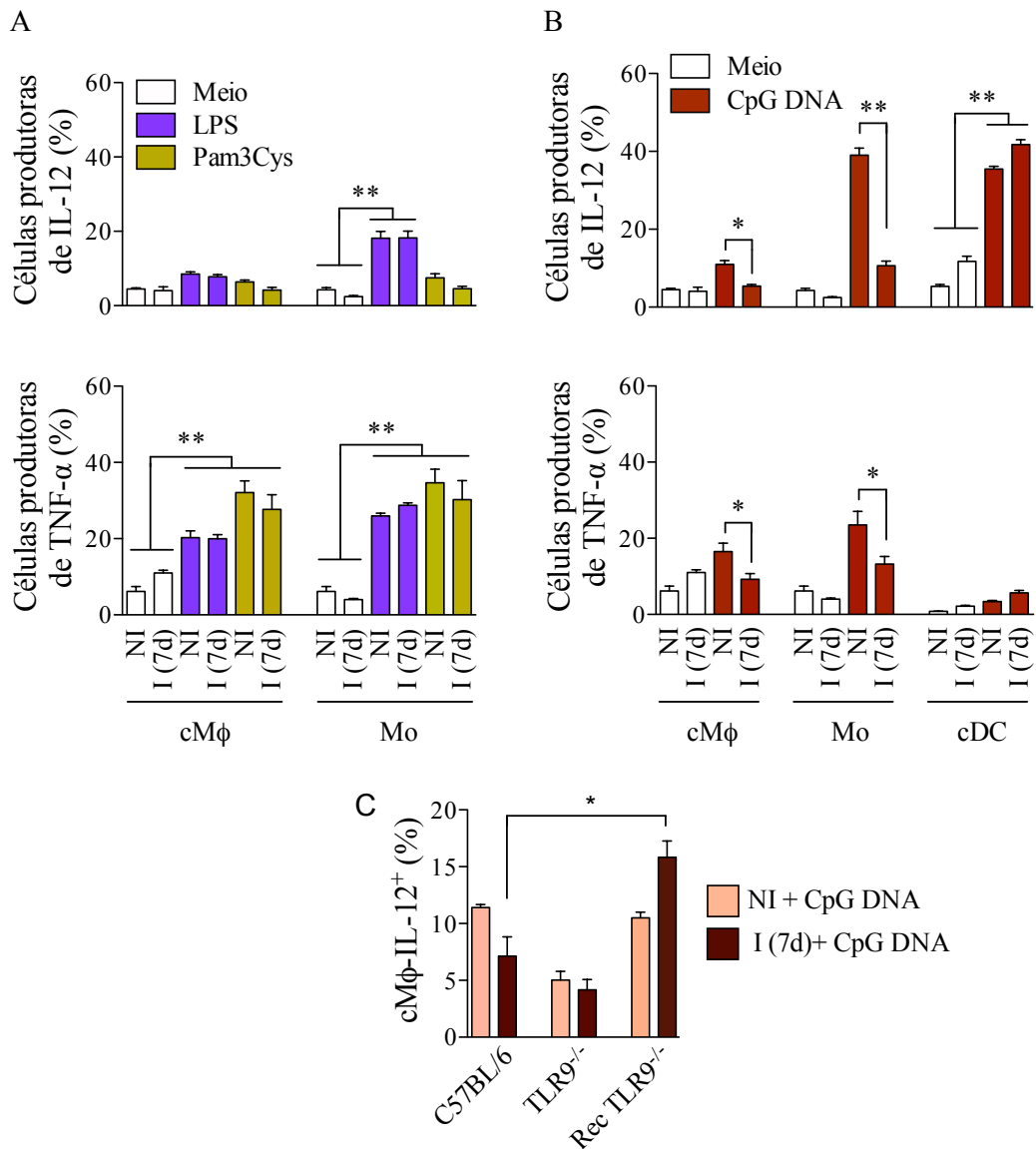


FIGURA 13 – Efeito de agonistas sobre a produção de citocinas por esplenócitos.

Esplenócitos de animais WT C57BL/6, sadios (NI) e infectados (I (7d)), foram estimulados *in vitro* com agonista de TLR2 (Pam3Cys - 1 µg/mL), TLR4 (LPS - 1 µg/mL) e TLR9 (CpG DNA - 1 µg/mL) por 12h.

A, Frequência de células IL-12⁺ e TNF-α⁺ após estimulação com LPS e Pam3Cys;

B, Frequência de células IL-12⁺ e TNF-α⁺ após estimulação com CpG DNA;

C, Frequências de cMφs-IL-12⁺ de animais WT, TLR9^{-/-} e Rec TLR9^{-/-} após estimulação com CpG DNA.

Rec TLR9^{-/-} = “camundongo TLR9^{-/-} reconstituído com cMφs de WT”.

*P<0,05 e **P<0,01 indicam significância estatística pelo teste t de Student.

Os dados representam três experimentos independentes (média ± SD de 4 animais).

5.4.3 Produção de citocinas por monócitos $Ly6C^{hi/lo} TLR2^{hi}$

Apesar de não ter sido detectada a síntese espontânea de citocinas por monócitos durante a infecção, a responsividade a agonistas de TLRs e a emergência de duas populações distintas indicam seu envolvimento na inflamação. Neste âmbito, os esplenócitos de animais infectados (7 d.p.i.) foram estimulados *in vitro* por 12h com agonistas de TLRs. Em seguida, avaliados, por citometria de fluxo, quanto à capacidade de produção de citocinas consideradas pró (IL-12 e TNF- α) e anti (IL-10) inflamatórias.

5.4.3.1 Resposta de monócitos ao agonista de TLR2

A alta expressão de TLR2 nos monócitos inflamatórios é uma característica notória. Por isto, avaliamos a resposta destas células a um agonista do receptor. Os esplenócitos foram incubados com Pam3Cys e as frequências de células $CD11b^{hi} MHCII^{lo} CD11c^{+} Ly6C^{hi/lo} TLR2^{hi}$ produtoras de citocinas foram apresentadas como $Mo-Ly6C^{hi/lo} citocina^{+}$ (Fig. 14). Cerca de 80% dos $Mo-Ly6C^{hi}$ esplênicos de animais sadios e infectados sintetizaram TNF- α na presença do agonista de TLR2. Além disto, 20% dos $Mo-Ly6C^{hi}$ produziram IL-12 nas mesmas condições, mas não IL-10 (Fig. 14A e B). Paralelamente, houve um aumento significativo (cerca de 35%) da frequência de $Mo-Ly6C^{lo} IL-10^{+}$ e $TNF-\alpha^{+}$ após estimulação via TLR2, mas estas células foram incapazes de sintetizar significativamente IL-12 (Fig. 14C e D).

5.4.3.2 Resposta de monócitos ao agonista de TLR9

O *T. cruzi* possui dois agonistas principais de TLRs. Para averiguar se a resposta dos monócitos foi célula-contexto dependente ou TLR-contexto dependente, avaliamos a capacidade dos $Mo-Ly6C^{hi/lo} TLR2^{hi}$ em responder via TLR9, isoladamente ou em combinação com o agonista de TLR2. Os resultados foram similares aos obtidos com Pam3Cys. Na cultura de esplenócitos de animais sadios, o CpG DNA induziu um aumento da frequência de células $Ly6C^{hi} IL-12^{+}$ (~20%), $Ly6C^{lo} IL-10^{+}$ (~25%) e $Ly6C^{hi/lo} TNF-\alpha^{+}$ (~85% e ~45%). Assim, confirmamos que os $Mo-Ly6C^{hi}$ foram hábeis em produzir IL-12 e TNF- α , enquanto que os $Mo-Ly6C^{lo}$ produziram TNF- α e IL-10, evidenciando uma especialização funcional independentemente do tipo de agonista no meio (Fig. 14A-E). Entretanto, o CpG DNA induziu uma menor porcentagem de células a produzir citocinas durante a infecção, principalmente $Mo-Ly6C^{hi/lo} TNF-\alpha^{+}$ (redução de ~15%) (Fig. 14B e D). Isto corroborou a hipótese de hiporresponsividade de TLR9 em monócitos (Fig. 13B), provavelmente relacionada a uma redução na expressão do receptor, assim como ocorreu com os cM ϕ s (Fig. 11A).

Isoladamente ou em combinação, os agonistas de TLR2 e TLR9 induziram frequências semelhantes de Mo-Ly6C^{hi}citocina⁺ nas culturas de esplenócitos de animais infectados, sugerindo que a população é capaz de responder igualmente a ambos agonistas (Fig. 14B). Em contraste, as frequências e números de Mo-Ly6C^{lo}citocina⁺ concomitantemente estimulados com agonistas de TLRs corresponderam à soma das frequências e números de células estimuladas com cada agonista. Isto sugeriu um impacto aditivo dos agonistas sobre subpopulações de Mo-Ly6C^{lo} (Fig. 14D-F).

Em seguida, quantificamos os níveis de citocinas produzidas pelos monócitos TLR2^{hi} (em MFI) para verificar o potencial indutor de cada TLR (Fig. 14G e H). Assim, observamos que os agonistas, principalmente o CpG DNA, induziram eficientemente os Mo-Ly6C^{hi} a produzirem citocinas pró-inflamatórias, o que relaciona com a eficiência no controle inicial da replicação parasitária. No entanto, o agonista de TLR2 definiu os níveis de citocinas a serem produzidas pelas células de animais sadios e infectados durante a dupla estimulação com Pam3Cys e CpG DNA, indicando um papel regulador negativo do TLR2 sobre o sinal de TLR9, assim como acreditamos ocorrer com as cDCs (Fig. 14G).

Por outro lado, a resposta da população Mo-Ly6C^{lo} aos agonistas de TLRs, principalmente ao Pam3Cys, favoreceu a resistência do hospedeiro contra o *T. cruzi* através da liberação do TNF- α , em parceria com os Mo-Ly6C^{hi}. As Mo-Ly6C^{lo} também foram fundamentais na resolução da inflamação mediada pela liberação de IL-10. Na presença de ambos os agonistas de TLR2 e TLR9, a capacidade de Mo-Ly6C^{lo} em produzir TNF- α e IL-10 foi potencializada quando comparada com o estímulo único, principalmente sobre a produção de IL-10. Isto indicou que dentre a população Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi} destaca-se uma subpopulação TLR9⁺ capaz de se autorregular positivamente quando há dupla estimulação de TLRs (Fig. 14H).

De acordo com este estudo, os monócitos compõem populações heterogêneas de células que apresentam diferentes padrões de expressão de TLRs. Porém, a alta expressão de TLR2 caracterizou as populações funcionais dos Mo-Ly6C^{hi/lo}, cujos padrões de produção de citocinas divergiram e foram independentes do tipo de agonista presente no meio. Além disto, as interações entre TLRs expressos pelos monócitos sugerem: 1) Redução do teor de Mo-Ly6C^{hi/lo} responsivos ao agonista de TLR9 durante infecção; 2) Regulação negativa de TLR2 sobre o sinal de TLR9 em Mo-Ly6C^{hi}; 3) Sinergia entre sinais de TLR2 e TLR9 em Mo-Ly6C^{lo}. Tudo isto demonstra uma regulação fina na ativação celular pelo uso balanceado de diferentes agonistas de TLRs.

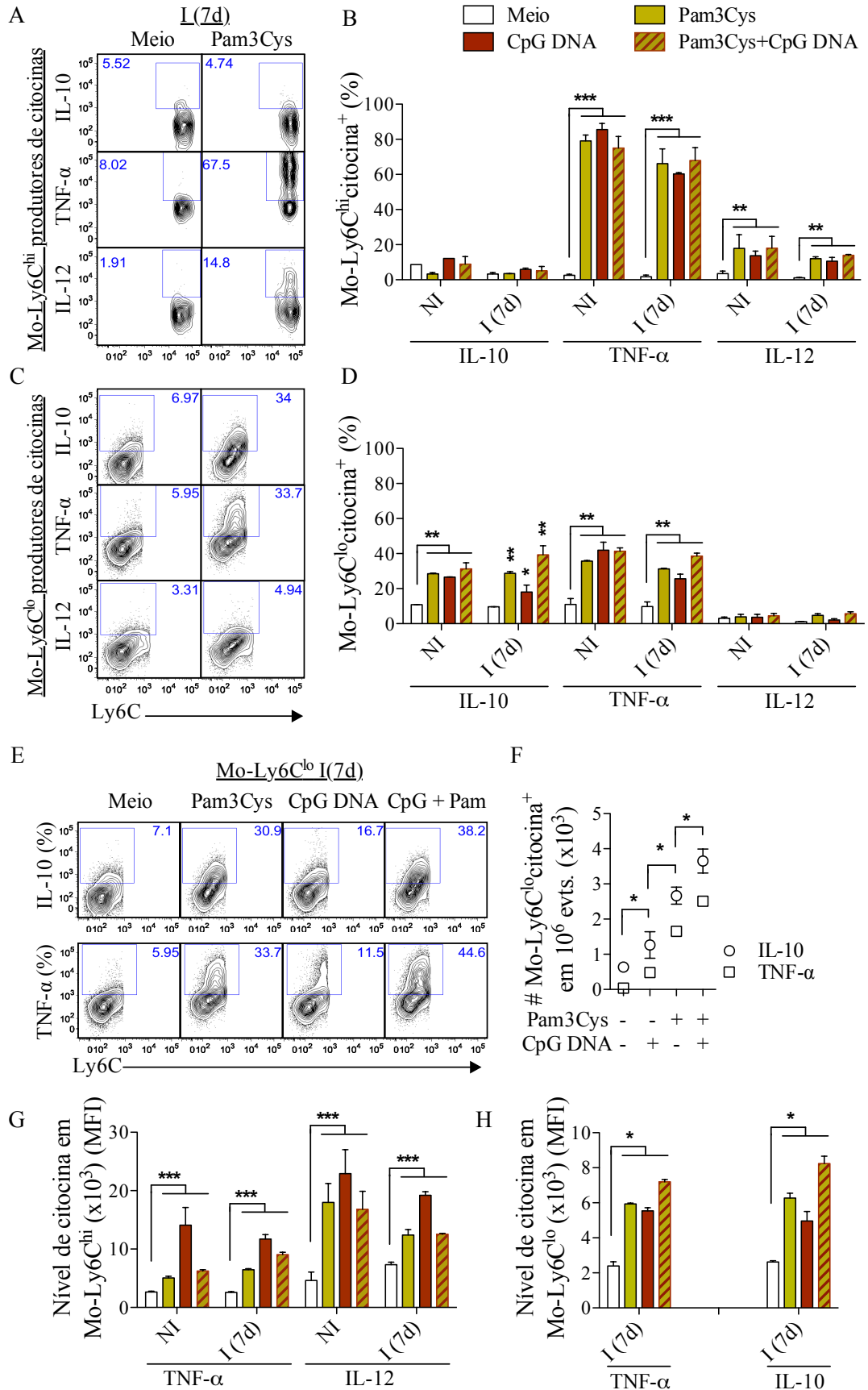


FIGURA 14 – Resposta inflamatória de monócitos a agonistas de TLRs.

Esplenócitos de animais WT saudáveis (NI) e infectados (I (7d)) foram estimulados *in vitro* por 12h com Pam3Cys (1 µg/mL) e CpG DNA (1 µg/mL), isoladamente ou em combinação.

A, *Contour plots* mostrando a síntese de citocinas por monócitos Ly6C^{hi}TLR2^{hi} em resposta ao agonista de TLR2;

B, Frequências de monócitos Ly6C^{hi}TLR2^{hi} produtores de IL-10, TNF-α e IL-12 em resposta aos agonistas de TLR2 e TLR9;

C, *Contour plots* mostrando a síntese de citocinas por monócitos Ly6C^{lo}TLR2^{hi} em resposta ao agonista de TLR2;

D, Frequências de monócitos Ly6C^{lo}TLR2^{hi} produtores de IL-10, TNF-α e IL-12 em resposta aos agonistas de TLR2 e TLR9;

E, *Contour plots* mostrando a síntese de citocinas em monócitos Ly6C^{lo}TLR2^{hi} em resposta aos agonistas de TLR2 e TLR9;

F, Número (#) de monócitos Ly6C^{lo}TLR2^{hi} produtores de IL-10 e TNF-α em resposta aos agonistas de TLR2 e TLR9, em 10⁶ eventos adquiridos;

G, Níveis de citocinas produzidas por monócitos Ly6C^{hi}TLR2^{hi} (em MFI) em resposta aos agonistas de TLR2 e TLR9 (em MFI);

H, Níveis de citocinas produzidas por monócitos Ly6C^{lo}TLR2^{hi} (em MFI) em resposta aos agonistas de TLR2 e TLR9.

*P<0,05 **P<0,01 e ***P<0,001 indicam significância estatística pela ANOVA e pós-teste de Bonferroni ou pela análise de médias com o teste t de Student.

Os dados representam três experimentos independentes (média ± SD de 4 animais).

5.5 MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE MONÓCITOS

Os monócitos são células hematopoiéticas geralmente sanguíneas, que emergem nos órgãos linfoides em condições inflamatórias e apresentam potencial efetor de resposta. Eles estão entre as principais células que orientam o sistema imune, uma vez que possuem capacidade de reconhecimento imunológico, produção de citocinas e potencial de diferenciação em diversas classes de macrófagos e DCs. Participam da manutenção da homeostasia e ajudam a instaurar e regular os processos inflamatórios. Por isto, investigamos como o uso de TLRs por monócitos durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* controla a produção de citocinas, sob a luz de diferentes mecanismos imunorregulatórios, envolvendo: a celularidade do baço, expressão de TLRs e utilização de vias de sinalização alternativas.

5.5.1 A infecção altera a população monocítica no baço

O processo inflamatório libera diferentes fatores de diferenciação e migração, responsáveis pela alteração da composição celular, principalmente nos órgãos linfoides. Assim como ocorreu com as cDCs e os cMφs (Fig. 10B e C), o perfil monocítico esplênico também foi alterado durante a infecção (Fig. 10D). Ao estudar a natureza dos monócitos inflamatórios $F4/80^{lo}CD11b^{hi}MHCII^{lo}CD11c^{+}Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi}$, observamos que o tamanho (FSC-A), a granulosidade (SSC-A) e os níveis de expressão de CD11b, MHCII, CD11c e Ly6C mantiveram-se relativamente constantes nos primeiros dias de infecção por *T. cruzi* (5, 6 e 7 d.p.i.). Estas características fenotípicas permitiram distingui-los entre si e de outras células. As expressões de CD11b e MHCII foram pontos comuns nas duas populações, porém houve diferenças quanto ao tamanho, granulosidade e expressão de CD11c (Fig. 15A e B).

O perfil populacional monocítico esplênico, representado pelas células $CD11b^{hi}MHCII^{lo}$, aumentou nos primeiros dias de infecção por *T. cruzi* (Fig. 10D e 15C). Porém, este aumento foi desigual ao avaliar a evolução das populações $TLR2^{hi}$. Em animais sadios, a prevalência de $Mo-Ly6C^{hi}TLR2^{hi}$ contrastou com o pequeno número de $Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi}$. Entretanto, este padrão inverteu durante a infecção, pois houve uma acentuada emergência da população $Ly6C^{lo}TLR2^{hi}$ (~80%) em comparação com a população de monócitos $Ly6C^{hi}TLR2^{hi}$ (~20%) (Fig. 10D e 15D).

No quarto dia de infecção, houve um aumento da população de $Mo-Ly6C^{hi}TLR2^{hi}$, seguido de um decréscimo no sétimo dia de infecção (Fig. 15D), o que correlacionou com a evolução da expressão de TLR2 nestas células. Isto sugere que o acréscimo da população $Mo-Ly6C^{hi}TLR2^{hi}$ no quarto dia de infecção pode ter decorrido

de um aumento da expressão do receptor em células precursoras Ly6C^{hi} existentes no baço (Fig. 15E). De fato, a variação do número de células com alta expressão de TLR2 influenciou diretamente o número de Mo-Ly6C^{hi}TLR2^{hi} produtores de TNF- α após estimulação com Pam3Cys (Fig. 15F). No entanto, apesar de não ter sido detectada variação da expressão de TLR2 em Mo-Ly6C^{lo} com a evolução da infecção, houve um aumento contínuo do número de Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi}TNF- α ⁺ após estimulação com Pam3Cys, sugerindo que os níveis elevados de TLR2 representam uma característica intrínseca destas células (Fig. 15E e F).

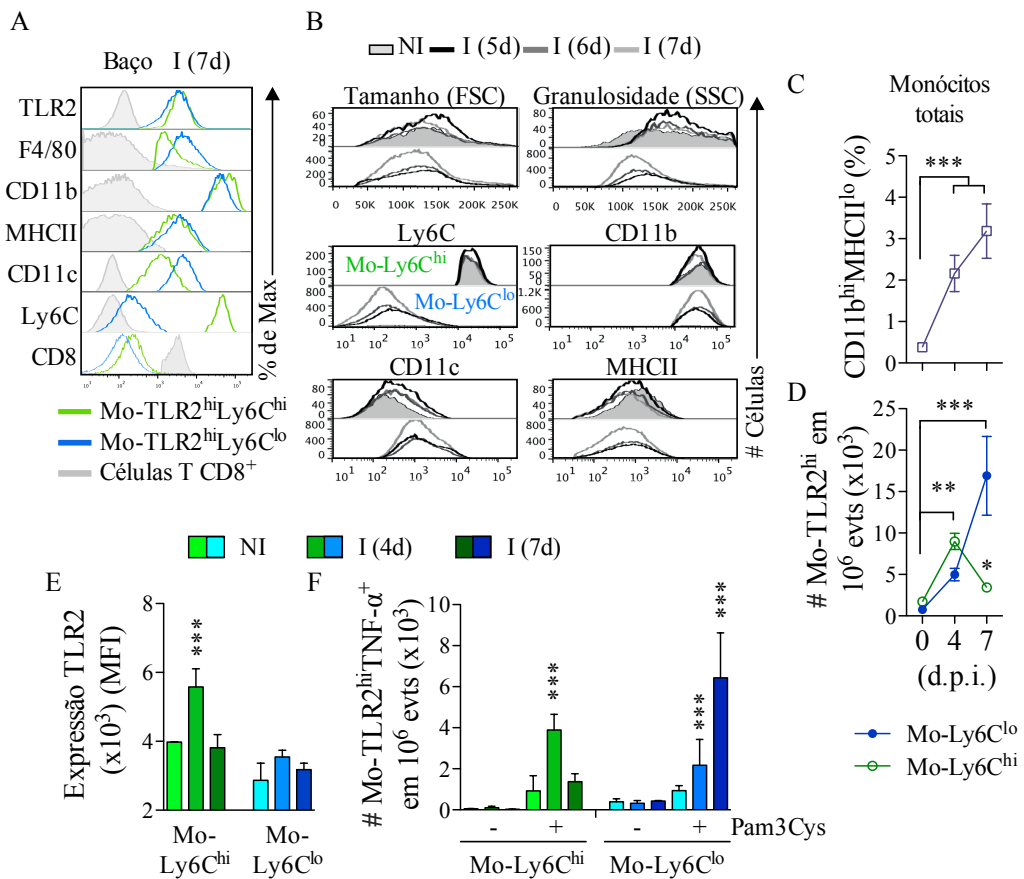


FIGURA 15 – Monócitos $Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi}$ esplênicos.

A, Os histogramas mostram a expressão de marcadores de superfície nos diferentes tipos de monócitos de camundongos WT C57BL/6 (7 d.p.i.);

B, Evolução do tamanho (FSC-A), granulosidade (SSC-A) e níveis de expressão de Ly6C, CD11b, CD11c e MHCII nos Mo- $Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi}$ (5, 6 e 7 d.p.i.);

C, Frequência de monócitos totais ($CD11b^{hi}MHCII^{lo}$) (4 e 7 d.p.i.);

D, Número (#) de monócitos $Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi}$ em 10^6 eventos adquiridos (4 e 7 d.p.i.);

E, Expressão de TLR2 (em MFI) em Mo- $Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi}$ (4 e 7 d.p.i.);

F, Número (#) de monócitos $Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi}TNF-\alpha^+$ adquiridos em 10^6 eventos (4 e 7 d.p.i.).

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam significância estatística pela ANOVA seguida do teste de Bonferroni.

Dados representativos de dois experimentos independentes (Média \pm SD de 4 animais).

5.5.2 A população de monócitos no baço é modulada por TLRs

O número de monócitos Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} esplênicos evoluiu de forma contrastante durante a infecção (Fig. 15D). Por isto, procuramos definir os fatores capazes de influenciar nesse evento e focamos no papel dos TLRs. Em um primeiro conjunto de experimentos, os esplenócitos totais foram incubados *in vitro* com agonistas de TLR2 e TLR9 por 12h. De acordo com a Tabela IV, a presença de Pam3Cys e CpG DNA induziu o aumento do número de Mo-Ly6C^{hi}TLR2^{hi} nas culturas de esplenócitos de camundongos infectados e sadios, indicando diferenciação/maturação *in situ* de células precursoras residentes. Em contraste, os agonistas de TLR2 ou TLR9 conduziram a uma ligeira diminuição do número de Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi} na cultura de esplenócitos de animais infectados, a qual pode decorrer de uma regulação negativa da expressão de TLR2 ou morte celular.

TABELA IV: Efeito dos agonistas de TLR sobre o número de monócitos TLR2^{hi}.

	≠ Mo-Ly6C ^{hi} TLR2 ^{hi} (xN)		≠ Mo-Ly6C ^{lo} TLR2 ^{hi} (xn)	
	NI	I (7d)	NI	I (7d)
Meio	1.00 ± 0.13	1.18 ± 0.04*	1.00±0.92	10.0 ± 0.40***
Pam3Cys	1.69 ± 0.13***	1.54 ± 0.17§§§	1.04±0.45	8.7 ± 0.50§
CpG DNA	1.29 ± 0.15*	1.52 ± 0.18§§§	1.02±0.46	8.5 ± 0.15§
Pam + CpG	1.52 ± 0.18***	1.63 ± 0.23§§§	0.96±0.48	7.6 ± 0.30§

- Os esplenócitos de camundongos WT C57BL/6 foram incubados com agonistas de TLR2 (Pam3Cys - 1µg/mL) e/ou TLR9 (CpG DNA - 1µg/mL) por 12h.

- Os números (#) de monócitos de animais sadios (NI) foram normalizados como sendo: N≈4000 Mo-Ly6C^{hi} e n≈1500 Mo-Ly6C^{lo}, em 10⁶ eventos adquiridos.

Dados representativos de três experimentos independentes (Média ± SD de 4 animais).

*P<0.05, ***P<0.001: significância estatística em relação às células não estimuladas de animais NI, pela ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

§P<0.05, §§§P<0.001: significância estatística em relação às células não estimuladas de animais infectados I (7dias) (**em negrito**), pela ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Em um segundo conjunto de experimentos, comparamos o número de Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} no baço dos camundongos WT, TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-} e Mal/TIRAP^{-/-} infectados para avaliar a importância dos TLRs e adaptador no controle populacional dos monócitos (Tabela V). Na ausência de TLR2 ou TLR9, houve uma redução significativa do número de Mo-Ly6C^{hi}TLR2^{hi}, mas a quantidade de Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi} permaneceu inalterada, corroborando com os dados da Tabela IV. Na ausência de

Mal/TIRAP, ambos os monócitos TLR2^{hi} tiveram redução de seus números (~60% para Mo-Ly6C^{hi} e ~30% para Mo-Ly6C^{lo}) quando comparado ao grupo selvagem infectado.

Em adição, avaliamos a influência da inflamação mediada por IL-12, crucial para a defesa de camundongos infectados, sobre o número de monócitos no baço dos animais (Tabela V). Na ausência de IL-12, o teor de Mo-Ly6C^{hi}TLR2^{hi} em animais infectados se manteve o mesmo de animais WT saudáveis, enquanto houve uma diminuição significativa da população Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi}. De fato, houve uma redução de cerca de 50% de Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi} no baço de camundongos IL-12^{-/-} infectados em comparação com camundongos WT infectados.

Esses dados sugerem que a inflamação mediada por IL-12 e a atuação de Mal/TIRAP regularam positivamente a presença de monócitos com alta expressão de TLR2 no baço de animais infectados com *T. cruzi*, enquanto que a presença de ambos os TLR2 e TLR9 foi essencial somente para a existência dos Mo-Ly6C^{hi}TLR2^{hi}. É possível que a presença de apenas um TLR (2, 4, 7 ou 9) nos animais TLR deficientes seja suficiente para a existência dos Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi}.

TABELA V: Número de monócitos esplênicos em camundongos deficientes.

	≠ Mo-Ly6C ^{hi} TLR2 ^{hi} (xN)	≠ Mo-Ly6C ^{lo} TLR2 ^{hi} (xn)
WT NI	1.00 ± 0.13	1.0 ± 0.9
WT I	1.18 ± 0.04*	10.0 ± 0.4***
TLR2 ^{-/-} I ^(a)	0.59 ± 0.14§§	11.0 ± 0.8
TLR9 ^{-/-} I	0.70 ± 0.06§§	11.0 ± 1.2
Mal/TIRAP ^{-/-} I	0.41 ± 0.03§§§	7.2 ± 0.2§§
IL-12 ^{-/-} I	1.00 ± 0.18	5.1 ± 1.1§§§

- O número (#) de monócitos no baço de animais NI foi normalizado como sendo: 1N≈4000 Mo-Ly6C^{hi} e 1n≈1500 Mo-Ly6C^{lo}, em 10⁶ eventos adquiridos.

^(a) As células de camundongos TLR2^{-/-} foram analisadas somente por meio das interpolações (CD11c vs. Ly6C).

Dados representativos de dois experimentos independentes (Média ± SD de 4 animais).

*P<0.05, ***P<0.001: significância estatística em relação às células de animais WT NI, pela ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

§§P<0.01, §§§P<0.001: significância estatística em relação às células de animais WT I (**negrito**), pela ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

5.5.3 Fatores que afetam os monócitos inflamatórios

A cooperação entre TLR2 e TLR9 elicitou o sistema imune durante a infecção por *T. cruzi*. Porém, as células do eixo fagocítico mononuclear utilizaram cada receptor de forma desigual. Por isto, estimulamos os esplenócitos de camundongos deficientes com agonistas de TLRs para entender a influência dos receptores e de IL-12 sobre a resposta inflamatória dos Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi}.

5.5.3.1 Depleção de TLRs e os Mo-TLR2^{hi}

A depleção de TLR2 e TLR9 impactou negativamente somente sobre o número de Mo-Ly6C^{hi}TLR2^{hi} (Tabela V). Porém, os Mo-Ly6C^{hi} remanescentes nos animais TLR-deficientes foram igualmente responsivos ao agonista do receptor complementar, com frequências de células TNF- α^+ (~35-40%), indicando que a via de sinalização responsável pela síntese de citocinas está funcional nestas células. Em adição, os TLRs foram independentemente capazes de conduzir sinais que convergiram na produção das mesmas citocinas (Fig. 16A e B) por via de sinalização controlada pelo sinal de TLR2 (Fig. 14G). Entretanto, a dupla estimulação com agonistas de TLR2 e TLR9 resultou em uma redução da frequência de células TLR-deficientes-TNF- α^+ em relação ao grupo selvagem. Isto indica que a cooperação entre TLRs foi essencial para a maturação da população de Mo-Ly6C^{hi}, provavelmente através da regulação cruzada entre suas expressões. Logo, os TLRs cooperaram para a presença de Mo-Ly6C^{hi}TLR2^{hi} no baço, além de potencializar o teor de células produtoras de citocinas.

Os Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi} comportaram da mesma forma quanto à produção de TNF- α e IL-10, sob as mesmas condições estimulatórias, indicando que utilizam a mesma via para síntese de citocinas. No entanto, a resposta inflamatória destas células foi intensamente afetada na ausência dos TLRs. De fato, os Mo-Ly6C^{lo} de animais TLR2^{-/-} não produziram citocinas, mesmo em resposta ao CpG DNA. Em adição, as frequências de Mo-Ly6C^{lo}TLR9^{-/-}citocina⁺ foram drasticamente reduzidas quando estimuladas com Pam3Cys. Isto significa que o TLR2 foi essencial para a função de Mo-Ly6C^{lo}, enquanto que o TLR9 a regulou. De fato, o CpG DNA potencializou a frequência de células produtoras de citocinas (Fig. 16A, C-E), além da própria síntese de citocinas (Fig. 14H), indicando que a presença de ambos os receptores também foi essencial para a maturação da população Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi}.

Portanto, a cooperação entre TLR2 e TLR9 induziu a presença de Mo-Ly6C^{hi}TLR2^{hi} no baço mas, apesar de enriquecer o população de células produtoras de citocinas, não foi essencial para seu potencial inflamatório. Em contraste, a cooperação

entre TLRs não foi necessária para recrutar os Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi} para o baço durante a infecção, mas sim, para desencadear seu potencial inflamatório.

5.5.3.2 Microambiente inflamatório e os Mo-TLR2^{hi}

Durante a infecção aguda por *T. cruzi*, o microambiente pró-inflamatório, caracterizado pela liberação de IL-12 por cDCs via TLR9, regulou negativamente o teor de Mo_s/cMφs responsivos ao CpG DNA. Por isto, avaliamos o papel de IL-12 sobre o potencial inflamatório dos Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} estimulados com agonistas de TLRs.

A ausência de IL-12 prejudicou a presença de Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} no baço durante a infecção (Tabela V) mas, a proporção entre as populações remanescentes não foi alterada nos animais IL-12^{-/-} (~30% de Mo-Ly6C^{hi} e ~70% de Mo-Ly6C^{lo}) (Fig. 16F). Isto sugere um impacto do IL-12 sobre o processo global de diferenciação/recrutamento das duas populações de monócitos inflamatórios.

Ao comparar a resposta inflamatória dos monócitos de animais IL-12^{-/-} e selvagens infectados, observamos frequências iguais de Mo-Ly6C^{hi}TLR2^{hi}citocina⁺ nas mesmas condições de estímulos, indicando que a depleção do IL-12 não interferiu na sinalização destas células. Porém, as frequências de Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi}citocina⁺ foram afetadas na ausência de IL-12, indicando que o microambiente inflamatório foi importante para a maturação funcional destas células (Fig. 16A-E). Em adição, a responsividade ao agonista de TLR2 indica sinalização funcional nos Mo-Ly6C^{lo}IL-12^{-/-} para a síntese de citocinas. Porém, o baixo teor de células responsivas ao CpG DNA nos fez presumir que o IL-12 regulou a ativação de TLR9 nestas células e, conseqüentemente, afetou a cooperação com o TLR2. Possivelmente, a presença de IL-12 atuou positivamente sobre a maturação da expressão de TLR9 nos Mo-Ly6C^{lo}.

Considerando a redução no conteúdo populacional de Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi} em animais IL-12^{-/-}, verificamos que o número total de células produtoras de citocinas também diminuiu consideravelmente nos animais deficientes (Fig. 16G), o que está relacionado com o balanço inflamatório IL-10/IL-12.

Portanto, o microambiente inflamatório mediado pela presença de IL-12 foi fundamental para o recrutamento de ambas as populações funcionais de monócitos, ao induzir a cooperação entre os TLR2 e TLR9 que potencializou o teor de células produtoras de citocinas. Porém, o IL-12 foi fundamental somente para a maturação dos Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi}.

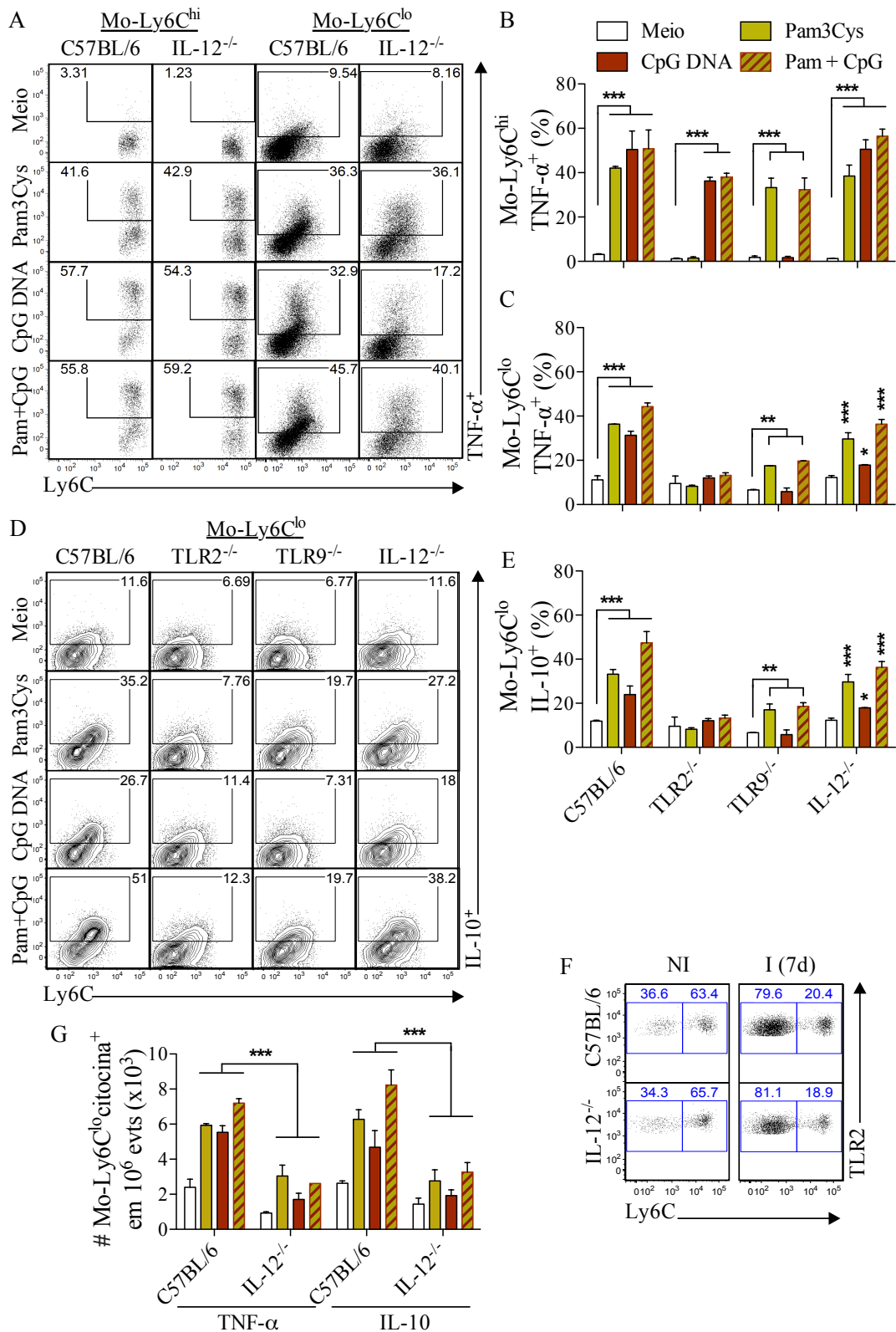


FIGURA 16 – Papel de IL-12 e TLRs na resposta inflamatória de monócitos.

Esplenócitos de animais infectados (7 d.p.i.), selvagens (WT C57BL/6) e deficientes (TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-} e IL-12^{-/-}), foram estimulados *in vitro* por 12h com Pam3Cys (1 µg/mL) e CpG DNA (1 µg/mL), isoladamente ou em combinação.

A, *Dot plots* mostrando a síntese de TNF- α por monócitos Ly6C^{hi/lo} de animais selvagens e IL-12^{-/-} em resposta aos agonistas de TLR2 e TLR9;

B, Frequências de monócitos Ly6C^{hi}TNF- α ⁺ de animais selvagens e deficientes em resposta aos agonistas de TLR2 e TLR9;

C, Frequências de monócitos Ly6C^{lo}TNF- α ⁺ de animais selvagens e deficientes em resposta aos agonistas de TLR2 e TLR9;

D, *Contour plots* mostrando a síntese de IL-10 por monócitos Ly6C^{lo} de animais selvagens e deficientes em resposta aos agonistas de TLR2 e TLR9;

E, Frequências de monócitos Ly6C^{lo}IL-10⁺ de animais selvagens e deficientes em resposta aos agonistas de TLR2 e TLR9;

F, *Dot plots* mostrando a frequência de Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} em animais selvagens e IL-12^{-/-}, sadios e infectados (7 d.p.i.);

G, Número (#) de monócitos Ly6C^{lo}TNF- α ⁺ e IL-10⁺ de animais selvagens e IL-12^{-/-} em resposta aos agonistas de TLR2 e TLR9, em 10⁶ eventos adquiridos.

*P<0,05 **P<0,01 e ***P<0,001 indicam significância estatística pela ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Os dados representam dois experimentos independentes (média \pm SD de 4 animais).

5.5.4 Agonistas de TLR modulam expressão de TLR2 em monócitos

Os splenócitos de camundongos foram identificados pelos marcadores (F4/80, CD11b, MHCII, CD11c e Ly6C) e caracterizados quanto à expressão de TLR2 (Fig. Suplementar 22A). Dentre eles, os monócitos que apresentaram elevada expressão de TLR2 e CD11c se mostraram aqueles com o maior grau de maturação, o que permitiu selecionar as populações inflamatórias, inclusive de animais TLR2^{-/-}. Desta forma, a estratégia de focar em células que expressam TLR2 permitiu analisar a funcionalidade do receptor em Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} durante a infecção pelo *T. cruzi*. Aqui, verificamos como os agonistas de TLRs impactaram sobre os níveis de expressão do TLR2 nas células que pertencem à linhagem monocítica, causando variações populacionais de Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} (Fig. 17).

Em um primeiro momento, avaliamos o papel de agonistas de TLR2 e TLR9 na modulação da expressão de TLR2 nas populações de Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} durante a infecção por *T. cruzi*. O CpG DNA induziu aumento da expressão de TLR2 em Mo-Ly6C^{hi} e, em menor escala, nos Mo-Ly6C^{lo}. Por outro lado, o Pam3Cys induziu aumento de expressão de TLR2 apenas em Mo-Ly6C^{hi} (Fig. 17A e B). Esses dados mostraram que, apesar de possuírem elevada expressão de TLR2, os monócitos foram influenciados pelos agonistas de TLR, corroborando os resultados apresentados nas Tabelas IV e V.

Em um segundo momento, avaliamos o impacto da depleção de TLR9 sobre a expressão de TLR2. Na ausência de TLR9, ambas as populações de Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} de camundongos infectados apresentaram níveis menores de TLR2 quando comparado com as células de animais WT infectados (Fig. 17C). Isto confirmou que o TLR9 regulou positivamente a expressão de TLR2 nas células da linhagem monocítica e, conseqüentemente, sua atividade.

A origem e destino dos monócitos são controversas. Porém, ao expandir o *gate* que identifica monócitos inflamatórios na interpolação (MHCII x CD11b), selecionamos células da linhagem monocítica em diferentes graus de maturação, sejam precursoras ou Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} que sofreram regulação de expressão de marcadores de superfície. Desta forma, foi possível selecionar células com menor expressão de TLR2 e CD11c, distintas pela expressão de Ly6C. Em animais sadios, o número de células Ly6C^{hi}TLR2⁺ totais sobressaiu o de Ly6C^{lo}TLR2⁺ totais, porém o recrutamento massivo de células Ly6C^{lo}TLR2⁺ inverteu a proporção das populações durante a infecção. O que reproduziu a evolução das populações Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} (Fig. 17D).

Em seguida, realizamos uma cinética de incubação de esplenócitos de animais saudáveis e infectados (7 d.p.i.) com agonistas de TLRs para avaliar sua influência sobre o teor de células TLR2^{hi} dentro a linhagem monocítica global. À princípio, verificamos que os números totais de ambos os tipos celulares (Ly6C^{hi/lo}TLR2⁺) não modificaram na presença dos agonistas. Em adição, não vimos interconversão entre os tipos de monócitos quando estimulados. No entanto, estas células apresentaram um ganho de expressão de TLR2, induzido principalmente pelo CpG DNA, o que repercutiu no aumento da porcentagem de Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} (Fig. 17D e E). Ao quantificar a proporção de Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} dentro a população Ly6C^{hi/lo}TLR2⁺ total, observamos que este efeito foi transitório (Fig. 17E). Durante processos inflamatórios, o *turnover* de vesículas direciona o TLR2 de endossomos para ser exposto na membrana plasmática, favorecendo o reconhecimento do receptor com seu ligante e, subsequente internalização do complexo receptor-ligante. Acreditamos que seja o caso dos monócitos.

O aumento da expressão de TLR2 em Mo-Ly6C^{hi/lo} em resposta aos agonistas de TLRs correlacionou com seu potencial inflamatório. Por isto, acreditamos que a elevada expressão de TLR2 funcionou como um marcador do estado inflamatório de monócitos, assim como TLR9 foi para as cDCs. Além disto, os Mo-Ly6C^{hi} apresentaram um aumento de expressão de TLR2 mais intenso e duradouro, correlacionando com os dados da Tabela IV. A menor variação dos níveis de expressão de TLR2 em Mo-Ly6C^{lo} sugere que esta população é recrutada em estágios elevados de ativação, enquanto os Mo-Ly6C^{hi} precisaram ser ativados *in situ* para desenvolverem funcionalidade.

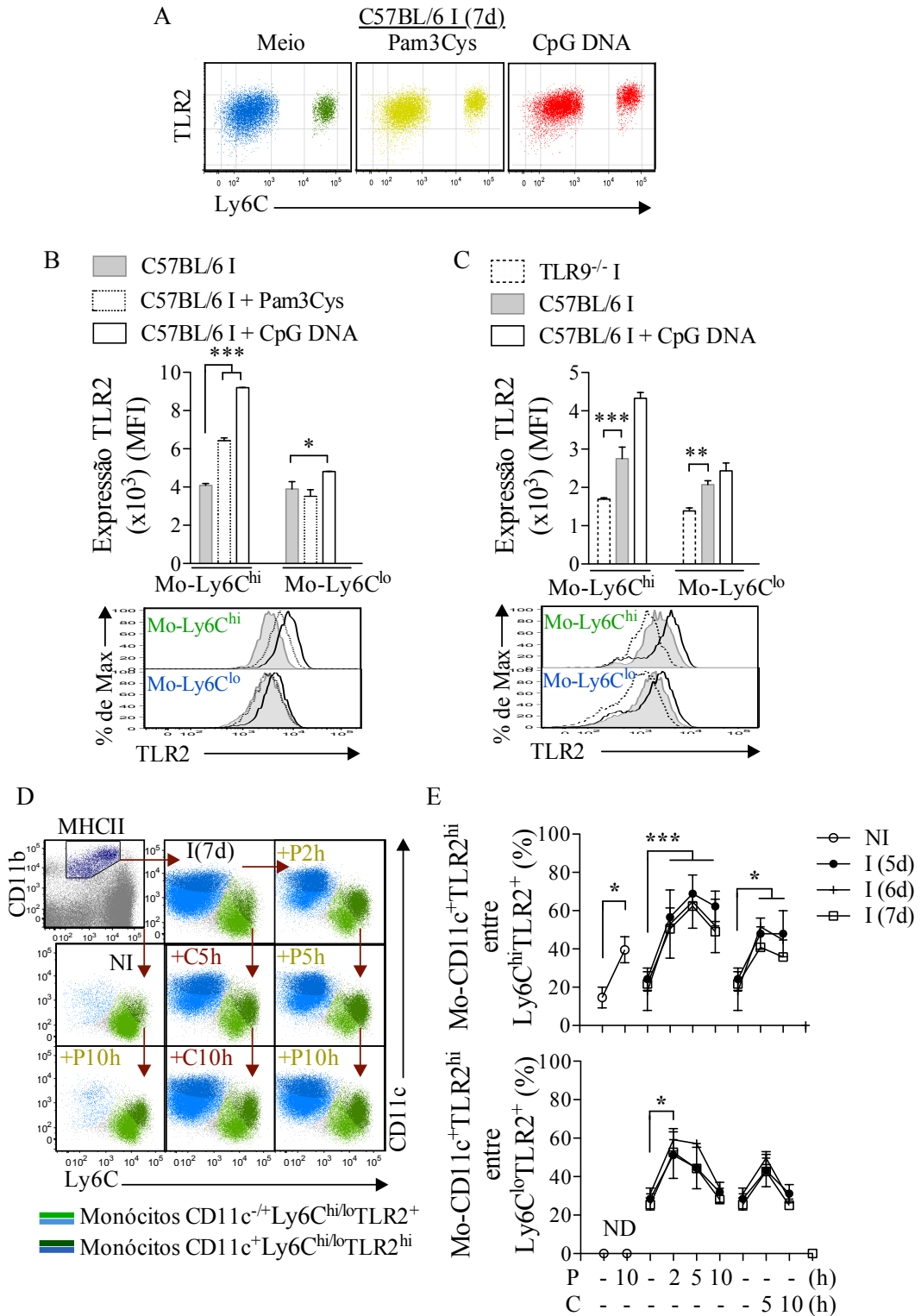


FIGURA 17 – Efeito de agonistas de TLRs sobre a expressão de TLR2 em monócitos.

Os esplenócitos de animais WT C57BL/6 infectados (7 d.p.i.) foram estimulados *in vitro* por até 10h com agonistas de TLR2 (Pam3Cys - 1 µg/mL) ou TLR9 (CpG DNA - 1 µg/mL).

A, B, Os *dot plots*, gráfico e histogramas mostram o impacto, após 10h, dos agonistas de TLR2 e TLR9 sobre os níveis de expressão de TLR2 em Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} de animais WT infectados (7 d.p.i.);

C, O gráfico e histogramas mostram o efeito da depleção de TLR9 sobre os níveis de expressão de TLR2 em Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} de animais WT e TLR9^{-/-} infectados (7 d.p.i.). Os Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} selvagens foram estimulados por 10h com CpG DNA como controle;

D, E, Os *dot plots* e gráficos mostram o efeito de agonistas de TLRs sobre a quantidade de monócitos Ly6C^{hi/lo}TLR2⁺ de animais infectados (5, 6 e 7 d.p.i.) que *up-regularam* a expressão de TLR2 e CD11c durante a cinética de incubação *in vitro* (2, 5 e 10h).

*P<0,05 **P<0,01 e ***P<0,001 indicam significância estatística pelo ANOVA e pós-teste de Bonferroni, ou pela análise de médias com o teste t de Student (média ± SD de 4 animais). Mo = monócito; P = Pam3Cys; C = CpG DNA.

Os dados são representativos de três experimentos independentes.

5.5.5 Mal/TIRAP e a sinalização gatilhada por TLRs em monócitos

A depleção de TLR2 e Mal/TIRAP correlacionou com a resistência à infecção por *T. cruzi* (Fig. 6) e com o aumento da liberação de IL-12p40, IFN- γ e NO (Fig. 9), indicando uma função regulatória. Além disto, a deficiência em Mal/TIRAP, adaptador que controla a ativação celular *downstream* TLR2, afetou o número de ambas as populações de monócitos, indicando que é uma molécula essencial para a existência dos monócitos no baço (Tabela V). Neste contexto, investigamos o impacto de Mal/TIRAP na resposta inflamatória dos Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} durante a infecção com *T. cruzi*.

Primeiramente, verificamos que a expressão de TLR2 foi similar em monócitos selvagens e Mal/TIRAP deficientes, excluindo possíveis influências do receptor sobre a produção de citocinas (Fig. 18A). Em seguida, os esplenócitos de animais Mal/TIRAP^{-/-} infectados foram incubados com agonistas de TLRs e avaliados quanto às frequências de Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi}citocina⁺ (Fig. 18B-E). Na ausência de Mal/TIRAP, a capacidade de produção de TNF- α por Mo-Ly6C^{hi}TLR2^{hi} em resposta aos agonistas permaneceu intacta (Fig. 18B e C). Em contraste, os Mo-Ly6C^{lo} sofreram uma drástica redução na capacidade de produzir TNF- α e IL-10 (Fig. 18B, D e E).

De fato, a ausência de Mal/TIRAP impediu a síntese de citocinas por Mo-Ly6C^{lo}, mas não por Mo-Ly6C^{hi}. Logo, as populações de monócitos utilizaram Mal/TIRAP de forma diferencial e independente do estímulo, sugerindo que o adaptador é uma molécula chave na predefinição de suas funções.

Os diferentes padrões de síntese de citocinas pelos Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} sugere o uso de vias de sinalização distintas. Considerando que Mal/TIRAP foi essencial apenas para os Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi} produzirem citocinas, nos interessamos em avaliar a cascata de sinalização desencadeada por TLR2 utilizada para a síntese de IL-10. Para tal, incubamos esplenócitos na presença de alguns inibidores de moléculas específicas da sinalização de TLRs e, após 30 minutos, adicionamos Pam3Cys. Os inibidores de TAK-1 (TAKi), ERK1/2 (PD95049) e I κ B (Bay11-7082) afetaram significativamente a resposta das células estimuladas com Pam3Cys. Indicando que TAK-1, ERK e NF- κ B foram requeridos para induzir a produção de IL-10 por Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi}. Em adição, os inibidores de PI3K (Ly94002) e AKT (AKTi) não afetaram a síntese de IL-10, o que permitiu descartar a necessidade da via PI3K/AKT na síntese de IL-10. Logo, os Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi} utilizaram a via TLR2:Mal/TIRAP:TAK-1, MAPK ERK1/2 e o fator de transcrição NF- κ B para produzir IL-10 (Fig. 18F).

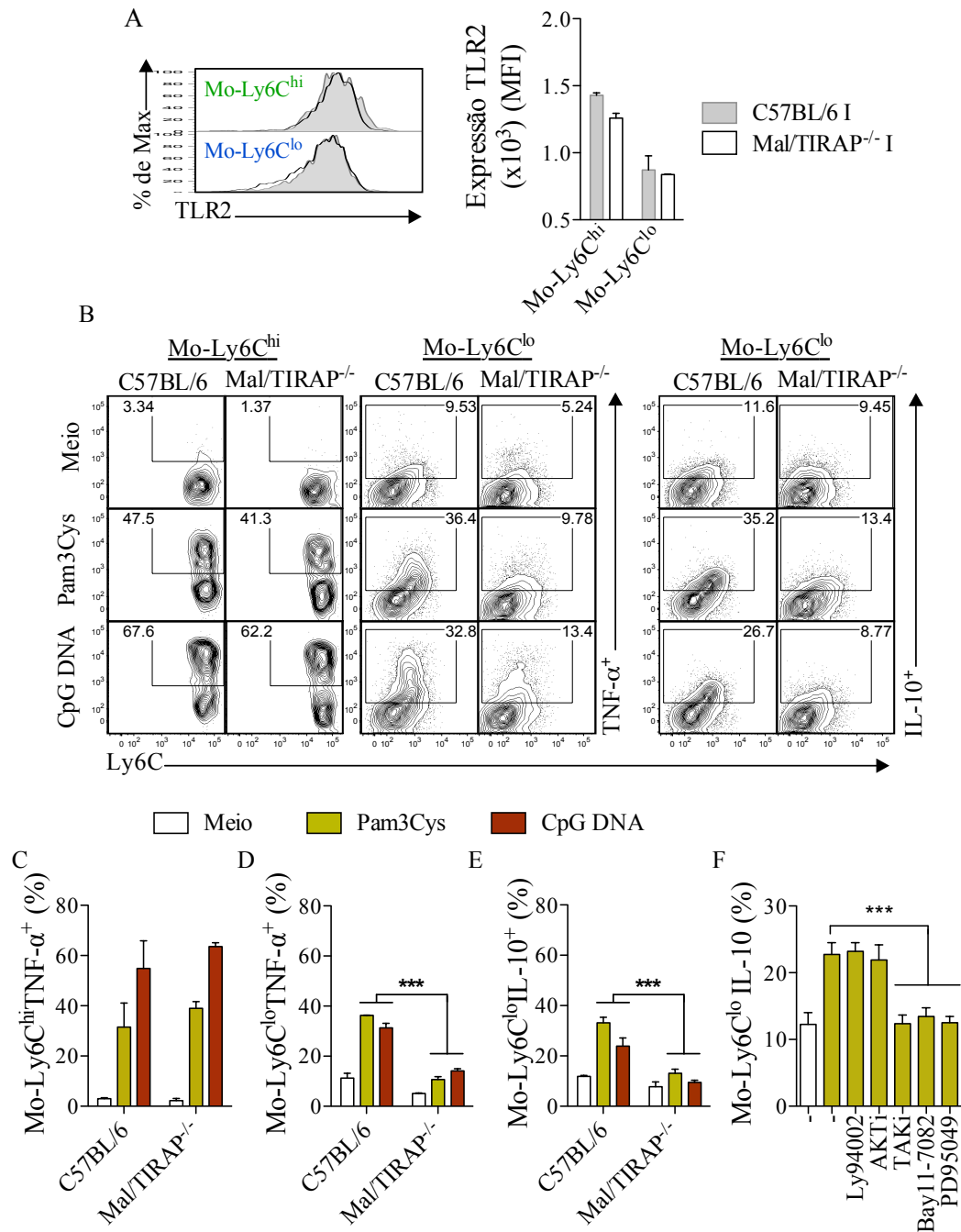


FIGURA 18 – Modulação da sinalização em Mo-Ly6C^{hi/lo}.

A, Os histogramas e gráfico mostram os níveis *ex vivo* de expressão de TLR2 em monócitos de animais WT C57BL/6 e Mal/TIRAP deficientes infectados (7 d.p.i.);

B, *Contour plots* mostrando a síntese de TNF-α e IL-10 por monócitos Ly6C^{hi/lo} de animais selvagens e Mal/TIRAP deficientes estimulados *in vitro* por 12h com agonistas de TLR2 (Pam3Cys - 1 µg/mL) e TLR9 (CpG DNA - 1 µg/mL);

C, Frequências de monócitos Ly6C^{hi}TNF-α⁺ de animais selvagens e Mal/TIRAP deficientes estimulados *in vitro* por 12h com agonistas de TLR2 e TLR9;

D, Frequências de monócitos Ly6C^{lo}TNF- α ⁺ de animais selvagens e Mal/TIRAP deficientes estimulados *in vitro* por 12h com agonistas de TLR2 e TLR9;

E, Frequências de monócitos Ly6C^{lo}IL-10⁺ de animais selvagens e Mal/TIRAP deficientes estimulados *in vitro* por 12h com agonistas de TLR2 e TLR9;

F, Esplenócitos de animais selvagens WT foram incubados por 30 min com diferentes inibidores de componentes da via de sinalização de TLRs, estimulados *in vitro* com agonista de TLR2 (Pam3Cys 1 μ g/mL) por 12h e avaliados quanto à frequência de Mo-Ly6C^{lo}IL-10⁺. Ly94002 (inibidor de PI3K - 20 μ M); AKTi (inibidor de AKT - 10 μ M); TAKi (inibidor de TAK - 200nM); Bay11-7082 (inibidor de I κ B/NF- κ B - 20 μ M); PD95049 (inibidor de ERK (MAPK) - 40 μ M).

***P<0,001 indica significância estatística pela ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Os dados representam dois experimentos independentes (média \pm SD de 4 animais).

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, evidenciamos uma cooperação entre receptores da imunidade servindo de plataforma para definir o padrão inflamatório em um modelo de infecção aguda com *T. cruzi*. Especificamente, demonstramos como o reconhecimento da cepa Y através de TLR2 e TLR9 ativou esplenócitos fagocíticos mononucleares (monócitos, macrófagos e DCs), resultando na produção diferencial de IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-10 e NO (Fig. 19). Além disto, investigamos como a produção de citocinas é modulada pela: celularidade esplênica, expressão de receptores e rede sinalizatória. Para tal, analisamos o comportamento de células de animais deficientes em receptores ou adaptadores frente à estimulação com diferentes ligantes.

6.1 Imunidade inata na infecção por *T. cruzi*

6.1.1 O efeito cooperativo entre TLRs e a inflamação

O *T. cruzi* possui duas moléculas principais capazes de elicitar o sistema imune via TLRs, as glicoproteínas semelhantes a mucina ancoradas a GPI (tGPI-mucina) e os motivos CpG DNA não metilados presentes no genoma do parasita. Respetivos agonistas de TLR2 e TLR9 (Almeida et al., 2000; Campos et al., 2001; Bafica et al., 2006; Bartholomeu et al., 2008). Ele também expressa um glicoinositolfosfolípido (GIPL) de membrana (membro da família GPI) reconhecido pelo TLR4 e os RNAs fita simples ricos em guanosinas e uridinas reconhecidos pelo TLR7 (Oliveira et al., 2004; Caetano et al., 2011). Pelo fato do parasita possuir mais de um agonista, foi proposta a ideia de cooperação entre receptores, a qual foi comprovada pela infecção experimental de animais TLR2^{-/-}, TLR9^{-/-}, TLR2/9^{-/-} e MyD88^{-/-} com a cepa Y (Bafica et al., 2006). A cooperação entre receptores promove uma resposta inflamatória equilibrada durante a infecção por *T. cruzi*. No entanto, os efeitos das interações entre sinais de TLRs nos diferentes tipos celulares ainda são pouco conhecidos, principalmente no que diz respeito ao controle do balanço citocinêmico Th1/Th2 e à função imunomoduladora.

No modelo de infecção aguda com a cepa Y, a resposta imune é caracterizada pela liberação de um padrão inicial de citocinas pró-inflamatórias típicas Th1, especialmente IL-12, IFN- γ e TNF- α , seguido pelo rápido equilíbrio com fatores anti-inflamatórios, como IL-10 e TGF- β (Abrahamsohn and Coffman, 1996; Aliberti et al., 1996; Cardillo et al., 1996). Em adição, a resposta inflamatória, parasitemia e susceptibilidade à infecção são diferencialmente afetadas pelas deficiências em TLRs (Almeida et al., 2000; Bartholomeu et al., 2008; Oliveira et al., 2004; Caetano et al.,

2011). Neste contexto, o TLR9 é apresentado como um forte indutor da resposta pró-inflamatória (Bafica et al., 2005; Bartholomeu et al., 2008), enquanto o TLR2 é indicado como agente imunomodulador (Ropert and Gazzinelli, 2004). Dicotomia observada pela infecção de animais TLR2 ou TLR9 deficientes (Bafica et al., 2006).

Neste trabalho, o TLR9 foi crucial para o controle da replicação do parasita e sobrevivência do hospedeiro, enquanto o TLR2 apresentou funções regulatórias, confirmando a complementaridade de suas funções. Outros grupos mostraram que o TLR4 também tem um potencial pró-inflamatório, além de uma função regulatória, em modelos de infecção com as cepas Y e RA (Oliveira et al., 2004; Poncini et al., 2010; Oliveira et al., 2010). Em paralelo, o TLR7 é proposto como ativador pró-inflamatório na infecção com as cepas CL-Brener e CL-14 (Caetano et al., 2011). Logo, as funções de TLR2 e TLR4 são comparáveis, assim como são as de TLR7 e TLR9.

6.1.2 Potencial pró-inflamatório de TLR2 e TLR9

A resposta pró-inflamatória composta por quimiocinas, citocinas e produtos ativos controla a infecção por *T. cruzi* por meio de dois eixos funcionais: indução da transcrição gênica mediada por IL-12/IFN- γ e atividade antimicrobiana de TNF- α /NO (Abrahamsohn and Coffman, 1996). Neste contexto, o IL-12 induz a síntese de IFN- γ por NKs e posteriormente por linfócitos T (Abrahamsohn and Coffman, 1996), além de ativar a produção de TNF- α por monócitos e macrófagos. Por sua vez, o TNF- α controla a parasitemia ao induzir a produção de NO por macrófagos previamente ativados por IFN- γ (Silva et al., 1995; Lima et al., 1997).

No estágio inicial do processo inflamatório, a liberação de IFN- γ induzida por IL-12 promove um intenso *priming* pró-inflamatório capaz de alterar a expressão proteica de células quiescentes, promover comunicação intercelular e induzir migração. Assim, o IFN- γ controla a expressão de receptores e moléculas sinalizantes, inclusive TLRs. Consequentemente, a ativação de TLRs nas células desencadeia uma sinalização rápida com recrutamento massivo de MyD88. A via TLR:MyD88 amplifica a produção de citocinas, promovendo um efeito *feedback* positivo sobre o *priming* pró-inflamatório (Franklin et al., 2009; Tchaptchet et al., 2012).

Os principais receptores que promovem este efeito estão envolvidos no reconhecimento de ácidos nucleicos, como o TLR9 (Franklin et al., 2009). De fato, as sequências de CpG DNA não metiladas semelhantes às aquelas encontradas no genoma da cepa Y do *T. cruzi* induzem e amplificam a resposta Th1, caracterizando o potencial imunoestimulatório de TLR9 (Bartholomeu et al., 2008). Aqui, demonstramos que este

potencial esteve intimamente associado ao controle de cDCs sobre a síntese direta de IL-12, indireta de IFN- γ e sobre a produção de citocinas por outras células nos primeiros passos da infecção aguda por *T. cruzi*. De fato, os macrófagos TLR9 competentes reconstituídos no sistema de animais TLR9^{-/-} produziram IL-12 em resposta ao CpG DNA, indicando que a imunopredileção de cDCs por TLR9 governou a produção sistêmica de IL-12.

Por sua vez, a atividade pró-inflamatória de TLR2 foi caracterizada pela produção de TNF- α e NO por linhagens de macrófagos estimulados com âncoras GPI da cepa Y (Campos et al., 2001). Aqui, comprovamos que macrófagos e monócitos esplênicos se especializaram na produção de TNF- α em resposta ao Pam3Cys, indicando uma imunopredileção por TLR2.

Neste trabalho utilizamos camundongos deficientes na experimentação, mas uma preocupação ao se trabalhar com estes modelos concerne a existência de fenômenos compensatórios, uma vez que a resposta imune sistêmica é reajustada na ausência de uma molécula ou célula. Por exemplo, encontramos uma compensação envolvendo a imunopredileção por TLR2 na produção de TNF- α , pois esta foi contornada a favor do TLR9 na ausência do TLR2. De fato, o CpG DNA induziu os esplenócitos totais de animais competentes a liberarem uma pequena quantidade desta citocina, contrastando com a elevada produção pelas células de camundongos TLR2^{-/-} estimuladas com o mesmo agonista. Por outro lado, os esplenócitos totais de camundongos TLR9^{-/-} incubados com Pam3Cys não liberaram níveis significativos de IL-12. Neste caso, não houve mecanismo compensatório que contornasse a síntese desta citocina.

6.1.3 Potencial imunomodulador de TLR2

Ropert propôs a atividade regulatória de TLR2 na infecção pela cepa Y de *T. cruzi* (Ropert and Gazzinelli, 2004). Um efeito também demonstrado na infecção com *Mycobacterium tuberculosis* (Quesniaux et al., 2004). Em adição, a exposição prévia de macrófagos derivados de células tronco a agonistas de TLR2 os fez produzir menos citocinas e compostos reativos de oxigênio (ROS) (Yáñez et al., 2013b). Aqui, evidenciamos que esta atividade regulatória esteve relacionada com a interferência entre sinais gatilhados por TLRs e com a indução de IL-10.

Os dados deste trabalho indicaram que o sinal de TLR9 que desencadeia a atividade pró-inflamatória de cDCs e Mo-Ly6C^{hi} seja negativamente regulado pela ativação concomitante de TLR2. cDCs e Mo-Ly6C^{hi} compartilharam a característica de

possuírem elevados níveis de TLR2. Porém, Pam3Cys não induziu níveis significativos de citocinas por cDCs e, quando associado com o CpG DNA, controlou os níveis de citocinas em Mo-Ly6C^{hi}. cDCs e Mo-Ly6C^{hi} também compartilharam a capacidade de produzir IL-12, a qual foi governada pelo TLR9. Porém, com a progressão da infecção por *T. cruzi*, os Mo-Ly6C^{hi} se tornaram hiporresponsivos ao CpG DNA, enquanto as cDCs elevaram os níveis de expressão de TLR9. Além disto, o CpG DNA induziu elevados níveis de IL-12 por esplenócitos TLR2^{-/-}, apesar dos números de Mo-Ly6C^{hi} funcionais serem reduzidos na ausência do receptor. Isto sugere que as cDCs se tornaram as principais produtoras de IL-12 que utilizaram TLR9 durante a infecção por *T. cruzi*. A manipulação de vias de sinalização, MAPKs e fatores de transcrição representa a hipótese mais provável para explicar o efeito regulatório de TLR2 nestas células. De fato, é a hipótese frequentemente encontrada na literatura (Agrawal et al., 2006; Dillon et al., 2004; Wenink et al., 2009).

Outro papel regulador de TLR2 decorreu da produção de IL-10 por Mo-Ly6C^{lo}. O IL-10 é sintetizado por diversos tipos celulares e inibe a atividade de células Th1, NKs e macrófagos, promovendo a resolução ou evitando a exacerbação da resposta inflamatória. Por outro lado, o IL-10 pode impedir a eliminação de patógenos e facilitar a imunopatologia como efeito colateral (Couper et al., 2008). Na infecção com a cepa RA do *T. cruzi*, DCs regulatórias induzem, *in vitro*, o aumento da razão IL-10/IL-12 e liberação de TGF- β (Poncini et al., 2008). A promoção da artrite também é associada com a redução de IL-10 na ausência de TLR2 (Huang et al., 2013). De fato, a razão (IL-12+IFN- γ)/IL-10 está diretamente ligada ao balanço Th1/Th2. Pois, o IL-10 inibe a liberação de IFN- γ , enquanto o IFN- γ suprime a produção de IL-10 por meio da ativação de GSK3, regulação de MAPKs e CREB/AP-1 e interrupção do *feedback* mediado por STAT3 (Hu et al., 2006). Neste contexto, acreditamos que o perfil regulatório do TLR2, caracterizado pelo bloqueio de vias sinalizantes clássicas e produção de IL-10, esteja relacionado com a ativação de Mal/TIRAP, o qual tem sido indicado como modulador chave *downstream* a TLR que dita o balanço de ativação de genes pró e anti-inflamatórios (Mellett et al., 2011).

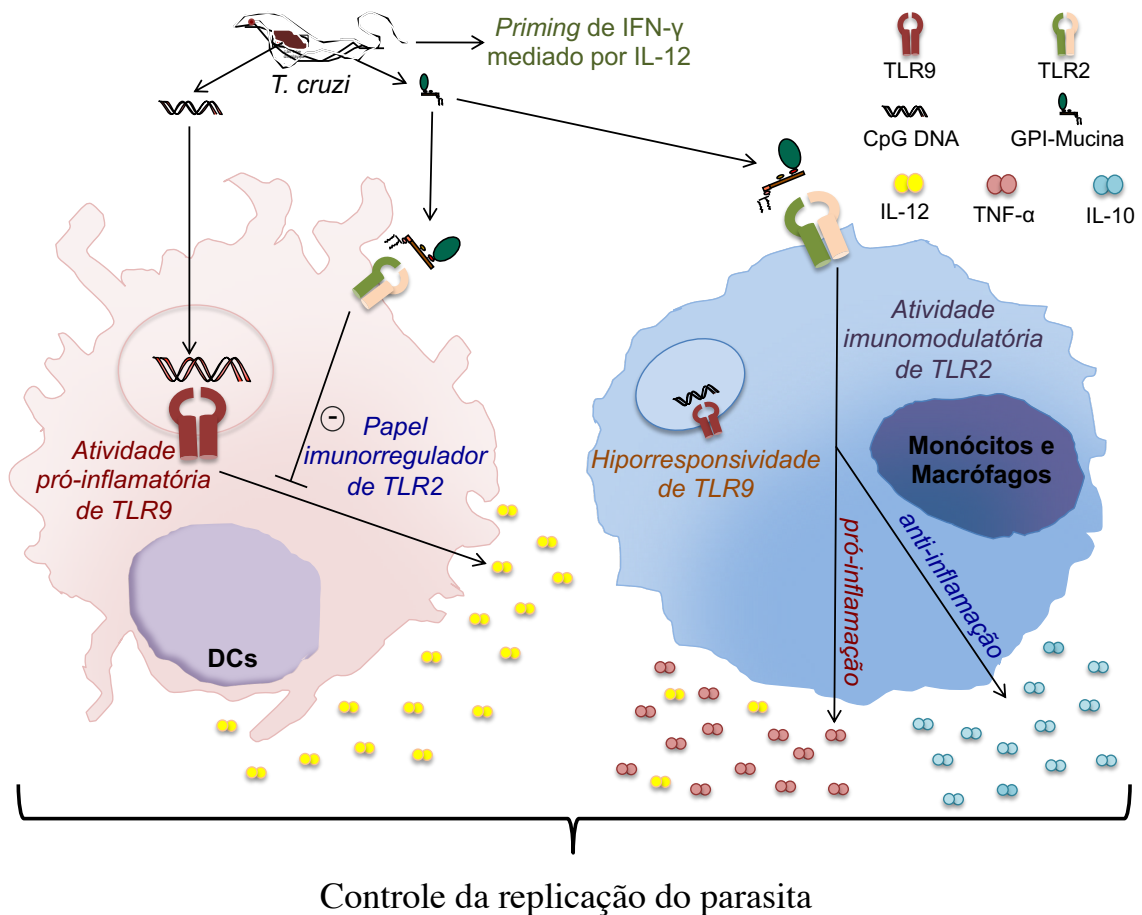


FIGURA 19 – Modelo de cooperação entre células que utilizam TLRs.

O *priming* pró-inflamatório gatilhado por IFN- γ durante a infecção com *T. cruzi* é potencializado pelo envolvimento de TLR9 na produção de IL-12 por cDCs. Paralelamente, é induzida uma hiporresponsividade a CpG DNA em macrófagos e monócitos. O TLR2 atua em DCs como imunorregulador da atividade de TLR9 e é o principal responsável pela produção de TNF- α por monócitos/macrófagos. Em monócitos Ly6C^{lo}, o TLR2 induz síntese de IL-10, caracterizando uma atividade anti-inflamatória.

6.2 Modulação da resposta imune na infecção por *T. cruzi*

Diversos mecanismos podem modular a atividade de TLRs. Aqui discutimos: a celularidade esplênica, expressão de receptores e utilização de sinalizações diferenciais.

6.2.1 A infecção remodela a celularidade do baço

Na homeostasia, as células do eixo fagocítico mononuclear compõem o sangue ou residem nos tecidos linfoides e epiteliais. Porém na inflamação, a liberação de estímulos de proliferação, diferenciação, migração e apoptose altera a celularidade destes tecidos. Neste contexto, definimos “recrutamento” como sendo o aumento tissular do conteúdo celular decorrente da migração somada à diferenciação de precursores *in situ*.

Este trabalho apontou um número expressivo de cDCs, cMφs e Mo-Ly6C^{hi} naturalmente residentes no baço de camundongos saudáveis e os caracterizou como fontes de citocinas. A pronta existência destas células sentinelas esteve relacionada com a rápida resposta pró-inflamatória, fundamental para o controle inicial da replicação do *T. cruzi*. Adicionalmente, observamos o recrutamento de dois tipos de monócitos nos primeiros dias de infecção, principalmente os Mo-Ly6C^{lo} produtores de IL-10. Acreditamos que o recrutamento dos Mo-Ly6C^{lo}, células dificilmente encontradas no baço de animais saudáveis, decorra na liberação tardia de citocinas anti-inflamatórias, responsáveis pelo controle da resposta imune. Em adição, a incubação de esplenócitos totais com agonistas de TLRs promoveu um aumento do número de Mo-Ly6C^{hi}, mas diminuiu ou não alterou a quantidade de Mo-Ly6C^{lo}. Isto sugere que os precursores diretos dos Mo-Ly6C^{hi} se encontram no baço de animais saudáveis, o que provavelmente não ocorre com os Mo-Ly6C^{lo}.

A recente identificação de cMoP instigou o interesse sobre a origem e destino das células que compõem o cerne do eixo fagocítico mononuclear, uma vez que ela é precursora exclusiva na formação de monócitos e macrófagos, não de DCs. Caracterizada por ser Ly6C⁺, a cMoP origina o Mo-Ly6C^{hi}, que por sua vez pode perder expressão de Ly6C e se diferenciar em Mo-Ly6C^{lo}. A transformação direta de cMoP em Mo-Ly6C^{lo}, ou de Mo-Ly6C^{lo} em Mo-Ly6C^{hi} ainda são questionadas (Hettinger et al., 2013). A partir do 4º dia em nosso modelo de infecção, a resposta inflamatória deflagrou um rápido aporte de monócitos expressando níveis intermediários de Ly6C no baço. Acreditamos que a medula óssea forneceu a maior parte destes monócitos inflamatórios, principalmente os Mo-Ly6C^{lo}. Em adição, acreditamos que a menor porção de monócitos que se diferenciou no órgão seja em maioria Mo-Ly6C^{hi}. Segundo

Feuerer, a diferenciação dos grupos de monócitos ocorre predominantemente na medula óssea, a fim de migrarem em um estágio avançado para órgãos linfoides secundários (Hettinger et al., 2013; Richards et al., 2013). Assim, vimos que a presença de Mo-Ly6C^{hi} no baço foi independente da inflamação, mas acentuada por ela. Em contrapartida, os Mo-Ly6C^{lo} foram basicamente inflamatórios, pois dependeram de estímulos do sistema imune para se desenvolver na medula óssea ou sangue. A função dos Mo-Ly6C^{hi} clássicos, também chamados de monócitos pró-inflamatórios e, às vezes, de DCs produtoras de TNF e iNOS (Tip-DCs), envolve o estabelecimento de uma resposta com padrão tipo Th1. No entanto, ainda pouco se sabe sobre os Mo-Ly6C^{lo} não clássicos (Serbina et al., 2008; Robbins and Swirski, 2010; Ingersoll et al., 2011). Recentemente, os Mo-Ly6C^{lo} têm sido relacionados com um comportamento de patrulhamento ao longo das paredes dos vasos sanguíneos em condições saudáveis, derivação em monócitos regulatórios, macrófagos e DCs com capacidades tolerogênicas, além de estarem envolvidos na reparação de danos teciduais durante a regressão de doenças (Arnold et al., 2007; Nahrendorf et al., 2007; Peng et al., 2009).

Como é conhecido, a função primária dos monócitos é “sentir” o ambiente na intenção de adaptar a resposta imune. Por isto, diferentes fatores estão relacionados com o recrutamento celular para os locais onde terão função biológica. Por exemplo, monócitos expressam receptores de quimiocinas distintos: CCR2 tem papel importante na migração de Mo-Ly6C^{hi}, enquanto Mo-Ly6C^{lo} utilizam CX3CR1 (Geissmann et al., 2003; Robbins and Swirski, 2010). Neste contexto, buscamos definir componentes da imunidade capazes de intervir na presença dos dois tipos de monócitos no baço de animais infectados, entre eles: IL-12, TLR2, TLR9 e Mal/TIRAP. Estes componentes têm papel importante na elicitação da resposta imune e na sobrevivência de camundongos na fase inicial da infecção por *T. cruzi* (Aliberti et al., 1996; Abrahamsohn and Coffman, 1996; Vignali and Kuchroo, 2012). Na infecção experimental de camundongos IL-12^{-/-} com *T. cruzi*, observamos uma diminuição do número de ambos os Mo-Ly6C^{hi/lo} em animais deficientes em relação aos selvagens, sem alterações na razão Mo-Ly6C^{hi}/Mo-Ly6C^{lo}. Isto sugere que a inflamação mediada por IL-12 atuou sobre a diferenciação de monócitos, mas não na conversão entre células Ly6C^{hi} e Ly6C^{lo}. Provavelmente, o impacto de IL-12 se deu nos processos iniciais de recrutamento de precursores de monócitos, quando se determina o destino da célula no processo inflamatório. Em adição, a quantidade de Mo-Ly6C^{hi} de camundongos IL-12^{-/-} infectados foi a mesma de animais selvagens saudáveis, o que sugere que a inflamação

mediada por IL-12 promoveu a maturação *in situ* da linhagem dos Mo-Ly6C^{hi} no baço, enquanto atuou sobre a linhagem dos Mo-Ly6C^{lo} em etapas pré-esplênicas.

A depleção de TLR2 ou TLR9 afetou apenas o número de Mo-Ly6C^{hi} esplênicos, enquanto que a ausência de Mal/TIRAP resultou em um menor número de ambos os tipos de monócitos quando comparado a animais selvagens, sadios e infectados. Isto confirmou o potencial modulador dos TLRs sobre o desenvolvimento de monócitos, principalmente os Mo-Ly6C^{hi}. A queda no teor de Mo-Ly6C^{hi} em animais TLR deficientes e o deslocamento para diferenciação de Mo-Ly6C^{hi}, após incubação dos esplenócitos totais com agonistas de TLRs, demonstram que estas células dependeram de ambos os TLRs para desenvolver e, conseqüentemente, desencadear seu papel pró-inflamatório. Por outro lado, a ausência de TLR2 ou TLR9 não afetou o número de Mo-Ly6C^{lo} no baço, mas sim seu potencial inflamatório. Provavelmente, a presença de pelo menos um TLR foi suficiente para estimular seu recrutamento ou outros mecanismos estão envolvidos. Por sua vez, nossos dados indicam que Mal/TIRAP, além de apresentar à função adaptadora de MyD88 nas vias de TLR2 e TLR4, foi chave na regulação da diferenciação/recrutamento/maturação/ativação dos monócitos inflamatórios. Provavelmente, sob influência de outros componentes sinalizantes, como o MyD88, IRAKs, TRAF-6, MAPKs e PI3K.

Durante a infecção por *T. cruzi*, observamos um recrutamento de cMφs no baço. Em paralelo, houve uma redução do número de cDCs, o que indica possível apoptose ou processo migratório. Diferentemente das cDCs e macrófagos residentes, os monócitos estão em um estágio intermediário de diferenciação. Por isto são considerados “células-coringas” no delineamento da resposta imune, uma vez que são responsáveis pela reposição de diferentes tipos de DCs e macrófagos capazes de orientar o elo entre respostas imunes inata e adaptativa. Nos primeiros estágios da infecção por *T. cruzi*, o recrutamento de monócitos inflamatórios para o baço foi fundamental na defesa do organismo. Pois na cronificação de doenças, a polarização dos monócitos correlaciona com a dicotomia existente entre monócitos/macrófagos Ly6C^{hi} clássicos e monócitos/macrófagos Ly6C^{lo} não clássicos, o que se estende às funções destas células. Além disto, diversos modelos demonstram *in vitro* que os monócitos também dão origem às DCs. Naik propõe que as células Ly6C⁺ não possuem este potencial, mas as células Ly6C^{lo} sim (todas DCs CD8⁻) (Naik et al., 2006). Em geral, estabelece-se um padrão onde células pró-inflamatórias derivam de Mo-Ly6C^{hi} e células anti-inflamatórias derivam de Mo-Ly6C^{lo}.

6.2.2 Modulação da expressão de receptores

Considerando que a atuação de um receptor é determinada por sua expressão, identificamos populações celulares com altos níveis de TLR2 e TLR9 para esclarecer suas funções durante a infecção aguda por *T. cruzi*. Em geral, os TLRs são expressos por células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas, porém, restringimos a busca à linhagem que compõe o eixo fagocítico mononuclear, pois ela possui reconhecida importância na produção de citocinas e no controle de infecções (Takeda et al., 2003; Yáñez et al., 2013a). Desta forma, evidenciamos que as cDCs possuem maior razão TLR9/TLR2 que cMφs esplênicos. De fato, DCs são mais eficientes que macrófagos para responder via TLR9 e iniciar a transcrição do gene *IL-12* no modelo de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Pompei et al., 2007).

De acordo com os dados deste trabalho, a liberação de IL-12 por cDCs reforça o *priming* pró-inflamatório induzido pela infecção, modulando a expressão dos TLRs nas células e definindo imunopredileções na produção de citocinas. De fato, a superexpressão de TLR9 resultou na resposta aumentada de cDCs e a redução do mesmo receptor correlacionou com a hiporresponsividade de macrófagos e monócitos ao CpG DNA. Assim, o TLR9 se mostrou um elemento chave no controle da resposta inflamatória. No caso das cDCs e Mo-Ly6C^{hi}, acreditamos que o aumento de expressão de TLR2 regule negativamente as atividades destas células.

Definimos também os monócitos inflamatórios como sendo TLR2^{hi}. Em adição, ambos os tipos de monócitos aumentaram a expressão de TLR2 sob estimulação com agonistas de TLRs, principalmente CpG DNA. Outros estudos relatam altos níveis de TLR2 em monócitos em diferentes modelos de infecções em humanos (Flo et al., 2001; Sabroe et al., 2002; Heggelund et al., 2004) e camundongos (Zigmond et al., 2012). Em alguns, a presença de TLR2 em monócitos tem sido associada como marcador inflamatório, o que cobre apenas um aspecto da atividade do TLR2 (Dasu et al., 2010; Lin et al., 2012; Mukherjee et al., 2015). Quando estimulamos os monócitos simultaneamente com Pam3Cys e CpG DNA, o TLR2 assumiu a função inflamatória nos Mo-Ly6C^{hi}, contrastando com a potencialização do número de Mo-Ly6C^{lo} produtores de citocinas e de sua intensidade de síntese. O aumento da expressão de TLR2 em monócitos sanguíneos também foi visto em pacientes com a doença de Kawasaki (KD) e sepse, indicando que o receptor pode ser responsável pela imunopatogênese em diferentes situações (Lin et al., 2012; Zigmond et al., 2012; Shmuel-Galia et al., 2016). A modulação de expressão de TLR2 também foi mostrada em macrófagos (Liu et al., 2001).

6.2.3 Utilização de sinalizações diferenciais

cDCs e cMφs produziram espontaneamente níveis consideráveis de citocinas, enquanto os monócitos precisaram ser reestimulados *in vitro* com agonistas de TLRs. Todavia, conservaram características intrínsecas que definiram seu *imprinting* sinalizatório após extração do hospedeiro. Em adição, a resposta inflamatória reduzida de animais TLR9^{-/-} e MyD88^{-/-} os tornou mais susceptíveis a infecções, inclusive por *T. cruzi* (Báfica et al., 2005; Huang et al., 2005), enquanto que a inflamação robusta dos animais TLR2^{-/-} e Mal/TIRAP^{-/-} permitiu o controle da parasitemia e resistência à infecção. Logo, a dicotomia de fenótipos nos camundongos deficientes indica a participação dos receptores e adaptadores em vias alternativas, assumindo papéis não-redundantes nas funções celulares. De fato, a mobilização de TLR9:MyD88 promoveu o estabelecimento da resposta Th1, eficaz para a eliminação de patógenos. Em contraste, a mobilização de TLR2:Mal/TIRAP controlou a exacerbação da resposta imune, o que representa um potencial mecanismo para evasão imunológica.

A predileção das células por TLRs direcionou sua especialização na produção de citocinas, mas diferentes vias podem ser gatilhadas no processo, sendo que as principais envolvem MyD88 (Fig. 20A). As DCs utilizam TLR9:MyD88 como eixo de sinalização para produção de IL-12 durante a infecção por *T. cruzi* (Báfica et al., 2005), *T. brucei* (Drennan et al., 2005) e *Toxoplasma gondii* (Scanga et al., 2002) (Fig. 20B). Por outro lado, TLR2:MyD88 é significativo para monócitos e macrófagos produzirem citocinas pró e anti-inflamatórias e metabólitos ativos, especialmente TNF- α , IL-10 e NO (Fig. 20C e D). Neste contexto, vimos que os TLRs induziram citocinas que mediaram a comunicação intercelular e coordenaram a cooperação entre células, explicando em parte, a maior susceptibilidade à infecção de camundongos TLR2/TLR9^{-/-} em comparação com os TLR2^{-/-} ou TLR9^{-/-} (Báfica et al., 2006).

Considerando a atividade modulatória de TLR2, macrófagos e monócitos utilizaram o receptor na síntese de citocinas. Entretanto, a presença de TLR2 em cDCs e Mo-Ly6C^{lo} esteve relacionada com uma regulação negativa do sinal de TLR9 (Fig. 20B). Logo, as diferentes funções deste receptor refletem as possibilidades de sinais alternativos a serem conduzidos, principalmente em monócitos, os quais são extremamente sensíveis aos agonistas de TLRs e induzíveis a diferenciação. A abertura dos sinais alternativos envolve a heterodimerização com TLR1 ou TLR6 e a mobilização diferencial de moléculas sinalizantes como MyD88, Mal/TIRAP, PI3K, MAPKs e fatores de transcrição (NF- κ B, AP-1, CREB e IRFs).

Um novo conceito emergiu neste estudo: o padrão de citocinas exibido pelos Mo-Ly6C^{hi/lo} foi célula-contexto dependente e TLR independente. Seja qual for o agonista de TLR utilizado, as populações de monócitos produziram o mesmo padrão de citocinas. Os Mo-Ly6C^{hi} produziram TNF- α e IL-12, o que está de acordo com trabalhos que definem essas células como pró-inflamatórias (Lin et al., 2009; Rivollier et al., 2012; Zigmund et al., 2012), enquanto os Mo-Ly6C^{lo} foram fontes de TNF- α e IL-10 (Fig. 20C e D). Isto demonstrou o uso de diferentes vias de sinalização pelo mesmo receptor e ilustrou o conceito da plasticidade do TLR2. Além disto, o fato dos diferentes monócitos TLR2^{hi} estarem envolvidos na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias pressupõe a possibilidade de manipulação do balanço entre perfis citocinêmicos Th1/Th2. Pois, o uso de inibidores de moléculas sinalizantes ou o manejo de fatores do microambiente inflamatório podem interferir no recrutamento dos monócitos ou na disponibilidade de suas moléculas sinais, inclusive receptores.

Os ligantes de TLRs demonstraram este potencial modulatório, como é o caso do CpG DNA. Aqui, evidenciamos que o TLR9 governou a liberação de IL-12 por cDCs, auxiliada por Mo-Ly6C^{hi}, e conseqüentemente, a cooperação entre receptores. Em adição, vimos que a depleção de IL-12 impactou sobre o número de ambas as populações de monócitos TLR2^{hi} e sobre o potencial inflamatório de Mo-Ly6C^{lo}. O que demonstra que o microambiente foi essencial para a maturação de ambos os tipos de monócitos. Neste contexto, verificamos também que o TLR9 foi fundamental para a existência de Mo-Ly6C^{hi} no baço de animais infectados, mas não para sua função inflamatória. Por outro lado, mesmo que a presença de Mo-Ly6C^{lo} não tenha sido afetada na ausência de TLR9, os Mo-Ly6C^{lo}TLR9^{-/-} apresentaram uma inusitada dificuldade em responder ao agonista de TLR2.

Os parâmetros que favorecem a produção de IL-10 em resposta aos agonistas de TLRs ainda não estão esclarecidos. Entretanto, a competência dos Mo-Ly6C^{lo} na produção desta citocina em resposta ao Pam3Cys nos possibilitou demonstrar o requerimento de Mal/TIRAP, TAK-1, ERK1/2 e NF- κ B para a produção de IL-10. Mellet sugere a função de Mal/TIRAP como chave reguladora *upstream* de CREB, um fator de transcrição ativado por ERK e indutor de IL-10 (Mellett et al., 2011), reforçando a ideia de que Mal/TIRAP desempenhou um papel imunorregulatório durante a infecção pelo *T. cruzi*, além de estar envolvido na homeostase e em outras doenças (Aviello et al., 2014). Isto correlacionou com a competência dos camundongos Mal/TIRAP^{-/-} infectados em montar a resposta de defesa do hospedeiro e induzir níveis mais altos de IL-12, NO e IFN- γ .

Inicialmente descrito como molécula recrutadora de MyD88 (Fitzgerald et al., 2001; Sheedy and O'Neill, 2007), Mal/TIRAP tem sido visto como uma ponte para vias alternativas, se tornando um importante regulador da ativação de TLRs (Bernard and O'Neill, 2013). Neste trabalho, Mal/TIRAP foi necessário para a produção de citocinas pelos Mo-Ly6C^{lo}, mas não pelos Mo-Ly6C^{hi} em resposta aos agonistas de TLR2 e TLR9. Assim, confirmamos que o padrão de citocinas exibido pelos monócitos foi TLR-contexto independente e diferencialmente comprometido com a função da proteína adaptadora Mal/TIRAP (Fig. 20C e D). Entretanto, o mecanismo envolvido no requerimento diferencial de Mal/TIRAP pelas duas populações de monócitos não foi elucidado. Provavelmente há expressão diferencial do adaptador ou divergência na mobilização de correceptores, moléculas sinalizantes e fatores de transcrição. O adaptador também pode influenciar a expressão de outras proteínas, por exemplo: FIZZ1 e arginase-1, que representam marcadores clássicos da polarização de monócitos/macrófagos M2 (Jablonski et al., 2015). Todos estes pontos podem modular a ativação de diferentes cascatas de sinalização e, por fim, impactar diretamente no padrão de liberação de citocinas pelos monócitos.

O fato dos Mo-Ly6C^{hi} não precisarem de Mal/TIRAP para responder a agonistas de TLRs assemelha ao descrito que ele é dispensável quando as interações entre o TLR2 e seu agonista são prolongadas ou aumentadas (Cole et al., 2010). O que pode ser conseguido ao se utilizar uma concentração elevada de agonista de TLR2 (Kenny et al., 2009), pela indução da internalização do complexo TLR2:ligante ou devido a um nível elevado de expressão de TLR2, como ocorre nos Mo-Ly6C^{hi}TLR2^{hi}. Em contraste, a depleção de Mal/TIRAP e de TLR2 demonstrou o papel do eixo TLR2:Mal/TIRAP na função de produção de citocinas pelos Mo-Ly6C^{lo}. Porém, a atividade de Mal/TIRAP vai muito além da modulação do potencial inflamatório dos monócitos, pois vimos que ele foi essencial para o recrutamento de ambos os tipos de células, juntamente com o IL-12. O fato dos Mo-Ly6C^{lo}IL-12^{-/-} e TLR9^{-/-} apresentarem menor responsividade aos agonistas de TLRs, principalmente ao CpG DNA, e a ação indutora de TLR9 sobre a expressão de TLR2 sugerem que o IL-12 pode modular a expressão de TLR9 nestas células e, indiretamente, induzir a expressão do TLR2. Outros componentes, como o próprio Mal/TIRAP, também podem ter a expressão regulada neste processo. Em adição, o fato dos Mo-Ly6C^{lo} de animais competentes, mas não os de Mal/TIRAP^{-/-} e TLR2^{-/-}, produzirem citocinas em resposta ao CpG DNA, sugere que o eixo sinalizatório TLR2:Mal/TIRAP determina o *imprinting* sinalizatório destas células, mas este pode ser acessado por outros receptores. Ou seja, o TLR9

poderia gatilhar um sinal via Mal/TIRAP em subpopulações de monócitos desde que haja ativação concomitante ou previa via TLR2. Esta interação intracelular entre os sinais de TLR9 e TLR2 pode ser mediada pelo próprio Mal/TIRAP, sugerindo que o adaptador desempenha um papel na sinalização de receptores endossomais. Previamente, Bonham relatou que Mal/TIRAP é requerido para a sinalização *downstream* de TLRs endossomais em resposta a ácidos nucleicos virais, incluindo o agonista de TLR9 (Bonham et al., 2014). Portanto, é provável que o Mal/TIRAP assuma um papel fora da via de sinalização TLR convencional para transformar os Mo-Ly6C^{lo} em células produtoras de citocina. Como excluímos a via PI3K:Akt da produção de IL-10, o fator responsável pela ativação diferencial destas células deve mobilizar uma rede de sinais alternativos envolvendo MyD88, Mal/TIRAP e outros componentes (MAPKs [Ex.: ERKs], c-Fos [AP-1], CREB...).

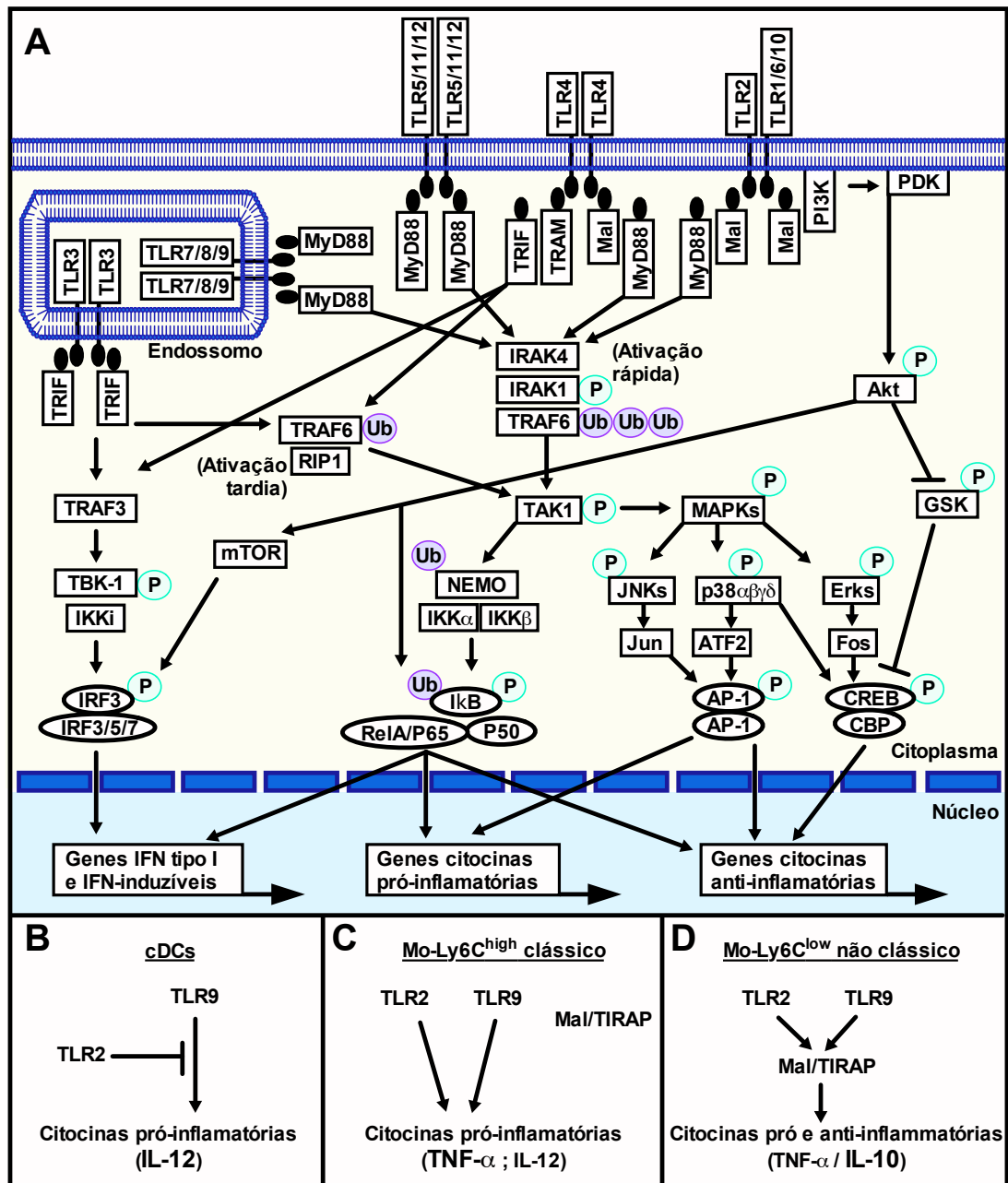


FIGURA 20 – Rede sinalizatória de TLRs em camundongos.

A, A sinalização induzida por ligante incicia com a dimerização de TLRs. Em seguida, o domínio TIR dos receptores recruta adaptadores que contêm TIR (MyD88 e Mal/TIRAP ou TRIF e TRAM). A interação entre adaptadores, IRAKs e TRAFs leva à ativação de TAK-1, MAPKs (ERK, JNK e p38) e fatores de transcrição (NF- κ B, IRFs, CREB e AP-1). Em paralelo, TLRs podem recrutar PI3K, levando à ativação de mTOR e Akt. B-D, Interações entre sinais de receptores durante a infecção por *T. cruzi*. B, TLR2 regula negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por TLR9 em cDCs. C, TLRs induzem IL-12 e TNF- α por Mo-Ly6C^{hi} de forma Mal/TIRAP independente. D, TLRs induzem IL-10 e TNF- α por Mo-Ly6C^{lo} de forma Mal/TIRAP dependente.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que há um “casamento perfeito” entre TLR2 e TLR9 na elicitação do sistema imune durante a defesa do hospedeiro contra o *T. cruzi*. O TLR9 apresentou um papel imunoestimulatório capaz de controlar a infecção, ao induzir um perfil de citocinas pró-inflamatórias. Em contraste, a plasticidade de TLR2 ao induzir citocinas pró e anti-inflamatórias definiu um papel imunomodulador na resposta imune. A relação TLR9/TLR2 correlacionou com a razão na produção de IL-12/IL-10, caracterizando o balanço citocinêmico Th1/Th2 durante a infecção. Além disso, analisar as comunicações entre monócitos, macrófagos e DCs permitiu descrever novos níveis de cooperação entre os sinais gatilhados pelos receptores. Por exemplo: a produção sinérgica e antagônica de citocinas marcou a complementaridade funcional das células; monócitos/macrófagos apresentaram hiporresponsividade ou tolerância a agonistas de TLR9; cDCs tiveram imunopredileção por TLR9 e monócitos/macrófagos por TLR2. Conhecer as relações entre TLR2 e TLR9 nos permitirá hipotetizar sobre a utilização terapêutica de agonistas de TLRs a fim de balancear o desregulamento da resposta imune em outras doenças. Este trabalho impacta diretamente sobre a escolha dos agonistas de TLR no uso imunoterapêutico e sugere que a combinação de agonistas dos TLR é mais eficiente, em termos de qualidade e duração de resposta.

1) *Como diferentes células são ativadas pelo mesmo TLR?* Um TLR ativa vias alternativas de acordo com a rede sinalizatória que a célula possui, sob a luz de diversos mecanismos regulatórios. Portanto, não somente a célula deve expressar o receptor, mas deve direcionar a sinalização para ativação de grupos gênicos específicos.

2) *Como uma célula pode ser ativada por diferentes TLRs, isoladamente ou em combinação?* Cada TLR tem potencial de mobilizar um grupo de moléculas sinalizantes, o que determinará a função da célula na elicitação da resposta imune. Porém, os sinais desencadeados por cada TLR podem interagir, resultando em uma rede integrada de regulação capaz de promover respostas sistêmicas mais robustas. O TLR9 sozinho induz pró-inflamação exacerbada. O TLR2 sozinho tem dificuldade de controlar a infecção. Juntos, o potencial pró-inflamatório de TLR9 permite controle da infecção, mas a modulação por TLR2 impede que a resposta inflamatória seja danosa ao hospedeiro.

3) *Como ocorre a cooperação entre células da imunidade no delineamento da resposta imune?* Durante a infecção por *T. cruzi*, as cDCs elicitam a resposta contra a infecção, através da liberação de IL-12 mediada por TLR9, enquanto os cMφs ajudam a eliminar o parasita ao produzir TNF- α e NO. Com o recrutamento de monócitos, há manutenção da resposta de TNF- α e NO, reposição da celularidade esplênica e elaboração da interface entre imunidades inata e adaptativa. A inflamação é desenrolada pela atividade pró-inflamatória dos Mo-Ly6C^{hi/lo} e controlada pela produção de IL-10 por Mo-Ly6C^{lo}. A razão entre a função de MyD88 e de Mal/TIRAP está diretamente vinculada à razão IL-12/IL10 e, conseqüentemente à razão Th1/Th2 (Fig. 21).

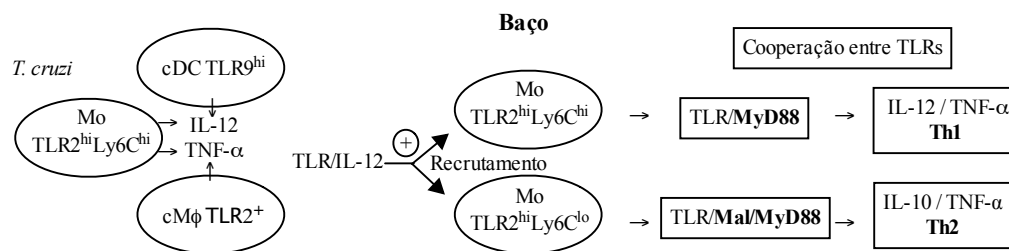


FIGURA 21 – Balanço citocínico modulado por TLRs.

4) *Principais achados do trabalho:*

☐ O efeito cooperativo entre TLR2 e TLR9 promove uma resposta equilibrada durante a infecção por *T. cruzi*.

☐ Confirmamos o papel imunoestimulador de TLR9 na indução de um perfil Th1 (regulação positiva de IL-12 e IFN- γ) e o papel imunomodulador de TLR2 na indução de um perfil Th2 (produção de IL-10 e regulação negativa de IL-12 e IFN- γ).

☐ Demonstramos que o uso de MyD88 e Mal/TIRAP não é redundante durante a infecção por *T. cruzi*, mas sim, há um efeito cooperativo entre adaptadores: propusemos que MyD88 está envolvido na resposta pró-inflamatória, assim como o TLR9, e que Mal/TIRAP possui um papel modulatório, assim como o TLR2.

☐ Indicamos o TLR9 como receptor essencial a cDCs na produção de IL-12 e o TLR2 em cMφs esplênicos para a síntese de TNF- α durante a fase aguda da infecção.

☐ O agonista de TLR2 (Pam3Cys) ativa a produção de citocinas em macrófagos e monócitos, porém regula negativamente a síntese de IL-12 por cDCs. O agonista de TLR9 (CPG DNA) ativa a produção de IL-12 por cDCs, porém monócitos e macrófagos são hiporresponsivos a este agonista durante a infecção por *T. cruzi*.

☐ Níveis elevados de TLR2 ou TLR9 permitem identificar células funcionais.

□ Demonstramos a existência de duas populações de monócitos inflamatórios TLR2^{hi} (F4/80^{lo}CD11b^{hi}MHCII^{lo}CD11c⁺Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi}), distintas pela expressão de Ly6C e recrutadas durante a infecção por *T. cruzi*: monócitos clássicos (Mo-Ly6C^{hi}) e monócitos não-clássicos (Mo-Ly6C^{lo}).

□ Mo-Ly6C^{hi} representam uma população heterogênea igualmente responsiva a agonistas de TLR2 e TLR9. Estão associadas a um perfil pró-inflamatório, pois sintetizam TNF- α (~80% das células) e em menor proporção IL-12 (~20% das células).

□ Mo-Ly6C^{lo} representam uma população heterogênea responsiva a agonista de TLR2 e em menor escala a TLR9. Estão associadas a um perfil modulador de resposta, pois sintetizam TNF- α e IL-10.

□ Os agonistas de TLR, principalmente TLR9, influenciam de forma diferencial os Mo-Ly6C^{hi/lo}TLR2^{hi} em termos de número, expressão de TLR2 e propriedades inflamatórias.

□ A cooperação entre agonistas de TLR2 e TLR9 induz a presença de Mo-Ly6C^{hi}TLR2^{hi} no baço, mas não é essencial para seu potencial inflamatório.

□ A cooperação entre agonistas de TLR2 e TLR9 não é necessária para recrutar os Mo-Ly6C^{lo}TLR2^{hi} para o baço durante a infecção, mas sim, para desencadear seu potencial inflamatório. De fato, potencializa os níveis de produção de citocinas por estas células.

□ Os níveis de expressão de TLR2 em ambas as populações de monócitos são potencializados por ativação de TLR9. Agonista de TLR2 induz aumento da expressão do próprio receptor em Mo-Ly6C^{hi}, mas não em Mo-Ly6C^{lo}.

□ IL-12, TLR9, TLR2 e Mal/TIRAP estão diferencialmente envolvidos no recrutamento de monócitos para o baço. Propusemos o IL-12 como um fator recrutador de ambos os monócitos, na mesma proporção; Mal/TIRAP como recrutador de ambos os monócitos; TLR2 e TLR9 como fatores importantes no recrutamento de Mo-Ly6C^{hi}. Provavelmente, o IL-12 atua em um estágio inicial na diferenciação de monócitos, afetando o número de ambas as populações.

□ Propusemos a sinalização via TLR2:Mal/TIRAP; ativação de TAK-1, NF- κ B e MAPK (ERK) como mecanismo básico na produção de IL-10 por Mo-Ly6C^{lo}.

□ Mal/TIRAP é essencial para Mo-Ly6C^{lo}, mas não é requerido por Mo-Ly6C^{hi} para produzir citocinas.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Investigar a heterogeneidade de monócitos/macrófagos e DCs no baço e na medula óssea e os mecanismos de regulação que estabelecem as normas da diferenciação e migração celular:

- Estimular *in vitro* as células do baço ou da medula óssea com agonistas de TLRs e avaliar o processo de diferenciação em monócitos, macrófagos e DCs;
- Fazer o *sorting* celular dos dois tipos de monócitos, reconstituir animais deficientes e investigar a capacidade migratória;
- Avaliar a capacidade migratória de monócitos pela expressão de receptores de quimiocinas (EX: CCR2, CX3CR1 e CCR7) e da utilização de marcadores de diferenciação e recrutamento, como o CD115;
- Estudar *in vitro* o envolvimento de IL-12, IFN- γ e Mal/TIRAP na diferenciação e capacidade migratória de monócitos;
- Caracterizar as vias de sinalização utilizadas por diferentes células na produção de diferentes citocinas (IL-12, TNF- α e IL-10);
- Investigar o papel de Mal/TIRAP x MyD88 e PI3K na regulação positiva e negativa na produção de citocinas em diferentes células da medula e baço.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abrahamsohn, I. a, and R.L. Coffman. 1996. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp. Parasitol.* 84:231–44. doi:10.1006/expr.1996.0109.
- Agrawal, A., S. Dillon, T.L. Denning, and B. Pulendran. 2006. ERK1–/– Mice Exhibit Th1 Cell Polarization and Increased Susceptibility to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 176:5788–5796.
- Aliberti, J.C., M. a Cardoso, G. a Martins, R.T. Gazzinelli, L.Q. Vieira, and J.S. Silva. 1996. Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. Immun.* 64:1961–7.
- Almeida, I.C., M.M. Camargo, D.O. Procópio, L.S. Silva, a Mehlert, L.R. Travassos, R.T. Gazzinelli, and M. a Ferguson. 2000. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from Trypanosoma cruzi are potent proinflammatory agents. *EMBO J.* 19:1476–85. doi:10.1093/emboj/19.7.1476.
- Alvares, T., M.V. Silva, M.T. Mendes, T.M. Carvalho-costa, L.R. Batista, E. Lages-silva, V. Rodrigues, C.J. Oliveira, and L.E. Ramirez. 2014. Immunomodulation by Trypanosoma cruzi : Toward Understanding the Association of Dendritic Cells with Infecting TcI and TcII Populations. *J. Immunol. Res.* 12p.
- Alvarez, Y., C. Municio, S. Alonso, M. Sánchez Crespo, and N. Fernández. 2009. The induction of IL-10 by zymosan in dendritic cells depends on CREB activation by the coactivators CREB-binding protein and TORC2 and autocrine PGE2. *J. Immunol.* 183:1471–9. doi:10.4049/jimmunol.0900312.
- An, H., H. Xu, Y. Yu, M. Zhang, R. Qi, and X. Yan. 2002a. Up-regulation of TLR9 gene expression by LPS in mouse macrophages via activation of NF-kB, ERK and p38 MAPK signal pathways. *Immunol. Lett.* 81:165–169.
- An, H., Y. Yu, M. Zhang, H. Xu, R. Qi, X. Yan, S. Liu, W. Wang, Z. Guo, J. Guo, Z. Qin, and X. Cao. 2002b. Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology.* 106:38–45.
- Anwar, M.A., S. Basith, and S. Choi. 2013. Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. *Exp. Mol. Med.* 45:e11. doi:10.1038/emm.2013.28.
- Aoki, M.P., E.A. Carrera-Silva, H. Cuervo, M. Fresno, N. Gironès, and S. Gea. 2012. Nonimmune Cells Contribute to Crosstalk between Immune Cells and Inflammatory Mediators in the Innate Response to Trypanosoma cruzi Infection. *J. Parasitol. Res.* 2012:737324. doi:10.1155/2012/737324.
- Arnold, L., A. Henry, F. Poron, Y. Baba-Amer, N. van Rooijen, A. Plonquet, R.K. Gherardi, and B. Chazaud. 2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* 204:1057–69. doi:10.1084/jem.20070075.
- Aubry, C., S.C. Corr, S. Wienerroither, C. Goulard, R. Jones, A.M. Jamieson, T. Decker, L. a J. O’Neill, O. Dussurget, and P. Cossart. 2012. Both TLR2 and TRIF contribute to interferon-β production during Listeria infection. *PLoS One.* 7:e33299. doi:10.1371/journal.pone.0033299.
- Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann. 2009. Blood monocytes: development,

- heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27:669–92. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132557.
- Aviello, G., S.C. Corr, D.G.W. Johnston, L. a J. O’Neill, and P.G. Fallon. 2014. MyD88 adaptor-like (Mal) regulates intestinal homeostasis and colitis-associated colorectal cancer in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 306:G769–78. doi:10.1152/ajpgi.00399.2013.
- Bafica, A., H.C. Santiago, R. Goldszmid, C. Ropert, R.T. Gazzinelli, and A. Sher. 2006. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 177:3515–9.
- Bafica, A., C. a Scanga, C.G. Feng, C. Leifer, A. Cheever, and A. Sher. 2005. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* 202:1715–24. doi:10.1084/jem.20051782.
- Bai, Y., C. Qian, L. Qian, F. Ma, J. Hou, Y. Chen, Q. Wang, and X. Cao. 2012. Integrin CD11b negatively regulates TLR9-triggered dendritic cell cross-priming by upregulating microRNA-146a. *J. Immunol.* 188:5293–302. doi:10.4049/jimmunol.1102371.
- Baldrige, M.T., K.Y. King, N.C. Boles, D.C. Weksberg, and M. a Goodell. 2010. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature.* 465:793–7. doi:10.1038/nature09135.
- Baldrige, M.T., K.Y. King, and M. a Goodell. 2011. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends Immunol.* 32:57–65. doi:10.1016/j.it.2010.12.003.
- Banerjee, A., and S. Gerondakis. 2007. Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. *Immunol. Cell Biol.* 85:420–424. doi:10.1038/sj.icb.7100098.
- Bardwell, L. 2016. Mechanisms of MAPK signalling specificity L. *Biochem Soc Trans.* 34:837–841. doi:10.1042/BST0340837.Mechanisms.
- Bartholomeu, D.C., C. Ropert, M.B. Melo, P. Parroche, C.F. Junqueira, S.M.R. Teixeira, C. Sirois, P. Kasperkovitz, C.F. Knetter, E. Lien, E. Latz, D.T. Golenbock, and R.T. Gazzinelli. 2008. Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 181:1333–44.
- Barton, G.M., and J.C. Kagan. 2009. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat. Rev. Immunol.* 9:535–42. doi:10.1038/nri2587.
- Bekeredjian-Ding, I., S.I. Roth, S. Gilles, T. Giese, A. Ablasser, V. Hornung, S. Endres, and G. Hartmann. 2006. T cell-independent, TLR-induced IL-12p70 production in primary human monocytes. *J. Immunol.* 176:7438–7446. doi:10.4049/jimmunol.176.12.7438.
- van Bergenhenegouwen, J., T.S. Plantinga, L. a B. Joosten, M.G. Netea, G. Folkerts, A.D. Kraneveld, J. Garssen, and A.P. Vos. 2013. TLR2 & Co: a critical analysis of the complex interactions between TLR2 and coreceptors. *J. Leukoc. Biol.* 94:885–902. doi:10.1189/jlb.0113003.
- Bernard, N.J., and L. a O’Neill. 2013. Mal, more than a bridge to MyD88. *IUBMB Life.* 65:777–786. doi:10.1002/iub.1201.
- Bhan, U., M.N. Ballinger, X. Zeng, M.J. Newstead, M.D. Cornicelli, and T.J.

- Standiford. 2010. Cooperative interactions between TLR4 and TLR9 regulate interleukin 23 and 17 production in a murine model of gram negative bacterial pneumonia. *PLoS One*. 5:e9896. doi:10.1371/journal.pone.0009896.
- Bonham, K.S., M.H. Orzalli, K. Hayashi, A.I. Wolf, C. Glanemann, W. Weninger, A. Iwasaki, D.M. Knipe, and J.C. Kagan. 2014. A promiscuous lipid-binding protein diversifies the subcellular sites of toll-like receptor signal transduction. *Cell*. 156:705–716. doi:10.1016/j.cell.2014.01.019.
- Brandt, K.J., C. Fickentscher, E.K.O. Kruithof, and P. De Moerloose. 2013. TLR2 ligands induce NF- κ B activation from endosomal compartments of human monocytes. *PLoS One*. 8:1–11. doi:10.1371/journal.pone.0080743.
- Brener, Z. 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 4:389–396.
- Brener, Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Anu. Rev. Microbiol.* 27:347–382.
- Burns, K., F. Martinon, C. Esslinger, H. Pahl, P. Schneider, J.-L. Bodmer, F. Di Marco, L. French, and J. Tschopp. 1998. MyD88, an Adapter Protein Involved in Interleukin-1 Signaling. *J. Biol. Chem.* 273:12203–12209. doi:10.1074/jbc.273.20.12203.
- Caetano, B.C., B.B. Carmo, M.B. Melo, A. Cerny, S.L. dos Santos, D.C. Bartholomeu, D.T. Golenbock, and R.T. Gazzinelli. 2011. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 187:1903–11. doi:10.4049/jimmunol.1003911.
- Campos, M.A.S., I.C. Almeida, O. Takeuchi, S. Akira, E.P. Valente, D.O. Procópio, L.R. Travassos, J. a Smith, D.T. Golenbock, and R.T. Gazzinelli. 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* 167:416–23.
- Cardillo, F., J.C. Voltarelli, S.G. Reed, and J.S. Silva. 1996. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect. Immun.* 64:128–34.
- Cargnello, M., and P.P. Roux. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75:50–83. doi:10.1128/MMBR.00031-10.
- Carlezon, W.A., R.S. Duman, and E.J. Nestler. 2005. The many faces of CREB. *Trends Neurosci.* 28:436–45. doi:10.1016/j.tins.2005.06.005.
- Celhar, T., R. Magalhães, and a-M. Fairhurst. 2012. TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong. *Immunol. Res.* 53:58–77. doi:10.1007/s12026-012-8270-1.
- Chai, L.Y. a, A.G. Vonk, B.J. Kullberg, P.E. Verweij, I. Verschueren, J.W.M. van der Meer, L. a B. Joosten, J.-P. Latgé, and M.G. Netea. 2011. *Aspergillus fumigatus* cell wall components differentially modulate host TLR2 and TLR4 responses. *Microbes Infect.* 13:151–9. doi:10.1016/j.micinf.2010.10.005.
- Chamorro, S., J.J. García-Vallejo, W.W.J. Unger, R.J. Fernandes, S.C.M. Bruijns, S. Laban, B.O. Roep, B. a 't Hart, and Y. van Kooyk. 2009. TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program. *J. Immunol.* 183:2984–94. doi:10.4049/jimmunol.0801155.
- Chaturvedi, A. and, and S.K. Pierce. 2009. How location governs Toll like receptor signaling. *Traffic.* 10:621–628. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00899.x.How.

- Chiang, C.Y., V. Veckman, K. Limmer, and M. David. 2012. Phospholipase C γ -2 and intracellular calcium are required for lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 4 (TLR4) endocytosis and interferon regulatory factor 3 (IRF3) activation. *J. Biol. Chem.* 287:3704–3709. doi:10.1074/jbc.C111.328559.
- Chinenov, Y., and T.K. Kerppola. 2001. Close encounters of many kinds : Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene.* 20:2438–2452.
- Cole, L.E., M.H.W. Laird, A. Seekatz, A. Santiago, Z. Jiang, E. Barry, K.A. Shirey, K. a Fitzgerald, and S.N. Vogel. 2010. Phagosomal retention of Francisella tularensis results in TIRAP/Mal-independent TLR2 signaling. *J. Leukoc. Biol.* 87:275–81. doi:10.1189/jlb.0909619.
- Colonna, M. 2007. TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own. *Eur. J. Immunol.* 37:306–9. doi:10.1002/eji.200637009.
- Couper, K.N., D.G. Blount, and E.M. Riley. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* 180:5771–7.
- Coura, J.R., and J. Borges-Pereira. 2010. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 115:5–13. doi:10.1016/j.actatropica.2010.03.008.
- Creagh, E.M., and L. a J. O’Neill. 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.* 27:352–7. doi:10.1016/j.it.2006.06.003.
- Cremer, T.J., J.P. Butchar, and S. Tridandapani. 2011. Francisella Subverts Innate Immune Signaling: Focus On PI3K/Akt. *Front. Microbiol.* 5:13. doi:10.3389/fmicb.2011.00013.
- Crozat, K., E. Vivier, and M. Dalod. 2009. Crosstalk between components of the innate immune system: promoting anti-microbial defenses and avoiding immunopathologies. *Immunol. Rev.* 227:129–49. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00736.x.
- Cuellar, A., S.P. Santander, M.D.C. Thomas, F. Guzmán, A. Gómez, M.C. López, and C.J. Puerta. 2008. Monocyte-derived dendritic cells from chagasic patients vs healthy donors secrete differential levels of IL-10 and IL-12 when stimulated with a protein fragment of Trypanosoma cruzi heat-shock protein-70. *Immunol. Cell Biol.* 86:255–60. doi:10.1038/sj.icb.7100146.
- Curtiss, L.K., A.S. Black, D.J. Bonnet, and P.S. Tobias. 2012. TLR1 and TLR6 in murine atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 53:2126–2132.
- Dasu, M.R., S. Devaraj, P. Samuel, and I. Jialal. 2010. Increased Toll-Like Receptor (TLR) Activation and TLR Ligands in Recently Diagnosed Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes Care.* 33:861–868. doi:10.2337/dc09-1799.
- Dempsey, A., and A.G. Bowie. 2015. Innate immune recognition of DNA : A recent history. *Virology.* 1–7. doi:10.1016/j.virol.2015.03.013.
- Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, a Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, and Z.J. Chen. 2000. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell.* 103:351–361. doi:10.1016/S0092-8674(00)00126-4.
- Dillon, S., A. Agrawal, T. Van Dyke, L. Mccauley, A. Koh, C. Maliszewski, S. Akira, and B. Pulendran. 2004. A Toll-Like Receptor 2 Ligand Stimulates Th2 Responses In Vivo, via Induction of Extracellular Signal-Regulated Kinase Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Fos in Dendritic Cells. *J. Immunol.* 172:4733–

4743.

- Doble, B.W. 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* 116:1175–1186. doi:10.1242/jcs.00384.
- Dobrovolskaia, M.A., A.E. Medvedev, E. Karen, N. Cuesta, V. Toshchakov, T. Ren, M.J. Cody, S.M. Michalek, N.R. Rice, and S.N. Vogel. 2003. Induction of In Vitro Reprogramming by Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 Agonists in Murine Macrophages: Effects of TLR “Homotolerance” Versus “Heterotolerance” on NF- κ B Signaling Pathway Components. *J. Immunol.* 170:508–519.
- Domínguez, P.M., and C. Ardavín. 2010. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol. Rev.* 234:90–104. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00876.x.
- Doyle, S.L., and L. a J. O’Neill. 2006. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem. Pharmacol.* 72:1102–13. doi:10.1016/j.bcp.2006.07.010.
- Drennan, M.B., J. Van Den Abbeele, V.J. Quesniaux, M. Barkhuizen, F. Brombacher, P. De Baetselier, B. Ryffel, and S. Magez. 2005. The Induction of a Type 1 Immune Response following a Trypanosoma brucei Infection Is MyD88 Dependent. *J. Immunol.* 175:2501–2509.
- Drutman, S.B., J.C. Kendall, and E.S. Trombetta. 2012. Inflammatory spleen monocytes can upregulate CD11c expression without converting into dendritic cells. *J. Immunol.* 188:3603–10. doi:10.4049/jimmunol.1102741.
- Dumitru, C.D., J.D. Ceci, C. Tsatsanis, D. Kontoyiannis, K. Stamatakis, J. Lin, C. Patriotis, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, G. Kollias, and P.N. Tsichlis. 2000. TNF- α Induction by LPS Is Regulated Posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-Dependent Pathway. *Cell.* 103:1071–1083.
- Dunne, A., S. Carpenter, C. Brikos, P. Gray, A. Strelow, H. Wesche, N. Morrice, and L. a J. O’Neill. 2010. IRAK1 and IRAK4 promote phosphorylation, ubiquitination, and degradation of MyD88 adaptor-like (Mal). *J. Biol. Chem.* 285:18276–82. doi:10.1074/jbc.M109.098137.
- Eferl, R., and E.F. Wagner. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 3:859–68. doi:10.1038/nrc1209.
- Fagerholm, S.C., M. Macpherson, M.J. James, and C.S. Lau. 2013. The CD11b-integrin (ITGAM) and systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 22:657–663.
- Fitzgerald, K. a, E.M. Palsson-McDermott, a G. Bowie, C. a Jefferies, a S. Mansell, G. Brady, E. Brint, a Dunne, P. Gray, M.T. Harte, D. McMurray, D.E. Smith, J.E. Sims, T. a Bird, and L. a O’Neill. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature.* 413:78–83. doi:10.1038/35092578.
- Flo, T.H., Ø. Halaas, S. Torp, L. Ryan, E. Lien, B. Dybdahl, A. Sundan, O. Halaas, and T. Espevik. 2001. Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J. Leukoc. Biol.* 69:474–81.
- Ford, A.Q., P. Dasgupta, I. Mikhailenko, E.M.P. Smith, N. Noben-Trauth, and A.D. Keegan. 2012. Adoptive transfer of IL-4R α + macrophages is sufficient to enhance eosinophilic inflammation in a mouse model of allergic lung inflammation. *BMC Immunol.* 13. doi:10.1186/1471-2172-13-6.
- Frame, S., and P. Cohen. 2001. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* 359:1–16.

- Franchi, L., T. Eigenbrod, R. Muñoz-Planillo, and G. Nuñez. 2009a. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat. Immunol.* 10:241–7. doi:10.1038/ni.1703.
- Franchi, L., N. Warner, K. Viani, and G. Nuñez. 2009b. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol. Rev.* 227:106–28. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x.
- Franklin, B.S., P. Parroche, M.A. Ataíde, F. Lauw, C. Ropert, R.B. de Oliveira, D. Pereira, M.S. Tada, P. Nogueira, L.H.P. da Silva, H. Bjorkbacka, D.T. Golenbock, and R.T. Gazzinelli. 2009. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:5789–94. doi:10.1073/pnas.0809742106.
- de Freitas, J.M., L. Augusto-Pinto, J.R. Pimenta, L. Bastos-Rodrigues, V.F. Gonçalves, S.M.R. Teixeira, E. Chiari, A.C. V Junqueira, O. Fernandes, A.M. Macedo, C.R. Machado, and S.D.J. Pena. 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2:e24. doi:10.1371/journal.ppat.0020024.
- van Furth, R., and Z. a Cohn. 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 128:415–35.
- Gautier, G., M. Humbert, F. Deauvieau, M. Scuiller, J. Hiscott, E.E.M. Bates, G. Trinchieri, C. Caux, and P. Garrone. 2005. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 201:1435–1446. doi:10.1084/jem.20041964.
- Gazzinelli, R.T., and E.Y. Denkers. 2006. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat. Rev. Immunol.* 6:895–906. doi:10.1038/nri1978.
- Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 19:71–82.
- Ghosh, S., and M. Karin. 2002. Missing Pieces in the NF- κ B Puzzle. *Cell.* 109:S81–S96. doi:10.1016/S0092-8674(02)00703-1.
- Ghosh, T.K., D.J. Mickelson, J. Fink, J.C. Solberg, J.R. Inglefield, D. Hook, S.K. Gupta, S. Gibson, and S.S. Alkan. 2006. Toll-like receptor (TLR) 2-9 agonists-induced cytokines and chemokines: I. Comparison with T cell receptor-induced responses. *Cell. Immunol.* 243:48–57. doi:10.1016/j.cellimm.2006.12.002.
- Granick, J.L., S.I. Simon, and D.L. Borjesson. 2012. Hematopoietic stem and progenitor cells as effectors in innate immunity. *Bone Marrow Res.* 2012:165107. doi:10.1155/2012/165107.
- Grouard, B.G., M. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau, and Y. Liu. 1997. The Enigmatic Plasmacytoid T Cells Develop into Dendritic. *J. Exp. Med.* 185:1101–1111.
- Guiducci, C., C. Ghirelli, M.-A. Marloie-Provost, T. Matray, R.L. Coffman, Y.-J. Liu, F.J. Barrat, and V. Soumelis. 2008. PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid predendritic cells in response to TLR activation. *J. Exp. Med.* 205:315–22. doi:10.1084/jem.20070763.
- Hacker, H., H. Mischak, T. Miethke, S. Liptay, R. Schmid, T. Sparwasser, K. Heeg, G. B.Lipford, and H. Wagner. 1998. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific

- endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 17:6230–6240.
- Hajishengallis, G., and J.D. Lambris. 2010. Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. *Trends Immunol.* 31:154–63. doi:10.1016/j.it.2010.01.002.
- Haller, O., G. Kochs, and F. Weber. 2006. The interferon response circuit: Induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology.* 344:119–130. doi:10.1016/j.virol.2005.09.024.
- Han, C., J. Jin, S. Xu, H. Liu, N. Li, and X. Cao. 2010. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nat. Immunol.* 11:734–42. doi:10.1038/ni.1908.
- Hanagata, N. 2012. Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *Int. J. Nanomedicine.* 7:2181–2195. doi:10.2147/IJN.S30197.
- Hansen, J.D., L.N. Vojtech, and K.J. Laing. 2011. Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. *Dev. Comp. Immunol.* 35:886–97. doi:10.1016/j.dci.2011.01.008.
- Hayden, M.S., and S. Ghosh. 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 132:344–62. doi:10.1016/j.cell.2008.01.020.
- Heggelund, L., F. Muller, E. Lien, A. Yndestad, T. Ueland, K.I. Kristiansen, T. Espevik, P. Aukrust, and S.S. Froland. 2004. Increased expression of toll-like receptor 2 on monocytes in HIV infection: possible roles in inflammation and viral replication. *Clin Infect Dis.* 39:264–269. doi:10.1086/421780.
- Heit, A., T. Maurer, H. Hochrein, S.B. Bauer, K. M. Huster, D. H. Busch, and H. And, Wagner. 2003. Cutting Edge: Toll-Like Receptor 9 Expression Is Not Required for CpG DNA-Aided Cross-Presentation of DNA-Conjugated Antigens but Essential for Cross-Priming of CD8 T Cells of. *J. Immunol.* 170:2802–2805. doi:10.4049/jimmunol.0902318.
- Hemmi, H., T. Kaisho, K. Takeda, and S. Akira. 2003. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J. Immunol.* 170:3059–3064. doi:10.4049/jimmunol.170.6.3059.
- Herna, J.C., J. Arteaga, and A. Kumar. 2011. Up-Regulation of TLR2 and TLR4 in Dendritic Cells in Response to HIV Type 1 and Coinfection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 27:1099–1109. doi:10.1089/aid.2010.0302.
- Hettinger, J., D.M. Richards, J. Hansson, M.M. Barra, A.-C. Joschko, J. Krijgsveld, and M. Feuerer. 2013. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat. Immunol.* 14:821–30. doi:10.1038/ni.2638.
- Hirotsani, T., M. Yamamoto, Y. Kumagai, S. Uematsu, I. Kawase, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. Regulation of lipopolysaccharide-inducible genes by MyD88 and Toll/IL-1 domain containing adaptor inducing IFN- β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328:383–392. doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.184.
- Holle, J.U., M. Windmüller, C. Lange, W.L. Gross, K. Herlyn, and E. Csernok. 2013. Toll-like receptor TLR2 and TLR9 ligation triggers neutrophil activation in granulomatosis with polyangiitis. *Rheumatology (Oxford).* 52:1183–9. doi:10.1093/rheumatology/kes415.
- Holling, T.M., E. Schooten, and P.J. Van Den Elsen. 2004. Function and regulation of

- MHC class II molecules in T-lymphocytes: Of mice and men. *Hum. Immunol.* 65:282–290. doi:10.1016/j.humimm.2004.01.005.
- Honda, K., and T. Taniguchi. 2006. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 6:644–58. doi:10.1038/nri1900.
- Hou, B., B. Reizis, and A.L. DeFranco. 2008. Toll-like receptors activate innate and adaptive immunity by using dendritic cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms. *Immunity.* 29:272–82. doi:10.1016/j.immuni.2008.05.016.
- Hu, X., J. Chen, L. Wang, and L.B. Ivashkiv. 2007. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 82:237–43. doi:10.1189/jlb.1206763.
- Hu, X., P.K. Paik, J. Chen, A. Yarilina, L. Kockeritz, T.T. Lu, J.R. Woodgett, and L.B. Ivashkiv. 2006. IFN-g Suppresses IL-10 Production and Synergizes with TLR2 by Regulating GSK3 and CREB/AP-1 Proteins. *Immunity.* 24:563–574. doi:10.1016/j.immuni.2006.02.014.
- Huang, L.-Y., K.J. Ishii, S. Akira, J. Aliberti, and B. Golding. 2005. Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. *J. Immunol.* 175:3964–3970. doi:10.1093/imm/175/6/3964 [pii].
- Huang, Q.-Q., R.E. Koessler, R. Birkett, H. Perlman, L. Xing, and R.M. Pope. 2013. TLR2 deletion promotes arthritis through reduction of IL-10. *J. Leukoc. Biol.* 93:751–9. doi:10.1189/jlb.0912473.
- Hui, L., L. Bakiri, E. Stepniak, and E.F. Wagner. 2007. p38 β : A suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle.* 6:2429–2433. doi:10.4161/cc.6.20.4774.
- Hultmark D. 1994. Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun.* 199:144–146. doi:10.1006/bbrc.1994.1206.
- Immig, K., M. Gericke, F. Menzel, F. Merz, M. Krueger, F. Schiefenheovel, A. Losche, K. Jager, U.-K. Hanisch, K. Biber, and I. Bechmann. 2014. CD11c-Positive Cells from Brain, Spleen, Lung, and Liver Exhibit Site-Specific Immune Phenotypes and Plastically Adapt to New Environments. *Glia.* 1–15. doi:10.1002/glia.22771.
- Ingersoll, M.A., A.M. Platt, S. and Potteaux, and G.J. Randolph. 2011. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol.* 32:470–477. doi:10.1016/j.it.2011.05.001.Monocyte.
- Ishikawa, H., Z. Ma, and G.N. Barber. 2009. LETTERS STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature.* 461:788–792. doi:10.1038/nature08476.
- Jablonski, K.A., S.A. Amici, L.M. Webb, J.D.D. Ruiz-Rosado, P.G. Popovich, S. Partida-Sanchez, and M. Guerau-De-arellano. 2015. Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. *PLoS One.* 10:5–25. doi:10.1371/journal.pone.0145342.
- Janeway, C. a. 2013. Pillars article: approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold spring harb symp quant biol. 1989. 54: 1-13. *J. Immunol.* 191:4475–87.
- Jennings, V.M. 1995. Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production. *ILAR J.* 37:119–125.
- Jensen, S., and A.R. Thomsen. 2012. Sensing of RNA viruses: a review of innate

- immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J. Virol.* 86:2900–10. doi:10.1128/JVI.05738-11.
- Jeong, E., and J.Y. Lee. 2011. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med. J.* 52:379–92. doi:10.3349/ymj.2011.52.3.379.
- Joffre, O., M. a Nolte, R. Spörri, and C. Reis e Sousa. 2009. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 227:234–47. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00718.x.
- Jope, R.S., and G.V.W. Johnson. 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29:95–102. doi:10.1016/j.tibs.2003.12.004.
- Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R.W. Malefyt, R. a Kastelein, F. Bazan, and Y.J. Liu. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 194:863–869. doi:10.1084/jem.194.6.863.
- Kagan, J.C., T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, and R. Medzhitov. 2008. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat. Immunol.* 9:361–368. doi:10.1038/ni1569.
- Kasperkovitz, P. V, N.S. Khan, J.M. Tam, M.K. Mansour, P.J. Davids, and J.M. Vyas. 2011. Toll-like receptor 9 modulates macrophage antifungal effector function during innate recognition of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Infect. Immun.* 79:4858–67. doi:10.1128/IAI.05626-11.
- Kawai, T., and S. Akira. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 13:816–825. doi:10.1038/sj.cdd.4401850.
- Kawai, T., and S. Akira. 2007. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 13:460–9. doi:10.1016/j.molmed.2007.09.002.
- Kawai, T., and S. Akira. 2008. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1143:1–20. doi:10.1196/annals.1443.020.
- Kawai, T., and S. Akira. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11:373–84. doi:10.1038/ni.1863.
- Kawai, T., and S. Akira. 2011. Review Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immun. Rev.* 34:637–650. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.006.
- Kayama, H., and K. Takeda. 2010. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.* 12:511–7. doi:10.1016/j.micinf.2010.03.005.
- Kenny, E.F., S. Talbot, M. Gong, D.T. Golenbock, C.E. Bryant, and L. a J. O’Neill. 2009. MyD88 adaptor-like is not essential for TLR2 signaling and inhibits signaling by TLR3. *J. Immunol.* 183:3642–51. doi:10.4049/jimmunol.0901140.
- Kim, E.K., and E.-J. Choi. 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1802:396–405. doi:10.1016/j.bbadis.2009.12.009.
- Kiura, K., A. Hasebe, A. Saeki, T. Segawa, F. Okada, H.M. Shamsul, M. Ohtani, T. Into, N. Inoue, M. Wakita, and K.-I. Shibata. 2011. In vivo anti- and pro-tumour activities of the TLR2 ligand FSL-1. *Immunobiology.* 216:891–900. doi:10.1016/j.imbio.2011.02.006.
- Koblansky, a A., D. Jankovic, H. Oh, S. Hieny, W. Sungnak, R. Mathur, M.S. Hayden, S. Akira, A. Sher, and S. Ghosh. 2013. Recognition of profilin by Toll-like

- receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 38:119–30. doi:10.1016/j.immuni.2012.09.016.
- Kondo, T., T. Kawai, and S. Akira. 2012. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol.* 33:449–58. doi:10.1016/j.it.2012.05.002.
- Koyasu, S. 2003. The role of PI3K in immune cells. *Nat. Immunol.* 4:313–319. doi:10.1038/ni0403-313.
- Krishnan, J., K. Selvarajoo, M. Tsuchiya, G. Lee, and S. Choi. 2007. Toll-like receptor signal transduction. *Exp. Mol. Med.* 39:421–38. doi:10.1038/emm.2007.47.
- Krug, A., A. Towarowski, S. Britsch, S. Rothenfusser, V. Hornung, R. Bals, T. Giese, H. Engelmann, S. Endres, A.M. Krieg, and G. Hartmann. 2001. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with Cd40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.* 31:3026–3037. doi:10.1002/1521-4141(200110)31:10<3026::AID-IMMU3026>3.0.CO;2-H.
- Krummen, M., S. Balkow, L. Shen, S. Heinz, C. Loquai, H.-C. Probst, and S. Grabbe. 2010. Release of IL-12 by dendritic cells activated by TLR ligation is dependent on MyD88 signaling, whereas TRIF signaling is indispensable for TLR synergy. *J. Leukoc. Biol.* 88:189–99. doi:10.1189/jlb.0408228.
- Kvale, E.O., Y. Fløisand, F. Lund-Johansen, H. Rollag, L. Farkas, S. Ghanekar, P. Brandtzaeg, F.L. Jahnsen, and J. Olweus. 2007. Plasmacytoid DCs regulate recall responses by rapid induction of IL-10 in memory T cells. *Blood*. 109:3369–76. doi:10.1182/blood-2006-06-031484.
- Laborde, E. a, S. Vanzulli, M. Beigier-Bompadre, M. a Isturiz, R. a Ruggiero, M.G. Fourcade, A.C. Catalan Pellet, S. Sozzani, and M. Vulcano. 2007. Immune complexes inhibit differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 179:673–81.
- LeBouder, E., J.E. Rey-Nores, N.K. Rushmere, M. Grigorov, S.D. Lawn, M. Affolter, G.E. Griffin, P. Ferrara, E.J. Schiffrin, B.P. Morgan, and M.O. Labéta. 2003. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J. Immunol.* 171:6680–6689. doi:10.4049/jimmunol.171.12.6680.
- Lee, C.C., A.M. Avalos, and H.L. Ploegh. 2012. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat. Rev. Immunol.* 12:168–79. doi:10.1038/nri3151.
- Lee, K.S., C. a Scanga, E.M. Bachelder, Q. Chen, and C.M. Snapper. 2007. TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to *Streptococcus pneumoniae*. *Cell. Immunol.* 245:103–10. doi:10.1016/j.cellimm.2007.04.003.
- Leifer, C. a, M.N. Kennedy, A. Mazzoni, C. Lee, M.J. Kruhlak, and D.M. Segal. 2004. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J. Immunol.* 173:1179–1183. doi:10.4049/jimmunol.173.2.1179.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. Reichhart, and J.A. Hoffmann. 1996. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spatzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell*. 86:973–983.
- Lemmon, M. a., and J. Schlessinger. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 141:1117–1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011.
- Lemos, J.R.D., W.F. Rodrigues, C.B. Miguel, R.C. Parreira, R.B. Miguel, A. de Paula Rogério, C.J.F. Oliveira, and J.E.L. Chica. 2013. Influence of parasite load on

- renal function in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*. 8:e71772. doi:10.1371/journal.pone.0071772.
- Li, H.-F., C.-F. Cheng, W.-J. Liao, H. Lin, and R.-B. Yang. 2010a. ATF3-mediated epigenetic regulation protects against acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21:1003–1013. doi:10.1681/ASN.2009070690.
- Li, X., S. Jiang, and R.I. Tapping. 2010b. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine*. 49:1–9. doi:10.1016/j.cyto.2009.08.010.
- Lima, E.C., I. Garcia, M.H. Vicentelli, P. Vassalli, and P. Minoprio. 1997. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect. Immun.* 65:457–465.
- Lin, H.-H., D.E. Faunce, M. Stacey, A. Terajewicz, T. Nakamura, J. Zhang-Hoover, M. Kerley, M.L. Mucenski, S. Gordon, and J. Stein-Streilein. 2005. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J. Exp. Med.* 201:1615–1625. doi:10.1084/jem.20042307.
- Lin, I.C., H.C. Kuo, Y.J. Lin, F.S. Wang, L. Wang, S.C. Huang, S.J. Chien, C.F. Huang, C.L. Wang, H.R. Yu, R.F. Chen, and K.D. Yang. 2012. Augmented TLR2 expression on monocytes in both human Kawasaki disease and a mouse model of coronary arteritis. *PLoS One*. 7:e38635. doi:10.1371/journal.pone.0038635.
- Lin, S.L., A.P. Castaño, B.T. Nowlin, M.L. Lupper, and J.S. Duffield. 2009. Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *J. Immunol.* 183:6733–43. doi:10.4049/jimmunol.0901473.
- Liu, K., G.D. Victora, T.A. Schwickert, P. Guermonprez, M. Meredith, K. Yao, F. Chu, G.J. Randolph, Y. Alexander, and M. Nussenzweig. 2009. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science*. 324:392–397. doi:10.1126/science.1170540.In.
- Liu, Y., Y. Wang, M. Yamakuchi, S. Isowaki, E. Nagata, Y. Kanmura, I. Kitajima, and I. Maruyama. 2001. Upregulation of Toll-Like Receptor 2 Gene Expression in Macrophage Response to Peptidoglycan and High Concentration of Lipopolysaccharide Is Involved in NF- κ B Activation. *Infect. Immun.* 69:2788–2796. doi:10.1128/IAI.69.5.2788.
- Loo, Y.-M., and M. Gale. 2011. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*. 34:680–92. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.003.
- MacNamara, K.C., K. Oduro, O. Martin, D.D. Jones, M. McLaughlin, K. Choi, D.L. Borjesson, and G.M. Winslow. 2011. Infection-induced myelopoiesis during intracellular bacterial infection is critically dependent upon IFN- γ signaling. *J. Immunol.* 186:1032–43. doi:10.4049/jimmunol.1001893.
- Mäkelä, S.M., M. Strengell, T.E. Pietilä, P. Osterlund, and I. Julkunen. 2009. Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 85:664–72. doi:10.1189/jlb.0808503.
- Maneu, V., M.Á. Estévez, S. de Dios, D. Gozalbo, M.L. Gil, and J. Megías. 2014. In vitro differentiation of murine hematopoietic progenitor cells toward the myeloid lineage occurs in response to *Staphylococcus aureus* and yeast species. *Microb. Pathog.* 69–70:9–12. doi:10.1016/j.micpath.2014.03.002.
- Manna, P.R., and D.M. Stocco. 2011. The role of specific mitogen-activated protein

- kinase signaling cascades in the regulation of steroidogenesis. *J. Signal Transduct.* 2011:821615. doi:10.1155/2011/821615.
- Manukyan, M., P. Nalbant, S. Luxen, K.M. Hahn, and U.G. Knaus. 2009. RhoA GTPase activation by TLR2 and TLR3 ligands: connecting via Src to NF-kappa B. *J. Immunol.* 182:3522–3529. doi:10.4049/jimmunol.0802280.
- Mayr, B., and M. Montminy. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:599–609. doi:10.1038/35085068.
- McGettrick, A.F., and L. a J. O’Neill. 2004. The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Mol. Immunol.* 41:577–82. doi:10.1016/j.molimm.2004.04.006.
- Medzhitov, R., P. Preston-hurlburt, and C.A. Janeway Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 388:6–9.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, a Stadlen, C. Chen, S. Ghosh, and C. a Janeway. 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell.* 2:253–258. doi:10.1016/S1097-2765(00)80136-7.
- Megías, J., V. Maneu, P. Salvador, D. Gozalbo, and M.L. Gil. 2013. Candida albicans stimulates in vivo differentiation of haematopoietic stem and progenitor cells towards macrophages by a TLR2-dependent signalling. *Cell. Microbiol.* 15:1143–53. doi:10.1111/cmi.12104.
- de Meis, J., A. Morrot, D.A. Farias-de-Oliveira, D.M.S. Villa-Verde, and W. Savino. 2009. Differential regional immune response in Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3:e417. doi:10.1371/journal.pntd.0000417.
- Mellett, M., P. Atzei, R. Jackson, L. a O’Neill, and P.N. Moynagh. 2011. Mal mediates TLR-induced activation of CREB and expression of IL-10. *J. Immunol.* 186:4925–35. doi:10.4049/jimmunol.1002739.
- Michailowsky, V., S.M.F. Murta, L. Carvalho-Oliveira, M.E.S. Pereira, L.R.P. Ferreira, Z. Brener, A.J. Romanha, and R.T. Gazzinelli. 1998. Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of benzimidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of Trypanosoma cruzi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2549–2556.
- Miyagi, T., M.P. Gil, X. Wang, J. Louten, W.-M. Chu, and C. a Biron. 2007. High basal STAT4 balanced by STAT1 induction to control type 1 interferon effects in natural killer cells. *J. Exp. Med.* 204:2383–2396. doi:10.1084/jem.20070401.
- Mori, G., P. D’Amelio, R. Faccio, and G. Brunetti. 2013. The Interplay between the bone and the immune system. *Clin. Dev. Immunol.* 2013:720504. doi:10.1155/2013/720504.
- Mukherjee, R., P. Kanti Barman, P. Kumar Thatoi, R. Tripathy, B. Kumar Das, and B. Ravindran. 2015. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci. Rep.* 5:13886. doi:10.1038/srep13886.
- Mulla, M.J., K. Myrtolli, S. Tadesse, N.L. Stanwood, A. Garipey, S. Guller, E.R. Norwitz, and V.M. Abrahams. 2013. Cutting-edge report: TLR10 plays a role in mediating bacterial peptidoglycan-induced trophoblast apoptosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 69:449–53. doi:10.1111/aji.12065.
- Muzio, M., J. Ni, P. Feng, and V.M. Dixit. 1997. IRAK (Pelle) Family Member IRAK-

- 2 and MyD88 as Proximal Mediators of IL-1 Signaling. *Science* (80-.). 278:1612–1615.
- Nahrendorf, M., F.K. Swirski, E. Aikawa, L. Stangenberg, T. Wurdinger, J.-L. Figueiredo, P. Libby, R. Weissleder, and M.J. Pittet. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* 204:3037–47. doi:10.1084/jem.20070885.
- Naik, S.H., D. Metcalf, A. van Nieuwenhuijze, I. Wicks, L. Wu, M. O’Keeffe, and K. Shortman. 2006. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat. Immunol.* 7:663–71. doi:10.1038/ni1340.
- Naik, S.H., P. Sathe, H.-Y. Park, D. Metcalf, A.I. Proietto, A. Dakic, S. Carotta, M. O’Keeffe, M. Bahlo, A. Papenfuss, J.-Y. Kwak, L. Wu, and K. Shortman. 2007. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.* 8:1217–26. doi:10.1038/ni1522.
- Nakahara, T., Y. Moroi, H. Uchi, and M. Furue. 2006. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J. Dermatol. Sci.* 42:1–11. doi:10.1016/j.jdermsci.2005.11.004.
- Napolitani, G., A. Rinaldi, F. Bertoni, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* 6:769–776. doi:10.1038/ni1223.
- Novak, N., S. Koch, J.-P. Allam, and T. Bieber. 2010. Dendritic cells: bridging innate and adaptive immunity in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:50–59. doi:10.1016/j.jaci.2009.11.019.
- O’Neill, L. a J., and A.G. Bowie. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 7:353–64. doi:10.1038/nri2079.
- Okamura, H., S. Kashiwamura, H. Tsutsui, T. Yoshimoto, and K. Nakanishi. 1998. Regulation of interferon- γ production by IL-12 and IL-18. *Curr. Opin. Immunol.* 10:259–264.
- Oliveira-Nascimento, L., P. Massari, and L.M. Wetzler. 2012. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front. Immunol.* 3:79. doi:10.3389/fimmu.2012.00079.
- Oliveira, A.-C., B.C. de Alencar, F. Tzelepis, W. Klezewsky, R.N. da Silva, F.S. Neves, G.S. Cavalcanti, S. Boscardin, M.P. Nunes, M.F. Santiago, A. Nóbrega, M.M. Rodrigues, and M. Bellio. 2010. Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice. *PLoS Pathog.* 6:e1000870. doi:10.1371/journal.ppat.1000870.
- Oliveira, A.-C., J.R. Peixoto, L.B. de Arruda, M. a Campos, R.T. Gazzinelli, D.T. Golenbock, S. Akira, J.O. Previato, L. Mendonça-Previato, A. Nobrega, and M. Bellio. 2004. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J. Immunol.* 173:5688–96.
- Onai, N., K. Kurabayashi, M. Hosoi-Amaike, N. Toyama-Sorimachi, K. Matsushima, K. Inaba, and T. Ohteki. 2013. A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential. *Immunity.* 38:943–57. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.006.

- Onai, N., A. Obata-Onai, M. a Schmid, T. Ohteki, D. Jarrossay, and M.G. Manz. 2007. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol.* 8:1207–16. doi:10.1038/ni1518.
- Orengo, J.M., J.E. Evans, E. Bettiol, A. Leliwa-Sytek, K. Day, and A. Rodriguez. 2008. Plasmodium-induced inflammation by uric acid. *PLoS Pathog.* 4:e1000013. doi:10.1371/journal.ppat.1000013.
- Orengo, J.M., A. Leliwa-sytek, J.E. Evans, B. Evans, D. Van De Hoef, M. Nyako, K. Day, and A. Rodriguez. 2009. Uric Acid Is a Mediator of the Plasmodium falciparum- Induced Inflammatory Response. *PLoS One.* 4:e5194. doi:10.1371/journal.pone.0005194.
- Ouyang, X., H. Negishi, R. Takeda, Y. Fujita, T. Taniguchi, and K. Honda. 2007. Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354:1045–51. doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.090.
- Owens, B.M.J., J.W.J. Moore, and P.M. Kaye. 2012. IRF7 regulates TLR2-mediated activation of splenic CD11c(hi) dendritic cells. *PLoS One.* 7:e41050. doi:10.1371/journal.pone.0041050.
- Palazon, A., A.W. Goldrath, V. Nizet, and R.S. Johnson. 2014. Review HIF Transcription Factors , Inflammation , and Immunity. *Immunity.* 41:518–528. doi:10.1016/j.immuni.2014.09.008.
- Palsson-McDermott, E.M., S.L. Doyle, A.F. McGettrick, M. Hardy, H. Husebye, K. Banahan, M. Gong, D. Golenbock, T. Espevik, and L. a J. O’Neill. 2009. TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. *Nat. Immunol.* 10:579–586. doi:10.1038/ni.1727.
- Peng, Y., Y. Latchman, and K.B. Elkon. 2009. Ly6C(low) monocytes differentiate into dendritic cells and cross-tolerize T cells through PDL-1. *J. Immunol.* 182:2777–85. doi:10.4049/jimmunol.0803172.
- Perrin-Cocon, L., O. Diaz, M. Carreras, S. Dollet, A. Guironnet-Paquet, P. André, and V. Lotteau. 2012. High-density lipoprotein phospholipids interfere with dendritic cell Th1 functional maturation. *Immunobiology.* 217:91–9. doi:10.1016/j.imbio.2011.07.030.
- Pinto, P.L.S., R. Takami, E. V. Nunes, C.S. Guilherme, O.C.O. Jr., J. Gama-Rodrigues, M. Okumura, and RHCFA/2980. 1999. Life cycle of Trypanosoma cruzi (Y strain) in mice. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S.Paulo.* 54:141–146.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.-Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 282:2085–2088. doi:10.1126/science.282.5396.2085.
- Pompei, L., S. Jang, B. Zamlynny, S. Ravikumar, A. McBride, S.P. Hickman, and P. Salgame. 2007. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis is due to use of distinct TLRs. *J. Immunol.* 178:5192–5199. doi:178/8/5192 [pii].
- Poncini, C. V, G. Giménez, C. a Pontillo, C.D. Alba-Soto, E.L.D. de Isola, I. Piazzón, and S.M.G. Cappa. 2010. Central role of extracellular signal-regulated kinase and Toll-like receptor 4 in IL-10 production in regulatory dendritic cells induced by Trypanosoma cruzi. *Mol. Immunol.* 47:1981–8.

doi:10.1016/j.molimm.2010.04.016.

- Poncini, C.V., C.D. Alba Soto, E. Batalla, M.E. Solana, and S.M. González Cappa. 2008. Trypanosoma cruzi induces regulatory dendritic cells in vitro. *Infect. Immun.* 76:2633–41. doi:10.1128/IAI.01298-07.
- Pulendran, B., H. Tang, and S. Manicassamy. 2010. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat. Immunol.* 11:647–55. doi:10.1038/ni.1894.
- Qi, M., and E. a Elion. 2005. MAP kinase pathways. *J. Cell Sci.* 118:3569–3572. doi:10.1242/jcs.02470.
- Quesniaux, V., C. Fremond, M. Jacobs, S. Parida, D. Nicolle, V. Yermeev, F. Bihl, F. Erard, T. Botha, M. Drennan, M.N. Soler, M. Le Bert, B. Schnyder, and B. Ryffel. 2004. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect.* 6:946–959. doi:10.1016/j.micinf.2004.04.016.
- Rassi, A., A. Rassi, and J.A. Marin-Neto. 2010. Chagas disease. *Lancet.* 375:1388–1402. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
- Redecke, V., H. Häcker, S.K. Datta, A. Fermin, P.M. Pitha, D.H. Broide, and E. Raz. 2004. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J. Immunol.* 172:2739–43.
- Richards, D.M., J. Hettinger, and M. Feuerer. 2013. Monocytes and macrophages in cancer: development and functions. *Cancer Microenviron.* 6:179–91. doi:10.1007/s12307-012-0123-x.
- Rivas, M.N., Y.T. Koh, A. Chen, A. Nguyen, Y.H. Lee, G. Lawson, and T.A. Chatila. 2012. MyD88 is critically involved in immune tolerance breakdown at environmental interfaces of Foxp3-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 122:1933–1947. doi:10.1172/JCI40591.
- Rivollier, A., J. He, A. Kole, V. Valatas, and B.L. Kelsall. 2012. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J. Exp. Med.* 209:139–55. doi:10.1084/jem.20101387.
- Robbins, C.S., and F.K. Swirski. 2010. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:2685–93. doi:10.1007/s00018-010-0375-x.
- Roelofs, M.F., L. a B. Joosten, S. Abdollahi-Roodsaz, a. W.T. Van Lieshout, T. Sprong, F.H. Van Den Hoogen, W.B. Van Den Berg, and T.R.D.J. Radstake. 2005. The expression of Toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of Toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum.* 52:2313–2322. doi:10.1002/art.21278.
- Roman-Campos, D., H.L.L. Duarte, P. a Sales, A.J. Natali, C. Ropert, R.T. Gazzinelli, and J.S. Cruz. 2009. Changes in cellular contractility and cytokines profile during Trypanosoma cruzi infection in mice. *Basic Res. Cardiol.* 104:238–46. doi:10.1007/s00395-009-0776-x.
- Ropert, C., and R.T. Gazzinelli. 2004. Regulatory role of Toll-like receptor 2 during infection with Trypanosoma cruzi. *J. Endotoxin Res.* 10:425–30. doi:10.1179/096805104225006507.
- Rose, S., A. Misharin, and H. Perlman. 2012. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry. A.* 81:343–50.

doi:10.1002/cyto.a.22012.

- Sabroe, I., E.C. Jones, L.R. Usher, M.K.B. Whyte, and S.K. Dower. 2002. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J. Immunol.* 168:4701–4710. doi:10.4049/jimmunol.168.9.4701.
- Santos-Sierra, S., S.D. Deshmukh, J. Kalnitski, P. Küenzi, M.P. Wymann, D.T. Golenbock, and P. Henneke. 2009. Mal connects TLR2 to PI3Kinase activation and phagocyte polarization. *EMBO J.* 28:2018–27. doi:10.1038/emboj.2009.158.
- Sardinha, L.R., R.M. Elias, K.R.B. Bastos, R.F. Marinho, M.R.D. Impe, D. De Imunologia, and I. De Cie. 2006. Contribution of NK, NK T, gdT, and abT Cells to the Gamma Interferon Response Required for Liver Protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 74:2031–2042. doi:10.1128/IAI.74.4.2031.
- Sardinha, L.R., T. Mosca, R.M. Elias, R.S. do Nascimento, L. a Gonçalves, D.Z. Bucci, C.R.F. Marinho, C. Penha-Gonçalves, M.R.D. Lima, and J.M. Alvarez. 2010. The liver plays a major role in clearance and destruction of blood trypomastigotes in *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4:e578. doi:10.1371/journal.pntd.0000578.
- Sato, A., M.M. Linehan, and A. Iwasaki. 2006. Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:17343–8. doi:10.1073/pnas.0605102103.
- Scanga, C. a, J. Aliberti, D. Jankovic, F. Tilloy, S. Bennouna, E.Y. Denkers, R. Medzhitov, and A. Sher. 2002. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* 168:5997–6001.
- Scanga, C.A., A. Bafica, C.G. Feng, A.W. Cheever, S. Hieny, and A. Sher. 2004. MyD88-Deficient Mice Display a Profound Loss in Resistance to Mycobacterium tuberculosis Associated with Partially Impaired Th1 Cytokine and Nitric Oxide Synthase 2 Expression. *Infect. Immun.* 72:2400–2404. doi:10.1128/IAI.72.4.2400.
- Schamber-Reis, B.L.F., P.M. Petritus, B.C. Caetano, E.R. Martinez, K. Okuda, D. Golenbock, P. Scott, and R.T. Gazzinelli. 2013. UNC93B1 and nucleic acid-sensing Toll-like receptors mediate host resistance to infection with *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* 288:7127–36. doi:10.1074/jbc.M112.407684.
- Schmid, M., A.K. Wege, and U. Ritter. 2012. Characteristics of “Tip-DCs and MDSCs” and Their Potential Role in Leishmaniasis. *Front. Microbiol.* 3:74. doi:10.3389/fmicb.2012.00074.
- Sengupta, D., A. Koblansky, J. Gaines, T. Brown, a P. West, D. Zhang, T. Nishikawa, S.-G. Park, R.M. Roop, and S. Ghosh. 2010. Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL. *J. Immunol.* 184:956–64. doi:10.4049/jimmunol.0902008.
- Serbina, N. V, T. Jia, T.M. Hohl, and E.G. Pamer. 2008. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu Rev Immunol.* 26:421–452. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326.Monocyte-Mediated.
- Sheedy, F.J., and L. a J. O’Neill. 2007. The Troll in Toll: Mal and Tram as bridges for TLR2 and TLR4 signaling. *J. Leukoc. Biol.* 82:196–203. doi:10.1189/jlb.1206750.
- Sheel, M., and C.R. Engwerda. 2012. The diverse roles of monocytes in inflammation caused by protozoan parasitic diseases. *Trends Parasitol.* 28:408–16. doi:10.1016/j.pt.2012.07.008.

- Shlyueva, D., G. Stampfel, and A. Stark. 2014. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nat. Rev. Genet.* 15:272–86. doi:10.1038/nrg3682.
- Shmuel-Galia, L., T. Aychek, A. Fink, Z. Porat, B. Zarmi, B. Bernshtein, O. Brenner, S. Jung, and Y. Shai. 2016. Neutralization of pro-inflammatory monocytes by targeting TLR2 dimerization ameliorates colitis. *EMBO J.* 35:685–698. doi:10.15252/embj.201592649.
- Shortman, K., and W.R. Heath. 2010. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* 234:18–31. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00870.x.
- Siednienko, J., A. Halle, K. Nagpal, D.T. Golenbock, and S.M. Miggin. 2010. TLR3-mediated IFN- β gene induction is negatively regulated by the TLR adaptor MyD88 adaptor-like. *Eur. J. Immunol.* 40:3150–60. doi:10.1002/eji.201040547.
- Sieve, A.N., K.D. Meeks, S. Lee, and R.E. Berg. 2010. A Novel Immunoregulatory Function for IL-23: Inhibition of IL-12 Dependent IFN- γ Production. *Eur J Immunol.* 40:2236–2247. doi:10.1002/eji.200939759.A.
- Silva, J.S., G.N. Vespa, M. a Cardoso, J.C. Aliberti, and F.Q. Cunha. 1995. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect. Immun.* 63:4862–4867.
- Simmons, D.P., D.H. Canaday, Y. Liu, Q. Li, A. Huang, W.H. Boom, and C. V Harding. 2010. Mycobacterium tuberculosis and TLR2 agonists inhibit induction of type I IFN and class I MHC antigen cross processing by TLR9. *J. Immunol.* 185:2405–15. doi:10.4049/jimmunol.0904005.
- Soung, Y.H., J.L. Clifford, and J. Chung. 2010. Crosstalk between integrin and receptor tyrosine kinase signaling in breast carcinoma progression. *BMB Rep.* 43:311–318. doi:10.5483/BMBRep.2010.43.5.311.
- de Souza, W. 1999. A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: From 1909 to 1999. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94:17–36. doi:10.1590/S0074-02761999000700003.
- de Souza, W., T.M.U. de Carvalho, and E.S. Barrias. 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int. J. Cell Biol.* 2010. doi:10.1155/2010/295394.
- Srivastava, S., S.P. Pandey, M.K. Jha, H.S. Chandel, and B. Saha. 2013. Leishmania expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clin. Exp. Immunol.* 172:403–9. doi:10.1111/cei.12074.
- St Germain, C., A. O'Brien, and J. Dimitroulakos. 2010. Activating Transcription Factor 3 regulates in part the enhanced tumour cell cytotoxicity of the histone deacetylase inhibitor M344 and cisplatin in combination. *Cancer Cell Int.* 10:32. doi:10.1186/1475-2867-10-32.
- Stamm, L.M., A.A. Satoskar, S.K. Ghosh, J.R. David, and R. Abhay. 1999. STAT-4 mediated IL-12 signaling pathway is critical for the development of protective immunity in cutaneous leishmaniasis. *Eur.J.Immunol.* 29:2524–2529.
- Swiecki, M., Y. Wang, W. Vermi, S. Gilfillan, R.D. Schreiber, and M. Colonna. 2011. Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *J. Exp. Med.* 208:2367–2374. doi:10.1084/jem.20110654.
- Swirski, F.K., M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J.-L. Figueiredo, R.H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa,

- T.R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder, and M.J. Pittet. 2009. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 325:612–6. doi:10.1126/science.1175202.
- Takeda, K., and S. Akira. 2004. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16:3–9. doi:10.1016/j.smim.2003.10.003.
- Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335–76. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.
- Takeuchi, O., and S. Akira. 2001. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacol.* 1:625–35.
- Takeuchi, O., and S. Akira. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 140:805–20. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022.
- Talvani, A., C.S. Ribeiro, J.C.S. Aliberti, V. Michailowsky, P.V. a Santos, S.M.F. Murta, A.J. Romanha, I.C. Almeida, J. Farber, J. Lannes-Vieira, J.S. Silva, and R.T. Gazzinelli. 2000. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: Tissue parasitism and endogenous IFN- γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* 2:851–866. doi:10.1016/S1286-4579(00)00388-9.
- Tan, J.K.H., and H.C. O’Neill. 2007. Concise review: Dendritic cell development in the context of the spleen microenvironment. *Stem Cells*. 25:2139–45. doi:10.1634/stemcells.2007-0244.
- Tarleton, R.L. 1991. Regulation of Immunity in *Trypanosoma cruzi* Infection. *Exp. Parasitol.* 73:106–109.
- Tarleton, R.L. 2007. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Opin. Immunol.* 19:430–4. doi:10.1016/j.coi.2007.06.003.
- Tchaptchet, S., M. Gumenscheimer, C. Kalis, N. Freudenberg, C. Hölscher, C.J. Kirschning, M. Lamers, C. Galanos, and M. a Freudenberg. 2012. TLR9-dependent and independent pathways drive activation of the immune system by *Propionibacterium acnes*. *PLoS One*. 7:e39155. doi:10.1371/journal.pone.0039155.
- Teixeira, M.M., R.T. Gazzinelli, and S. Silva. 2002. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.* 18:262–265.
- Tomczak, M.F., M. Gadjeva, Y.Y. Wang, K. Brown, I. Maroulakou, P.N. Tsihchlis, S.E. Erdman, J.G. Fox, and B.H. Horwitz. 2006. Defective Activation of ERK in Macrophages Lacking the p50/p105 Subunit of NF- κ B Is Responsible for Elevated Expression of IL-12 p40 Observed after Challenge with *Helicobacter hepaticus*. *J. Immunol.* 176:1244–1251. doi:10.4049/jimmunol.176.2.1244.
- Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3:133–146. doi:10.1038/nri1001.
- Trinchieri, G., and A. Sher. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* 7:179–90. doi:10.1038/nri2038.
- Tullai, J.W., S. Tacheva, L.J. Owens, J.R. Graham, and G.M. Cooper. 2011. AP-1 is a component of the transcriptional network regulated by GSK-3 in quiescent cells. *PLoS One*. 6:e20150. doi:10.1371/journal.pone.0020150.
- Ueno, H., E. Klechevsky, R. Morita, C. Aspod, T. Cao, T. Matsui, T. Di Pucchio, J. Connolly, J.W. Fay, V. Pascual, a K. Palucka, and J. Banchereau. 2007. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.* 219:118–42. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00551.x.

- Uings, I.J. 2000. Cell receptors and cell signalling. *Mol. Pathol.* 53:295–299. doi:10.1136/mp.53.6.295.
- Underhill, D.M., Ozinsky, M., Hajjar, P., Stevens, C.B., Wilson, M., Bassetti, M., and Adjemian, J. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 401:811–5. doi:10.1038/44605.
- Uronen-hansson, H., J. Allen, M. Osman, G. Squires, N. Klein, and R.E. Callard. 2004. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 are present inside human dendritic cells, associated with microtubules and the Golgi apparatus but are not detectable on the cell surface: integrity of microtubules is required for interleukin-12 production in response. *Immunology.* 111:173–178. doi:10.1111/j.1365-2567.2003.01803.x.
- de Veer, M.J., J.M. Curtis, T.M. Baldwin, J. DiDonato, A. Sexton, M.J. McConville, E. Handman, and L. Schofield. 2003. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.* 33:2822–31. doi:10.1002/eji.200324128.
- Verstak, B., K. Nagpal, S.P. Bottomley, D.T. Golenbock, P.J. Hertzog, and A. Mansell. 2009. MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP interaction with TRAF6 is critical for TLR2- and TLR4-mediated NF- κ B proinflammatory responses. *J. Biol. Chem.* 284:24192–203. doi:10.1074/jbc.M109.023044.
- Vignali, D.A., and V.K. Kuchroo. 2012. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat. Immunol.* 13:722–8. doi:10.1038/ni.2366.
- Wang, T., W.P. Lafuse, and B.S. Zwilling. 2000. Regulation of toll-like receptor 2 expression by macrophages following *Mycobacterium avium* infection. *J. Immunol.* 165:6308–6313. doi:10.4049/jimmunol.165.11.6308.
- Wang, Y., T. Chen, C. Han, D. He, H. Liu, H. An, Z. Cai, and X. Cao. 2007. Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4. *Blood.* 110:962–71. doi:10.1182/blood-2007-01-066027.
- Warner, N., and G. Núñez. 2013. MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction. *J. Immunol.* 190:3–4. doi:10.4049/jimmunol.1203103.
- Wen, A.Y., K.M. Sakamoto, and L.S. Miller. 2010. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J. Immunol.* 185:6413–9. doi:10.4049/jimmunol.1001829.
- Wenink, M.H., K.C.M. Santegoets, J.C. Broen, L. van Bon, S. Abdollahi-Roodsaz, C. Popa, R. Huijbens, T. Remijn, E. Lubberts, P.L.C.M. van Riel, W.B. van den Berg, and T.R.D.J. Radstake. 2009. TLR2 promotes Th2/Th17 responses via TLR4 and TLR7/8 by abrogating the type I IFN amplification loop. *J. Immunol.* 183:6960–70. doi:10.4049/jimmunol.0900713.
- Wesche, H., W.J. Henzel, W. Shillinglaw, S. Li, and Z. Cao. 1997. MyD88: An Adapter That Recruits IRAK to the IL-1 Receptor Complex. *Immunity.* 7:837–847. doi:10.1016/S1074-7613(00)80402-1.
- Wolf, A.J., A. Arruda, C.N. Reyes, A.T. Kaplan, T. Shimada, K. Shimada, M. Arditi, G. Liu, and D.M. Underhill. 2011. Phagosomal degradation increases TLR access to bacterial ligands and enhances macrophage sensitivity to bacteria. *J. Immunol.* 187:6002–10. doi:10.4049/jimmunol.1100232.
- Wu, J., L. Sun, X. Chen, F. Du, H. Shi, C. Chen, and Z.J. Chen. 2013. Cyclic-GMP-AMP Is An Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA. *Science (80-).* 15:826–831.

- Yáñez, A., H.S. Goodridge, D. Gozalbo, and M.L. Gil. 2013a. TLRs control hematopoiesis during infection. *Eur. J. Immunol.* 43:2526–33. doi:10.1002/eji.201343833.
- Yáñez, A., N. Hassanzadeh-Kiabi, M.Y. Ng, J. Megías, A. Subramanian, G.Y. Liu, D.M. Underhill, M.L. Gil, and H.S. Goodridge. 2013b. Detection of a TLR2 agonist by hematopoietic stem and progenitor cells impacts the function of the macrophages they produce. *Eur. J. Immunol.* 43:2114–25. doi:10.1002/eji.201343403.
- Yáñez, A., C. Murciano, J.-E. O'Connor, D. Gozalbo, and M.L. Gil. 2009. *Candida albicans* triggers proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells by a MyD88-dependent signaling. *Microbes Infect.* 11:531–5. doi:10.1016/j.micinf.2009.01.011.
- Zaru, R., N. Ronkina, M. Gaestel, J.S.C. Arthur, and C. Watts. 2007. The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways. *Nat. Immunol.* 8:1227–1235. doi:10.1038/ni1517.
- Zhan, Y., Y. Xu, S. Seah, J.L. Brady, E.M. Carrington, C. Cheers, B. a Croker, L. Wu, J. a Villadangos, and A.M. Lew. 2010. Resident and monocyte-derived dendritic cells become dominant IL-12 producers under different conditions and signaling pathways. *J. Immunol.* 185:2125–33. doi:10.4049/jimmunol.0903793.
- Zhang, C.-Y., N. Bai, Z.-H. Zhang, N. Liang, L. Dong, R. Xiang, and C.-H. Liu. 2012. TLR2 signaling subpathways regulate TLR9 signaling for the effective induction of IL-12 upon stimulation by heat-killed *Brucella abortus*. *Cell. Mol. Immunol.* 9:324–33. doi:10.1038/cmi.2012.11.
- Zhang, G., Z. Zhang, and Z. Liu. 2013. Interferon regulation factor-3 is a critical regulator of the mature of dendritic cells from mice. *Scand. J. Immunol.* 77:13–20. doi:10.1111/sji.12005.
- Zhang, M., H. Tang, Z. Guo, H. An, X. Zhu, W. Song, J. Guo, X. Huang, T. Chen, J. Wang, and X. Cao. 2004. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* 5:1124–33. doi:10.1038/ni1130.
- Zhang, W., and H.T. Liu. 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 12:9–18. doi:10.1038/sj.cr.7290105.
- Zhang, Y., and Y. Li. 2013. Regulation of innate receptor pathways by microRNAs. *Sci. China. Life Sci.* 56:13–8. doi:10.1007/s11427-012-4428-2.
- Zhang, Y., S. Liu, J. Liu, T. Zhang, Q. Shen, Y. Yu, and X. Cao. 2009. Immune Complex/Ig Negatively Regulate TLR4-Triggered Inflammatory Response in Macrophages through FcγRIIb-Dependent PGE2 Production. *J. Immunol.* 182:554–562.
- Zhang, Y., F. Luo, Y. Cai, N. Liu, L. Wang, D. Xu, and Y. Chu. 2011. TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. *J. Immunol.* 186:1963–9. doi:10.4049/jimmunol.1002320.
- Zhou, S., E. a Kurt-Jones, L. Mandell, A. Cerny, M. Chan, D.T. Golenbock, and R.W. Finberg. 2005. MyD88 is critical for the development of innate and adaptive immunity during acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Eur. J. Immunol.* 35:822–30. doi:10.1002/eji.200425730.
- Zigmond, E., C. Varol, J. Farache, E. Elmaliah, A.T. Satpathy, G. Friedlander, M.

Mack, N. Shpigel, I.G. Boneca, K.M. Murphy, G. Shakhar, Z. Halpern, and S. Jung. 2012. Ly6Chi Monocytes in the Inflamed Colon Give Rise to Proinflammatory Effector Cells and Migratory Antigen-Presenting Cells. *Immunity*. 37:1076–1090. doi:10.1016/j.immuni.2012.08.026.

Zingales, B., S.G. Andrade, M.R.S. Briones, D. a. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, a. M. Macedo, C.R. Machado, M. a. Miles, a. J. Romanha, N.R. Sturm, M. Tibayrenc, and a. G. Schijman. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 104:1051–1054. doi:10.1590/S0074-02762009000700021.

10. ANEXOS

10.1. Artigos Publicados

10.1.1. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016

- 2016 – MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP is required for cytokine production by splenic Ly6C^{lo}TLR2^{hi} but not by Ly6C^{hi}TLR2^{hi} monocytes during *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Biological Chemistry*, v.291, n.45, p. 23832-23841 (1º Autor).

10.1.2. *mBio*, 2015

- 2015 – DNA-Containing Immunocomplexes Promote Inflammasome Assembly and Release of Pyrogenic Cytokines by CD14⁺CD16⁺CD64^{high}CD32^{low} Inflammatory Monocytes from Malaria Patients. *mBio*, v. 6, p. e01605-15-e01605-15 (5º Autor).

10.1.3. *Plos One*, 2013

- 2013 – Differential Use of TLR2 and TLR9 in the Regulation of Immune Responses during the Infection with *Trypanosoma cruzi*. *Plos One*, v.8, p.e63100 (1º Autor).

10.1.4. *PloS Neglected Tropical Diseases*, 2012

- 2012 – Neutrophil Paralysis in *Plasmodium vivax* Malaria. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.6, p.e1710 (6º Autor).

10.2 Divulgação na Global Medical Discovery

HOME	ABOUT GMD	CONSULTING SERVICES	CONTACT US	SEPTEMBER 5, 2013
------	-----------	---------------------	------------	-------------------

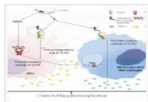
GLOBAL MEDICAL DISCOVERY

Search:

Key Scientific Articles	Top Patents	Clinical Trials	Leaders in Medicine	Events	Licensing & Partnership
-------------------------	-------------	-----------------	---------------------	--------	-------------------------

Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*.

Gravina HD, Antonelli L, Gazzinelli RT, Ropert C. *PLoS One*. 2013 May 1;8(5):e63100.



Top Patents

- MARKER FOR DIAGNOSIS OF BREAST CANCER, TEST METHOD, AND TEST KIT
- CLASS I ANTI-CEA ANTIBODIES AND USES THEREOF
- METHOD OF TREATING OSTEOARTHRITIS WITH AN ANTIBODY TO NGF

10.3 Divulgação na *World Biomedical Frontiers*



World Biomedical Frontiers
ISSN: 2328-0166

ALLERGY ALZHEIMER'S DISEASE ANEMIA ARTHRITIS CANCER OBESITY OSTEOPOROSIS STEM CELLS STROKE

Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*.
PLoS One. 2013 May 1;8(5):e63100.
Gravina HD, Antonelli L, Gazzinelli RT, Ropert C.
Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

11. FIGURA SUPLEMENTAR

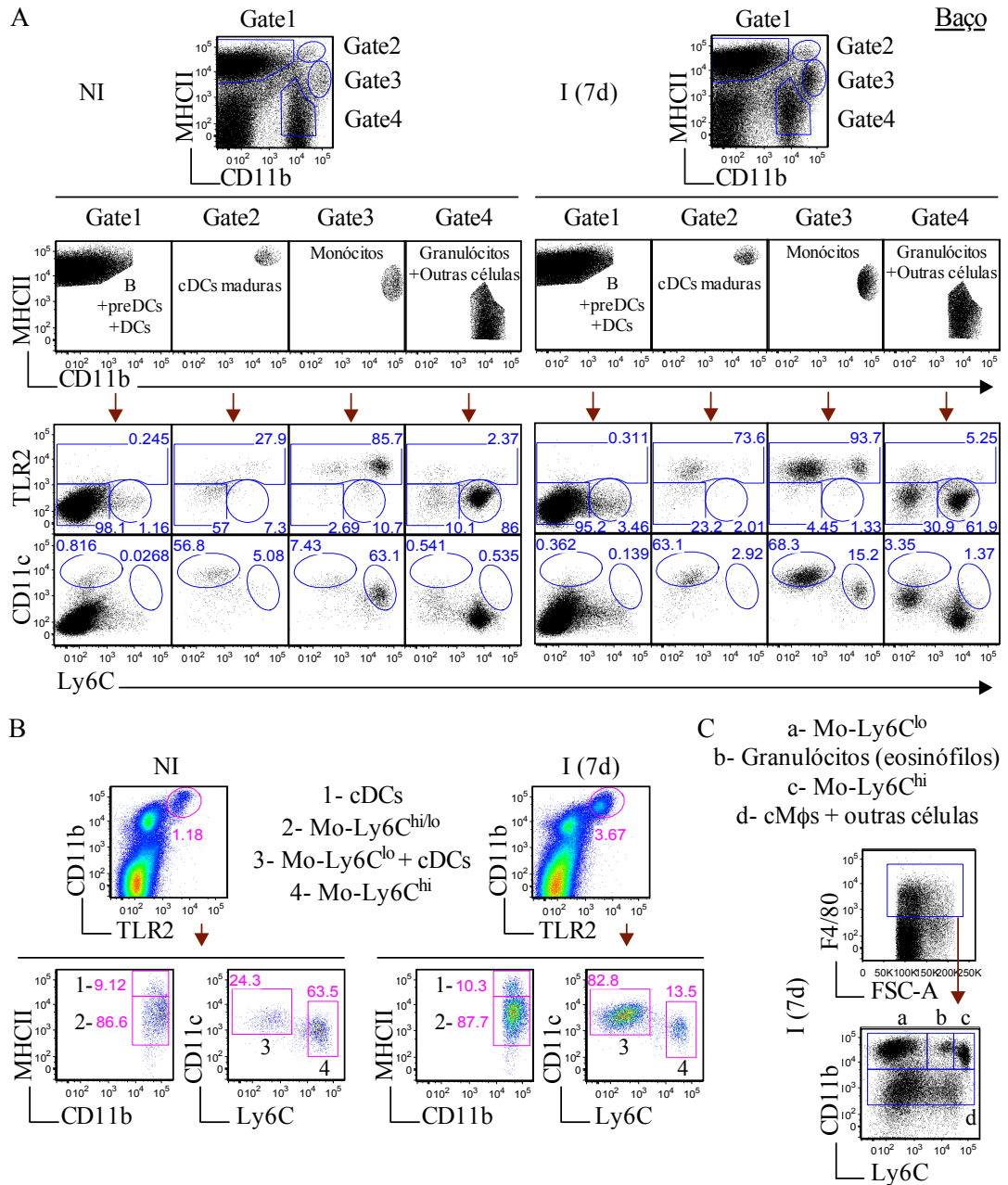


FIGURA 22 – Estratègia de gating de esplenòcitos.

A, Através dos *gates* 1-4, na interpolação (CD11b x MHCII), diferentes tipos celulares presentes no baço de camundongos saudios e infectados puderam ser selecionados. Em seguida, a interpolação (Ly6C x CD11c ou TLR2) permitiu diferenciar os tipos de monócitos das demais populações e verificar aquelas que expressaram TLR2.

B, O *gate* na interpolação (TLR2 x CD11b) permitiu identificar tipos celulares dentre a população que possui alta expressão de TLR2. Entre elas, identificam-se os Mo-Ly6C^{hi/lo} e uma fração de cDCs, apresentados nos *gates* nas interpolações (CD11b x

MHCII) e (Ly6C x CD11c). Obs.: Dentre a população TLR2⁺ (níveis intermediários) foram encontrados cDCs, cMφs, Mo_s, seus precursores e derivados em diferentes estágios de diferenciação/ativação celular.

C, O *gate* na interpolação (FSC-A x F4/80), seguido da interpolação (Ly6C x CD11b) permitiu identificar cMφ-Ly6C^{hi/lo}, Mo-Ly6C^{hi/lo} e granulócitos dentre a população que possui alta expressão de F4/80.