

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

ANDREIA BARROSO GONÇALVES

**O receptor aril hidrocarboneto como sensor da resposta imune  
inata: da influência no valor adaptativo do *Trypanosoma cruzi*  
ao controle da inflamação por células dendríticas na  
encefalomielite autoimune experimental**

Belo Horizonte

2018

ANDREIA BARROSO GONÇALVES

**O receptor aril hidrocarboneto como sensor da resposta imune inata: da influência no valor adaptativo do *Trypanosoma cruzi* ao controle da inflamação por células dendríticas na encefalomielite autoimune experimental**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de doutora.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Fabiana Simão Machado

Colaborador no exterior: Dr. Francisco Javier Quintana (Brigham and Women's Hospital – BWH – Harvard Medical School - HMS)

Belo Horizonte

2018

043      Gonçalves, Andréia Barroso.  
          O receptor aril hidrocarboneto como sensor da resposta imune inata: da influência no valor adaptativo do *Trypanosoma cruzi* ao controle da inflamação por células dendríticas na encefalomielite autoimune experimental [manuscrito] / Andréia Barroso Gonçalves. – 2018.  
          117 f. : il. ; 29,5 cm.

          Orientadora: Dr<sup>a</sup> Fabiana Simão Machado. Colaborador: Dr. Francisco Javier Quintana.

          Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

          1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Doença de Chagas. 3. Receptores de Hidrocarboneto Arílico. 4. Macrófagos. 5. Espécies Reativas de Oxigênio. 6. Encefalomielite Autoimune Experimental. I. Machado, Fabiana Simão. II. Quintana, Francisco Javier. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

          CDU: 577.1



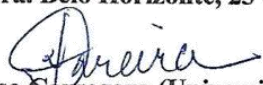
Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE ANDRÉIA BARROSO GONÇALVES.**  
 Aos vinte e três dias do mês de março de 2018 às 13:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "'O receptor aril hidrocarboneto como sensor da resposta imune inata: da influência no valor adaptativo do Trypanosoma cruzi ao controle da inflamação por células dendríticas na encefalomielite autoimune experimental"', requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Fabiana Simão Machado, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Vanessa Carregaro (Universidade de São Paulo), aprovada; Dr. Luiz Carlos Crocco Afonso (Universidade Federal de Ouro Preto), aprovada; Dr. Thiago de Castro Gomes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Flávio Almeida Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Fabiana Simão Machado - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA  
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 23 de março de 2018.

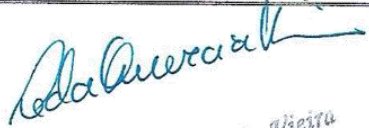
  
 Dra. Vanessa Carregaro (Universidade de São Paulo)

  
 Dr. Luiz Carlos Crocco Afonso (Universidade Federal de Ouro Preto)

  
 Dr. Thiago de Castro Gomes (UFMG)

  
 Dr. Flávio Almeida Amaral (UFMG)

  
 Dra. Fabiana Simão Machado - Orientadora (UFMG)

  
 Profª Leda Quercia Vieira  
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 2018-2019

**Algumas vezes o que aprendemos, e o que nos tornamos no  
processo, é até mesmo mais importante do que aquilo que  
buscamos**

**TRAVESSIA**

*Life is a journey, not a destination*

**Dan Millman**

# DEDICATÓRIA

*À minha mãe, Kátia Barroso Gonçalves, que a tantos ajudou nos percalços científicos, e que agora tem a recompensa por boa parte de tudo aquilo que renunciou em prol da minha educação. Com amor e gratidão.*

*Ao meu irmão Alex por tanto amparo e por ser exemplo de determinação, garra e pessoa.*

*Ao meu pai que com certeza deve estar, em algum lugar, com a energia em vibração por mais uma conquista daquela pequena menina que gostava tanto de acompanhá-lo.*

*Aos meus familiares e amigos que pacientemente compreenderam minha ausência em vários momentos, e que foram fonte fundamental de equilíbrio ao longo da jornada.*

*À energia maior que me guia, sustenta, preenche e ampara.*

# **AGRADECIMENTOS**

*“O homem, ser de relações, e não só de contatos, não apenas está no mundo, mas com o mundo.”*

Paulo Freire

Por isso e pela importância do que aprendi no processo agradeço:



À Prof<sup>a</sup>. Fabiana Simão Machado pela orientação desde a iniciação científica, pela oportunidade e paciência, por me ensinar a confiar no meu potencial, por me apresentar e presentear com ideias envolvendo o mundo do AhR, pelo amparo tanto científico quanto pessoal, pelos momentos de amizade, por lutar por mim e por tornar possível as minhas impossibilidades. A você sou e serei sempre grata. Eis aqui a última integrante do seu primeiro grupo de alunos. Espero que de alguma forma tenha valido a pena. Parabéns pelos quase dez anos de Laboratório de Imunorregulação de Doenças Infecciosas (LIDIN).

Aos colegas dos primórdios do LIDIN, Ronan Araújo, Lísia Éssper e Fátima Brant pelas trocas no início da jornada. À turma que pelo LIDIN passou e já se foi, Aline Lara, Cynthia Val, Renata Rocha, Isabela Avelar, Ricardo Rodrigues, Júlia Castro, Samuel, Melisa Glaudrón e Katherinne Manrico obrigada pela convivência. Ao Paulo Gaio (Caio) e Ana Carolina pelas ajudas com as contagens de tripomastigotas independentemente do dia e hora. Aos que além de colegas de trabalho se tornaram amigos, Bruno Cabral, Pollyana Pimentel, Diego Rodney, Allysson Cramer, Ana Carolina Alvarenga, Lorryne Sousa e Heliana Fernandes, a amizade de vocês poderia perfeitamente ser incluída como um dos objetivos do trabalho. É principalmente a vocês que agradeço pela troca de dúvidas, questionamentos, experiências, angústias, alegrias, diversão ao longo dos experimentos, discussão de resultados, companhia e amparo nos congressos. A todos, o mais importante agradecimento é a paciência que tiveram comigo em uma das mais difíceis artes, a arte de conviver. Serei eternamente grata.

Ao Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo por ser abrigo da minha primeira morada científica, pelas contínuas oportunidades, pela prontidão sempre que necessito de ajuda, pelo constante incentivo, pelo carinho e pela amizade.

À Prof<sup>a</sup>. Santuza Maria Ribeiro Teixeira que foi extremamente receptiva e empenhada em indicar a minha atual orientadora. Além disso, agradeço por sempre ser solícita quando procuro ajuda e por compartilhar comigo sabedorias sobre o mundo das novas chances que nos são dadas.

Às Prof<sup>as</sup>. Milene Rachid pela paciência com as extensas e prolongadas questões histológicas.

Ao Prof. Mauro Martins Teixeira por abrigar nosso laboratório em seu grupo de pesquisa. Aos membros do Imunofar que estão sempre dispostos a ajudar durante os experimentos, dúvidas e discussões. Em especial a Franck pelas ajudas com o citômetro, a Ilma pelo socorro com os materiais, aos colegas da biologia molecular, que pacientemente sanaram inúmeras dúvidas, Lucas Secchim, Daniel Cisalpino, Fernando Roque e Carol Fialho, a Ludmila e ao Thiago Ávila pelas ajudas com as sondas. Sou grata a todos.

À Prof<sup>a</sup>. Leda Quércia Vieira pela colaboração, disponibilidade, informações, sugestões, incentivo, momentos de confraternização e pela inesquecível frase: “Você está feliz? Então sorria”. Aos integrantes do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia (LAGI) Matheus Heitor, Dionne Castro, Grazi Goes, Caio Natale, Paula Seixas, Diego Borges, Débora, Léo Ribeiro, Lili Martins, Pierre, Matheus Eustáquio, Ana Clara Matoso e Allysson. A vocês o meu muito obrigada pela boa vizinhança, por atenderem aos meus inúmeros pedidos de “empréstimos”, por serem minha fonte de alto astral, pela companhia nos congressos e pela agitação que ultrapassa paredes. Valeu demais LAGI, lá fora não existem vizinhos como vocês.

Ao Prof. Jader dos Santos Cruz pela presteza e ajuda sem medir esforços, pela colaboração, pelo trabalho em equipe no ENAPEBI, por ajudar no processo de ida ao exterior e acompanhar as angústias da dificuldade financeira, pelo incentivo e preocupação, por ser presença, por proporcionar um dos momentos mais emocionantes da minha vida e em meio a isso tudo ser amizade, ser família. Aos alunos do Laboratório de Membranas Excitáveis e de Biologia Cardíaca Artur Miranda e Chistiane Freitas pelas conversas e realização dos longos e trabalhosos experimentos de eletrofisiologia.

Ao Prof. João Marques Trindade e ao Dr. André Nicolau pela boa vontade e disposição para discutir as ideias relacionadas ao mundo dos RNAs. Infelizmente não pude prosseguir com os dados preliminares levantados pelo André, mas espero que em algum momento alguém faça uso daquelas informações.

Ao Prof. Francisco Javier Quintana pela atenção e primeira oportunidade na SBI 2015 mesmo sem me conhecer, por ser inspiração com uma postura tão ativa, por abrir as portas de um novo mundo científico em um ambiente estimulador como a *Harvard Medical School*, por ser fonte de ideias envolvendo o mundo do AhR, pela possibilidade de colocar em prática a minha antiga curiosidade de entender mais sobre biologia molecular e *systems biology*, pela compreensão, visão, sabedoria de que “*No one is born an immunologist*” e pela segunda oportunidade.

Aos colegas do Quintana’s Lab Atsushi Kadowaki, Carolina Savatier, CC Chao, Chistina Vázquez, Emily Tjon, Fede Giovannoni, Iain Clark, Laura Ambrosio, Maisa Takenaka, Mike Wheeler, Patrick Hewson, Sadegh Seyed e Veit Rothhammer pela inspiração, convivência, ajudas, discussões, confraternizações, diversidade cultural e linguística e cordialidade em me receber. A Ashley Parsons e Megan Moleski por toda ajuda administrativa, Allisson James pelas saudações em português e pelas alegrias dançantes diárias. Vocês sabem tornar o intenso ambiente de trabalho um lugar agradável. Grata pela convivência nesses primeiros 11 meses.

Aos amigos Rafael Rezende, Sabrina Rezende, Felipe Von Glehn, Maisa Takenaka, Lucas Faustino, pequena Bia e Thais Moreira que conheci em Boston e que foram não só do

mundo científico, mas também família. Vocês me proporcionaram o alívio da saudade brasileira. Gratidão pela companhia, ajuda e amizade.

Ao Prof. Herbert Bernard Tanowitz pelo estímulo e afetuoso parabéns ao final de uma apresentação e pela colaboração.

Ao Prof. Gustavo Batista de Menezes por abrir as portas do seu laboratório com imensa boa vontade permitindo a utilização do microscópio confocal, por explicar a técnica com tamanha empolgação e disposição independente da hora, e pelo incentivo, ajuda e conversas em Boston.

A Celise e ao Alexandre do departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG pelas ajudas administrativas, e ao Orlando Matos (Orlandis) pelas dicas para o ENAPEBI, pela presteza em ajudar prontamente mesmo que de longe e pelo alto astral de sempre incluindo a prática do inglês.

Aos professores que por meio da arte de ensinar comportilham o conhecimento conosco, e neste momento em especial aos do departamento de Bioquímica e Imunologia que se dividem e desdobram em meio a atividades administrativas, busca por financiamentos, orientações, bancas, aulas e fazem da nossa pós-graduação um programa de excelência.

Aos colegas de bases pelas discussões e pelas confraternizações ao fim de cada módulo. Em especial ao Lucas Barreto pela companhia nos momentos gastronômicos e pelas discussões sobre a vida.

Aos membros da banca Luis Crocco, Vanessa Carregaro, Flavio Amaral, Thiago Castro e aos suplentes Leda Vieira e Andre Talvani que foram muito agradáveis e atenciosos no processo de decisão de composição da banca, e por disponibilizarem parte do tempo para discutir e contribuir com o nosso trabalho.

Aos que, apesar de não contribuírem cientificamente, foram meu suporte e incentivo para que eu realizasse este trabalho. Aos familiares mais próximos, obrigada por acompanharam e torcerem bem de perto pela minha realização. Aos amigos por pacientemente entenderam minha ausência em muitos momentos.

Ao meu país e aos brasileiros que financiam a educação pública da qual tenho usufruído desde 2006 na Universidade Federal de Minas Gerais. Espero e torço para que em algum momento o conhecimento científico que é produzido nessa instituição seja de fato aplicado e que todos sejam recompensados.

Aos camundongos sacrificados ao longo desses anos. Mesmo praticando as normas para o uso de animais, com o hábito do trabalho diário, às vezes nos desconectamos do fato

de que mesmo diferente de nós em complexidade, esses animais não deixam de serem seres vivos que há anos são parte fundamental da nossa ciência, e que nos trazem benefícios.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq) da UFMG pelo apoio financeiro. E em especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) também pelo apoio financeiro e por tornarem possível a excelente experiência de fazer parte do doutorado no exterior.

## RESUMO

O receptor aril hidrocarboneto (AHR) é um fator de transcrição ativado por ligante envolvido no controle de vários aspectos da resposta imune, incluindo a ativação e diferenciação de tipos específicos de células T e células apresentadoras de antígenos. Isso faz dele um relevante fator de transcrição para o contexto de infecções incluindo a infecção por *Trypanosoma cruzi*, e no contexto de doenças autoimunes como a Esclerose Múltipla (EM) e seu modelo experimental a encefalomielite autoimune experimental (EAE). A relevância de AHR para o controle da infecção pela cepa Y de *T. cruzi* ainda é desconhecida e foi investigada ao longo desse trabalho. Camundongos selvagens (WT) e AHR KO foram infectados por *T. cruzi* e tiveram os níveis quantificados de: parasitemia, inflamação do miocárdio e fibrose, expressão de AHR, citocinas, moléculas citotóxicas, no baço e/ou coração. Observamos aumento na expressão de AHR no coração de camundongos WT aos 15 dias após infecção (dpi). Os camundongos deficientes de AHR infectados por *T. cruzi* apresentaram redução na parasitemia, na inflamação e fibrose do miocárdio. Isso foi associado com um aumento da resposta imune caracterizada pelos níveis elevados de citocinas inflamatórias no coração desses camundongos. *In vitro*, a deficiência de AHR resultou em controle da replicação do parasita e redução nos níveis de ROS. Observamos que AHR influencia o desenvolvimento da infecção por *T. cruzi* por proporcionar o controle da produção de ROS e por influenciar a expressão de reguladores fisiológicos chave da inflamação. Já no contexto da autoimunidade, AHR controla a eficácia do laquinimode, composto em fase III de teste para o tratamento da EM. O laquinimode demonstrou efeito supressor em células dendríticas (DCs), mas ainda não se sabe se é de forma dependente de AHR. Em BMDCs não observamos efeito supressor do laquinimode, mas em DCs do baço vimos que o laquinimode e o delaq (um dos metabolitos do laquinimode), foram capazes de ativar AHR e reduzir a resposta inflamatória de forma dependente de AHR. Além disso, observamos um efeito supressor do delaq na produção de IL-6 e consequente redução da produção de IL-17 por células Th17 e aumento de Treg, também de forma dependente de AHR em DCs. Demonstramos aqui o papel antiinflamatório de AHR tanto na infecção experimental por *T. cruzi* quanto na EAE e a relevância desse receptor na resposta imune inata.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*; doença de Chagas; receptor aril hidrocarboneto; macrófagos; resposta imune inata; espécies reativas de oxigênio; encefalomielite autoimune experimental.

## ABSTRACT

The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-activated transcription factor involved in controlling several aspects of immune responses, including the activation and differentiation of specific T cell subsets and antigen-presenting cells, thought to be relevant in the context of experimental *Trypanosoma cruzi* infection, and in the context of autoimmune diseases as Multiple Sclerosis (MS) and its experimental model the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The relevance of AHR for the outcome of *T. cruzi* infection is not known and was investigated here. We infected wildtype (WT) and AHR KO mice with *T. cruzi*-Y strain and we quantified the levels of: parasitemia, myocardial inflammation and fibrosis, expression of AHR, cytokines, production of cytotoxic molecules in heart and/or spleen. AHR expression was increased in the heart of infected WT mice at 15 days post infection (dpi). Infected AHR KO mice displayed significantly reduced parasitemia, inflammation, and fibrosis of the myocardium. This was associated with an increased immune response characterized by increased levels of inflammatory cytokines in the heart of these mice. *In vitro*, AHR deficiency caused impairment in parasite replication and decreased levels of ROS production and the expression control of key inflammation-physiological regulators. In the context of autoimmunity, AHR controls the efficacy of laquinimode (Laqui), a compound which is in stage III phase for the treatment of MS. Laquinimode have a suppressor effect on dendritic cells (DCs), thus is still not known if it is in an AHR -dependent manner. In BMDCs we did not observe a laquinimod-suppressor effect, but in DCs from spleen, we saw that laquinimod and delaquinimod (a laquinimod metabolite), were able to activate AHR and impair the inflammatory response in an AHR -dependent manner. Furthermore, we note a delaquinimod suppressor effect in the production of IL-6 and consequent reduction of IL-17 production by Th17 cells, and an increase in Treg cells, also in an AHR-DCs dependent manner. Herein, we demonstrated the anti-inflammatory role of AHR during experimental *T. cruzi* infection as well as during EAE, and the relevance of this receptor for the innate immune response.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*; Chagas` disease; aryl hydrocarbon receptor; macrophages; innate immune response; reactive oxygen species; experimental autoimmune encephalomyelitis

## LISTA DE ABREVIATURAS

AHH	aril hidrocarboneto hidroxilase
AgTc	Antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i>
AhR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i> - Receptor aril hidrocarboneto
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ARNT	Translocador nuclear de AhR
ATLs	análogos estáveis de lipoxina
BBB	Barreira hematoencefálica
BMDCs	Células dendríticas diferenciadas de células da medula óssea
BZ	Benzonidazol - Rochagan®
cDCs	Células dendríticas convencionais
cDNA	DNA complementar
CETEA/CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal/Comissão de Ética no Uso de Animais
DEPC	dicarbonato de dietila
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRE	elementos responsivos à dioxina
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima
EM	Esclerose múltipla
FICZ	6-formylindolo[3,2-b]carbazole
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
HAH	hidrocarbonos aromáticos halogenados
HBSS	solução salina balanceada de Hank's
HLA	Antígeno leucocitário humano
IACUC	<i>Institutional Animal Care and Use Committee</i>
IDO	<i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IFN- $\gamma$	Interferon <i>gamma</i>
IL	Interleucina
ILCs	células linfoides inatas
iNOS	Oxido nítrico sintase induzível
ITE	<i>2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester</i>
KO	<i>Knockout</i>
LLC-MK2	células epiteliais de rim de macaco Rhesus
LPS	Lipopolissacarídeo
LXA	Lipoxina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MOG	Glicoproteína da mielina de oligodendrócitos
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase
NQO1	quinona oxiredutase

Nrf2	fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
O <sub>2</sub> *	Superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PAHs	hidrocarbonos aromáticos policíclicos
PBS	tampão fosfato-salino
PCBs	bifenilas policloradas
PCR	reação em cadeia da polimerase
RNO	Espécies reativas de nitrogênio
ROR- $\gamma$ t	<i>retinoic-acidreceptor-related orphan receptor-gamma t</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBF	soro bovino fetal
SNC	Sistema nervoso central
SOCS	proteína supressora de sinalização de citocinas
TCDD	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina
TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento beta
Th	<i>T helper</i> - T auxiliar
TLR	receptores do tipo toll
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	T reguladoras
UV	Ultra violeta
WHO	<i>World Health Organization</i> - Organização Mundial da Saúde



## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2- DOENÇA DE CHAGAS</b> .....	18
2.1-Agente etiológico, vetor e ciclo de vida.....	18
2.2-Tratamentos.....	23
2.3-Resposta imune a infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
2.1.1-Macrófagos e citocinas.....	23
2.1.2-Estresse oxidativo.....	24
2.1.3-Miocardite.....	25
<b>3- ESCLEROSE MULTIPLA</b> .....	27
3.1-O modelo murino da EM.....	29
3.2- Resposta imunológica na EM e EAE.....	30
3.3- Tratamentos.....	31
3.4- Laquinimode e delaquinimode.....	32
<b>4- O RECEPTOR ARIL HIDROCARBONETO</b> .....	33
4.1- Funções fisiológicas.....	33
4.2- Papel do AhR nas doenças infecciosas.....	39
4.3- Papel do AhR na autoimunidade.....	39
<b>5- JUSTIFICATIVA</b> .....	42
<b>6- OBJETIVOS</b> .....	43
<b>7- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
<b>8- RESULTADOS</b> .....	58
<b>9- DISCUSSÃO</b> .....	80
<b>10- CONCLUSÃO</b> .....	92
<b>11- REFERÊNCIAS</b> .....	94

# INTRODUÇÃO

*We should spend less time ranking children and more time helping them to identify their natural competencies and gifts and cultivate these. There are hundreds and hundreds of ways to succeed and many, many different abilities that will help you get there*

**Howard Gardner**

---

## 1- DOENÇA DE CHAGAS

### 1.1- Agente etiológico, vetor e ciclo de vida

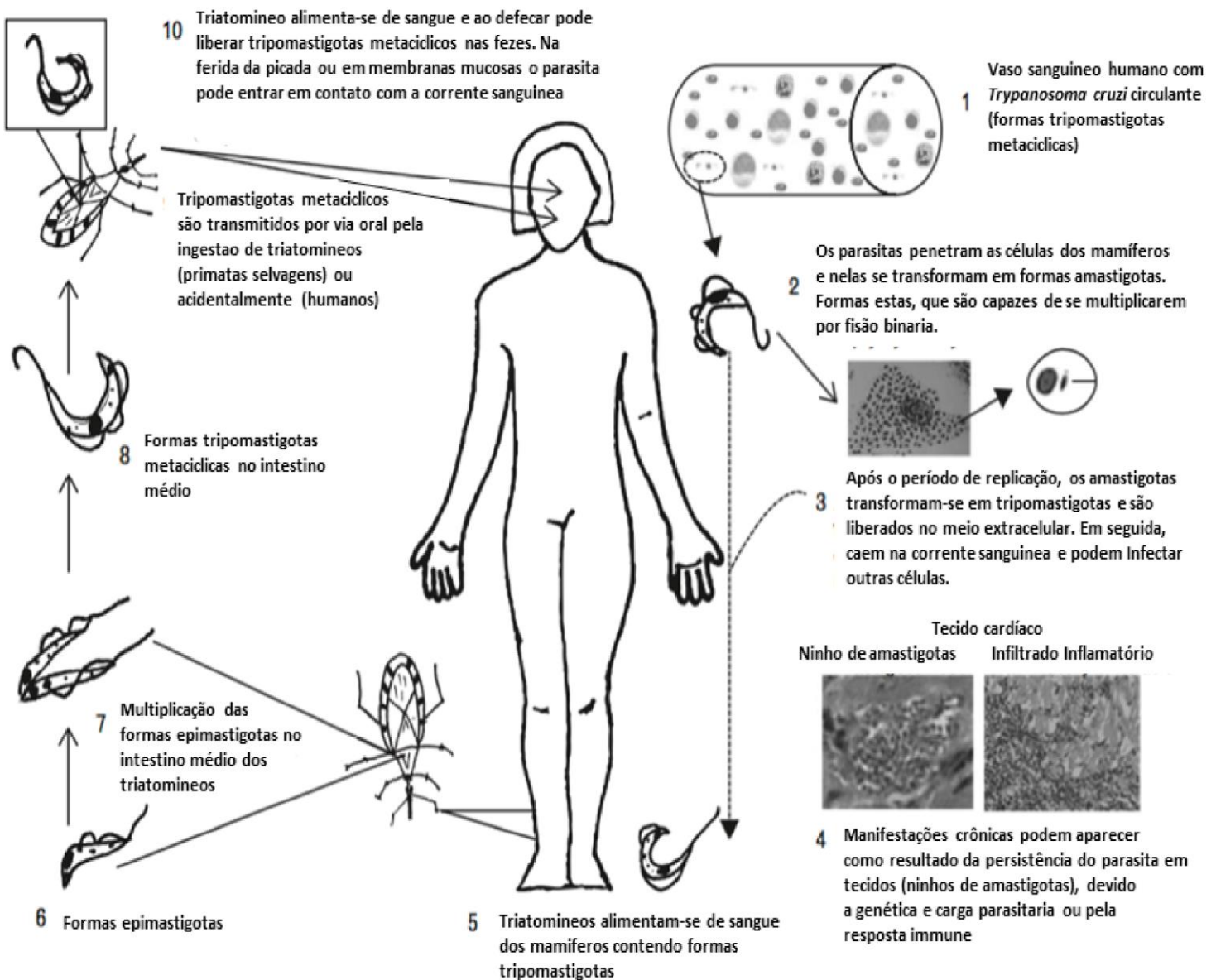
A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana foi descoberta e descrita em 1909, em um trabalho pioneiro do médico Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (Chagas, 1909). A doença tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um hematozoário flagelado que do ponto de vista filogenético pertence ao reino Protozoa, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastidea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma*. Além de ser encontrada principalmente na América Latina, a doença de Chagas tem sido detectada nas últimas décadas nos Estados Unidos da América, Canadá, muitos países europeus e alguns países do Pacífico Ocidental. Atualmente, estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas pelo parasita (**Figura 1**). De acordo com a Organização Mundial da Saúde - *World Health Organization* (Who, 2014), essa nova distribuição global se deve ao fluxo de migração da América Latina para o resto do mundo. Apesar de estarmos há mais de um século da descrição da doença e do aumento da investigação científica na área, a doença de Chagas ainda representa um grave problema de saúde pública na América Latina e é reconhecida como uma das principais doenças tropicais negligenciadas no mundo (Who, 2014).



**Figura 1. Distribuição global de indivíduos infectados por *Trypanosoma cruzi*.** Inicialmente descrita como Tripanossomíase Americana, a Doença de Chagas e característica da América Latina, atualmente podemos encontrar indivíduos com a doença em outros continentes devido principalmente a migração de pessoas infectadas. Adaptado de (Ribeiro *et al.*, 2012).

Com relação ao ciclo de transmissão do parasita, a forma infectiva é a tripomastigota metacíclica (alongada com flagelo, o que facilita o movimento) (Teixeira *et al.*, 2006). Intracelularmente, os parasitas escapam do vacúolo parasitóforo e diferenciam-se em formas amastigotas (forma ovóide e sem flagelo), que se reproduzem assexuadamente por fissão binária no citoplasma celular. Tal fato pode levar à degeneração e morte da célula hospedeira uma vez que há grande número e movimentação intensa dos tripomastigotas. Essas formas flageladas são liberadas no sangue, e no sistema linfático, e são capazes de infectar outras células do corpo, causando lesões, principalmente, em tecidos musculares cardíacos e lisos (Teixeira *et al.*, 2006). Os barbeiros são os principais vetores para os humanos, no intestino médio desses insetos, os parasitas se tornam epimastigotas e se multiplicam e ao se diferenciarem na forma tripomastigota metacíclica, que é eliminada nas fezes e urina durante o repasto sanguíneo, podem penetrar através de feridas ou mucosas no organismo do hospedeiro definitivo, recomeçando assim o ciclo de transmissão da doença de Chagas (Figura 2).

## Triatomíneo/Humano (mamíferos)

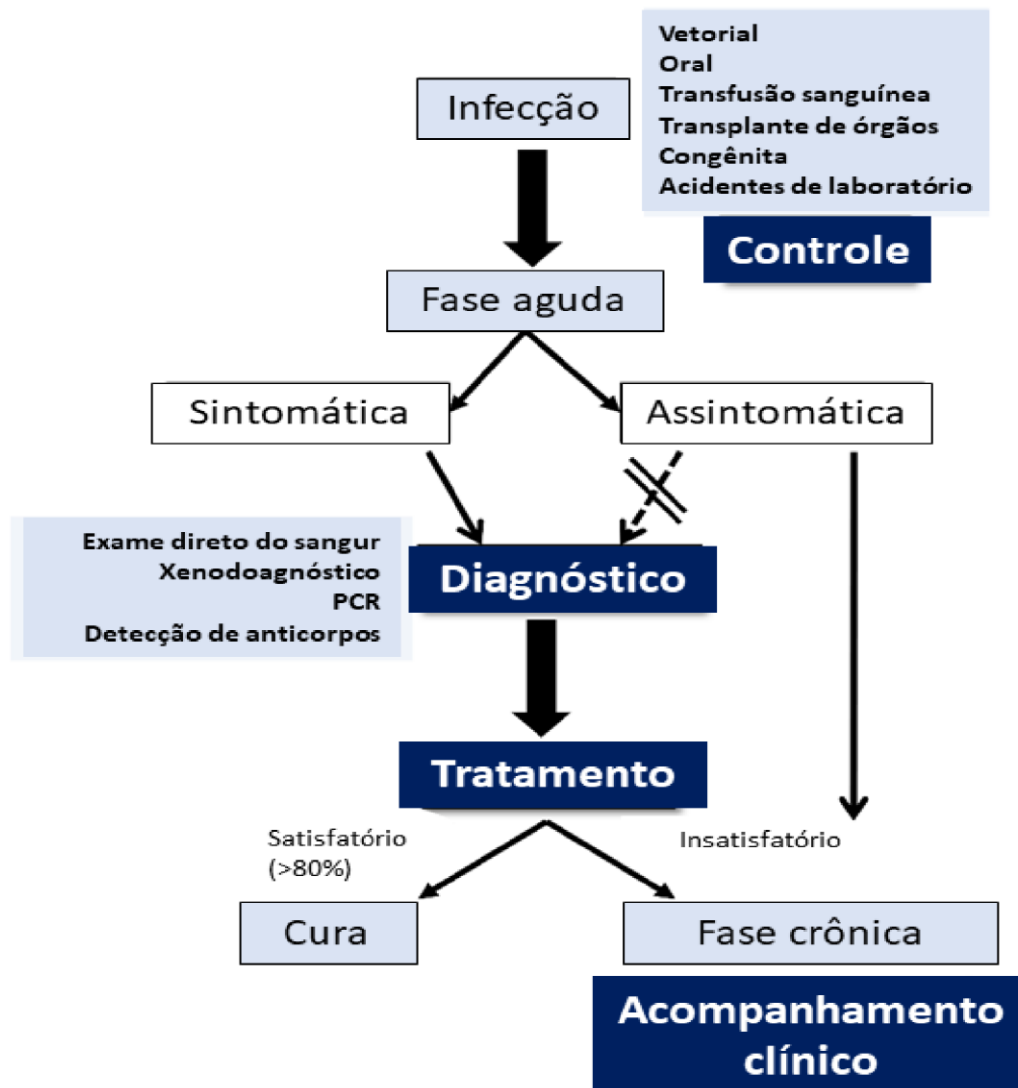


**Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.** Descrição dos estágios de vida no triatomíneo e no humano. A picada do barbeiro geralmente ocorre em áreas expostas do corpo e o indivíduo picado carrega acidentalmente as fezes do barbeiro infectado com *T. cruzi* para o local da picada, para mucosas ou para qualquer lugar na pele em que haja uma lesão. A forma infectiva é a tripomastigota metacíclica. Após a infecção, as formas tripomastigotas penetram em vários tipos de células do hospedeiro. Intracelularmente, os parasitas escapam do vacúolo parasitóforo e diferenciam-se em formas amastigotas, que se reproduzem assexuadamente por fissão binária no citoplasma celular. Tal fato pode levar à degeneração e morte da célula hospedeira uma vez que há grande número e movimentação intensa dos tripomastigotas. Essas formas flageladas são liberadas no sangue, e no sistema linfático, e são capazes de infectar outras células do corpo, causando lesões, principalmente, em tecidos musculares cardíacos e lisos. Os barbeiros no ato do repasto sanguíneo ingerem os tripomastigotas do sangue, e no estômago do invertebrado, a forma tripomastigota começa a adquirir aspectos arredondados, alguns se tornando esferomastigotas e outros epimastigotas. Ao chegar ao intestino, mais precisamente na porção média, os parasitas se tornam epimastigotas e se multiplicam. As formas epimastigotas migram para o intestino posterior do inseto, e lá se diferenciam na forma tripomastigota metacíclica, que é eliminada nas fezes e na urina durante o repasto sanguíneo. Após esse processo, por meio de um transporte mecânico realizado pelo potencial futuro hospedeiro, as formas tripomastigotas podem penetrar através de

feridas ou mucosa no hospedeiro definitivos, recomeçando assim o ciclo de transmissão da doença de Chagas. Adaptado de (Esper *et al.*, 2015).

Além da transmissão vetorial existem outras formas de infecção pelo agente etiológico sendo elas: a congênita; por transfusão de sangue ou de órgãos; e por ingestão oral. Essas últimas têm sido eleitas como de grande importância epidemiológica por levar a doença para outros países não endêmicos e por serem responsáveis por surtos recentes de doença aguda. Há ainda, mesmo que em menor ocorrência, as infecções que ocorrem por manuseio de animais e acidentes laboratoriais. (Teston *et al.*, 2013; Who, 2014).

A doença é composta basicamente por uma fase aguda e uma fase crônica (**Figura 3**). A fase aguda é caracterizada por alta parasitemia e a presença de anticorpos específicos também auxilia a detecção da doença. (Teixeira *et al.*, 2006). Já na fase crônica, o principal meio de constatação da doença é pela presença de anticorpos específicos, uma vez que a parasitemia é inexistente. Nesta fase os indivíduos são classificados como assintomáticos (forma indeterminada), podendo durar por toda a vida do paciente. Todavia, em cerca de 30% dos pacientes, a doença evolui para uma fase sintomática que pode se caracterizar na forma cardíaca, digestiva, cardiodigestiva ou nervosa (Tanowitz *et al.*, 1992).



**Figura 3. Fluxograma descritivo das fases da doença de Chagas.** A detecção da doença ainda na fase inicial é importante para o início do tratamento e controle da infecção. Entretanto, a ausência de sintomas bem definidos torna difícil o diagnóstico. Dos indivíduos que são tratados na fase aguda, cerca de 80% apresentam sucesso no tratamento. Quando não tratados nessa fase ocorre a evolução para a fase crônica. Desses indivíduos que entram nessa fase, cerca de 30% desenvolvem a forma clínica severa da doença, que geralmente evolui para morte devido às complicações clínicas. A busca por marcadores prognósticos de progressão da doença é um aspecto crítico para prevenção da patogênese e introdução de medidas clínicas melhores. Adaptado de (Andrade *et al.*, 2014).

## 1.2- Tratamentos

Com relação aos tratamentos existentes, as drogas disponíveis são nifurtimox e benzonidazol – Rochagan ® (BZ). Entretanto, elas devem ser administradas por longos períodos de tempo, geram graves efeitos colaterais, são eficazes apenas na fase aguda, e geram tolerância (Punukollu *et al.*, 2007; Tarleton, 2007). A ação do BZ pode envolver ligações covalentes e outros tipos de interações de intermediários nitro redutores com componentes do parasito ou até mesmo ligações ao DNA (Coura e Castro, 2002; Dias, 2009). Há evidências que indicam que o nifurtimox e o BZ possuem mecanismo de ação através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. O radical nitro que é formado pela ação do fármaco BZ estaria envolvido com seu efeito tripanocida por meio da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *T. cruzi*, por exemplo, DNA e citocromo P450. O BZ aumenta a fagocitose e lisa o *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de IFN- $\gamma$ , que inibe o crescimento do *T. cruzi* por meio da ação da enzima NADH-fumarato redutase (Dias, 2009).

## 1.3- Resposta imune a infecção por *Trypanosoma cruzi*

### 1.3.1- Macrófagos e citocinas

Com relação ao sistema imunológico, sabe-se que o sistema mononuclear fagocitário representa um subgrupo dos leucócitos, sendo que os componentes centrais são os monócitos, macrófagos, e as células dendríticas (DCs), que derivam de precursores mielóides da medula óssea. No sangue estão presentes os monócitos e, principalmente nos tecidos, encontramos os macrófagos que possuem um importante papel durante a inflamação (Geissmann *et al.*, 2010). Durante a fase aguda da doença de Chagas há forte resposta inflamatória para controlar a replicação do parasita, e para isso ocorre o recrutamento das células da linhagem monocítica (Fabrino *et al.*, 2011). A forma tripomastigota metacíclica tem a capacidade de invadir uma variedade muito grande de células no local em que foi inoculada, essa invasão às células do hospedeiro vertebrado ocorre pelo reconhecimento entre parasita e célula. Tal processo envolve uma variedade muito grande de moléculas que estão presentes tanto na célula do hospedeiro quanto no *T. cruzi* e pode ser dividido em três estágios: adesão e reconhecimento, sinalização e invasão. (Andrade e Andrews, 2005; Albertti *et al.*, 2010; De Souza *et al.*, 2010).



Quando ativados, os macrófagos podem produzir altos níveis de citocinas inflamatórias tais como interleucina (IL)-12 e fator de necrose tumoral (TNF). IL-12 pode ativar as células *natural killers* (NK) que são capazes de liberar interferon *gamma* (IFN- $\gamma$ ), isso leva a expansão de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Essas células T também são capazes de produzirem IFN- $\gamma$  o que amplifica a expansão de mais células T (Torrice *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1995; Aliberti *et al.*, 1996). IFN- $\gamma$  ativa os macrófagos infectados por *T. cruzi* a produzirem óxido nítrico (NO), um importante agente microbicida durante essa infecção (Machado *et al.*, 2000; Fabrino *et al.*, 2011). A produção de IFN- $\gamma$  é também implicada na indução da produção de TNF e IL-1 $\beta$  por macrófagos. (Silva *et al.*, 2003). Por outro lado, as citocinas regulatórias IL-10 e fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) inibem a ativação de macrófagos mediada por IFN- $\gamma$ , inibindo a produção de NO, quimiocinas e diferenciação de células produtoras de IFN- $\gamma$ . (Silva *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 2003). Portanto, a neutralização de IL-10 endógena aumenta a produção de IFN- $\gamma$ , indução de NO e conseqüentemente morte do parasita (Reed *et al.*, 1994; Cardillo *et al.*, 1996). A produção de NO também pode ser inibida pelo consumo do substrato da óxido nítrico sintase (NOS), a L-arginina. A enzima arginase pode metabolizar a L-arginina em Lornitina e uréia. Em macrófagos infectados, o consumo da L-arginina pela NOS ou pela arginase pode levar a morte ou a proliferação do parasita, respectivamente (Balaña-Fouce *et al.*, 2012)

Coletivamente, esses estudos sugerem que IL-12 e IFN- $\gamma$  favorecem a diferenciação de linfócitos T *helper* (Th)1, levando à produção de IFN- $\gamma$  e conseqüente diminuição de síntese de IL-10, sendo esse mecanismo um fator chave requerido para indução e manutenção do controle da infecção aguda induzida por *T. cruzi*. (Torrice *et al.*, 1991; Aliberti *et al.*, 1996). Dessa forma, entendemos que a interação apropriada entre as células apresentadoras de antígenos (APCs) e células T, e a conseqüente resposta imune gerada por tais interações, são essenciais para determinar o destino de uma infecção. (Fabrino *et al.*, 2011).

### 1.3.2- Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ROS) e as de nitrogênio (RNS) são derivadas do oxigênio e nitrogênio e são mais reativas do que eles. A primeira redução do oxigênio molecular gera o O<sub>2</sub><sup>\*</sup>, que por nova redução gera o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e a reação do NO com o O<sub>2</sub><sup>\*</sup> gera o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (Bayir, 2005). A atuação dessas espécies pode ser controlada pela atuação de diferentes proteínas com papel antioxidantes, tais como

superóxido desmutase, peroxidase, catalase e glutathione oxidase. A falta do balanço entre a produção das ROS e a detoxificação delas resulta em estresse oxidativo, que pode levar a inflamação, câncer, doenças renais, hepáticas, neurológicas e cardiovasculares (Matés *et al.*, 1999; Pacher *et al.*, 2007).

As ROS possuem um efeito citotóxico bem conhecido, mas apesar disso elas apresentam um papel bem diverso para o controle dos tripanosomatídeos (Paiva e Bozza, 2014; Goes *et al.*, 2016). Tal diversidade é devido ao fato de que dependendo da concentração, ROS pode levar à morte, ou replicação do parasita, ou participar da sinalização e proliferação celular (Paiva *et al.*, 2012; Menna-Barreto e De Castro, 2014). Como os alvos de ação de alguns dos tratamentos existentes estão relacionados com os mecanismos oxidativos do agente etiológico da doença e do hospedeiro, o melhor entendimento desse processo nos modelos de estudo da doença de Chagas, podem colaborar para a melhora dos poucos tratamentos existentes, e até o desenvolvimento de novos tratamentos.

### **1.3.3- Miocardite**

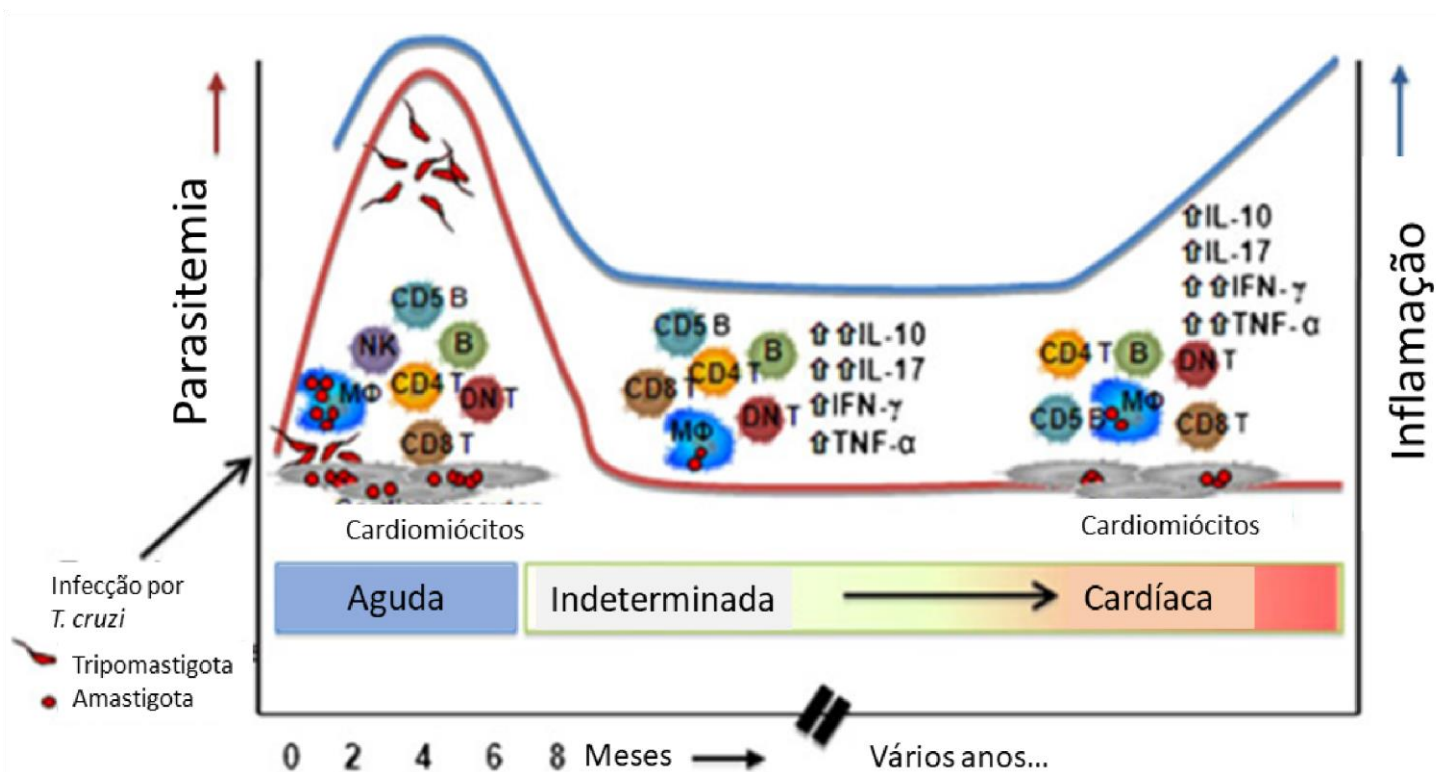
A miocardite é caracterizada como um processo inflamatório, sendo que pode ser devido à infecção por protozoários como, por exemplo, pelo *T. cruzi*, por vírus, bactérias, fungos ou por causas idiopáticas. A causa do desencadeamento da miocardite pode ser por alojamento do agente inflamatório no tecido cardíaco com consequente ativação da resposta imune humoral e celular do hospedeiro. No caso da doença de Chagas, a patogênese do tecido cardíaco ainda não é claramente definida, mas algumas teorias são apontadas como causadoras da miocardite sendo elas: distúrbios neurogênicos, distúrbios microvasculares, dano dependente da presença do parasita e lesão tecidual mediada pelo sistema imune (Rassi e Marin, 2017).

Dados de pacientes chagásicos com síndrome da imunodeficiência adquirida, demonstraram que houve aceleração de danos causados pela cardiopatia chagásica, mas sem a observação de amastigotas no tecido e sem reagudização da doença (Almeida *et al.*, 2009). Esses dados dão força à teoria de que epítomos compartilhados entre o parasita e o hospedeiro seriam um dos responsáveis pelo dano cardíaco.

Com relação à inflamação e dano do miocárdio associado com a presença do parasita, sabe-se que a ativação da imunidade inata e consequente imunidade adaptativa podem gerar inflamação crônica que tem como objetivo controlar o parasitismo local e é composta por ativação de diferentes tipos celulares, que produzem moléculas citotóxicas que podem

controlar a infecção, mas que também podem causar dano tecidual (**Figura 4**). Dentre elas as citocinas desempenham um papel importante uma vez que evidências mostraram que elas são capazes de modular diretamente a função da célula muscular cardíaca, o que pode deprimir ou potencializar a função contrátil dos cardiomiócitos. Tal alteração pode ser pelo fato de que dessa forma interferem na dinâmica intracelular de cálcio (Krown *et al.*, 1995; Goldhaber *et al.*, 1996; Roman-Campos *et al.*, 2009).

Durante a fase aguda da doença de Chagas as manifestações mais graves são miocardite, que pode ser acompanhada por arritmias, insuficiência cardíaca congestiva e, de forma mais rara, meningocéfalite. Dentre os 30-40% dos indivíduos que sobrevivem à fase aguda e desenvolvem sinais e sintomas na fase crônica que podem chegar a resultar em falha cardíaca e/ou digestiva (Esper *et al.*, 2015). A falha cardíaca é a manifestação mais severa da doença e esta associada com incapacidade para trabalhar, baixa qualidade de vida e altas taxas de letalidade (Rassi e Little, 2000).



**Figura 4. Relação entre parasitemia, inflamação e fases da doença de Chagas.** A maioria das pessoas infectadas por *T. cruzi* desenvolve parasitemia associada com uma intensa resposta imune celular e humoral envolvendo células tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa. Nessa fase os indivíduos podem apresentar características clínicas severas da doença que vão de febre alta, arritmia cardíaca a morte. Na grande

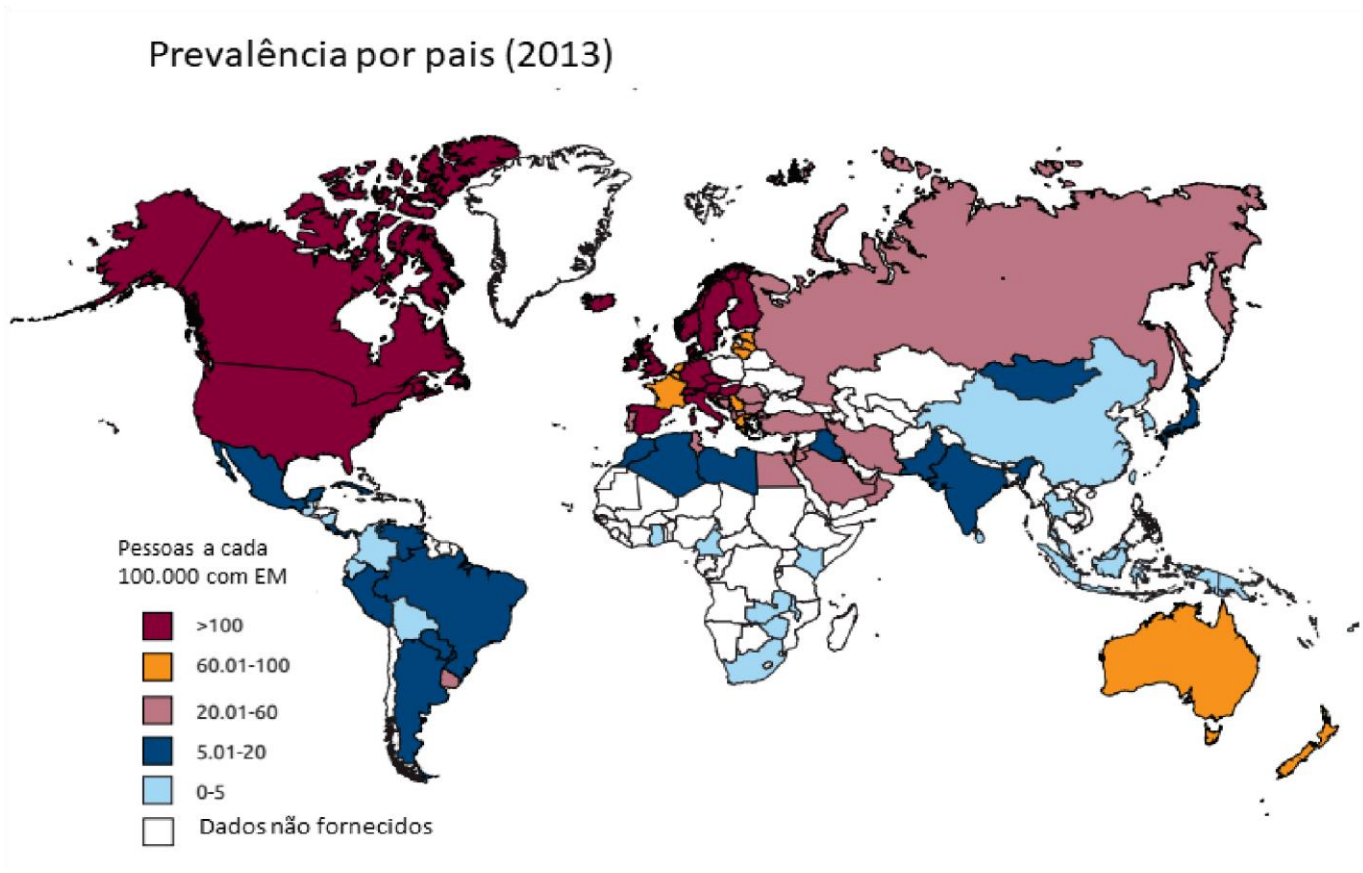
maioria dos casos há controle da fase inicial pelo sistema imune acompanhada da redução tanto da parasitemia quanto dos sintomas e início da fase crônica da doença. Nessa fase, a maioria dos indivíduos entra na fase indeterminada (assintomática) associada com uma resposta imune inflamatória e reguladora balanceada (baixa taxa de inflamação). Aproximadamente 30% dos indivíduos progridem para a forma clínica cardíaca associada com alto quadro inflamatório. Tipos celulares representados na figura: células T CD4, T CD8 e T duplo negativas (DN), macrófagos (MΦ), células *natural killer* (NK), células B CD5 (secretoras de IgM). O aumento da inflamação está associado com dados que demonstram aumento da resposta inflamatória (citocinas e quimiocinas). Adaptado de (Machado *et al.*, 2012).

## 2- ESCLEROSE MULTIPLA

A esclerose múltipla (EM) é a desordem imunológica inflamatória e neurodegenerativa (desmielinizante) mais comum em jovens e adultos, especialmente na Europa e na América do Norte. Relatos iniciais da doença são do século XIV, e em 1868 o neurologista Jean-Martin Charcot foi o primeiro a fazer correlações entre as características clínicas da EM com mudanças patológicas observadas após a morte de indivíduos doentes. Robert Carswell e Jean Cruveilhier também fizeram importantes descrições iniciais sobre a doença (Kumar *et al.*, 2011).

Estimativas apontam que a prevalência mundial da doença é de aproximadamente 2.5 milhões de indivíduos afetados, o que faz com que o entendimento dessa doença seja muito importante tanto para a cura desses indivíduos (saúde pessoal) quanto para a sociedade (saúde pública). Isso porque essa é uma das doenças neurológicas mais importantes, com altos gastos para o tratamento dos doentes e alto gasto financeiro causado pela inabilidade dos indivíduos afetados (Compston e Coles, 2008). Devido ao fato de que o início da EM é por volta dos 30 anos, a perda de produtividade dos pacientes pode ser significativa, assim como o custo financeiro para a sociedade relatado acima (Al-Omaishi *et al.*, 1999). Para compensar a perda financeira, indivíduos com EM recorrem a ajudas sociais para debilitados. Além disso, dados da *National Multiple Sclerosis Society* sugerem que americanos com EM usam mais recursos de cuidados com a saúde do que a população em geral.

A média de prevalência da doença é maior do que 100 casos a cada 100.000 habitantes nas regiões com maior incidência (**Figura 5**). A doença também apresenta grande relevância no Brasil sendo que a prevalência varia de 1,36 por 100.00 indivíduos nas regiões equatoriais a 15 casos por 100.000 habitantes na região sudeste (Ferreira *et al.*, 2004; Fragosos e Fiore, 2005).



**Figura 5 – Prevalência mundial da Esclerose Múltipla.** No mapa podemos observar que a latitude está associada a uma maior chance de desenvolvimento da EM e que provavelmente está associada diretamente com os níveis de radiação ultravioleta e indiretamente com os níveis de vitamina D. Adaptado de *Atlas of MS 2013* da *Multiple Sclerosis International Federation*.

Devido à alta reatividade de células T e a liberação de citocinas, atribui-se a autoimunidade uma das maiores responsáveis pelo desencadeamento da doença, mas ainda não se sabe de forma assertiva qual a real etiologia da EM, mesmo sendo uma doença descoberta ainda no século XIX. Dados obtidos ao longo desses anos levam a crer que uma multiplicidade de fatores estão relacionados diretamente com a doença, como por exemplo, fatores genéticos, fatores ambientais e infecções. Com relação a genética, já se sabe da forte influência de um dos alelos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC)-II, e do gene do antígeno leucocitário humano HLA (Svejgaard, 2008; Sawcer et al., 2011; Parnell e Booth, 2017). Um dos dados que embasam a influência do fator genético é que o risco de desenvolver a doença vai de 1 a cada 1000 na população em geral, para 1 a cada 4 em gêmeos idênticos (Parnell e Booth, 2017). Há discussões também sobre a possibilidade de influência da infecção viral por Epstein-Barr, mas as bases moleculares ainda não são muito claras. Com relação aos fatores ambientais há relações com a baixa exposição aos raios ultravioleta (UV),

tabagismo e níveis reduzidos de vitamina D (Ramagopalan *et al.*, 2010). Números sobre a maior incidência da doença em países de clima temperado, principalmente os situados na parte norte da Terra (**Figura 5**), estão relacionados de forma direta com os fatores ambientais citados (Simpson *et al.*, 2011).

A doença pode afetar várias partes do sistema nervoso central (SNC), o que inclui medula espinhal, tronco cerebral, cerebelo, cérebro e nervos ópticos, mas os nervos periféricos não são afetados. A EM é caracterizada por numerosas lesões discretas (placas) espalhadas por toda a substância branca do SNC. Essas lesões causam múltiplos e variados sintomas e sinais de disfunção neurológica. Um sintoma inicial comum é a neurite óptica, que é uma desordem transiente do nervo óptico que frequentemente gera visão borrada ou cegueira provisória. Outros sintomas sensoriais podem incluir dormência, formigamento dos pés ou das mãos, frio ou dor ardente e tontura. Sintomas motores podem incluir falta de coordenação motora, desequilíbrio, fraqueza, tremor e aumento de tônus muscular..

Além dos sintomas serem variados, assim também é o curso da doença. Existem três tipos principais de curso da EM: surto remissão que compreende cerca de 85% dos casos e é caracterizada por surtos isolados seguidos por subseqüentes períodos de estabilidade; secundária progressiva, que se estabelece após vários surtos com a debilidade clínica aumentando continuamente; e primária progressiva, em que os pacientes desenvolvem déficits clínicos progressivos e contínuos desde o primeiro surto (Friese *et al.*, 2006).

## 2.1- O modelo murino da EM

Existem diversos modelos experimentais da EM e o que usamos neste estudo foi o da encefalomielite autoimune experimental (EAE). O composto utilizado para imunização dos animais foi a glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG) 35-55, peptídeo que tem sido descrito como um dos possíveis responsáveis pela resposta autoimune. No entanto, como algumas características imunológicas da EAE não são as mesmas da EM, tem-se discutido que a EAE na verdade é um modelo de doença autoimune específica ao antígeno (MOG). A descrição da relação de MOG com a doença é datada em 1976 quando Lebar e colaboradores disseram que a desmielinização observada em animais induzidos era mediada por anticorpos que reagem a um componente da mielina, e que na época era denominado M2 (Lebar *et al.*, 1976). Ao longo de quase 20 anos diversas descobertas foram realizadas com relação a essa proteína e a doença, e em 1998, Slavin e colaboradores imunizaram camundongos C57BL/6

com MOG<sub>35-55</sub>. Eles observaram que os animais desenvolveram uma doença de surto único e cronicamente paralisante e dessa forma consolidaram o modelo em questão (Slavin *et al.*, 1998). Além da debilidade motora há outras semelhanças entre a EM e a EAE, sendo um exemplo o fato de que a desmielinização e o infiltrado inflamatório no SNC de células T CD4<sup>+</sup> encontradas em pacientes com EM, também pode ser observado no modelo da EAE (Hjelmström *et al.*, 1998; Goverman, 2009). Essa similaridade permite que a EAE seja um modelo útil para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos da EM. Um ponto negativo do modelo é que dois medicamentos testados com sucesso na EAE, não tiveram eficácia comprovada na EM. Entretanto, outras terapias para EM testadas na EAE foram eficazes na atenuação da EAE, sendo que uma delas é um dos tratamentos de primeira linha da EM, o acetato de glatiramer.

## 2.2- Resposta imunológica na EM e EAE

O papel de células T CD4<sup>+</sup> autorreativas é fundamental no processo fisiopatológico da EM e EAE. A maior parte destas células seria eliminada durante o desenvolvimento no timo, mesmo aquelas que expressam receptores de mielina. Entretanto, a ideia é que algumas células autorreativas escapariam da seleção tímica e constituiriam o repertório periférico de células T. Estas células seriam ativadas a partir do contato com o epítipo antigênico, contato este mediado pelo MHC em conjunto com sinais coestimulatórios apropriados de APCs. Nesse processo, o repertório de auto antígenos apresentados aumentaria progressivamente e a tolerância seria perdida (Mbongue *et al.*, 2014; Grigoriadis *et al.*, 2015). As DCs tem forte influência na tolerância (Obregon *et al.*, 2017). Devido ao papel de APCs e ao perfil tolerogênico, essas células são importantes para a manutenção tanto da homeostasia quanto da conexão da resposta imune inata com a adaptativa. O papel das DCs na autoimunidade do SNC não está relacionado apenas a polarização das células T em órgãos periféricos. As DCs também promovem a entrada de células T no SNC, a polarização de células patogênicas no SNC e a disseminação da resposta autoimune a novos epítopos no SNC (Quintana, 2013a).

Células T ativadas na periferia atravessam a barreira hematoencefálica (BBB) para o SNC onde são reativadas e passam a secretar citocinas e desse modo exercer funções efetoras. As células Th1 produzem IFN- $\gamma$  e TNF, enquanto as células Th17 secretam tanto IL-17 quanto IL-21 e IL-22 e podem também produzir IFN- $\gamma$ , sendo que todas elas contribuem para a patogenicidade da doença (Baecher-Allan *et al.*, 2018). As células T efetoras (CD8<sup>+</sup>)

também podem ser uma fonte produtora de IL-17 e IFN- $\gamma$ , e na EM tem sido descritas como componentes principais das lesões em todo o cérebro e em todos os diferentes estágios da doença (Baecher-Allan *et al.*, 2018; Lassmann, 2018). Essa intensa secreção de citocinas leva a ativação de células imunes residentes no SNC (microglia, astrócitos, macrófagos), assim como a liberação de citocinas por essas células, aumento da função de APCs e aumento da produção de ROS e RNO. As células T efetoras podem ser reguladas, tanto na periferia quanto no SNC, por células T reguladoras (Treg-Foxp3<sup>+</sup> ou Tr1-Foxp3<sup>-</sup>), células T CD8<sup>+</sup> reguladoras, células NK e células B reguladoras (BaecherAllan *et al.*, 2018).

### 2.3- Tratamentos

A EM ainda é uma doença sem cura. O tratamento é tipicamente focado principalmente em reduzir a progressão da doença e amenizar os sintomas. Em algumas pessoas os sintomas são muito amenos e por isso não há necessidade de tratamento. A maior parte da resposta imune associada a EM ocorre nos estágios iniciais da doença. Um tratamento agressivo nessa fase pode retardar a formação de novas lesões. Para os indivíduos com quadro de surto e remissão, o que engloba o maior número de doentes, existem alguns tratamentos disponíveis sendo eles: IFN- $\beta$ , ocrelizumab, acetato de glatiramer, fumarato de dimetila, fingolimode, teriflunomide, natalizumab, alemtuzumab, mitoxantrone (Schapiro, 2009).

Apesar dos diversos avanços conquistados com os estudos sobre a EM, incluindo as terapias citadas acima, ainda há necessidade de melhorar as estratégias terapêuticas existentes, e até mesmo o desenvolvimento de novas terapias. Para isso, os modelos animais tem auxiliado muito no que diz respeito às descrições do funcionamento básico do sistema imune na autoimunidade e conseqüentemente na compreensão dos mecanismos de atenuação da patologia da EM. O modelo murino da EM, a EAE, tem sido extensivamente utilizado para desvendar os mecanismos da inflamação autoimune. A imunização contra antígenos de mielina não mimetiza exatamente os mecanismos que levam ao estabelecimento da EM, mas ainda sim, os dados desse modelo são extremamente úteis, e quando um possível tratamento para a EM é identificado, a eficácia desse tratamento em diferentes modelos de EAE geralmente será um dos testes da relevância do candidato a um real medicamento para a EM.

De fato, muitas terapias testadas em pacientes com EM são baseadas em conceitos derivados dos dados de EAE. No caso da EM, lidamos com um estado patológico dependente



do tráfego de células do sistema imune e da produção de citocinas, o que significa que há numerosos alvos em potencial para o tratamento durante o desenvolvimento da doença. Contudo, a seguinte lógica deve ser levada em consideração: primeiro, há que ser feito um esforço para inibir o desenvolvimento inicial da população patogênica; segundo, reduzir o fluxo de migração de células para o local da inflamação e finalmente, neutralizar as moléculas efetoras produzidas por essa população (Miller e Karpus, 2007). Com o intuito de identificar o alvo terapêutico que tenha um papel nas fases citadas acima, ou de minimizar os efeitos colaterais dos medicamentos já existentes ou ainda em fases de teste, é importante compreender os mecanismos da patogenicidade.

### 2.3.1 Laquinimode

O laquinimode (Nerventra ou ABR-215062) é um composto administrado de forma oral que esta na fase III de teste para o tratamento da EM primária progressiva e também para a doença de Huntington (Thöne e Linker, 2016). Os efeitos observados nos testes com laquinimode são parecidos com os efeitos do fingolimode, composto que já é usado em tratamentos de pacientes com EM (Pubchem, 2018). Estudos *in vitro* e *in vivo* já demonstraram efeitos benéficos do laquinimode nos modelos de EM (Brück e Wegner, 2011). Dados obtidos em ratos evidenciaram redução da produção de citocinas próinflamatórias (TNF e IL-12) e aumento de citocinas anti-inflamatórias (TGF- $\alpha$  e IL-4) quando tratados com laquinimode (Brück e Wegner, 2011).

Outro importante resultado, que tem relação com um dos maiores problemas da patogenicidade da EM, foi a observação do bloqueio da entrada de células T inflamatórias no SNC. Além disso, o tratamento com laquinimode também retardou o quadro clínico da EAE de maneira dose dependente (Yang *et al.*, 2004). Outra citocina que tem relevante efeito na EM e nos modelos dessa doença, e que teve redução da produção em animais tratados com laquinimode, foi a IL-17. Tal efeito foi maior quanto maior a dose administrada (Wegner *et al.*, 2010; Brück e Wegner, 2011; Kaye *et al.*, 2016). Como citado anteriormente, outro ponto chave para a proteção da patogênese inflamatória da doença é o controle do dano no SNC. Laquinimode demonstrou ter efeito neuroprotetivo devido à proteção axonal e inibição da ativação da micróglia (Brück e Wegner, 2011; Mishra *et al.*, 2014; Lühder *et al.*, 2017). Desse modo, os estudos demonstram que laquinimode age principalmente via redução do infiltrado de células T CD4<sup>+</sup> para o SNC e dessa forma leva a neuroproteção.

A capacidade de laquinimode de prevenir os surtos de remissão, e diminuir significativamente a proliferação tanto de células T CD4<sup>+</sup> quanto T CD8<sup>+</sup> no SNC no modelo de EAE, foi associada com redução da capacidade das células dendríticas de ativar as células T em questão (Jolivel *et al.*, 2013). Joviel e colaboradores também observaram que DCs maduras, de camundongos e de humanos, tratadas com laquinimode tiveram baixos níveis de produção de quimiocinas levando a uma diminuição da quimioatração de monócitos. Em pacientes com EM tratados com laquinimode também observaram um controle negativo na produção de quimiocinas por DCs convencionais (cDCs) (Jolivel *et al.*, 2013).

### 3- O RECEPTOR ARIL HIDROCARBONETO

#### 3.1- Funções fisiológicas

Uma pesquisa recente na base de dados PubMed utilizando o termo *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) resultou em mais de 8000 trabalhos, e a busca por AhR e *ligands* resultou em mais de 1220 trabalhos que descrevem diversos ligantes para esse receptor, e as diversas possibilidades de respostas fisiológicas que resultam da interação entre eles. Por isso, se pudéssemos personificar o AhR diríamos que ele é “extremamente social”. Entretanto, na década de setenta, o que hoje é conhecido como AhR, foi inicialmente associado apenas como um possível receptor para o 2,3,7,8-Tetraclorodibenzop-dioxina (TCDD) que é um poluente altamente tóxico (Poland *et al.*, 1974). Dois anos depois o mesmo autor demonstrou em células hepáticas que TCDD se ligava ao ainda desconhecido receptor. Poland e colaboradores descreveram que tal ligação resultava na indução da atividade da enzima aril hidrocarboneto hidroxilase (AHH), que é codificada por genes da família do *cyp1* do citocromo P450, e que esta enzima provavelmente não era o único produto induzido por meio da interação do possível novo receptor com TCDD (Poland *et al.*, 1976). Os estudos de Poland foram de extrema importância, pois partiu deles e dos estudos de Nebert as primeiras ideias sobre a existência do AhR que veio a ser descrito como tal em 1980 por Okey e colaboradores (Nebert 1980, Okey, Bondy et al. 1980, Nebert, Jensen et al. 1982)

Hoje sabemos que AhR é uma proteína composta por 805 aminoácidos em camundongos e 848 em humanos, pesa cerca de 100 kilodaltons (kDa) e atua como fator de transcrição geralmente dependente de ligante. Análises filogenéticas demonstraram que AhR é uma proteína altamente conservada. Na escala evolutiva ela está presente em todos os

grupos viventes, dos vertebrados em diante, e há homologia em invertebrados. (Hahn *et al.*, 1997). AhR localiza-se no citoplasma e após ser ativada pelo ligante é translocada para o núcleo. É expressa em células que se espalham por todo o corpo, principalmente em barreiras de entrada de patógenos e poluentes, tais como pele, pulmão e intestino. No intestino, AhR é fundamental para a sobrevivência e para a função das células linfoides inatas (ILC) do tipo 3 positivas para o *retinoic-acidreceptor-related orphan receptorgamma t* (ROR $\gamma$ t) (Qiu *et al.*, 2013; Artis e Spits, 2015). As ILCs são essenciais para a composição da imunidade da mucosa e secretam a IL-22, que é importante para manter a imunidade e a integridade da mucosa (Qiu *et al.*, 2012). Sendo assim, AhR tem um papel protetivo pois é ele que, em conjunto com ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, orquestra a imunidade inata nesse órgão (Qiu *et al.*, 2012). Devido a ampla localização/distribuição, o receptor tem a capacidade de auxiliar na identificação e sinalização, para o sistema imune (principalmente na resposta inata), da presença de fatores nocivos ao organismo, atuando, dessa forma, como um sensor ambiental e possível alvo terapêutico (Quintana, 2013b).

Grande parte do que foi descrito até o momento sobre esse receptor, foi elucidado com a indução de AhR por poluentes e ligantes exógenos como: hidrocarbonos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilas policloradas (PCBs) e hidrocarbonos aromáticos halogenados (HAH). Muitos outros compostos químicos têm relação com AhR, mas a maioria deles, se comparados ao TCDD, atuam fracamente como indutores. Isso se deve ao fato de que, geralmente, os compostos halogenados são os que possuem maior afinidade pelo AhR (Stejskalova *et al.*, 2011). Além dos ligantes exógenos, sabe-se que AhR é suscetível à indução por vários compostos endógenos ou ainda pode ser induzido até mesmo na ausência de ligantes (Denison *et al.*, 2011; Quintana e Sherr, 2013; Lee *et al.*, 2017; Gutiérrez-Vázquez e Quintana, 2018). Três fatores dificultam a identificação de ligantes endógenos desse receptor: 1) o local e a concentração do suposto composto, pois as quantidades necessárias para ativar o receptor podem ser pequenas e, além disso, a atuação pode ser muito pontual; 2) a comprovação da ativação do receptor é feita, principalmente, pela quantificação de CYP1A1. Entretanto, como nem todos os ligantes levam a produção de altos níveis de CYP1A1, podem haver casos em que a quantidade dessa proteína não possa ser mensurada, mesmo havendo a indução da expressão dela; 3) o ligante pode ser um composto instável, o que também dificulta a identificação.

Mesmo com essas limitações, vários ligantes já foram identificados: curcumina; carotenoides e flavanóides (quercetina); índigo e idirubina (metabólitos do triptofano);

6formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) (um fotoproduto da degradação do triptofano quando exposto a radiação U.V.); bilirubina e biliverdina; prostaglandinas; lipoxina (LXA) A<sub>4</sub>, 2(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester (ITE) e outros compostos (Schaldach *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2002; Quintana, 2013b). Por fim, na indução que ocorre na ausência de ligante, a ativação de AhR pode se dar de maneira pós traducional ou pelo aumento das concentrações de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) que levam a translocação nuclear (Elizondo *et al.*, 2011) e indução de genes alvos em células Hepa1c1c7 (Oesch-Bartlomowicz *et al.*, 2005).

AhR encontra-se no citosol de diversas células como um complexo formado por proteínas de choque térmico (HSP) 90, *hepatitis B vírus X-associated protein 2* (XAP2 ou ARA9 ou AIP) e a proteína quinase c-SRC. Quando o ligante entra em contato com o receptor esse complexo é translocado para o núcleo, local onde ocorre a heterodimerização do AhR com o translocador nuclear (ARNT). O complexo heterodimérico reconhece elementos responsivos à dioxina (DRE), que são sequências nos promotores capazes de recrutar co-ativadores e induzir a transcrição de genes alvo (Denison *et al.*, 1988b; a; Petrusis *et al.*, 2003; Schulte *et al.*, 2017). Alguns dos genes descritos como regulados por AhR são a cicloxigenase-2 (catalisa a conversão de ácido araquidônico a prostaglandinas) (Martey *et al.*, 2005); a quimiocina CCL1 (quimiotaxia de monócitos) (N'diaye *et al.*, 2006); a proteína supressora de sinalização de citocinas (SOCS) 2 (Boverhof *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2006); a distrofina Dp71 (distrofia muscular Duchenne) (Bermúdez De León *et al.*, 2006); MHC Q1<sup>b</sup> (Dong *et al.*, 1997) e o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) (antioxidante em locais com estresse oxidativo) (Marchand *et al.*, 2004).

O fenótipo observado em camundongos AhR *knockout* (KO) e a indução de AhR por TCDD permitiram elucidar varias funções fisiológicas de AhR como: deficiência reprodutiva (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995); desenvolvimento vascular (Lahvis *et al.*, 2000) e homeostase do sistema endócrino (Nishimura *et al.*, 2005). Há também, associação da exposição de dioxinas com mudança no número e função de linfócitos (Neubert *et al.*, 1993; Tonn *et al.*, 1996). Já foi descrito que em modelos murinos o TCCD tem capacidade de alterar a resposta humoral dependente de células T, e dessa forma, suprimir a produção de anticorpos (Vecchi *et al.*, 1980) o que conseqüentemente leva a redução de células T de memória (Dooley e Holsapple, 1988). A ativação de AhR pode inibir diretamente a ativação de células T e a sua subsequente diferenciação, o que resulta na supressão da proliferação de células T auxiliares e células B (Nohara *et al.*, 2005).

Quando ativado por TCDD, AhR pode induzir uma supressão potente da resposta imune adaptativa (Funatake *et al.*, 2004) interferindo na expressão de MHC-II em algumas APCs (Shepherd *et al.*, 2001) e até mesmo inibindo a atividade de neutrófilos (Ackermann *et al.*, 1989). Foi sugerido também que a ativação de AhR por TCDD pode resultar na imunossupressão em camundongos pela indução de células Treg (Funatake *et al.*, 2005). Entretanto, muitos autores têm sugerido que o efeito supressor de AhR não esteja relacionado com a geração de células supressoras, mas que o receptor esteja ativando células T efetoras de tal forma a chegar a induzir a apoptose delas, e principalmente, que o TCDD, e não outras dioxinas, tem um mecanismo de ação que é independente de AhR (Camacho *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2008; Funatake *et al.*, 2009). Outros estudos reforçaram essa ideia quando demonstraram a importância de AhR no desenvolvimento das células Th17. A diferenciação *in vitro* de Th17 dependente de AhR foi demonstrada por (Veldhoen *et al.*, 2008), quando com o uso de um antagonista houve a diminuição da quantidade de células Th17 diferenciadas. Quando em contato com o agonista FICZ, a ativação de AhR aumentou o número de células Th17 e a produção de IL-17 de forma dosedependente (Kimura *et al.*, 2008).

Outra via de atuação de AhR é sobre a enzima *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO). Essa proteína catalisa a clivagem oxidativa do anel indol de moléculas regulatórias importantes como serotonina, melatonina e o triptofano. Essa enzima possui um sitio de ligação para o ânion superóxido ( $O_2^*$ ), que atua como um doador de oxigênio (Kobayashi *et al.*, 1989). IDO pode ser induzido em condições inflamatórias, e o IFN- $\gamma$  é um dos principais ativadores dessa enzima. A degradação e a depleção do triptofano pela IDO podem levar a quase completa inibição do crescimento de patógenos dependentes desse aminoácido, pois o triptofano é o aminoácido menos disponível, é indispensável para a composição de várias proteínas e dessa forma é fundamental para o crescimento desses patógenos (Pfefferkorn, 1984; Däubener *et al.*, 1993; Mackenzie *et al.*, 1998; Mackenzie *et al.*, 1999; Knubel *et al.*, 2010). Tem sido descrito que o NO pode levar a degradação da IDO, portanto NO teria um efeito de controlar a estabilidade e atividade da IDO (Hucke *et al.*, 2004). Em fagócitos mononucleares também foi observada a inibição da IDO pelo NO e pela iNOS (Thomas *et al.*, 1994; Alberati-Giani *et al.*, 1997). Ao contrário do papel do NO como inibidor da IDO, AhR pode atuar como um indutor dessa enzima. Essa via, AhR/IDO, ainda pode ser positivamente regulada por alguns metabólitos da degradação do triptofano, como por exemplo a quinurenina, que pode ativar AhR (Jaronen e Quintana, 2014; Gutiérrez-Vázquez

e Quintana, 2018). Em DCs derivadas da medula óssea, a ativação de AhR por lipopolissacarídeo (LPS) e CpG regulou a expressão daIDO e a função das DCs que levaram a diferenciação de células T em células Treg e Th17 (Nguyen *et al.*, 2010). Torna-se claro que a atividade da IDO pode afetar significativamente vários processos fisiopatológicos, sendo considerada uma defesa inata do hospedeiro contra infecções, incluindo a infecção por *T. cruzi* (Knubel *et al.*, 2010). No entanto, a compreensão da relevância de AhR na interação desses diversos fatores que influenciam a atividade da IDO ainda demanda estudo.

### 3.2- Papel do AhR nas doenças infecciosas

Em conjunto, o vasto número de ligantes descritos acima, os genes induzidos e as funções fisiológicas, demonstram que AhR exerce diversas funções importantes tanto na fisiologia normal quanto na doença. Como o AhR possui características de sensor ambiental, ele torna-se uma molécula relevante para o contexto de resposta imune efetora realizada por APCs. A combinação dos níveis de citocinas, do tipo de tecido e do ligante envolvido, determina se a ativação de AhR resultará no estímulo ou na supressão de uma resposta imune específica e por isso seu papel vem sendo estudado ao longo de algumas infecções (Esser e Rannug, 2015). Durante a infecção experimental por *Listeria monocytogenes* os camundongos AhR KO são mais susceptíveis a infecção do que os heterozigotos frente a uma primeira infecção. Entretanto, os animais KO não demonstraram diferença na resistência adquirida a infecção e nem na produção de citocinas por células T. (Shi *et al.*, 2007). Frente a infecção experimental por *Leishmania major* os camundongos deficientes de AhR tiveram menor número de parasitas nas feridas da pata quando comparados com os WT. Essa diferença pode estar associada com um aumento, no início da infecção, da citocina pro-inflamatória TNF e com a redução de células Treg nos camundongos AhR KO. (Elizondo *et al.*, 2011). Na infecção experimental por *Plasmodium berguei* ANKA os camundongos deficientes de AhR tiveram aumento na parasitemia, mortalidade anterior a dos WT, aumento de IL-17 e IL-6 no cérebro, aumento de IFN- $\gamma$  e TNF no baço. Além disso, AhR também foi descrito com capacidade de controlar a expressão de SOCS3 no cérebro (Brant *et al.*, 2014). Durante a infecção por *T. gondii* foi demonstrado que AhR é capaz de induzir SOCS2, que atua como um importante mediador intracelular das ações anti-inflamatórias da LXA<sub>4</sub> (Machado *et al.*, 2006; Mcberry *et al.*, 2012).

As proteínas da família SOCS medeiam as ações delas ligando-se aos domínios intracelulares dos receptores de citocinas ou hormônios, prevenindo a ligação e ativação de

elementos *downstream* à sinalização (Alexander e Hilton, 2004). Algumas proteínas SOCS também facilitam a degradação dependente de proteossoma de fatores de transcrição através da indução de ubiquitinação (Kile *et al.*, 2002; Alexander e Hilton, 2004), via poliubiquitinação catalisada pelo complexo ElonginasBC/Culin-2 ligados ao domínio SOCS-box no carboxi-terminal das proteínas SOCS. A família de proteínas SOCS compreende oito elementos denominados CIS e SOCS1 até SOCS7. SOCS1, SOCS2 e SOCS3 têm sido os membros mais estudados e são associados com a supressão de transdução da sinalização de citocinas pela inibição da atividade da proteína *Janus kinase* (JAK). SOCS1 desempenha um papel importante como um regulador negativo da sinalização de IFN- $\gamma$ , enquanto SOCS3 tem uma função dual, uma vez que é capaz de inibir simultaneamente a cascata de sinalização desencadeada por citocinas pro inflamatórias e anti-inflamatórias tais como IL-6 e IL-10, respectivamente (Delgado-Ortega *et al.*, 2013). Já foi bem descrito que a família SOCS tem regulação cruzada e que SOCS2 pode influenciar a atividade de outros membros da família, como por exemplo SOCS1 e SOCS3 (Delgado-Ortega *et al.*, 2013). SOCS2 é induzido por LXA<sub>4</sub> e análogos estáveis de lipoxina (ATLs) e associa-se com TRAF2 e TRAF6, moléculas adaptadoras essenciais para o desenvolvimento das respostas imune inata e adaptativa (Choi, 2005; Machado *et al.*, 2006). Dados do nosso grupo demonstraram que SOCS2 atenua os danos fisiológicos causados no coração durante a infecção experimental por *T. cruzi* (Esper *et al.*, 2012), mas a importância de AhR, neste modelo, ainda é desconhecida.

Com toda essa diversidade de atuação, podemos concluir que a indução de AhR pode gerar diferentes respostas inflamatórias, de forma célula e contexto específico, e o entendimento da sua atuação em outras vias demonstra-se importante. Como citado anteriormente, durante a infecção por *T. gondii* foi observado, em DCs, o envolvimento de AhR nessa infecção (Machado *et al.*, 2006; Mcberry *et al.*, 2012). No entanto, o papel de AhR na indução/modulação de SOCS2, quando ativado por LXA<sub>4</sub> e outros ligantes, durante a infecção por *T. cruzi* ainda é desconhecido. O único estudo que envolve AhR e a infecção por *T. cruzi* demonstrou que, tanto células B primárias humanas quanto de camundongos produzem IL-17 por meio de um programa transcricional independente dos fatores de transcrição AhR e ROR $\gamma$ t (Bermejo *et al.*, 2013).

Outro fator que faz com que AhR tenha um papel relevante nas doenças infecciosas é a relação com as ROS. Estudos tem demonstrado que a ativação de AhR resulta em estresse oxidativo, e que provavelmente é induzido pelo metabolismo de alguns ligantes de AhR pelas CYPs (Denison *et al.*, 2011). Ao contrario, outros estudos têm mostrado que AhR pode atuar

como um agente protetor contra o estresse oxidativo por meio da indução da expressão de genes que estão envolvidos com respostas antioxidantes. Alguns desses genes são os que codificam as enzimas glutathione S-transferase (GST) e NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), que são bem conhecidas para o controle da defesa contra as ROS. Além disso, o Nrf2 que regula a expressão de proteínas antioxidantes, também é regulado por AhR (Dietrich, 2016).

Sendo assim, como AhR está envolvido com uma resposta imune diversa e o seu papel durante a infecção por *T. cruzi* ainda não foi completamente elucidado, é de extrema importância tentarmos entender qual é essa relação, para que futuramente AhR seja um possível e potencial alvo de intervenções terapêuticas durante a doença de Chagas.

### **3.3- Papel do AhR na autoimunidade**

Durante a EAE AhR é capaz de regular a diferenciação de Treg e Th17. Quando o receptor é ativado por TCDD há indução de células Treg que resultam na supressão da EAE. Entretanto, quando o receptor é ativado por FICZ há interferência no desenvolvimento das células Treg e aumento na diferenciação das células Th17 e, dessa forma, aumenta a severidade da doença nos camundongos (Quintana *et al.*, 2008; Veldhoen *et al.*, 2008). Como o balanço entre as células Treg e Th17 tem sido considerado até mesmo mais importante que o balanço Th1/Th2 no que diz respeito ao desenvolvimento da autoimunidade, o foco dos estudos nesse contexto é principalmente o papel de AhR no sistema imune adaptativo (Quintana e Sherr, 2013). No entanto, respostas imunes adaptativas são moldadas e direcionadas pelo contexto de citocinas e sinais coestimuladores, que são fornecidos principalmente pelo sistema imune inato (Qiu *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2013). Além disso, as células do sistema imune inato são as primeiras a entrarem em contato com poluentes ambientais e são potencialmente influenciáveis pelas condições dos arredores. Entretanto, o papel de AhR na imunidade inata durante doenças autoimunes do SNC não é completamente conhecido.

Na EM e na EAE a micróglia e monócitos inflamatórios, membros importantes da imunidade inata, foram encontrados em lesões na substância branca e cinzenta do SNC, sendo que são os últimos a serem pensados como determinantes essenciais de gravidade e progressão da EM (Trebst *et al.*, 2001; Kutzelnigg *et al.*, 2005; Weiner, 2008; Mayo *et al.*, 2012). Além disso, vários efeitos na acumulação de monócitos no cérebro têm sido



descobertos na EAE e na EM. Monócitos inflamatórios parecem estar envolvidos na desmielinização, fagocitose, neurodegeneração (Bauer *et al.*, 1994; Basso *et al.*, 2008), apresentação de antígenos para as células T, promover a disseminação do epitopo (KatzLevy *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2001; McMahon *et al.*, 2005), e por fim estão associados com a progressão da EAE (Fife *et al.*, 2000; Ajami *et al.*, 2011). Por outro lado a micróglia e os monócitos também podem favorecer a mielinização, levar a sobrevivência neuronal e reduzir as respostas inflamatórias mediadas por células T (Stadelmann *et al.*, 2002; Kotter *et al.*, 2005; Doring e Yong, 2011). Tem sido demonstrado que AhR é expresso em neutrófilos, macrófagos e DCs (Frericks *et al.*, 2007; Kerkvliet, 2009) e que o *knock-down* genético deste receptor em DCs causa deficiência na produção da IL-10 em resposta ao estímulo dos receptores do tipo toll (TLR) (Masuda *et al.*, 2011). Entretanto, os mecanismos moleculares que são a base desse processo, e que determinam um resultado prejudicial ou favorável, ainda estão, em grande parte, desconhecidos para a EM e para a EAE.

Sabemos que as DCs controlam as células T, e apesar de alguns estudos sugerirem fortemente um papel de AhR no controle das DCs (Bankoti *et al.*, 2010; Mezrich *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2010; Benson e Shepherd, 2011; Aguilera-Montilla *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2014), ainda se faz necessário buscar um entendimento melhor da função da expressão de AhR nessas células no contexto da autoimunidade. Como descrito anteriormente um dos compostos em fase de teste para o tratamento da EM é o laquinimode. Já foi descrito que esse composto é capaz de ativar AhR e que esse receptor é essencial para a eficácia da droga, contudo ainda não sabemos se em DCs esse efeito também é dependente de AhR. Na metabolização do laquinimode há formação de pelo menos 6 compostos (M1-M6). A desmetilação da quinolina do ABR-215062 gera um composto M5 que nesse trabalho será denominado como delaquinimode (delaq). Dados do grupo demonstraram que o delaq ativa AhR de forma mais intensa que o laquinimode e por isso visamos compreender melhor os mecanismos de ação do fármaco para possivelmente aumentar a eficácia do tratamento.

## **JUSTIFICATIVA**

Mesmo após mais de 100 anos de estudos sobre essa doença de Chagas cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas, os custos para tratamento dos doentes são altos, os tratamentos existentes ainda não são satisfatórios, a doença ainda é negligenciada e várias questões permanecem obscuras (Chagas, 1909; Who, 2014). O AhR já foi descrito como um

dos receptores de LXA<sub>4</sub>, sua ativação resulta na indução de SOCS2 em DCs além de levar a produção de citocinas anti-inflamatórias durante a infecção por *T. gondii* (Machado *et al.*, 2006; Mcberry *et al.*, 2012), e SOCS2 é importante para a função cardíaca durante a infecção por *T. cruzi* (Esper *et al.*, 2012). Além da LXA vários outros compostos endógenos e exógenos, têm sido descritos como ativadores de AhR, o que inclui pigmentos bacterianos que podem atuar como padrões moleculares associados a patógenos, e isso faz com que esse receptor tenha um papel de receptor intracelular de reconhecimento de padrões e sensor ambiental (Moura-Alves *et al.*, 2014; Rothhammer *et al.*, 2016). Na infecção experimental por *Plasmodium berguei* ANKA AhR esta relacionado com a redução da produção de IL-17, IL-6 e SOCS3 no cérebro dos camundongos deficientes de AhR (Brant *et al.*, 2014).

AhR tem sido descrito como uma proteína fundamental para a eficácia do laquinimode, composto já em fase III de testes para o tratamento de doenças autoimunes. Uma das vias de atuação do laquinimode é o controle de IL-17, citocina que é mediadora central do processo inflamatório da EAE (Kaye *et al.*, 2016; Baecher-Allan *et al.*, 2018). Os efeitos do laquinimode são dependentes das DCs e da sinalização via AhR. Entretanto, ainda não se sabe se AhR também é necessário para os efeitos do delaq, e se seriam dependentes de AhR em DCs.

Assim, acreditamos que a compreensão da função de AhR na modulação do sistema imune inato e adaptativo durante a infecção experimental por *T. cruzi* e o entendimento da participação desse receptor na eficácia de fármacos já existentes, e em fase de teste para o tratamento de doenças autoimunes, é essencial para ajudar na elaboração de compostos para a melhora dos danos e sintomas causados pela doença ou até de medidas preventivas mais eficientes.

# OBJETIVOS

## 1.1- Objetivos gerais

Elucidar a influência do receptor AhR na resposta imunológica inata e a conexão com a resposta adaptativa, tanto na infecção por *Trypanosoma cruzi* quanto na eficácia de potenciais fármacos para o tratamento da EM.

## 1.2- Objetivos específicos

- Analisar se AhR é induzido *in vivo* ao longo da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* nos principais locais acometidos pela doença (coração e baço).

- Definir se AhR exerce alguma função na modulação da resposta imune durante infecção por *T. cruzi*.
- Elucidar *in vivo* e *in vitro* o papel de AhR na indução da produção das ROS e esclarecer o envolvimento desses compostos com o controle da replicação do parasita.
- Analisar *in vitro* se AhR é modulado em macrófagos e DCs e avaliar o papel desse receptor na indução da resposta imune em células tratadas, ou não, com antagonistas de AhR durante a infecção por *T. cruzi*.
- Investigar a participação de AhR na via IFN- $\gamma$  / IDO / quinunerina / AhR durante a infecção por *T. cruzi*.
- Avaliar se AhR é ativado em DCs tratadas com laquinimode ou delaquinimode
- Avaliar o perfil de ativação das DCs tratadas com laquinimode ou delaquinimode na presença ou ausência de AhR
- Avaliar a capacidade das DCs tratadas com laquinimode ou delaquinimode de polarizar células T, e qual população é induzida, na presença de MOG<sub>35-55</sub>.

## MATERIAL E MÉTODOS

## 1- Animais

Foram utilizados camundongos das linhagens C57BL/6 (tipo selvagem - WT), SWR/J (Swiss) e AhR KO em que o gene de interesse foi deletado. Os animais C57BL/6 foram obtidos no Biotério Central, os Swiss do Centro de Bioterismo (CEBIO) e os camundongos AhR KO foram obtidos junto a colônia de criação no biotério de criação do grupo de Imunofarmacologia do ICB e mantidas em micro isoladores com filtro e ventilação. Os animais de experimentação foram acondicionados com barreiras ambientais, sob condições de temperatura e foto período controladas e receberam ração (Labina, Paulinea, SP, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. Camundongos fêmeas ou machos com idade entre oito e dez semanas foram utilizados nos experimentos. Todos os experimentos realizados com os animais em questão estão de acordo com os protocolos éticos. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/Comissão de Ética no Uso de Animais (CETEA/CEUA) da UFMG, sob os números de protocolo 089/10 e 305/2016

Para os experimentos realizados na *Harvard Medical School* (HMS) os camundongos C57BL/6, 2D2 TCR (Bettelli *et al.*, 2003) e Itgax-Cre foram comprados na *Jackson Laboratory*. Para a deleção específica de AhR em DCs (Itgax<sup>cre</sup>AhR<sup>fl/fl</sup>) cruzamos os camundongos Itgax-Cre com os AhR<sup>fl/fl</sup>, que possuem o fundo B6. A deleção de AhR foi verificada por PCR e *western blot*. Os camundongos usados tinham idade entre oito e 12 semanas e foram mantidos nas instalações da HMS. Todos os experimentos foram feitos na HMS de acordo com as regras do *Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)*.

## 2- Infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*

Parasitas da cepa Y de *T. cruzi* foram mantidos em camundongos Swiss e utilizados para infecção *in vivo*. Os animais foram inoculados intraperitonealmente com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas sanguíneas em uma solução final de 200  $\mu$ L de sangue e tampão fosfatosalino (PBS). A parasitemia foi quantificada no pico da liberação de parasitas aos 9 dias após infecção (dpi), ou diariamente do terceiro ao décimo quinto dpi. Para essa análise coletamos 5  $\mu$ L de sangue da veia caudal dos animais e em uma lâmina exposta ao aumento de 40X no microscópio óptico, contamos as formas tripomastigotas em 100 campos.

Em experimentos realizados *in vitro*, com a cepa Y, foram utilizadas formas tripomastigotas cultivadas e isoladas de células epiteliais de rim de macaco Rhesus

(LLCMK2). Essas células foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>3</sup> em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e suplementado com 5% de soro bovino fetal inativado (SBF) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 2 mM de Lglutamina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, BLR Life Technologies). As culturas foram mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após infecção, replicação e liberação do parasita nestas células foi feita a coleta do sobrenadante seguida de centrifugação a 500 x g por 10 minutos para sedimentação das células. Posteriormente o sobrenadante desta centrifugação foi novamente centrifugado a 1000 x g por 10 minutos com desaceleração lenta. O número de parasitas foi contado na câmara de Neubauer e a quantidade foi ajustada em uma proporção 5:1 (parasitas/célula).

### **3- Cultura de células do baço**

Suspensões celulares de animais WT e AhR KO controles, e infectadas com *T. cruzi* por 10 dias, foram lavadas em solução salina balanceada de Hank's (HBSS) e tratadas com tampão de lise (9 partes de 0.16 mM de cloreto de amônio e 1 parte de 0.17mM de TrisHCl, pH 7.5) por 4 minutos. As células foram então lavadas três vezes em HBSS, centrifugadas 500 x g e ajustadas para uma quantidade de 1x10<sup>6</sup> células por poço em meio RPMI-1640 suplementado como descrito anteriormente. As suspensões celulares foram adicionadas em placas de cultura (Nunc) de 96 poços para detecção de citocinas por ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA), marcação com sondas para quantificação de compostos citotóxicos ou preparadas para citometria de fluxo.

### **4- Quantificação de peroxinitrito em células do baço tratadas com FeTPPs**

Células do baço de camundongos WT e AhR KO foram isolados como descrito acima e tratados por 1 hora com 10 µM ou 50 µM de FeTPPs (CALBIOCHEM, San Diego, California, USA) um decompositor de ONOO<sup>-</sup> que o isomeriza em nitrato. Em seguida incubamos as células com 25 mM da sonda *Dihydrorhodamine 123* (DHR 123, Invitrogen) por 30 min a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> ao abrigo da luz como descrito por (Kooy *et al.*, 1994), com modificações, para quantificar indiretamente o ONOO<sup>-</sup>. A fluorescência foi medida em um fluorímetro (Synergy 2, BIOTEK, USA) em um comprimento de onda de excitação de 507 nm e emissão a 529 nm. Os dados foram representados como unidades arbitrárias da fluorescência emitida pela sonda.

## 5- Histologia e quantificação de fibrose cardíaca

Após a eutanásia os corações de cinco animais de cada grupo (WT e AhR KO controles ou infectados) foram removidos aos 10 e 15 dpi e cortados transversalmente. Cada coração foi lavado em PBS e fixado em 4% de tampão fosfato formaldeído. Após 24 horas de fixação, os tecidos foram embebidos em parafina, e três cortes semi-consecutivos (de 5  $\mu\text{m}$  de espessura) foram marcados por Tricômico de Gomori para avaliação da fibrose. Os cortes foram randomicamente escolhidos na objetiva de 40X. Imagens foram capturadas pelo aparelho (DEI-470; Optronics, Goleta, CA) conectado ao microscópio (IX70; Olympus, Center Valley, PA) e analisados em Image-Pro Express versão 4.0 (Media Cybernetics) e em software KS300 (Zeiss, Jena, Germany). A quantificação da fibrose foi feita “as cegas” em 10 seções que compreendiam as paredes livres dos ventrículos direito e esquerdo. A porcentagem da fibrose do miocárdio foi obtida de 25 *hits* em uma grátícula em uma magnitude final de 400X. A fibrose coincidente com cada *hit* foi contada em um total de 250 *hits* para cada coração de cada animal. Os valores foram expressos como a média da porcentagem de fibrose.

## 6- Cultura de macrófagos

Três dias após injeção de 2 mL de tioglicolato de sódio a 3% (*Becton, Dickinson and Company* – BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) na cavidade peritoneal dos camundongos, os macrófagos residentes e inflamatórios de animais C57BL/6 e AhR KO foram colhidos por lavagem da cavidade peritoneal com 7 mL de PBS. Após lavagem com RPMI-1640 suplementado foi feita a centrifugação do lavado a 500 x g por 10 minutos, ao final o sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em RPMI-1640 completo e então diluídas em azul de tripan a 0,4% (Sigma-Aldrich). Na câmara de Neubauer as células foram contadas pelo método de exclusão daquelas coradas em azul. Foram utilizadas  $2 \times 10^5$  células por poço em placas de 96 poços e  $2 \times 10^5$  ou  $1 \times 10^6$  células por poço em placas de 24 poços. Após um período de 3 horas de incubação, em placas de cultura a 37 °C em câmara úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, as células não aderentes foram removidas por lavagem. Em seguida foram mantidas nas mesmas condições de incubação citadas anteriormente.



## **7- Estimulação de macrófagos por antígenos de *T. cruzi* (AgTc)**

A estimulação *in vitro* de macrófagos de camundongos WT por AgTc foi feita com 10 µg/mL do lisado do parasito em contato com as células por 6, 12 e 24 horas. Os AgTc foram concentrados de acordo com o protocolo de (Laucella *et al.*, 2004). A quantificação de AhR no lisado de macrófagos de camundongos WT foi analisada por imunoblot.

## **8- Quantificação da expressão de AhR por Western Blot**

Proteínas totais dos baços e dos corações de camundongos WT e AhR KO, e dos macrófagos de camundongos WT foram extraídas por homogeneização dessas amostras em tampão de lise composto por: 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 0,5% de Nonidet P-40 e 2% do coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich). O homogenato foi sonificado por 1 minuto, incubado no gelo por 10 minutos e depois centrifugado a 16.000 x g, por 20 minutos a 4°C. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford e 30 ou 80 µg de proteínas foram separadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (10%). Em seguida, as proteínas foram transferidas do gel para membrana Immobilon-NC livre de triton (Merck) pelo sistema de transferência semi-seco ou molhado (BioRad). A membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em solução salina tamponada com Tris (1 M Tris e 3 M NaCl, pH 7,4 – TBS) com 0,5% Tween-20 (Sigma-Aldrich) (TBST) por 1 hora e depois incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo primário diluído em TBST com 0,5% de leite desnatado. Os anticorpos utilizados foram: AhR primário de camundongo (Abcam, Cambridge, Reino Unido). GAPDH primário de Coelho (Cell signaling, Danvers, Massachusetts, EUA) e β-actina primário de camundongo (Cell signaling). As bandas foram reveladas por reação de quimioluminescência com ECL Plus (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). As imagens foram analisadas quantitativamente pela intensidade das bandas com a utilização do software *Image J*. Os valores foram normalizados de acordo com os valores de GAPDH ou β-actina.

## **9- Atividade tripanocida em macrófagos**

Macrófagos de animais WT e AhR KO foram isolados, cultivados e infectados como descrito anteriormente. Após 24 horas de incubação as células foram infectadas e posteriormente estimuladas com 100ng/mL de IFN-γ ou tratadas com 10 µM ou 50 µM de

FeTPPS. Depois de 48 horas de infecção dos macrófagos ( $1 \times 10^6$  células/poço) a taxa de crescimento intracelular dos amastigotas foi avaliada após fixação e coloração das lamínulas com panótico rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). Para representação da quantificação de amastigotas foram contadas 300 células por lamínula (infectadas e não infectadas), e o número total de amastigotas nas células infectadas. Com contagem na câmara de Neubauer das formas tripomastigotas, no sobrenadante da cultura dos macrófagos infectados, a taxa de crescimento também foi avaliada diariamente do quarto ao oitavo dia após infecção.

## **10- Detecção de mRNA pela ação da transcriptase reversa e amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR)**

### **• Extração de RNA total**

O RNA total do baço e coração de camundongos WT, e de macrófagos de camundongos WT e AhR KO, ambos infectados ou não por *T. cruzi*, foram isolados. Para isso foi adicionado 500  $\mu$ L de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para cada 30 mg de tecido ou  $4 \times 10^6$  células. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Posteriormente, foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha) para cada 500  $\mu$ l de Trizol utilizado. As amostras foram homogeneizadas, incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugadas a 12.000 x g durante 15 minutos. Após a centrifugação, a mistura foi separada em uma fase inferior composta por fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase superior aquosa incolor. Como o RNA estava contido nessa fase superior ela foi coletada e transferida para um novo microtubo. Para a precipitação do RNA foram adicionados 500  $\mu$ L de isopropanol (Merck) para cada 500  $\mu$ L de Trizol utilizado, e a mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida o material foi centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos. O RNA precipitado foi lavado duas vezes com 1 ml de etanol (Merck) 75% em água tratada com dicarbonato de dietila (DEPC) (USB, Corp., Cleveland, OH, EUA) e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi deixado em repouso por 5 a 10 minutos para que o etanol evaporasse. O RNA precipitado foi diluído em 50  $\mu$ L (tecido) e 20  $\mu$ L (células) de água livre de RNase tratada com DEPC a 60°C e os tubos foram incubados a mesma temperatura por 30 minutos para completa diluição do precipitado, em seguida as amostras foram armazenadas a -70°C. A quantificação de RNA para padronização foi feita no espectrômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), nos

comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Foram consideradas apropriadas as amostras que apresentaram uma relação ácido nucléico/proteína (OD260/OD280) com valores entre 1,6 e 2,0.

#### • Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA extraído como indicado acima. Foi utilizado um volume final de reação de 25 µL contendo: 2µg de RNA, 250 nM de dNTPs (Promega, Corp., Madison, WI, EUA), 10 mM TRIS-HCl (pH 8,3) 15 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT (Gibco BRL, Life Technologies), RNAsin inibidor de RNase (Promega Corp.) e 0,75 pmoles de oligo (dT) 15 primer (Promega Corp.). A mistura foi colocada em um termociclador e incubada inicialmente por 5 minutos a 70°C e 5 minutos a 4°C. Após tal incubação, foi adicionado 50 U da enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega Corp.) a cada amostra e em seguida foram incubadas por 5 minutos a 23°C, 5 minutos a 4°C, 60 minutos a 37°C, 5 minutos a 90°C, e finalmente a 4°C. O cDNA, produto da reação, foi armazenado a -20°C até sua amplificação.

#### • Amplificação específica por PCR em tempo real

A amplificação da expressão de mRNA específica foi realizada através da PCR em tempo real com a utilização de iniciadores com sequências específicas para *T. cruzi* (**Quadro 1**). As reações foram realizadas sob um sistema de detecção de sequência ABI PRISM®7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com a utilização de 10% da reação de cDNA em um volume total de 10 µL da mistura de PCR. Todas as reações foram desenvolvidas em duplicatas com o uso de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante. O programa de PCR utilizado para amplificação de cDNA foi desenvolvido sob as seguintes condições: 2 minutos a 50°C, ativação da AmpliTaq a 95°C durante 10 minutos, desnaturação a 95°C por 15 segundos, em seguida a 60°C por 5 segundos. Finalmente, as amostras foram esfriadas por 1 minuto a 4°C. O gene de interesse foi normalizado em relação a expressão do gene constitutivo 18S (**Quadro 1**). A quantificação relativa do produto foi feita pelo método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . A quantificação absoluta foi feita de acordo com uma curva em que a quantidade de parasita era conhecida. A mudança na expressão foi representada como relativa aos animais não infectados.

### • Amplificação específica por PCR convencional

A amplificação da expressão de mRNA específica foi realizada por meio da PCR com a utilização de iniciadores com sequências específicas para IDO (**Quadro 1**). A reação foi realizada com a utilização da GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega) de acordo com as especificações do fabricante. O programa de PCR utilizado para amplificação de cDNA foi realizado sob as seguintes condições: 3 minutos a 94°C para desnaturação, em seguida realizamos o ciclo de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C, 1 minuto a 72°C por 34 vezes, ao final mais 2 minutos a 72°C e o resfriamento a 4°C.

### • Eletroforese em gel de agarose

Para o preparo do gel utilizamos a concentração de 1,5% de agarose em tampão tris/borato/EDTA (TBE) e após a solubilização da agarose foi adicionado GelRed (Uniscience, São Paulo, SP, Brasil). Um volume de 25 µL do padrão e de cada amostra foi aplicado nas canaletas do gel. Por uma hora e meia foram aplicados 80 volts com amperagem livre e para visualização das bandas e documentação da imagem utilizamos o aparelho ChemiDoc MP System (BioRad).

Iniciadores	Senso	Antisenso
18S	CTCAACACGGGAAACCTCA	CGTTCCACCAACTAAGAACG
IDO	AGGATCCTTGAAGACCACCA	CCAATAGAGAGACGAGGAAG

**Quadro1** – Sequência dos iniciadores utilizados para quantificação de RNA mensageiro

### • Experimentos realizados na *Harvard Medical School*

A extração de RNA foi feita por RNeasy columns (Qiagen, USA) e o cDNA foi preparado de acordo com as especificações do *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems, USA). Os cDNAs foram usados como molde para reação de qPCR com a utilização de sondas TaqMan (Applied Biosystems). *Ahr* Mm00478930\_m1, *cyp1a1* Mm00487218\_m1, *cyp1b1* Mm00487229\_m1, *gapdh* Mm99999915\_g1, *il-10* Mm00439614\_m1, *il-12* Mm00434169\_m1, *il-1b* Mm00434228\_m1, *il-23* Mm00518984\_m1, *il-27* Mm00461162\_m1, *il-6* Mm00446190\_m1, *socs1* Mm00782550\_s1, *socs2* Mm00850544\_g1, *socs3* Mm00545913\_s1 e *tnf* Mm00443258\_m1. As reações de qPCR foram feitas em ViiA™ 7

Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e as análises foram de acordo com o método de  $\Delta Ct$  e os resultados foram apresentados como  $2^{-\Delta Ct}$ .

### **11- Detecção de citocinas por ELISA**

Para dosagem das citocinas IL-12p40 e IFN- $\gamma$  (Kit para ELISA – R&D Systems) no sobrenadante de 48 horas de cultura de esplenócitos de camundongos WT e AhR KO infectados por *T. cruzi*, foi feita a centrifugação da placa a 300 x g por 5 minutos. Posteriormente 50  $\mu$ L do sobrenadante foram utilizados juntamente com os kits citados e de acordo com as especificações dos fabricantes. Os limites de detecção foram de 18,2 pg/mL para IL-12p40 e 11,2 pg/mL para IFN- $\gamma$ . Em ambos, os padrões possuíam uma concentração inicial de 2.000 pg/mL.

### **12- Viabilidade celular de macrófagos estimulados com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Macrófagos de camundongos WT foram obtidos como descrito anteriormente. Após serem cultivados de um dia para o outro foram tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldreich). Nas culturas estimuladas por 48 horas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as concentrações utilizadas foram de 300, 200, 100 e 50 mM. Para o ensaio de MTT, uma solução de 2 mg/mL de MTT foi preparada em RPMI-1640 suplementado como descrito anteriormente. 70  $\mu$ L de tal solução foram adicionadas a cada poço da placa de 96 poços e que continha  $2 \times 10^5$  células em cada. A placa foi incubada por 2 horas a 37 °C em câmara úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período de incubação o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan formados foram solubilizados em 300  $\mu$ L de dimetilsulfoxido (DMSO) por poço. Em nova placa 100  $\mu$ L de cada amostra foi transferido em duplicata e a viabilidade celular foi medida a 540 nM no espectrofotômetro. Os dados foram apresentados em porcentagem com relação as amostras não tratadas.

### **13- Isolamento de células da medula óssea e diferenciação em células dendríticas (BMDCs)**

Camundongos C57BL/6 fêmeas, com idade entre oito e 12 semanas, foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram as tíbias e fêmures coletados. Após a retirada do tecido muscular circundante, os ossos foram colocados em solução de etanol 70% por 5 minutos

para desinfecção e lavados com PBS. Em fluxo laminar as diáfises dos ossos recolhidos foram cortadas, os ossos foram colocados em micro tubos de centrifuga de 0,5 mL com um furo na base. Esses tubos foram inseridos em micro tubos de centrifuga de 1,5 mL e centrifugados por 2 minutos a 500 x g para remoção do conteúdo da medula. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de tampão de lise ACK (Lonza, USA), a reação foi parada com meio RPMI (Gibco, USA) completo e em seguida as células foram filtradas em separadores de nylon com malha de 70 µm (BD FALCON, USA) para remoção de detritos e desagregação celular. O material coletado foi centrifugado a 400 x g por 10 minutos a 4°C e o precipitado foi suspenso em 10 mL de RPMI 1640 completo. O número de células foi determinado pelo Cellometer (Nexcelom, USA).  $2 \times 10^6$  células foram adicionadas por cada placa de petri de 100 mm x 15 mm em 10 mL meio RPMI 1640 suplementado como descrito anteriormente e com 10% de soro fetal bovino (R10) contendo 20 ng/mL de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (Preprotech, USA) e cultivadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. No terceiro dia foram adicionados 10 mL de R10 com 20 ng/mL de GM-CSF, no sétimo dia foram retirados 10 mL de cada placa, esse volume foi centrifugado a 400 x g por 10 minutos e depois de suspensas em R10 com 20 ng/mL de GM-CSF as células foram replaqueadas. No décimo dia as células foram removidas com PBS gelado.

#### **14- Isolamento e purificação de DCs derivadas do baço**

Para o isolamento das DCs do baço reproduzimos o protocolo de (Tavernier *et al.*, 2015) com algumas modificações. Após a lise dos eritrócitos, o número de células foi quantificado pelo Cellometer e a purificação foi feita por CD11c *MicroBeads UltraPure* (Miltenil Biotech, USA). Em seguida, quantificamos novamente o número de células e um total de  $2 \times 10^5$  células foram plaqueadas por poço em placas de 96 poços, com fundo em U, em um volume total de 250 µL de R10. As culturas foram mantidas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **15- Estimulação das células dendríticas em cultura**

Para cinética de ativação as BMDCs foram ativadas com 1 µg/mL de LPS, 10µM de laquinimode e 10 nM de delaq por um período de 3, 6, 12 e 18 horas. Para inibição da via de sinalização de AhR as células foram tratadas previamente por 1 hora com 10 µg/mL do antagonista CH-223191.

## 16- Purificação de células T CD4+ *naive* por esferas magnéticas

Baços de camundongos da linhagem 2D2, que possuem TCR específico para MOG foram coletados, macerados e a depleção das hemácias foi feita com tampão hemolítico ACK. As células foram lavadas em PBS, contadas e ressuspensas em tampão de separação (tampão MACS). Realizamos a purificação das células T CD4+ *naives* pelo kit de esferas magnéticas CD4+CD62L+ (Miltenil Biotech) de acordo com as normas do fabricante.

## 17- Ensaio de diferenciação *in vitro* de células T CD4+ *naive* na presença de DCs

Culturas de DCs de animais WT e Itgax<sup>cre</sup>AhR<sup>flox</sup> foram tratadas com delaq por 1 hora em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e estimuladas com LPS por 6 horas nas mesmas condições de cultivo e nas 3 últimas horas foram estimuladas com MOG<sub>35-55</sub>. Ao final das 6 horas as DCs foram lavadas 2 vezes com PBS estéril e ressuspensas em meio R10. As células T *naive* CD4+CD62L+ esplênicas de animais WT foram purificadas como descrito acima, e co-cultivadas com as DCs em placas de 96 poços, na proporção de 1 DCs (1x10<sup>5</sup> cels/poço) para 4 células T *naive* (4x10<sup>5</sup> cels/poço) em 250µL de meio R10. Após 3 dias de cultura a produção das citocinas foi analisada por citometria de fluxo.

## 18- Citometria de fluxo

Baços de camundongos WT e AhR KO infectados foram coletados aos 10 dias após infecção (dpi) por *T. cruzi*. Os órgãos foram macerados com EDTA 0,5 M (pH 8) e meio RPMI-1640 completo contendo 5% de SFB e em seguida centrifugadas a 400 x g por 10 minutos a 4°C, as hemácias foram lisadas com solução de lise de eritrócito. Após centrifugação, nas mesmas condições citadas anteriormente, o precipitado foi diluído em meio RPMI-1640 com 5% de SFB. Para quantificação as células foram contadas na câmara de Neubauer com a utilização de azul de tripan para exclusão das células não viáveis. Após o ajuste da quantidade de células (1x10<sup>6</sup> por amostra) incubamos por 3 horas com 5 µL de Brefedin A (Sigma-Aldrich), um metabólito de fungos, para que seja interrompido o transporte de proteínas por meio do não funcionamento do aparato de Golgi. Esse tratamento foi feito nas amostras com marcações intracelulares. As combinações de marcações foram listadas no **Quadro 2**. Um total de 30 mil eventos (compensação) e 100 mil eventos (amostra) foram adquiridas com o uso do FACS-Canto (BD) e as análises foram feitas no programa FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

- Experimentos realizados na *Harvard Medical School*

Para verificação do perfil de citocinas produzidas pelas células T utilizamos o conjunto de anticorpos CD3 (BV650), CD4 (APC Cy7), IL-17 (PE), Foxp3 (FITC) e IL-10 (APC) (eBioscience e Biolegend, USA). Para fixação e permeabilização utilizamos o kit *Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set* (eBioscience) após 4 horas de estimulação por PMA, ionomicina e *Golgi Stop*. As células foram analisadas nos citômetros LSRII ou Fortessa (BD Biosciences).

Combinação	Marcação extracelular		Marcação intracelular	
	Proteína	Fluorocromo	Proteína	Fluorocromo
1	F4/80	APC-Cy7	IL-12p70	PE
	CD11b	PE-Cy5	iNOS	FITC
	CD11c	PE-Cy7		
	CD8	BD Horizon V450		
2	F4/80	APC-Cy7	ROS	H2DCFDA
	CD11b	PE-Cy5		
	CD3	PE-Cy7		
	CD4	BD Horizon V450		
3	CD8	PerCP	IFN- $\gamma$	FITC
	CD3	PE-Cy7	IL-17	PE
	CD4	BD Horizon V450	IL-10	APC
4	CD8	PerCP	Foxp3	PE
	CD3	APC-Cy7	IL-10	APC
	CD4	BD Horizon V450	Arginase	FITC
	CD25	PerCP		
5	F4/80	APC-Cy7	il-10	APC
	CD11b	Pacific Blue		

**Quadro 2** – Combinação de marcadores extracelulares e intracelulares para análises celulares por citometria de fluxo.

## 19- Microscopia confocal

Os macrófagos de camundongos WT foram obtidos como descrito anteriormente. Lamínulas foram tratadas com 1M de HCl de um dia para o outro. Após lavagem com álcool foram adicionadas em placas de 24 poços e foram acrescentadas  $5 \times 10^5$  células por poço. Após as células serem estimuladas ou infectadas com TcAg ou *T. cruzi*, de acordo com a descrição acima, elas foram fixadas com acetona gelada por 1 minuto e após 10 minutos de secagem foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para marcação as lamínulas foram descongeladas e após 30 minutos foram lavadas com 100  $\mu\text{L}$  de PBS-BSA 1% por lamínula por 10 minutos. O bloqueio foi feito com Fc Block - CD16/32 (BD Biosciences) diluído em PBS/BSA 1%



(1:100 – 50  $\mu$ L) por 30 minutos. Para realização da marcação intracelular as lamínulas foram lavadas com solução de permeabilização celular - *Perm 35 Wash* (BD Bioscience) (1:12 em PBS/BSA 1%) e incubadas por 30 minutos com o anticorpo primário de cabra de AhR (Santa Cruz) (1:100 – 50  $\mu$ L). Em seguida as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS/BSA 1% e incubadas com anticorpo secundário conjugado com fluorescência – Alexa Fluor 594 de macaco anti cabra diluídos em solução de permeabilização (1:100 - 50  $\mu$ L) também por 30 minutos. Antes da marcação com o fluoróforo lavamos 1 vez com PBS/BSA 1% e adicionamos F4/80 anti camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Caltag Laboratories, CA, EUA) (1:500 - 50  $\mu$ L) diluído em PBS/BSA 1% por 30 minutos. Por fim, adicionamos 1 mg/mL de DAPI (Invitrogen) seguido de 10 minutos de incubação e lavamos 3 vezes com PBS/BSA 1%. Antes da fixação da lamínula à lâmina com Fluormount (Sigma-Aldreich) um período de 10 minutos foi reservado para secagem das lâminas. A captura das imagens foi feita no microscópio confocal Nikon Eclipse Ti - C2 com os seguintes lasers (excitação a 405, 488 e 543 nm) e emissão com filtros *band-pass* de 450/50, 515/30 e 584/50 nm. As análises foram feitas no programa Volocity (PerkinElmer).

## **20- Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão para cada grupo. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 5.0. Os grupos em que as comparações foram feitas estão discriminados nas próprias figuras ou na descrição delas. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando após *t teste Student* ou *oneway ANOVA* seguido de Bonferroni pos teste, o valor de  $p < 0,05$ .



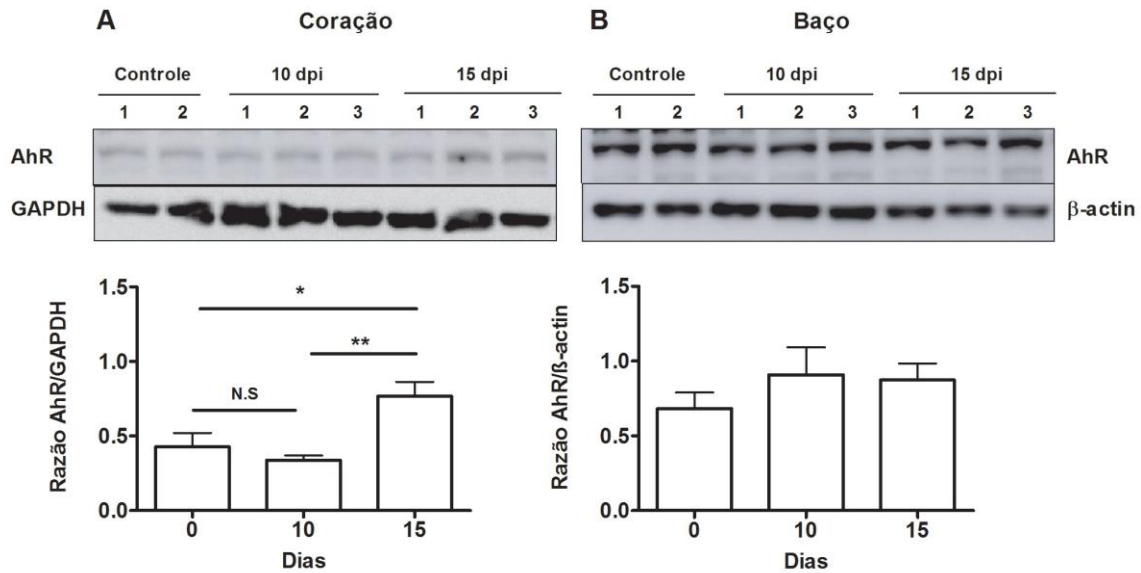
# RESULTADOS

*We cannot always do great things in life, but we can do small things with great love*

**Dan Millman**

## **1- AhR é regulado positivamente no coração de camundongos WT infectados por *T. cruzi*.**

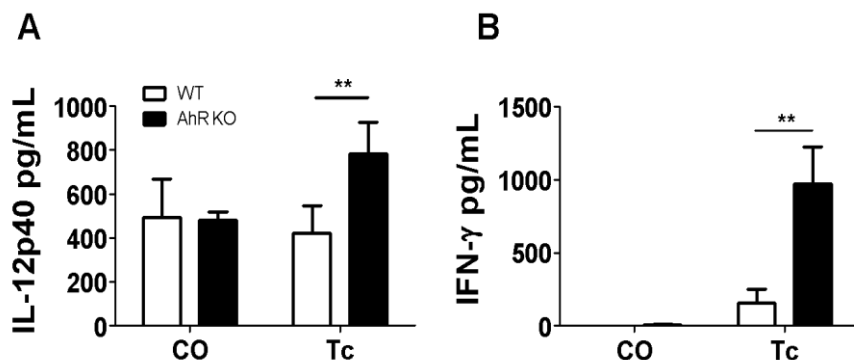
Para investigar o envolvimento de AhR durante a infecção por *T. cruzi*, nós analisamos o nível da expressão desse receptor por *western blot*. Os órgãos avaliados foram o coração e o baço de animais WT aos 10 e 15 (dpi). Nossos dados demonstraram que a infecção por *T. cruzi* induz a expressão de AhR no coração aos 15 dpi (**Figura 6A**). No baço, os níveis protéicos de AhR não apresentaram alteração após a infecção experimental por *T. cruzi* (**Figura 6B**). Esses dados indicam que AhR exerce alguma função ao longo da infecção por *T. cruzi* pois ao menos no órgão que é mais afetado pela doença, observamos um aumento da expressão proteica desse fator de transcrição (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016).



**Figura 6 – Indução da expressão de AhR *in vivo* durante infecção experimental por *T. cruzi*.** Camundongos WT foram infectados com  $1 \times 10^3$  tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Os corações (A) e os baços (B) foram retirados aos 10 e 15 dias após infecção (dpi). Os níveis da proteína AhR foram mensurados por *western blot*. Para análise, normalizamos os dados de acordo com a proteína constitutiva GAPDH para as amostras do coração e  $\beta$ -actina para as do baço. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes. \*\*  $P < 0.01$  \*  $P < 0,05$ .

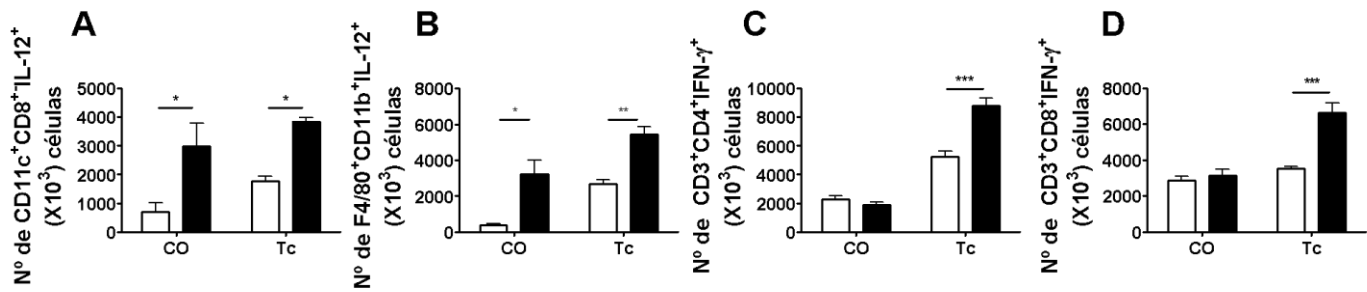
## 2- Papel de AhR na modulação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias no baço durante infecção por *T. cruzi*

Dados obtidos anteriormente demonstraram que AhR relaciona-se com maior susceptibilidade a doença de Chagas em modelo murinho uma vez que observamos redução da parasitemia em camundongos deficientes de AhR (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016). Para melhor compreensão do perfil imunológico avaliamos por ELISA e citometria de fluxo, a produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  no baço em diferentes populações celulares aos 10 dpi. Os resultados obtidos através do método de ELISA, demonstraram um aumento na liberação de IL-12 e IFN- $\gamma$  (**Figura 7A e B, respectivamente**) no sobrenadante da cultura de células do baço dos camundongos AhR KO infectados quando comparados aos WT (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016).



**Figura 7 – Os baços de animais AhR KO infectados por *T. cruzi* possuem resposta inflamatória intensa quando comparada a dos WT também infectados.** Os baços de animais WT e AhR KO infectados por *T. cruzi* foram processados aos 10 dias após infecção (dpi) e analisados por ELISA. Medidas da expressão de IL-12p40 (A) e IFN- $\gamma$  (B) foram feitas no sobrenadante após 48 horas de cultura dos esplenócitos. Os resultados foram representados como controle (CO) e infectados por *T. cruzi* (Tc) e as análises feitas entre WT x AhR KO. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \*\*  $P < 0.01$ .

Ao avaliarmos por citometria de fluxo o perfil das células produtoras de IL-12 e IFN- $\gamma$  após 10 dpi, observamos um aumento no número de DCs (CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IL12<sup>+</sup>) (**Figura 8A**) e de macrófagos (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>IL12<sup>+</sup>) (**Figura 8B**), no baço de camundongos AhR KO infectados. Vimos também que na infecção a ausência de AhR resulta em um aumento do número de células T produtoras de IFN- $\gamma$  (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) e (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) (**Figura 8C e D**). Dessa forma, podemos concluir que o aumento na produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , em conjunto com outros mediadores, é fundamental para o maior controle da replicação do parasita observada nos camundongos AhR KO (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016). Tal fenótipo corrobora dados que relatam o papel antiinflamatório desse receptor.

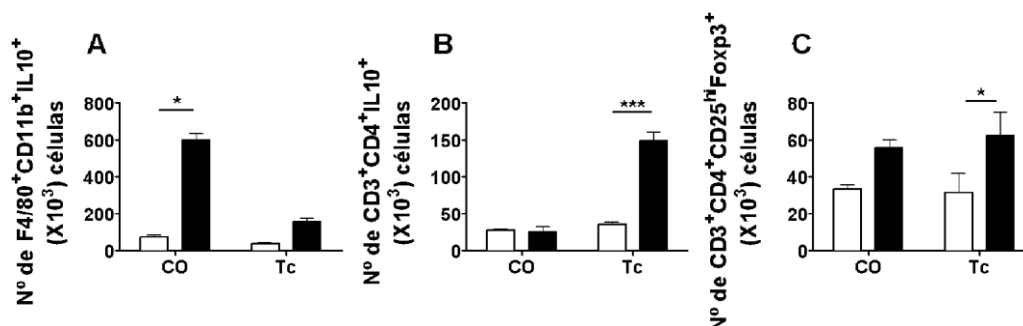


**Figura 8 – DCs/macrófagos e células T são responsáveis pela produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , respectivamente, nos baços de animais AhR KO infectados por *T. cruzi*.** Os baços de animais WT e AhR KO infectados por *T. cruzi* foram processados aos 10 dias após infecção (dpi) e analisados por citometria de fluxo. Medidas da expressão de IL-12p70 e IFN- $\gamma$  foram feitas após marcação extracelular e intracelular das seguintes populações: DCs CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> (A) e macrófagos F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> (B); células T auxiliares CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (C) e células T citotóxicas CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (D). Os resultados foram representados como controle (CO) e infectados por *T. cruzi* (Tc) e as análises feitas entre WT x AhR KO. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \*\*\*  $P < 0,001$  \*\*  $P < 0,01$  \*  $P < 0,05$ .

Para caracterizar melhor o perfil da resposta imune inata e adquirida, também analisamos as proporções de macrófagos F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>, e de diferentes populações de células T CD4<sup>+</sup> no baço de camundongos WT e AhR KO aos 10 dpi. A citocina IL-10 é reguladora e produzida tanto por macrófagos quanto por células NK, Th2 e algumas subpopulações de Treg. Dados anteriores demonstram que os níveis de mRNA de IL-10 aos 10 dpi foram os mesmos entre os grupos. Entretanto, aos 15 dpi os níveis dessa citocina foram menores na ausência do receptor (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016). As análises por citometria de fluxo demonstraram que sem infecção há maior número de macrófagos F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> no baço de camundongos AhR KO, mas esses níveis são quase que completamente reduzidos com a infecção e tornam-se iguais aos 10 dpi (Figura 9A). Para o perfil Th2 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>) o número de células foi o mesmo na ausência da infecção, mas aos 10 dpi houve aumento nos camundongos deficientes de AhR (Figura 9B). Esses dados sugerem que os mecanismos que levam a supressão da inflamação pela ativação de AhR durante a infecção por *T. cruzi* são mediados, ao menos parcialmente por IL-10 produzida por células Th2 (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016).

Quanto a expressão de mRNA total de Foxp3, o fator de transcrição característico de alguns subtipos de células Treg (Zhang, Kong et al. 2014), observamos durante meu mestrado que não houve diferença entre os grupos aos 10 dpi. Entretanto, aos 15 dpi houve aumento da expressão de Foxp3 nos camundongos AhR KO, quando comparado aos WT também

infectados. Ao analisarmos o número de células da subpopulação de Treg ( $CD3^+CD4^+CD25^{hi}Foxp3^+$ ), encontramos que aos 10 dpi a ausência de AhR resulta em um aumento dessas células, mas ao normalizarmos esse número de células durante a infecção pelo número na ausência da infecção, observamos que não há diferença entre os grupos (**Figura 9C**) (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016).



**Figura 9 - O controle da resposta inflamatória em camundongos AhR KO tem contribuição das células Th2 e Treg.** Os baços de animais WT e AhR KO infectados por *T. cruzi* foram processados aos 10 dias após infecção (dpi) e analisados por citometria de fluxo. Medidas da expressão de IL-10 e Foxp3 foram feitas após marcação extracelular e intracelular das seguintes proteínas e populações: Macrófagos F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> (A), células Th2 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>) (B) e células Treg (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>Foxp3<sup>+</sup>) (D). Os gráficos estão representados em número de células, controle (CO) e infectados por *T. cruzi* (Tc) e as análises feitas entre WT x AhR KO. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \*\*\*  $P < 0,001$  \*  $P < 0,05$ .

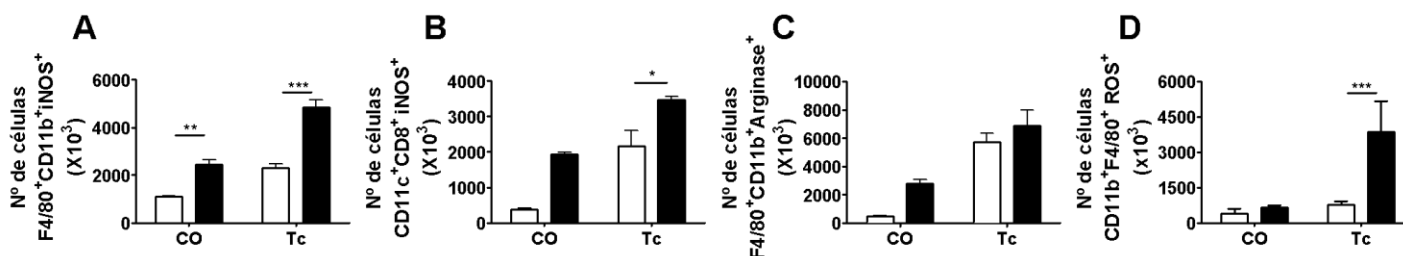
A intensa resposta inflamatória induzida em camundongos AhR KO infectados por *T. cruzi* induz proteínas e moléculas que levam efetivamente a eliminação do parasita. Uma possível molécula efetora para o intenso controle da replicação do parasita nos camundongos AhR KO seria o NO. Porém, nossos resultados demonstraram que sistemicamente o NO não é responsável pelo controle da parasitemia, pois não encontramos diferenças nos níveis de nitrito nem no soro, nem no baço aos 10 dpi, ponto da infecção próximo ao controle da parasitemia (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016). No entanto, novos dados demonstraram que há aumento no número de macrófagos

F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>iNOS<sup>+</sup> (**Figura 10A**) e DCs CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>iNOS<sup>+</sup> (**Figura 10B**) aos 10 dpi no baço de camundongos AhR KO (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016).

Sabemos que a atividade da enzima arginase I é importante, pois ela tem a capacidade de interferir diretamente na replicação do parasita (Balaña-Fouce *et al.*, 2012). Observamos aos 10 dpi, na ausência do receptor, o mesmo número de macrófagos F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>arginase<sup>+</sup> entre os grupos (**Figura 10C**). Sendo assim, é provável que *in vivo*, ao menos aos 10 dpi, essa

enzima não tenha exercido um papel crucial na replicação do parasita na ausência do receptor (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016).

Outra possível explicação para a redução da parasitemia na ausência de AhR é a produção das ROS com um consequente aumento nos níveis de  $\text{ONOO}^-$ . Dados do meu mestrado demonstraram que há intensa produção de ROS no baço de camundongos AhR KO aos 10 dpi. Tal fato não é acompanhado pelo aumento nos níveis de  $\text{ONOO}^-$  (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016). Outras análises feitas por citometria de fluxo dão suporte aos resultados anteriores e indicaram que um aumento no número de macrófagos  $\text{F4/80}^+\text{CD11b}^+\text{ROS}^+$  na ausência de AhR, aos 10 dpi, quando comparados ao grupo WT, poderia ser um dos fatores responsáveis pelo controle da replicação do parasita (**Figura 10D**) (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016). É importante ressaltar que nessas análises os granulócitos e linfócitos não apresentaram aumento na produção de ROS frente à infecção por *T. cruzi* na ausência de AhR (dados não mostrados). Isso sugere que o aumento da produção de ROS no baço, tem participação efetiva dos macrófagos presentes nesse órgão e que, *in vivo*, AhR é um regulador negativo do estresse oxidativo durante a infecção por *T. cruzi*.

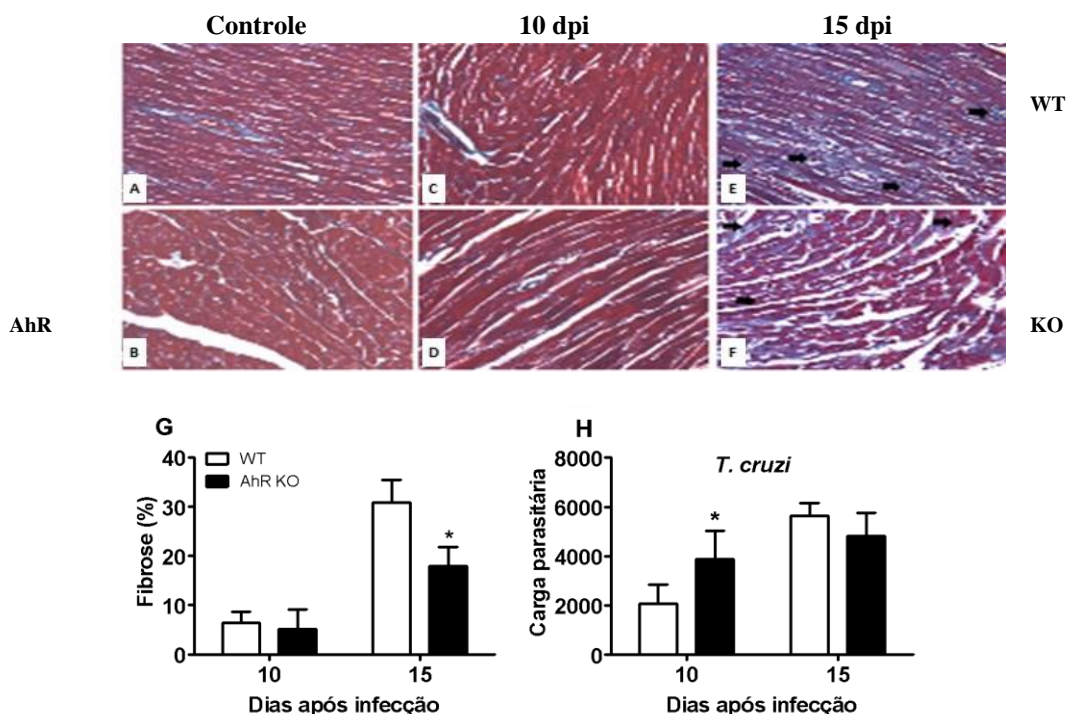


**Figura 10 – Na ausência de AhR, NO e iNOS, mas não arginase, possivelmente contribuem para a eliminação do parasita.** Os baços de animais WT e AhR KO infectados por *T. cruzi* foram processados aos 10 dias após infecção (dpi) e analisados por citometria de fluxo. Medidas da expressão de iNOS, arginase e ROS foram feitas em DCs e/ou macrófagos presentes no baço. Após marcação extracelular e intracelular as seguintes populações foram quantificadas e estão representadas como número de células macrófagos  $\text{F4/80}^+\text{CD11b}^+\text{iNOS}^+$  (**B**), DCs  $\text{CD11c}^+\text{CD8}^+\text{iNOS}^+$  (**C**), macrófagos  $\text{F4/80}^+\text{CD11b}^+\text{arginase}^+$  (**A**) e  $\text{F4/80}^+\text{CD11b}^+\text{ROS}^+$  (**D**). Os resultados foram representados como controle (CO) e infectados por *T. cruzi* (Tc) e as análises estatísticas foram feitas entre WT x AhR KO. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \*\*\*  $P < 0,001$  \*\*  $P < 0,01$  \*  $P < 0,05$ .



### 3- Redução da fibrose induzida por *T. cruzi* no coração de camundongos AhR KO.

Como o coração é um órgão gravemente afetado pela infecção por *T. cruzi*, nós analisamos o infiltrado inflamatório, a fibrose e o perfil de importantes citocinas durante a infecção. Dados do meu mestrado demonstraram redução do infiltrado inflamatório no coração de camundongos AhR KO infectados por *T. cruzi* aos 15 dpi. Outras análises evidenciaram que há uma atenuação da fibrose em camundongos deficientes de AhR aos 15 dpi quando comparados aos WT também infectados (**Figura 11E, F e G**). Entretanto, a quantificação do parasita no coração revelou aumento de *T. cruzi* aos 10 dpi em camundongos AhR KO, quando comparado aos WT (**Figura 11H**), mas essa diferença não se manteve aos 15 dpi (**Figura 11H**) (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016).

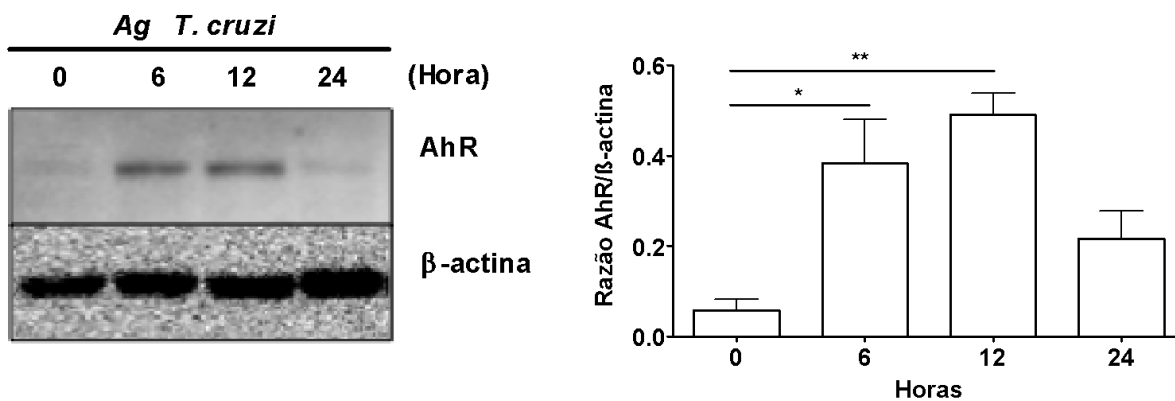


**Figura 11 – Fibrose cardíaca e carga parasitária.** Seções representativas do coração de camundongos WT e AhR KO, infectados ou não por *T. cruzi*, marcadas com tricômico de Gomori. Tecido cardíaco normal de camundongos WT e AhR KO não infectados respectivamente (**A e B**). Pouca deposição de colágeno aos 10 dias após infecção (dpi) nos dois grupos (**C e D**). Fibrose cardíaca intensa nos animais WT infectados e reduzida em camundongos AhR KO, também infectados aos 15 dpi, respectivamente (**E e F, flechas**). Amplificação: A-F: x400. Quantificação da área de fibrose (**G**). Quantificação do parasita no tecido cardíaco por q-PCR (**H**). Os dados foram representados como porcentagem de fibrose (eixo y) por tempo de infecção (eixo x) (**G**). Dados representados como expressão quantitativa absoluta de RNA mensageiro de regiões específicas de *T. cruzi* (eixo y) por tempo de infecção (eixo x) (**H**). \* $P < 0,05$ .

#### 4- AhR é regulado positivamente em macrófagos estimulados por TcAg.

É bem descrito que na doença de Chagas os macrófagos são um importante alvo do *T. cruzi* e têm um papel decisivo na etapa inicial da proliferação parasitária. Essas células são APCs e possuem mecanismos citotóxicos capazes de matar o parasita (Novais *et al.*, 2014; Paiva e Bozza, 2014). Para tentarmos entender se a deficiência desse receptor resulta em uma maior habilidade de eliminar o parasita pelos macrófagos, assim como foi observado *in vivo* nos camundongos AhR KO infectados por *T. cruzi*, torna-se importante o estudo dessas células na ausência de AhR.

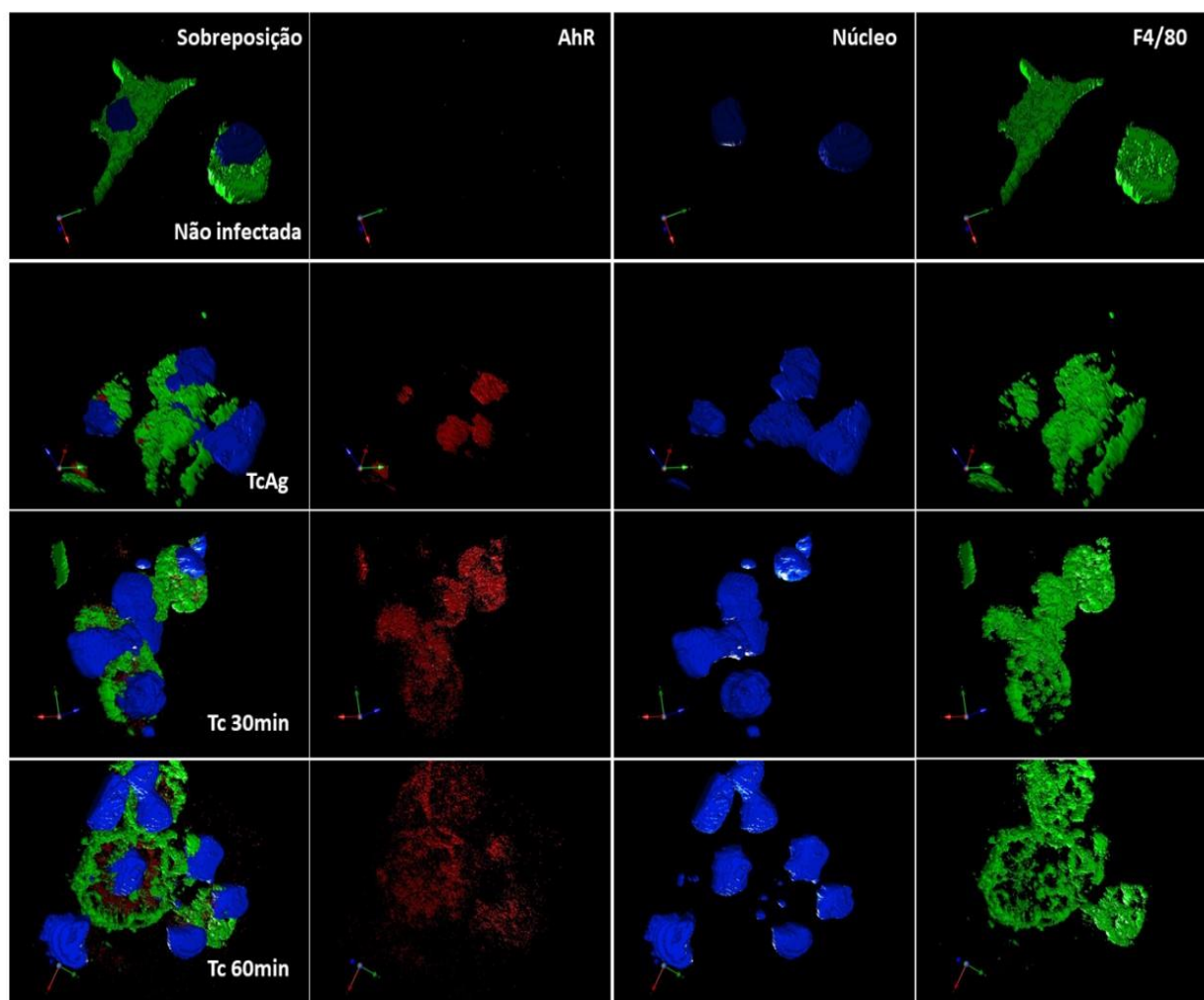
Para determinar se essas células aumentam a expressão de AhR em resposta a *T. cruzi*, macrófagos de camundongos WT foram purificados, cultivados e estimulados com 10  $\mu\text{g/mL}$  de TcAg *in vitro*, e a expressão do receptor foi quantificada por *western blot*. Nossos resultados demonstraram claramente que a expressão de AhR é regulada positivamente as 6 e 12 horas após estímulo (**Figura 12**) (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016).



**Figura 12 – AhR é regulado positivamente em macrófagos de camundongos WT infectados por *T. cruzi*.** Macrófagos de camundongos WT foram purificados, cultivados e estimulados (10  $\mu\text{g/mL}$  TcAg) como descrito anteriormente. Após 6, 12 e 24 horas de estímulo, as células foram lisadas e a expressão de AhR foi quantificada pelo método de *western blot*. Os dados foram representados como a razão entre a expressão de AhR e da proteína  $\beta$ -actina que é expressa constitutivamente (eixo Y), e o tempo de estímulo em horas (eixo X). Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \*\*  $P < 0,01$  \*  $P < 0,05$ .

Visto que o *T. cruzi* é capaz de induzir a expressão proteica de AhR, nos questionamos se o receptor é de fato translocado para o núcleo e ativado. Para responder esse questionamento, plaqueamos  $2 \times 10^5$  macrófagos por poço, e após serem cultivados de um dia para o outro as células foram estimuladas com antígenos de *T. cruzi* por 6 horas (**Figura 13**) ou infectadas com tripomastigotas por 30 e 60 minutos (**Figura 13**). Para análise avaliamos a expressão e localização de AhR por microscopia confocal.

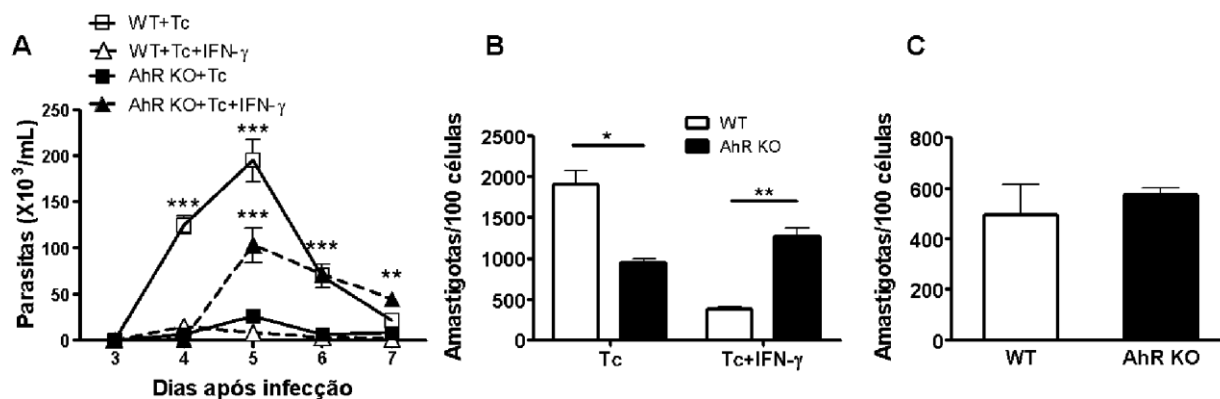
Os dados demonstraram que quando cultivamos as células apenas em meio de cultura, há expressão basal de AhR (**Figura 13 – Não infectada**), assim como observado por *western blot*. Quando os macrófagos foram estimulados com TcAg ( $\mu\text{g/mL}$ ) por 6 horas observamos intensa expressão de AhR e co localização com o núcleo (**Figura 13 – TcAg**). Nas células infectadas por 30 e 60 minutos por *T. cruzi* também observamos a indução da expressão de AhR sendo que com 30 minutos os pontos de expressão encontram-se mais próximos do núcleo do que com 60 minutos, tempo em que podemos observar que a proteína já se encontra mais dispersa pelo citoplasma (**Figura 13 – Tc 30 min e Tc 60 min**).



**Figura 13 - Indução de AhR por TcAg e *T. cruzi*.** Macrófagos de camundongos WT foram isolados e cultivados como descrito anteriormente.  $5 \times 10^5$  células por poço foram estimuladas 6 horas com TcAg ou infectadas por *T. cruzi* por 30 ou 60 minutos. Após fixadas, as células foram marcadas com Alexa Fluor 488 para F4/80, AhR com Alexa Fluor 594 e DAPI para DNA dos macrófagos e do *T. cruzi*. Para melhor visualização as imagens foram trabalhadas com a ferramenta 3D *Isosurface* do programa de análise de imagens Velocity. O experimento foi realizado uma vez.

## **5- A produção de ROS e a atividade das enzimas arginase e IDO estão associadas com o controle da replicação do parasita em macrófagos deficientes de AhR.**

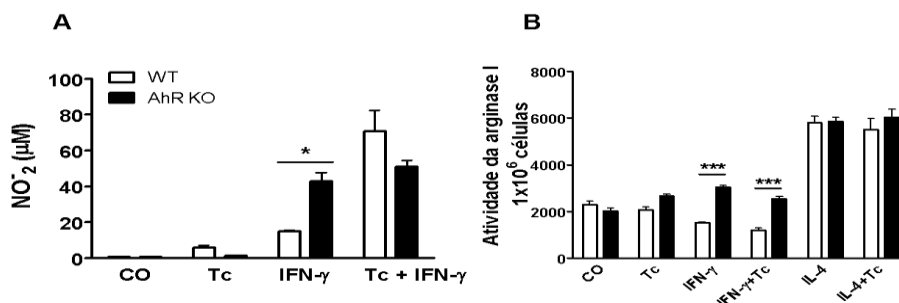
Para tentar compreender a contribuição de AhR em macrófagos para o controle da infecção purificamos, cultivamos e infectamos essas células de camundongos WT e AhR KO, e estimulamos as células com 100 ng/mL de IFN- $\gamma$ . Os macrófagos deficientes de AhR demonstraram uma atividade tripanocida elevada aos 4, 5 e 6 dpi, quando comparados aos WT (**Figura 14A**). Quando estimuladas por IFN- $\gamma$ , as células dos camundongos WT apresentaram um aumento na atividade tripanocida, quando comparado as células do mesmo animal infectadas, mas não estimulados com essa citocina, aos 4, 5 e 6 dpi (**Figura 12A**). Entretanto, de forma interessante, ao tratarmos com IFN- $\gamma$  os macrófagos deficientes de AhR infectados por *T. cruzi*, observamos que essas células perderam, parcialmente, a capacidade tripanocida (**Figura 14A**). Mesmo com essa perda, os macrófagos AhR KO infectados/tratados com IFN- $\gamma$ , ainda liberam menos parasitas, quando comparados aos WT infectados, e liberam mais parasitas quando comparados aos WT infectados/tratados com IFN- $\gamma$  e aos AhR KO apenas infectados (**Figura 14A**). A quantidade de amastigotas dentro dos macrófagos, apenas infectados, também foi reduzida na ausência de AhR (**Figura 14B**). Mas quando estimulados com IFN- $\gamma$ , a quantidade de amastigotas foi maior nas células AhR KO quando comparadas as WT também tratadas, ambos as 48 horas após infecção. Esses dados correspondem com a quantidade de tripomastigotas liberados no sobrenadante das culturas (**Figura 14A**). Porém, tal diferença ainda poderia ser resultado de modificações nas células dos camundongos AhR KO que poderiam tê-las tornado mais resistentes a invasão do parasita. Para responder a esse questionamento, quantificamos a taxa de infecção entre os dois grupos de células após 4 horas de infecção. Observamos que não há diferença no nível de infectividade das células WT e AhR KO (**Figura 14C**). Dessa forma, podemos concluir que o mecanismo utilizado pelos macrófagos de camundongos AhR KO para eliminar os parasitas, provavelmente ocorre ainda dentro da célula, e que tal controle não ocorre apenas após a liberação desses parasitas por compostos citotóxicos liberados no meio.



**Figura 14 – AhR é importante para replicação do parasita.** Macrófagos de camundongos WT e AhR KO foram purificados, cultivados, infectados e estimulados (100 ng/mL IFN- $\gamma$ ) como descrito anteriormente. A atividade tripanocida foi acompanhada pela contagem de tripomastigotas liberados no sobrenadante das culturas aos 3, 4, 5, 6 e 7 dias após infecção (dpi) (A). Atividade microbicida avaliada pela quantidade de amastigotas dentro das células após 48 horas de infecção (B). Quantificação da proporção de infecção das células após 4 horas de infecção (C). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas entre WT x AhR KO. \*\*\*  $P < 0,001$  \*\*  $P < 0,01$  \*  $P < 0,05$ .

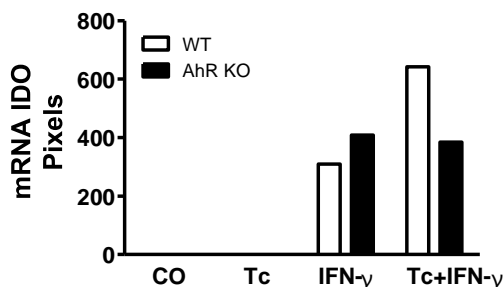
Para investigar a habilidade que os macrófagos deficientes de AhR possuem para eliminar o parasita, quantificamos a produção e liberação de alguns mediadores citotóxicos, que são responsáveis diretos pela eliminação do parasita. Sabemos que dois desses compostos, NO e ROS, fazem parte desse importante grupo de moléculas que auxiliam nessa eliminação de patógenos intracelulares em macrófagos (Gupta *et al.*, 2011; Kimura *et al.*, 2014; Novais *et al.*, 2014). Quando dosamos indiretamente o NO, observamos que os níveis dessa molécula estão aumentados no sobrenadante da cultura de macrófagos deficientes de AhR estimulados com IFN- $\gamma$  (Figura 15A). No entanto, os níveis de NO nos macrófagos de WT e AhR KO não foram diferentes quando infectados e tratados com IFN $\gamma$  (Figura 15A).

Sabe-se que a L-arginina é utilizada tanto pela arginase I quanto pela iNOS, a enzima responsável pela produção de NO (Balaña-Fouce *et al.*, 2012). Por isso, mensuramos a atividade da arginase I e observamos que ela também não é a provável explicação para a diferença encontrada em culturas apenas infectadas pelo *T. cruzi* (Figura 15B). Entretanto, nas culturas infectadas por *T. cruzi* e estimuladas com IFN- $\gamma$ , observamos um aumento na atividade da arginase I nas células deficientes de AhR (Figura 15B). Esse aumento poderia explicar a perda parcial da atividade tripanocida e microbicida das células deficientes de AhR que foram infectadas por *T. cruzi* e estimuladas com IFN- $\gamma$  (Figura 14).



**Figura 15 – A intensa atividade tripanocida das células deficientes de AhR não é dependente de óxido nítrico.** Macrófagos de camundongos WT e AhR KO foram purificados, cultivados, infectados e estimulados (100 ng/mL IFN- $\gamma$ ) como descrito anteriormente. Quantificação indireta de NO após 48 horas de infecção (A). Avaliação quantitativa da atividade da enzima arginase I após 48 horas de infecção (B). Cada unidade é definida como a quantidade da enzima que catalisa a conversão da L-arginina a 1  $\mu$ mol de ureia. Representativo de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas entre WT x AhR KO. \*\*\*  $P < 0,001$  \*  $P < 0,05$

A enzima IDO pode ser ativada por IFN- $\gamma$  e utiliza o triptofano como substrato, o que resulta na produção de metabólitos capazes de ativar AhR, e além disso, ao consumir o triptofano inviabiliza a replicação do parasita (Pfefferkorn, 1984; Däubener *et al.*, 1993; Mackenzie *et al.*, 1998; Mackenzie *et al.*, 1999). Resultados preliminares demonstram uma aparente redução na expressão de mRNA de IDO após 6 horas de infecção por *T. cruzi* e estímulo com IFN- $\gamma$ , nos macrófagos AhR KO (Figura 16). Mais análises tanto *in vitro*, quanto *in vivo* são necessárias para analisarmos de forma mais clara a papel dessa proteína em conjunto com AhR durante a infecção por *T. cruzi*.



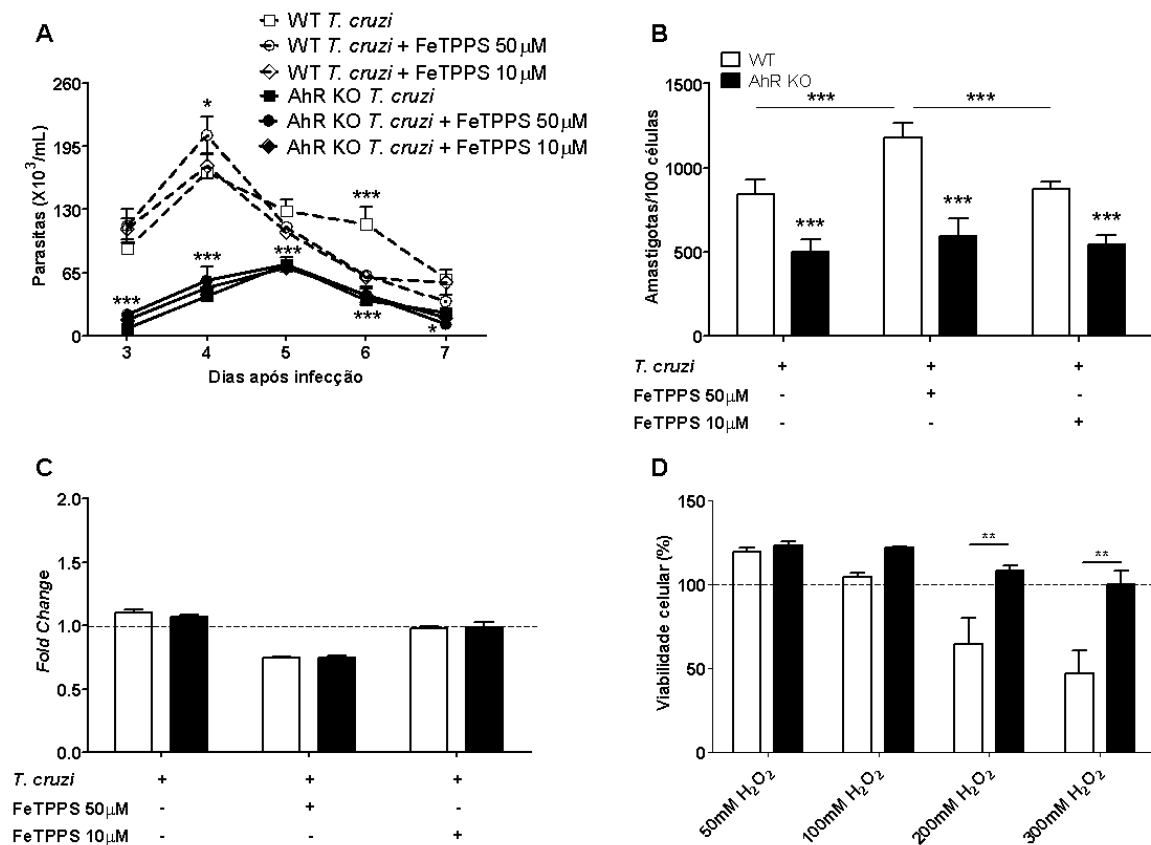
**Figura 16 – Possível envolvimento de IDO com a parcial perda da capacidade microbicida de macrófagos AhR KO.** Macrófagos de camundongos WT e AhR KO foram purificados, cultivados, infectados e estimulados (100 ng/mL IFN- $\gamma$ ) como descrito anteriormente. Avaliação qualitativa por RT-PCR convencional da produção de mRNA de IDO após 6 horas de infecção. Experimento realizado uma vez.

Como as ROS também compõem um grupo de importantes moléculas efetoras, durante meu mestrado quantificamos em tempo real a produção de ROS em macrófagos *in vitro*. Nossos dados demonstraram que macrófagos AhR KO não infectados produzem níveis basais de ROS similares aos WT. Entretanto, a deficiência de AhR resultou em redução na produção de ROS por macrófagos estimulados com zimosan ou infectados por *T. cruzi*. Esses

dados indicam que, *in vitro*, a produção de ROS por macrófagos é parcialmente dependente de AhR (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016). Além disso, já foi descrito que as ROS podem favorecer a replicação de *T. cruzi*, dependendo da localização e concentração da produção (Paiva *et al.*, 2012; Paiva e Bozza, 2014; Goes *et al.*, 2016).

As análises feitas durante meu mestrado demonstraram *ex vivo* que o ONOO<sup>-</sup> provavelmente não está envolvido com a maior capacidade dos camundongos AhR KO de eliminarem o parasita. Para avaliar o papel do ONOO<sup>-</sup> de forma mais clara, infectamos macrófagos *in vitro*, os tratamos com FeTPPS, um decompositor de ONOO<sup>-</sup>, e em seguida acompanhamos a atividade tripanocida, microbicida e quantificamos indiretamente a produção de ONOO<sup>-</sup>. A quantidade de tripomastigotas liberados e de amastigotas dentro dos macrófagos permaneceu reduzida nas células AhR KO tratadas, quando comparados aos WT também tratados com FeTPPS (**Figura 17A e B, respectivamente**) (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016). Entretanto, o consumo do ONOO<sup>-</sup> em células WT infectadas resultou em aumento da liberação de tripomastigotas dos 4 aos 7 dpi e no aumento da quantidade de amastigotas após 48 horas de infecção (**Figura 17A e B, respectivamente**). Acreditamos que em macrófagos *in vitro*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em conjunto com as enzimas arginase (**Figura 15B**) e IDO (**Figura 16**), seriam os prováveis responsáveis pelo controle da replicação do parasita. Resultados preliminares indicam que as células deficientes de AhR são mais resistentes a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figura 17D**).





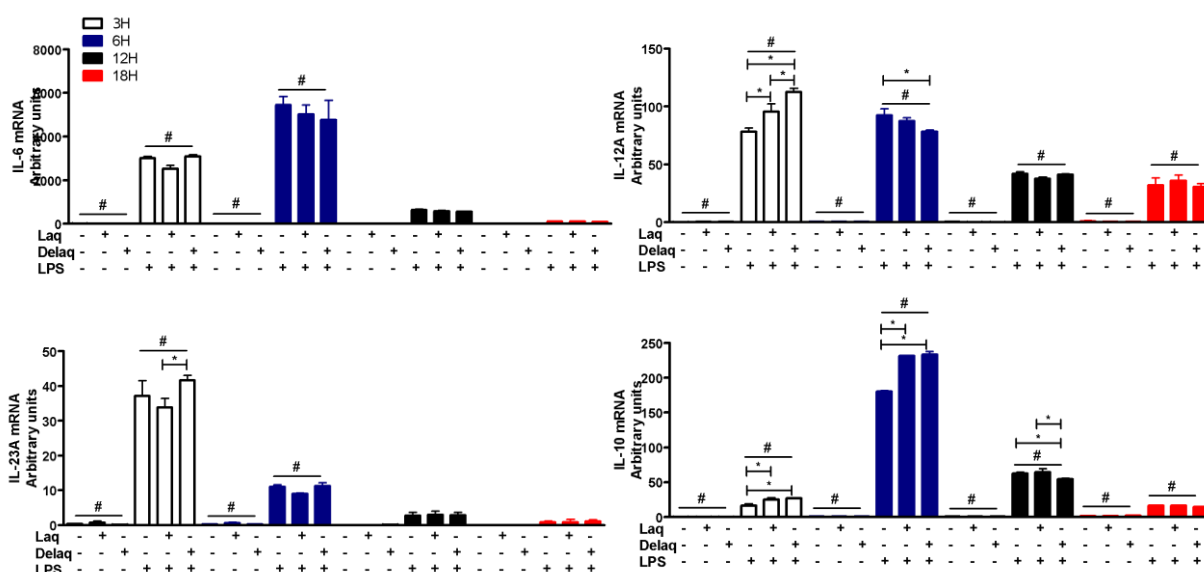
**Figura 17 - ONOO<sup>-</sup> não é o responsável pelo controle da replicação do parasita nas células deficientes de AhR.** Macrófagos de camundongos WT e AhR KO foram purificados, cultivados, infectados e estimulados (10 ou 50  $\mu$ M FeTPPS) como descrito anteriormente. A atividade tripanocida foi acompanhada pela contagem de tripomastigotas liberados no sobrenadante das culturas do 3<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> dia após infecção (dpi) (A). Atividade microbicida avaliada pela quantidade de amastigotas dentro das células após 48 horas de infecção (B). Quantificação indireta da produção de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (C). Teste de citotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quantificado pelo método de MTT. Os dados são referentes a um experimento (D). As análises estatísticas foram feitas entre todos os grupos e tratamentos e os dados são representativos de um dos três experimentos realizados (A e B). Experimento realizado duas vezes e uma vez (C e D, respectivamente). A análise estatística foi feita entre WT x AhR KO (C e D). \*\*\*  $P < 0,001$  \*\*  $P < 0,01$  \*  $P < 0,05$ .

## PARTE II

### 6- Laquinimode e delaquinimode são capazes de ativar genes *downstream* de AhR

Para definirmos um tempo ideal de tratamento com laquinimode ou delaq e avaliar o perfil de ativação das BMDCs de camundongos WT ativadas ou não com LPS por 3, 6, 12 e 18 horas, avaliamos os níveis de mRNA de algumas citocinas que são importantes indicadores de ativação e tolerogenicidade das DCs (IL-6, IL12, IL23 e IL-10) foram avaliados. Observamos aumento da expressão de *il-6* e *il-12* com 3 horas de estímulo pelas células ativadas por LPS e tratadas com laquinimode ou delaq, e pico de expressão foi após 6 horas,

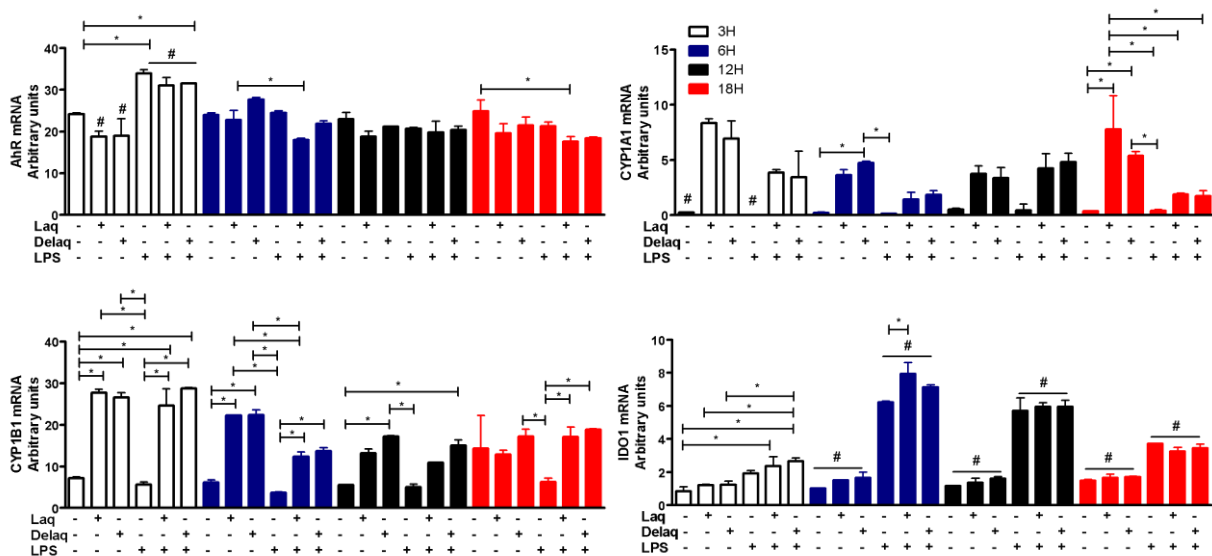
indicando que as células foram ativadas, mas que os tratamentos não influenciaram nos níveis de mRNA de *Il-6* (**Figura 18**). Já os níveis de mRNA de *Il-12* nas células ativadas por LPS foram maiores quando tratadas por laquinimode ou delaquinimode por 3, 6, 12 e 18 horas, sendo que após 3 horas ambos os compostos aumentaram os níveis de *il12* e após 6 horas delaquinimode reduziu a expressão de *Il-12* (**Figura 18**). A expressão de *Il-23* foi induzida apenas nas BMDCs ativadas por LPS e tratadas com laquinimode ou delaquinimode após 3 e 6 horas de tratamento, sendo que dos compostos apenas o delaquinimode foi capaz de aumentar a expressão de *Il-23* (**Figura 18**). Os níveis de mRNA de *il-10* também foram maiores nas BMDCs ativadas por LPS e tratadas com laquinimode ou delaquinimode após 3, 6, 12 e 18 horas de tratamento, sendo que após 3 e 6 horas os compostos induziram um aumento na expressão de *Il-10* e que esse efeito foi perdido após 12 e 18 horas de tratamento (**Figura 18**).

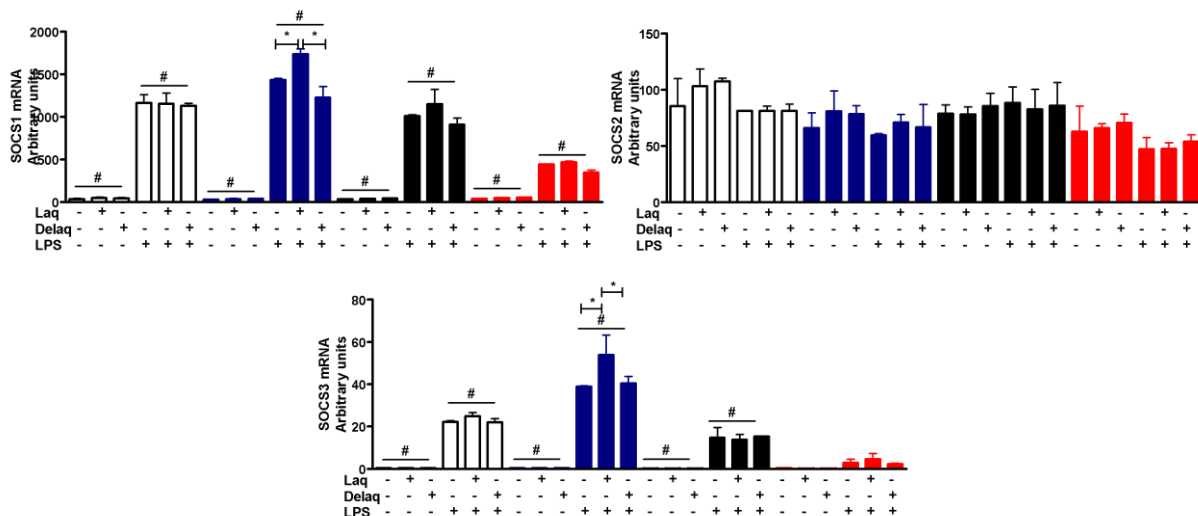


**Figura 18 – Cinética de ativação BMDCs tratadas com laquinimod ou delaquinimod.** Células da medula óssea de camundongos WT foram cultivadas por 9 dias na presença de 20 ng/mL de GM-CSF. No nono dia as células foram estimuladas com 1 µg/mL de LPS, 10 µM de laquinimod (Laq) ou 10 nM de delaquinimod (Delaq). Após 3, 6, 12 e 18 horas de estímulo, as células foram lisadas e as expressões gênicas de *il-6*, *il-12a*, *il-23a* e *il-10* foram quantificadas por RT-qPCR. Os dados foram representados como unidades arbitrárias e foram analisados pelo método de Delta Ct. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \*\*\*  $P < 0,001$  \*\*  $P < 0,01$  \*  $P < 0,05$ .

Também avaliamos a capacidade dos compostos em questão de induzir a via de sinalização de AhR. Como AhR é um fator de transcrição, um dos modos de avaliar a ativação desse receptor é quantificando a expressão de genes que são controlados por ele. Por isso, quantificamos os níveis de mRNA *cyp1a1*, *cyp1b1*, *ido1*, *socs1*, *socs2* e *socs3*. Os resultados

demonstraram que tanto nas BMDCs não ativadas quanto nas ativadas por LPS, laquinimode ou delaq são capazes de ativar AhR em todos os tempos avaliados, sendo que com 3 horas as células ativadas e tratadas a expressão gênica foi maior do que nas não ativadas, o que não foi observado nos demais tempos (**Figura 19**). Quanto à expressão de *cyp1a1* e *cyp1b1* observamos que laquinimode e delaq são capazes de induzir a expressão dos dois genes que são *downstream* de AhR mesmo nas BMDCs não ativadas. O mesmo ocorreu quando as células foram ativadas por LPS, mas em ambas as situações não vimos diferença nos níveis de ativação pelo tratamento de delaq, quando comparada com laquinimode. Esse perfil foi observado principalmente após 3 e 6 horas de tratamento e/ou ativação (**Figura 19**). Com relação à indução da expressão de mRNA dos membros da família SOCS, não observamos diferença nos níveis de *socs2*, mas vimos que *socs1* é regulado positivamente em todos os tempos de ativação e tratamento com laquinimode ou delaq, sendo que após 6 horas, laquinimode foi capaz de aumentar e delaq reduzir a expressão desse gene (**Figura 19**). O mesmo perfil foi observado para os níveis de *socs3* com a exceção de que esse gene não foi induzido após 18 horas de ativação e/ou tratamento (**Figura 19**).

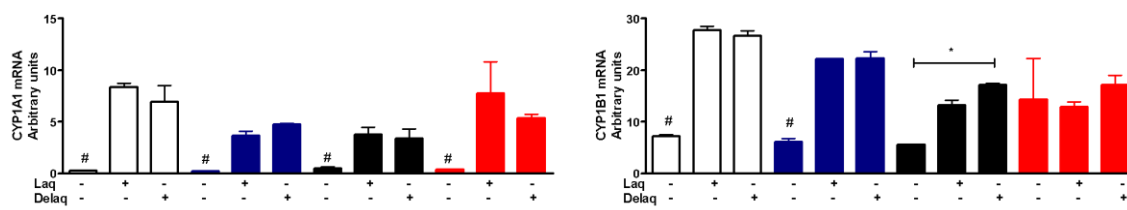




**Figura 19 - Cinética de expressão de genes induzidos pela ativação de AhR em BMDCs estimuladas com laquinimode ou delaquinimode.** Células da medula óssea de camundongos WT foram cultivadas por 9 dias na presença de 20ng/mL de GM-CSF. No nono dia as células foram estimuladas com 1  $\mu$ g/mL de LPS, 10  $\mu$ M de laquinimod ou 10 nM de delaq. Após 3, 6, 12 e 18 horas de estímulo, as células foram lisadas e as expressões gênicas de *cyp1a1*, *cyp1b1*, *ahr*, *ido*, *socs1*, *socs2* e *socs3* foram quantificadas por RT-qPCR. Os dados foram representados como unidades arbitrárias e foram analisados pelo método de Delta Ct. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \*\*\*  $P < 0,001$  \*\*  $P < 0,01$  \*  $P < 0,05$ .

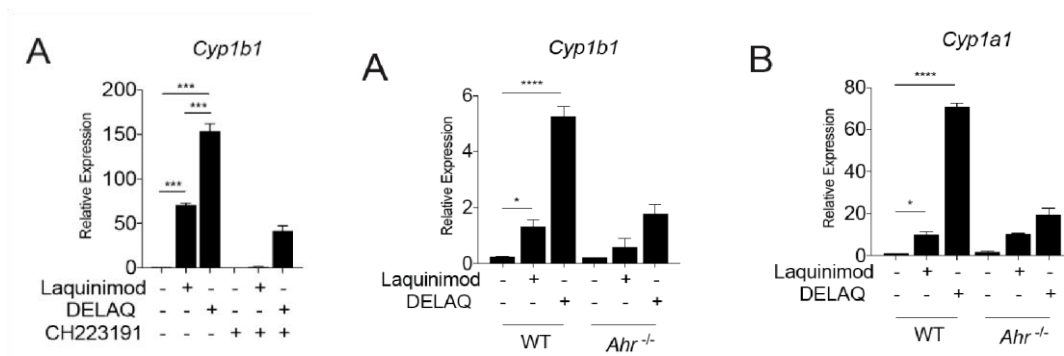
## 7- Delaquinimode é capaz de ativar genes *downstream* de AhR de forma mais intensa do que laquinimode apenas em DCs primárias

Sabemos que as BMDCs e as DCs primarias do baço podem apresentar diferenças na proporção dos diferentes subtipos de DCs e conseqüentemente variação da resposta imune (Mildner e Jung, 2014). Além disso, como o cenário de diferenciação das BMDCs é diferente daquele em que as DCs do baço se encontram, pode haver diferença no perfil de resposta imune produzido por essas células (Xu, Zhan et al. 2007, Segura, Albiston et al. 2009). Dados do nosso grupo demonstraram que delaq tem efeitos mais intensos do que laquinimode com relação à ativação de genes da via de AhR. Entretanto, observamos que laquinimode ou delaq são capazes de ativar *cyp1a1* e *cyp1b1* em BMDCs, mas não houve diferença nos níveis de ativação entre um tratamento e outro (Figura 20). Por isso, após definirmos que o tempo de ativação de 6 horas é necessário para avaliarmos os parâmetros desejados, utilizamos DCs primárias para a realização dos demais experimentos.



**Figura 20 – Laquinimod e delaquinimod apresentam o mesmo perfil de expressão de genes induzidos por AhR em BMDCs.** Células da medula óssea de camundongos WT foram cultivadas por 9 dias na presença de 20ng/mL de GM-CSF. No nono dia as células foram estimuladas com 10  $\mu$ M de laquinimod ou 10 nM de delaquinimod. Após 3, 6, 12 e 18 horas de estímulo, as células foram lisadas e as expressões gênicas de *cyp1a1* e *cyp1b1* foram quantificadas por RT-qPCR. Os dados foram representados como unidades arbitrárias e foram analisados pelo método de Delta Ct. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \*\*\*  $P < 0,001$  \*\*  $P < 0,01$  \*  $P < 0,05$ .

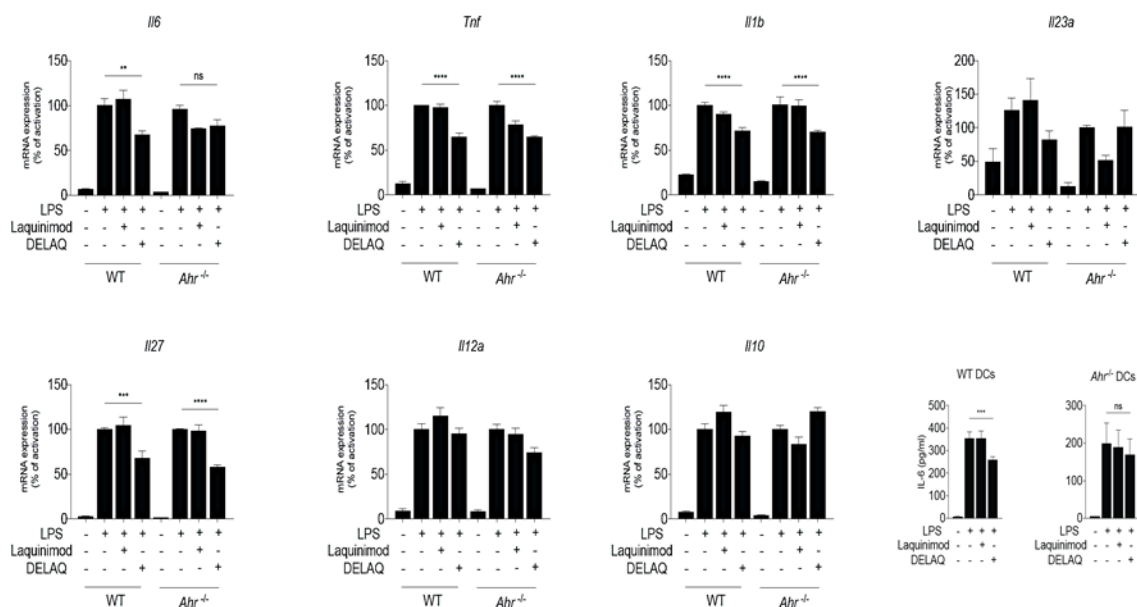
Por isso, avaliamos a ativação de genes *downstream* de AhR em DCs derivadas do baço de camundongos WT ou *Itgax<sup>cre</sup>AhR<sup>flox</sup>*, em que a deficiência de AhR é restrita a essas células, após 6 horas de tratamento. Vimos que nas células WT não ativadas, delaq é capaz de induzir a expressão de mRNA de *cyp1a1* e *cyp1b1* de forma mais intensa que laquinimode (**Figura 21**). Sabemos que em camundongos esse efeito é dependente de AhR, mas ainda não foi descrito se esse fenótipo em DCs é também dependente do receptor (Kaye, Piryatinsky et al. 2016). Para analisarmos se essa dependência existe, avaliamos os mesmos parâmetros nas células tratadas com o antagonista de AhR, o CH-223191, ou nas DCs de animais *Itgax<sup>cre</sup>AhR<sup>flox</sup>*. Nossos dados demonstraram que tanto na presença do antagonista, quanto na ausência de AhR, laquinimode e delaq reduzem os níveis de mRNA de *cyp1a1* e *cyp1b1*, ambas em comparação as células WT (**Figura 21**). Esses dados indicam que a ativação desses genes é resultante da ativação de AhR.



**Figura 21 – Ativação de AhR por laquinimod ou delaquinimod em células dendríticas primárias.** Células dendríticas primárias foram isoladas do baço de camundongos WT e *Itgax<sup>cre</sup>AhR<sup>flox</sup>* por beads para CD11c por seleção positiva. As células foram estimuladas com 10  $\mu$ g/mL de CH-223191 ou 10  $\mu$ M de laquinimode ou 10 nM de delaquinimode (Delaq). Após 6 horas de estímulo as células foram lisadas e a expressão gênica de *cyp1a1* e *cyp1b1* foi quantificada por RT-qPCR. Os dados foram representados como unidades arbitrárias e foram analisados pelo método de Delta Ct. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \*\*\*  $P < 0,001$  \*\*  $P < 0,01$  \*  $P < 0,05$ .

## 8- Delaquinimode reduz a produção de IL-6 em células dendríticas de forma dependente de AhR

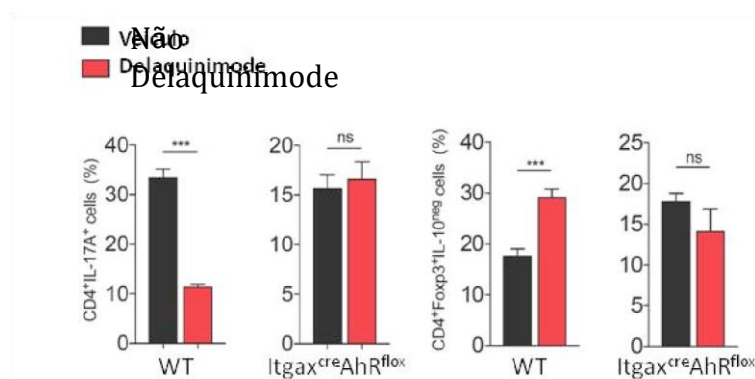
Sabemos que o perfil de citocinas liberadas pelas DCs são um indicativo do subtipo a que foram diferenciadas, e determinam o perfil de células T que será induzido por elas (Reis E Sousa, 2006; Quintana *et al.*, 2010; Mildner e Jung, 2014). Para compreender o perfil de ativação das DCs primárias, analisamos os níveis de expressão de mRNA de algumas citocinas importantes para a EAE. Observamos que nas DCs WT, delaq é capaz de suprimir a expressão de mRNA de *Il-6*, *tnf*, *il-1beta* e *il-27*, entretanto apenas a supressão de *il-6* é dependente da expressão de AhR em DCs (**Figura 22**). Esse mesmo perfil foi observado quando dosamos no sobrenadante das culturas os níveis de IL-6 liberados após 6 horas de estímulo (**Figura 22**).



**Figura 22 – A inibição da produção de IL-6 por delaquinimod em DCs primárias é dependente de AhR.** Células CD11c<sup>+</sup> foram isoladas do baço de camundongos WT e *Itgax*<sup>cre</sup>*AhR*<sup>fllox</sup> por beads CD11c. As células foram estimuladas com 1 µg/mL de LPS ou 10 µM de laquinimod ou 10 nM de delaquinimod. Após 6 horas de estímulo, as células foram lisadas e as expressões gênicas de *il-6*, *tnf*, *il23a*, *il-1β*, *il27*, *il12a* e *il-10* foram quantificadas por qPCR. A produção de IL-6 foi dosada por ELISA no sobrenadante das culturas. Os dados foram representados como unidades arbitrárias e foram analisados pelo método de Delta Ct. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. \*\*\*  $P < 0,001$  \*\*  $P < 0,01$  \*  $P < 0,05$ .

Sabe-se que no contexto da EM e da EAE, o estímulo de células Th0 por IL-6 e TGF-β leva a diferenciação de células Th17 (Egwuagu and Larkin Iii 2013). Para avaliar se no nosso modelo essa diferenciação foi alterada pelo tratamento com delaq, utilizamos DCs de animais WT e *Itgax*<sup>cre</sup>*AhR*<sup>fl</sup> tratadas com o composto e ativadas com LPS e MOG. Após 6

horas de estímulo as DCs foram co-cultivadas por 72 horas com células T CD4 *naives* de camundongos 2D2, que possuíam TCR específico para MOG, e que podem responder de maneira específica ao antígeno da EAE (Bettelli, Pagany et al. 2003). Ao fim do período indicado avaliamos o perfil de diferenciação e de resposta das células T. Nossos dados demonstraram que nas DCs WT condicionadas na presença de delaq houve supressão da diferenciação de células Th17 produtoras de IL-17, quando comparadas com as não tratadas do mesmo grupo (**Figura 23**). De forma oposta, a expansão de células Treg FoxP3<sup>+</sup> foi maior quando da presença de DCs WT tratadas com delaq quando comparadas as WT não tratadas (**Figura 23**). Quando co-cultivamos as células dendríticas de camundongos *Itgax<sup>cre</sup>AhR<sup>fl</sup>* tratadas com delaq, com as células T dos animais 2D2, observamos que não houve diferença na porcentagem de expressão de IL-17 e FoxP3 nas células T CD4, quando comparadas as DCs do WT, indicando que esse perfil de polarização induzido por delaq e MOG, é dependente de AhR (**Figura 23**).



**Figura 23-** A diferenciação de células Th17 e Treg em animais tratados com delaquimod é dependente da expressão de AhR em DCs. DCs de camundongos WT e *Itgax<sup>cre</sup>AhR<sup>fl</sup>* foram isoladas, ativadas por LPS e MOG e tratadas com delaquimode (Delaq). Após 6 horas co-cultivamos as células T *naive* por 72 horas com uma proporção de 1 DC para 4 células T. As análises de expressão de IL-17 e Foxp3 foram feitas em células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> por citometria de fluxo. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. Não significativo (ns). \*\*\*  $P < 0,001$



# DISCUSSÃO

*Nobody was born a master; amateurs become experts because they did not give up on learning. You are going as far as you can if you'll learn and apply.*

**Israelmore Ayivor**

Sabemos que AhR é crucial para muitas funções do sistema immune, tanto para as fisiológicas, quanto nos contextos de autoimunidade e de infecções (Shi *et al.*, 2007; Quintana *et al.*, 2008; Elizondo *et al.*, 2011; Quintana e Sherr, 2013; Brant *et al.*, 2014). Já foi descrito que AhR pode ser expresso e ativado em diversas células do coração durante a embriogênese cardíaca e na fase adulta de camundongos, o que demonstra a importância do receptor para a função desse órgão (Carreira *et al.*, 2015). De fato, vimos que a infecção por *T. cruzi* induz um aumento da expressão de AhR no coração dos camundongos WT aos 15 dpi. Além disso, dados obtidos durante meu mestrado demonstraram um aumento do infiltrado inflamatório no coração (Barroso, Gualdrón-López *et al.* 2016). Acreditamos que esse aumento de células inflamatórias e/ou a infecção dos cardiomiócitos, pode ter resultado em maior expressão de AhR durante a infecção por *T. cruzi* nesse tecido.

No baço, outro órgão importante para a resposta imunológica nesta infecção, não observamos por *western blot* diferença na produção proteica de AhR. Entretanto, essa ausência de diferença pode ser devido ao fato de que a análise foi feita no extrato total do órgão e que populações celulares diferentes, com relevâncias imunológicas distintas, podem expressar diferencialmente o receptor, mas quando analisadas em conjunto, inviabilizam a quantificação proteica de células que separadamente seriam relevantes na infecção com níveis aumentados de AhR.

É interessante que compostos originados, e ou decompostos, pela flora comensal já foram descritos como fontes abundantes de agonistas de AhR, tais substâncias têm capacidade de ativar a sinalização por meio desse receptor em doses fisiologicamente relevantes (Quintana e Sherr, 2013; Rothhammer *et al.*, 2016; Gutiérrez-Vázquez e Quintana, 2018). Observamos nesse trabalho, que há indução da expressão proteica de AhR por TcAg, e provável ativação do receptor tanto por TcAg quanto por *T. cruzi* (Barroso, Gualdrón-López *et al.* 2016). Análises como dosagem de metabolitos da ativação de AhR (CYP1A1, CYP1B1) e ensaio de gene reporter ainda são necessárias para comprovar a ativação do receptor no nosso modelo.

Entretanto, nossos dados e os relatos na literatura já nos levam a sugerir que por possuírem capacidade de induzir AhR, compostos derivados de *T. cruzi* poderiam levar a redução da resposta inflamatória frente a infecção, o que daria condições ao parasita de burlar a resposta inflamatória inicial e dessa forma replicar-se de maneira eficiente resultando em um aumento do valor adaptativo desse parasita. Além disso, a ativação de AhR está

relacionada a respostas antioxidantes (Stockinger *et al.*, 2014), o que resultaria na redução da produção dos principais agentes citotóxicos ao longo da infecção por *T. cruzi*.

De fato, quando avaliamos o curso natural da infecção, observamos que na ausência de AhR o *T. cruzi* perde parte da capacidade replicativa, o que provavelmente está associado com o descontrole das estratégias evolutivas desse parasita de burlar a resposta imune do hospedeiro (Barroso, Gualdrón-López *et al.* 2016). Muitos estudos sugerem que AhR faz parte de vias regulatórias que são capazes de inibir respostas inflamatórias em diversos modelos de infecção (Sanchez *et al.*, 2010; Elizondo *et al.*, 2011; Brant *et al.*, 2014). Dessa forma nos questionamos se esse fenótipo anti-inflamatório de AhR também pode ser observado frente a infecção por *T. cruzi*. Observamos que no nosso modelo AhR desempenha esse papel regulatório, uma vez que o número de macrófagos e células dendríticas infectadas e deficientes de AhR produtoras de IL-12 e IFN- $\gamma$ , foi maior aos 10 dpi nesses animais. Sugerindo que parte do controle inflamatório e da replicação do parasita é dependente de AhR.

É importante ressaltar que esse controle é exercido principalmente por macrófagos, uma vez que o maior número de células produtoras dessas citocinas observado nos baços dos camundongos AhR KO infectados, foram macrófagos. Entretanto, isso não significa que as células dendríticas não desempenham um importante papel ao longo da infecção, mesmo porque essas células tem forte influência na conexão da resposta imune inata com a adaptativa, e mesmo tendo sido em menores quantidades quando comparadas aos macrófagos, elas ainda representam um número significativo de células.

Com relação à resposta efetora dos macrófagos, sabemos que a produção de ONOO<sup>-</sup> é dependente da presença de NO e O<sub>2</sub><sup>-</sup> em quantidades equimolares no mesmo compartimento (Nathan e Shiloh, 2000; Liochev e Fridovich, 2003; Pacher *et al.*, 2007). Por citometria de fluxo avaliamos a produção de iNOS e ROS, proteínas e compostos responsáveis pela resposta efetora. Observamos que os macrófagos dos camundongos AhR KO infectados produzem a maior quantidade desses compostos (Barroso, Gualdrón-López *et al.* 2016). Resultados de experimentos *ex vivo* indicaram um aumento da produção de ROS, mas não de ONOO<sup>-</sup> e NO em células do baço de camundongos deficientes de AhR infectados por *T. cruzi*. Quando analisamos a presença de NO dos animais, observamos aumento da presença de NO no soro dos camundongos AhR KO aos 15 dpi. A presença de NO no soro só é detectada quando há excesso da produção dessa molécula nos tecidos. O fato de não termos observado diferença na quantidade de NO no soro aos 10 dpi não significa que essa molécula não tenha

sido efetivamente produzida nos tecidos (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016). Acreditamos que NO em conjunto com ROS, podem ser os responsáveis diretos pelo controle da replicação do parasita na ausência de AhR pois observamos maior produção de iNOS e ROS aos 10 dpi nos macrófagos dos baços desses animais, e ausência de diferença entre os grupos no número de células produtoras de arginase.

Na infecção por *T. cruzi* sabemos que do ponto de vista do hospedeiro uma forte resposta inflamatória inicial é importante para o controle inicial da replicação do parasita. Além disso, levando em conta tanto o hospedeiro quanto o parasita, é importante que haja uma resposta imune reguladora para conter o possível dano tecidual causado pela intensa resposta inflamatória, e para que o parasita se perpetue. No nosso modelo, aos 10 dpi observamos alta produção de IL-10 pelas células Th2 dos camundongos AhR KO infectados por *T. cruzi*. Desse modo, o controle da resposta inflamatória no nosso modelo é provavelmente exercido principalmente pelas células T produtoras de IL-10. Observamos também aumento no número de Treg nos animais AhR KO infectados, mas quando é feita a normalização dos grupos infectados pelos respectivos controles, não há diferença entre o número dessas células entre WT e AhR KO (ambos infectados), indicando que na infecção AhR não desempenha um papel essencial para a expansão dessas células. Frente ao forte perfil de produção de IL-10, outra população celular que deveria ser avaliada é a Tr1, que são células reguladoras FoxP3<sup>-</sup> produtoras de IL-10.

O relevante papel dos macrófagos observado *in vivo* e o conhecimento de que essas células são importantes APCs durante a doença de Chagas, nos conduziu a realizar experimentos *in vitro* na tentativa de compreender melhor a função que AhR desempenha para o controle da infecção por *T. cruzi* observada no nosso trabalho (Novais *et al.*, 2014). Os dados demonstraram que as células estimuladas com TcAg expressam AhR principalmente após 6 e 12 horas de estímulo (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016). Além disso, análises por microscopia confocal também demonstraram a ativação de AhR tanto pelo TcAg quanto pelo parasita. Dessa forma podemos concluir que além de induzir a expressão do receptor, proteínas do parasita levam a translocação e ativação de AhR. Esses dados indicam que os padrões de reconhecimento a patógenos (PAMPs) derivados do *T. cruzi*, são responsáveis pela ativação de vias de sinalização que induzem a transcrição e transmigração de AhR em macrófagos. Estudos recentes demonstraram que o fator de transcrição NF-κB atua na transcrição e ativação de AhR (Vogel *et al.*, 2014). Outros estudos relacionam a via de sinalização desse mesmo fator de transcrição, NFκB, com a infecção por *T. cruzi* (Huang et

al., 2003). Em conjunto, esses trabalhos nos levam a hipótese de que durante a infecção por *T. cruzi*, a ativação de NF- $\kappa$ B pode levar a transcrição e ativação de AhR. Entretanto, experimentos precisam ser feitos para comprovar essa hipótese, uma vez que sabemos que as vias ativadas *downstream* de AhR são diversas e dependentes do modo com que o receptor foi ativado (Jackson, Joshi et al. 2015).

Vimos que o papel crucial de AhR para a replicação do *T. cruzi in vivo* foi observado também *in vitro*. A diferença de replicação do parasita entre as células no animal WT e do AhR KO, não está associada com a taxa de entrada do parasita nessas células, que foi avaliada após 4 horas de infecção (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016). Por termos observado que após 48 horas de infecção há menos formas amastigotas nos macrófagos deficientes de AhR, concluímos que essa diferença está provavelmente associada com mecanismos citotóxicos que influenciam a replicação dessas formas ainda dentro da célula (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016). De forma interessante, quando infectamos os macrófagos e após duas horas tratamos as células com IFN- $\gamma$ , houve perda parcial da atividade tripanocida dos macrófagos AhR KO, esse fenótipo também foi observado na quantificação de amastigotas intracelulares após 48 horas de infecção, sustentando também a ideia de que o controle da replicação provavelmente ocorre logo na fase inicial da infecção.

Como sabemos que o controle da parasitemia é exercido por diversos mecanismos imunológicos como produção de RNS e ROS, avaliamos nos macrófagos a produção desses compostos (Torrice *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 2003; Piacenza *et al.*, 2008; Alvarez *et al.*, 2011). Quando quantificamos NO após 48 horas de cultura vimos que a produção dele, uma das principais moléculas efetoras durante a infecção por *T. cruzi*, não é o responsável por conter de forma mais eficiente a replicação dos parasitas nas células deficientes de AhR *in vitro*. Como a arginase I compete com a enzima produtora de NOS, a iNOS, pelo mesmo substrato (Balaña-Fouce *et al.*, 2012), mensuramos a atividade da arginase I. Observamos que ela também não é a provável explicação para a diferença encontrada em culturas apenas infectadas pelo *T. cruzi*. Entretanto, nas culturas infectadas por *T. cruzi* e estimuladas com IFN- $\gamma$ , observamos um aumento na atividade da arginase I nas células deficientes de AhR. Esse aumento poderia explicar a ausência de diferença na produção de NO e a perda parcial da atividade tripanocida e microbicida das células deficientes de AhR que foram infectadas por *T. cruzi* e estimuladas com IFN- $\gamma$ .

A enzima IDO é ativada por IFN- $\gamma$ , está relacionada com o controle da replicação parasitaria uma vez que influencia a degradação e disponibilidade de triptofano, e essa

degradação leva a produção de metabólitos que ativam AhR (Alberati-Giani *et al.*, 1997; Hucke *et al.*, 2004; Knubel *et al.*, 2010; Jaronen e Quintana, 2014; Nguyen *et al.*, 2014). Dados preliminares da expressão mRNA daIDO nos macrófagos demonstraram que, nas células deficientes de AhR infectadas por *T. cruzi* e tratadas com IFN- $\gamma$ , há redução da quantidade de mRNA quando comparadas com as células do WT nas mesmas condições. Outras análises como quantificação por RT-qPCR, *western blot*, ELISA e gene reporter/luciferase ainda precisam ser feitas para confirmar o efeito daIDO no nosso modelo. É importante ressaltar que a co-evolução daIDO com o AhR já foi relatada e assim como citado acima, essa enzima também se relaciona com estratégias de controle de replicação de parasitas, incluindo o *T. cruzi* (Knubel *et al.*, 2010; Jaronen e Quintana, 2014). Esses dados dão força à ideia de que AhR atua no valor adaptativo do *T. cruzi*.

É bem estabelecido que as ROS agem em células do sistema imune como mediadores para eliminar patógenos intracelulares (Ba *et al.*, 2010; Kimura *et al.*, 2014). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que dependendo da concentração e da localização da produção dessas ROS, elas podem facilitar a infecção e replicação do *T. cruzi* (Paiva *et al.*, 2012; Paiva e Bozza, 2014; Goes *et al.*, 2016). Além disso, vários estudos tem relacionado AhR a resposta mediada pelo fator nuclear associado ao fator eritróide 2 (Nrf2) em diversos tipos celulares, e descrevem que esses dois fatores de transcrição agem sinergicamente a xenobióticos e a antioxidantes (Stockinger *et al.*, 2014).

Com os dados de ROS observados *in vivo* nos camundongos AhR KO, podemos supor que há incapacidade dos macrófagos de ativar uma resposta antioxidante para as concentrações de ROS encontradas durante a infecção por *T. cruzi*. Assim, uma resposta inflamatória aumentada, seguida por alta produção de mediadores citotóxicos, NO e ROS *in vivo*, podem ter resultado em melhor controle da replicação do parasita na ausência de AhR. Já os nossos resultados *in vitro* corroboram os dados da literatura que demonstram que em certas concentrações, ROS é importante para a replicação do *T. cruzi* (Barroso, GualdrónLópez *et al.* 2016).

*Ex vivo*, não observamos diferença entre os grupos na produção de ONOO $\cdot$ . No entanto já é bem descrito que ONOO $\cdot$  é um dos compostos com maior citotoxicidade para o *T. cruzi* (Alvarez *et al.*, 2011). Como nossas análises foram feitas no baço, a produção de ONOO $\cdot$  pelos macrófagos pode ter sido diluída em meio a todas as células desse órgão dessa forma inviabilizado a detecção. Por isso, avaliamos a taxa de replicação tanto de amastigotas quanto tripomastigotas dos macrófagos infectados por *T. cruzi* e ou tratados com o

decompositor de ONOO<sup>-</sup>. Assim como relatado na literatura vimos que o ONOO<sup>-</sup> é importante para a replicação do parasita nas células WT, mas na ausência de AhR ele não é responsável pelo controle diferenciado da replicação do parasita. Dessa forma, esses dados corroboram o fenótipo que encontramos *ex vivo* (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016). Além do ONOO<sup>-</sup> outra molécula que faz parte das ROS, e tem relevante papel efetor, é a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dados preliminares demonstraram que os macrófagos deficientes de AhR são mais resistentes aos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No entanto, mais análises serão necessárias para comprovar o envolvimento direto dessa molécula no nosso modelo (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016).

O coração é o órgão mais afetado durante a doença de Chagas. Por isso, avaliamos o efeito de AhR na inflamação e dano tecidual. Dados do meu mestrado mostraram que no coração os níveis de mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL-12, IL-6, TNF e IL-17 apresentaram aumento na ausência do receptor AhR. O marcador de células Treg, FoxP3, e a citocina regulatória IL-10, também apresentaram aumento nos níveis de mRNA no início da infecção, mas aos 15 dpi esses níveis foram reduzidos igualmente em ambos os grupos. A expressão de mRNA das proteínas SOCS 2 e 3 foi menor na ausência do receptor AhR aos 10 dpi, mas os níveis permaneceram os mesmos entre os grupos aos 15 dpi. Não houve diferença quanto a expressão de SOCS1 no coração (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016). É importante lembrar que SOCS2 é essencial para a função dos cardiomiócitos durante a infecção por *T. cruzi* (Esper *et al.*, 2012). Além disso, dados do nosso laboratório demonstraram que a expressão de SOCS2 é maior em cardiomiócitos purificados de camundongos WT infectados por *T. cruzi*. Dessa forma, podemos sugerir que AhR controla a expressão de SOCS2 também em cardiomiócitos.

Ao avaliarmos o infiltrado inflamatório e a fibrose nesse tecido, observamos que ambos são reduzidos aos 15 dpi nos camundongos AhR KO quando comparado aos WT também infectados. Em conjunto, esses dados podem indicar que é provável que as células residentes no coração também devem ser capazes de produzir mediadores inflamatórios e citotóxicos. Isso porque mesmo com alta quantidade de parasitas aos 10 dpi, e sem diferença na quantidade de células infiltradas no tecido, os camundongos AhR KO são capazes de controlar a migração do parasita e a fibrose aos 15 dpi, quando comparados aos WT (Barroso, Gualdrón-López et al. 2016). De fato, foi demonstrado pelo nosso grupo que cardiomiócitos são produtores de citocinas, quimiocinas e NO quando infectados por *T. cruzi* (Machado, Martins et al. 2000). Análises da fisiologia cardíaca foram feitas para elucidar a relevância de AHR nos processos fisiológicos ao longo da infecção. No entanto, mais análises são

necessárias para elucidar melhor a fisiologia cardíaca no nosso modelo. Como enfatizado anteriormente há vários relatos na literatura descrevendo AHR como um importante sensor que atua no sistema imune tanto na infecção quanto na autoimunidade. Até o momento os dados do nosso grupo demonstraram que durante a infecção por *T. gondii* LXA<sub>4</sub> sinaliza via AHR e induz a expressão de SOCS2 em células dendríticas (Machado *et al.*, 2006). Na malária experimental AHR controla a produção de IL-17 e SOCS3 no cérebro. E no modelo experimental da doença de Chagas vimos que a expressão de AHR é aumentada no coração de camuundongos WT infectados por *T. cruzi*; que há aumento da expressão e translocação para o núcleo em macrófagos estimulados por TcAg; que a ausência de AHR resulta em redução da parasitemia e redução do infiltrado inflamatório e fibrose no coração apesar do aumento da produção de citocinas próinflamatórias e redução da expressão de SOCS2 (importante para a função cardíaca); que AHR provavelmente influencia mecanismos anti-oxidantes controlando a produção de ROS por macrófagos do baço e atua como um fator anti-inflamatório; e de forma controversa, a replicação do parasita *in vitro* nos macrófagos deficientes de AHR é controlada mesmo com a redução da produção de ROS.

Em conjunto, os dados do nosso grupo demonstram o envolvimento de AHR em doenças parasitárias incluindo o desconhecido papel de AHR para o sucesso replicativo do *T. cruzi* e consequente estabelecimento da infecção. Esse controle da infecção exercido por AHR ocorre já na fase inicial da infecção, indicando que provavelmente são mecanismos da imunidade inata que desempenham papel relevante nesse fenótipo (Barroso, GualdrónLópez *et al.* 2016). Já foi descrito que AHR é fundamental em células dendríticas durante a infecção experimental por *T. gondii*, pensando na importância desse receptor em infecções parasitárias, e tendo em vista a nossa hipótese de que o controle da infecção ocorre já na fase inata da resposta imune, é fundamental entendermos o papel dessas células no nosso modelo (Machado, Johndrow *et al.* 2006).

Pelo fato de AHR já ter sido descrito como molécula fundamental para a eficácia de tratamento de doenças autoimunes como a EM, Huntington e câncer (Kaye *et al.*, 2016; Megna *et al.*, 2017; Ogura *et al.*, 2017; Safe *et al.*, 2017), faz-se necessário mais estudos para a compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais AHR atua ao longo da infecção por *T. cruzi* e das doenças em que o controle da atividade desse receptor já é estudada. Com o objetivo de futuramente pesquisar e conectar todas essas questões, durante meu doutorado sanduiche, parte dos experimentos foram feitos com base no tratamento de DCs por laquinimode, composto que está em fase III de teste para o tratamento da EM, e que tem a



eficácia no controle da diferenciação de células T patogênicas de forma dependente de AHR (Kaye *et al.*, 2016).

Roquinimex (Linimod<sup>®</sup>) é um composto que foi testado para o tratamento da EM. A partir da triagem de estruturas ativas desse composto e de modificações químicas, chegou-se a descoberta do laquinimode, que em comparação ao composto original aumentou em 20 vezes a eficácia do tratamento nos modelos da EM (Thöne and Linker 2016). Quanto aos mecanismos imunológicos, sabemos que laquinimode tem parte da estrutura molecular similar a estrutura do ácido quinurêncio, que é um composto com capacidade comprovada de ativação de AHR. Sabe-se que laquinimode regula negativamente a imunogenicidade das DCs e desse modo modula a EM (Jolivel *et al.*, 2013). Entretanto ainda não se sabe se essa dependência é restrita a expressão de AHR em DCs.

Por isso, no objetivo de compreender se no mecanismo de ação do laquinimode há participação de AHR na eficácia dos efeitos do composto, inicialmente acompanhamos uma cinética de ativação de BMDCs de animais WT e avaliamos o perfil imunológico dessas células para definirmos o tempo ideal de tratamento. Nossos dados demonstraram que em BMDCs laquinimode e delaq (um dos derivados do laquinimode) não induzem um perfil fenotipicamente robusto de controle da produção de citocinas inflamatórias. Isso pode estar associado com o fato de que nessas células o tratamento com laquinimode pode alterar negativamente a expressão da molécula co-estimulatória CD86, indicando que o estímulo para maturação pode interferir na indução de células tolerogênicas semi-maturas ou células efectoras maduras (Jolivel *et al.*, 2013). Além disso, outros trabalhos já demonstraram que as BMDCs não passaram pelo estágio de diferenciação fisiológico natural e que, além disso, não possuem em suas membranas proteínas que auxiliam no *cross presentation*. Sendo assim, se o mecanismo de ação do laquinimode e delaq envolve esse processo, não poderíamos observar nessas células um perfil de expressão gênica induzido por AHR.

Apesar dos níveis de citocinas não terem sido modificados significativamente pelos tratamentos com os compostos, quando comparados aos grupos ativados por LPS, vimos que os genes *downstream* AHR, foram ativados nas BMDCs tratadas tanto com laquinimode quanto com delaq. Tal indução foi observada tanto em BMDCs imaturas, quanto em BMDCs maduras. Laquinimode também aumentou a expressão de *Il-10* e *ido*, importantes marcadores de tolerogenicidade das DCs (Nguyen *et al.*, 2010). Além disso, a expressão de *socs1* e *socs3* foi regulada positivamente em BMDCs tratadas por 6 horas com laquinimode. Já foi descrito que SOCS3 atua como um regulador negativo de STAT4 e STAT3, proteínas importantes

para a sinalização de citocinas por células T efectoras (Egwuagu e Larkin Iii, 2013), indicando que essa poderia ser mais uma via pela qual laquinimode exerce sua eficácia para o controle da inflamação.

Como o contexto de maturação das DCs é muito importante para o perfil de resposta dessas células, analisamos também a capacidade de laquinimode e delaq de ativar a via de AHR em DCs primárias não ativadas. Os resultados demonstraram aumento da expressão de *cyp1a1* e *cyp1b1* nas células WT tratadas tanto por laquinimode quanto por delaq, sendo que a ativação desses genes por delaq é maior quando comparado ao tratamento com laquinimode. Para avaliar se esse efeito era dependente de AHR, tratamos as células WT com o agonista de AHR, e também utilizamos DCs primárias de camundongos transgênicos em que a expressão de AHR está condicionada a expressão da recombinase cre. A recombinase em questão é expressa constitutivamente sob o controle do promotor de *cd11c* a integrina *alpha x* (*Itgax*). Logo, a deleção de AHR é direcionada a células que expressam CD11c. Os resultados demonstraram que com o tratamento pelos compostos, o perfil de ativação de genes *downstream* de AHR é realmente devido a expressão de AHR em DCs.

Conhecendo o tempo de ativação das DCs e sabendo que AHR está modulando a resposta imune frente ao tratamento com os compostos, analisamos o perfil de citocinas das DCs ativadas ou não, na presença ou ausência dos compostos em questão. Os dados demonstraram que IL-6 é controlada negativamente por delaq de forma dependente de AHR em DCs primárias. É conhecido que IL-6 é uma citocina pleiotrópica com múltiplas funções e que no contexto da autoimunidade, em conjunto com TGF- $\beta$ , promove a diferenciação de células Th17 e inibe a diferenciação de células Treg Foxp3<sup>+</sup> (Bettelli *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2008; Heink *et al.*, 2017). Foi descrito recentemente que um dos subtipos das DCs, as cDCs (DCs convencionais) é caracterizado pela expressão de Sirp- $\alpha$ . Nessas células Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup>, a IL-6 em vez de sinalizar pelo receptor, pode ser apresentada as células T em um processo denominado *trans-presentation*, e desse modo levar a diferenciação de células Th17. Já a IL-6 secretada é capaz de suprimir a expressão de FoxP3 em células T (Heink *et al.*, 2017).

Como descrito acima, sabe-se que o perfil de citocinas produzido pelas DCs, determina a subpopulação dessas células diferenciada. Para avaliar qual foi o perfil induzido em nosso modelo, co-cultivamos as DCs de animais WT e *Itgax*<sup>cre</sup>AHR<sup>fl</sup> que foram ativadas por LPS, MOG e tratadas com delaq, com células T DC4<sup>+</sup> de animais 2D2. Nossos dados demonstraram que a redução na expressão de IL-6 nas DCs tratadas com delaq foi

acompanhada pela redução de IL-17 por células Th17, e aumento de FoxP3 por Tregs, e que esse efeito de delaq é dependente da expressão de AHR em DCs.

Levando em conta, os dados publicados que indicam que dos tipos de DCs as cDCs são as que possuem um subgrupo (CD4<sup>+</sup>) capaz de ativar células T, e o fenótipo encontrado nos nossos experimentos, é provável que das DCs, as cDCs Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> podem ser as que desempenham maior função nesse fenótipo. Entretanto, mais análises devem ser feitas para confirmar, pois como dito, as cDCs compreendem um grupo que contem outros subgrupos de DCs que podem ser distinguidos pela expressão de Sirp- $\alpha$  e CD4, e podem apresentar perfis de resposta imunológica completamente diferentes (Mildner and Jung 2014).

Esses dados demonstram pela primeira vez que delaq modula as funções das DCs de modo dependente de AHR e compromete a ativação de subtipos de células T que influenciam no estabelecimento de doenças autoimunes. Importante ressaltar que após comprovarmos que as cDCs são de fato responsáveis pelo fenótipo observado, devemos realizar experimentos com células em que a deficiência de AHR é condicionada apenas as cDCs, para isso células de animais cre para um dos fatores de transcrição específicos de cDCs (*zbtb46*<sup>cre</sup>) cruzados com os AHR<sup>fl</sup>, devem ser utilizadas.

Dados do nosso grupo demonstraram que ligantes (metabolitos do triptofano) de AHR que foram produzidos pela microbiota intestinal de camundongos, chegam ao SNC e modulam a função de astrócitos e a função dessas células de modo a reduzir a inflamação e neurodegeneração. Vimos então que o microbioma do intestino participa de vias imunomodulatórias que controlam a autoimunidade no SNC (Rothhammer, Mascanfroni et al. 2016). Esses e outros dados da literatura tem reavivado discussões sobre a hipótese da higiene na autoimunidade (Bach 2018). As maneiras com que AHR leva a determinado fenótipo imunológico são dependentes do modo de ativação do receptor. Portanto, o mecanismo de controle exercido por AHR em uma doença, pode ser diferente do mecanismo de controle em outra. Por isso, é necessário que entendamos o mecanismo de ação desse receptor nos diferentes contextos, para que a intervenção terapeutica por meio dele seja estudada, assim como já tem sido para alguns tipos de câncer (Megna, Carney et al. 2017, Ogura, Miyauchi et al. 2017, Safe, Cheng et al. 2017).

Desse modo, com o fato de estarmos em uma era de *genome-wide association studies* e *systems biology*, que são ferramentas que nos tiram da visão reducionista e nos levam a visão do todo, temos que reconsiderar o modo de ver a ciência no contexto específico e ampliar para o contexto geral. Se pensarmos nas duas doenças estudadas nesse trabalho,

inicialmente poderíamos dizer que são completamente distintas e distantes. Entretanto, aqui demonstramos que em ambas a ativação de AHR leva principalmente a um perfil anti-inflamatório, sendo que na infecção experimental por *T. cruzi* a ativação do receptor tanto pelo parasita quanto pelo antígeno dele, leva a redução da resposta efetora, já na EAE, o composto derivado do laquinimode tem sua eficácia no controle do perfil de DCs patogênicas dependente da ativação de AHR.

Com os resultados obtidos e levando em consideração a hipótese da higiene na autoimunidade, poderíamos propor, por exemplo, a utilização de antígenos de *T. cruzi*, para a redução da resposta inflamatória na EM, lembrando que o tratamento com probióticos, microorganismos ou terapia de reposição fecal já tem sido sugerida para a prevenção de doenças autoimunes. Sendo assim, pensar no que é um organismo em sua totalidade e voltar nossa visão para um contexto geral, deve ser um hábito na ciência. Às vezes, é necessário a realização de experimentos em um contexto mais específico, e esse tem sido o alvo de grande parte das pesquisas, mas é importante sempre voltarmos ao contexto geral, principalmente agora em que existem ferramentas disponíveis para esse tipo de análises.

# CONCLUSÃO

*“I try to show the public that chemistry, biology, physics, astrophysics is life. It is not some separate subject that you have to be pulled into a corner to be taught about.”*

**Neil deGrasse Tyson**

Vimos que na ausência de AHR há redução da infecção e da inflamação cardíaca *in vivo* e de modo original vimos que AHR desempenha um papel relevante na infecção experimental por *T. cruzi*, que esse controle ocorre ainda na fase aguda da doença com atuação principal da resposta imune inata. Isso demonstra que AHR provavelmente contribui para o valor adaptativo e sucesso evolutivo do *T. cruzi*. Ainda com relação a atuação de AHR na resposta imune inata, nossos resultados demonstraram que a eficácia para o tratamento da EAE, utilizando o delaq é dependente da ativação de AHR em células dendríticas e consequente redução da polarização de células Th17 e aumento das Treg, demonstrando que AHR é de fato um forte candidato como alvo terapêutico.

## REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M. F. et al. Selective inhibition of polymorphonuclear neutrophil activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 101, n. 3, p. 470-80, Dec 1989. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2557688> >.
- AGUILERA-MONTILLA, N. et al. Aryl hydrocarbon receptor contributes to the MEK/ERK-dependent maintenance of the immature state of human dendritic cells. **Blood**, v. 121, n. 15, p. e108-17, Apr 2013. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23430108> >.
- AJAMI, B. et al. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. **Nat Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 1142-9, Sep 2011. ISSN 1546-1726. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804537> >.
- AL-OMAISHI, J.; BASHIR, R.; GENDELMAN, H. E. The cellular immunology of multiple sclerosis. **J Leukoc Biol**, v. 65, n. 4, p. 444-52, Apr 1999. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10204572> >.
- ALBERATI-GIANI, D. et al. Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression by nitric oxide and inflammatory mediators in IFN-gamma-activated murine macrophages and microglial cells. **J Immunol**, v. 159, n. 1, p. 419-26, Jul 1997. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9200481> >.

- ALBERTTI, L. A. et al. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in Trypanosoma cruzi invasion and intracellular development. **Microbes Infect**, v. 12, n. 10, p. 784---9, Sep 2010. ISSN 1769---714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20561595> >.
- ALEXANDER, W. S.; HILTON, D. J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 503---29, 2004. ISSN 0732---0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032587> >.
- ALIBERTI, J. C. et al. Interleukin---12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect Immun**, v. 64, n. 6, p. 1961---7, Jun 1996. ISSN 0019---9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8675294> >.
- ALMEIDA, E. A. et al. [Fatal evolution of Chagas'disease/Aids co---infection: diagnostic difficulties between myocarditis reactivation and chronic chagasic cardiomyopathy]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 2, p. 199---202, 2009. Mar---Apr 2009. ISSN 1678---9849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448942> >.
- ALVAREZ, M. N. et al. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage---derived cytotoxin against internalized Trypanosoma cruzi: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. **J Biol Chem**, v. 286, n. 8, p. 6627---40, Feb 2011. ISSN 1083---351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21098483> >.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014. ISSN 1935---2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25077613> >.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The Trypanosoma cruzi---host---cell interplay: location, invasion, retention. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 819---23, Oct 2005. ISSN 1740---1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16175174> >.
- ARTIS, D.; SPITS, H. The biology of innate lymphoid cells. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 293---301, Jan 2015. ISSN 1476---4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25592534> >.



BA, X. et al. Trypanosoma cruzi induces the reactive oxygen species---PARP---1---RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. **J Biol Chem**, v. 285, n. 15, p. 11596---606, Apr 2010. ISSN 1083---351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20145242> >.

BACH, J. F. The hygiene hypothesis in autoimmunity: the role of pathogens and commensals. **Nat Rev Immunol**, v. 18, n. 2, p. 105---120, Feb 2018. ISSN 1474---1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29034905> >.

BAECHER---ALLAN, C.; KASKOW, B. J.; WEINER, H. L. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. **Neuron**, v. 97, n. 4, p. 742---768, Feb 2018. ISSN 1097---4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29470968> >.

BALANÑA---FOUCE, R. et al. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. **Mol Biochem Parasitol**, v. 181, n. 2, p. 85---93, Feb 2012. ISSN 1872---9428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22033378> >.

BANKOTI, J. et al. Functional and phenotypic effects of AhR activation in inflammatory dendritic cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 246, n. 1---2, p. 18---28, Jul 2010. ISSN 1096---0333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20350561> >.

BARROSO, A. et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor modulates production of cytokines and reactive oxygen species and development of myocarditis during Trypanosoma cruzi infection. **Infect Immun**, Aug 2016. ISSN 1098---5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27481250> >.

BASSO, A. S. et al. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1532---43, Apr 2008. ISSN 0021---9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18340379> >.

BAUER, J. et al. Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neurosci Res**, v. 38, n. 4, p.

- 365---75, Jul 1994. ISSN 0360---4012.  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7932870> >.
- BAYIR, H. Reactive oxygen species. **Crit Care Med**, v. 33, n. 12 Suppl, p. S498---501, Dec 2005. ISSN 0090---3493.  
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16340433> >.
- BENSON, J. M.; SHEPHERD, D. M. Dietary ligands of the aryl hydrocarbon receptor induce anti-inflammatory and immunoregulatory effects on murine dendritic cells. **Toxicol Sci**, v. 124, n. 2, p. 327---38, Dec 2011. ISSN 1096---0929.  
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21948866> >.
- et al. Trypanosoma cruzi trans---sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR $\gamma$ t and Ahr that leads to IL---17 production by activated B cells. **Nat Immunol**, v. 14, n. 5, p. 514---22, May 2013. ISSN 1529---2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563688> >.
- BERMÚDEZ DE LEÓN, M. et al. Beta---naphthoflavone represses dystrophin Dp71 expression in hepatic cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1759, n. 3---4, p. 152---8, 2006 Mar---Apr 2006. ISSN 0006---3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730384> >.
- BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235---8, May 2006. ISSN 1476---4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648838> >.
- BETTELLI, E. et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein---specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. **J Exp Med**, v. 197, n. 9, p. 1073---81, May 2003. ISSN 0022---1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12732654> >.
- BOVERHOF, D. R. et al. 2,3,7,8---Tetrachlorodibenzo---p---dioxin induces suppressor of cytokine signaling 2 in murine B cells. **Mol Pharmacol**, v. 66, n. 6, p. 1662---70, Dec 2004. ISSN 0026---895X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15371557> >.
- BRANT, F. et al. Immune response profile and development of pathology during Plasmodium berghei Anka infection: the role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). **Infect**

- Immun, May 2014. ISSN 1098---5522. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24818665> >.
- BRÜCK, W.; WEGNER, C. Insight into the mechanism of  
 laquinimod action. **J Neurol Sci**, v. 306, n.  
 1---2, p. 173---9, Jul 2011. ISSN  
 1878---5883. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21429524> >.
- CAMACHO, I. A.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. S. 2,3,7,8---  
 Tetrachlorodibenzo---p---dioxin (TCDD) induces Fas---dependent  
 activation---induced cell death in superantigen---primed T cells.  
**Arch Toxicol**, v. 76, n. 10, p.  
 570---80, Oct 2002. ISSN 0340---5761.  
 Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12373453> >.
- CARDILLO, F. et al. Regulation of Trypanosoma cruzi  
 infection in mice by gamma interferon and interleukin 10:  
 role of NK cells. **Infect Immun**, v. 64, n. 1, p.  
 128---34, Jan 1996. ISSN 0019---9567. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8557330> >.
- CARREIRA, V. S. et al. Disruption of Ah Receptor  
 Signaling during Mouse Development Leads to Abnormal Cardiac  
 Structure and Function in the Adult. **PLoS One**, v. 10,  
 n. 11, p. e0142440, 2015. ISSN 1932---6203. Disponível em:  
 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26555816> >.
- CHAGAS, C. **Nova Tripanosomíaze Humana: Estudos sobre a morfologia  
 e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de  
 uma nova entidade mórbida do homem.:** Mem. Inst.  
 Oswaldo Cruz: 159---218 p. 1909. **CHOI, Y. Role of TRAF6 in  
 the immune system. Adv Exp Med Biol**, v. 560, p.  
 77---82, 2005. ISSN 0065---2598. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932023> >.
- COMPSTON, A.; COLES, A. Multiple sclerosis. **Lancet**,  
 v. 372, n. 9648, p. 1502---17, Oct 2008. ISSN 1474---547X.  
 Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18970977> >.
- COURA, J. R.; CASTRO, S. L. D. **A critical review  
 on Chagas disease chemotherapy.** Rio de Janeiro:  
 Mem Inst Oswald Cruz. 97: 3---24 p. 2002.
- DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S.  
 Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction. **Int J**

- Cell ISSN 1687---8884. Biol, v. 2010, Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811486> >.
- DELGADO---ORTEGA, M. et al. SOCS proteins in infectious diseases of mammals. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 151, n. 1---2, p. 1---19, Jan 2013. ISSN 1873---2534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23219158> >.
- DENISON, M. S.; FISHER, J. M.; WHITLOCK, J. P. Inducible, receptor---dependent protein---DNA dioxin---responsive transcriptional enhancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 8, p. 2528---32, Apr 1988a. ISSN 0027---8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2833743> >.
- DENISON, M. S. et al. The DNA recognition site for the dioxin---Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. **J Biol Chem**, v. 263, n. 33, p. 17221---4, Nov 1988b. ISSN 0021--9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2846558> >.
- DENISON, M. S. et al. Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. **Toxicol Sci**, v. 124, n. 1, p. 1---22, Nov 2011. ISSN 1096---0929. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21908767> >.
- DIAS, L. C. E. A. **Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos.** Quimica Nova. 32: 2444---1457 p. 2009.
- DIETRICH, C. Antioxidant Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor. **Stem Cells Int**, v. 2016, p. 7943495, 2016. ISSN 1687---966X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27829840> >.
- DONG, L.; MA, Q.; WHITLOCK, J. P. Down---regulation of major histocompatibility complex Q1b gene expression by 2,3,7,8---tetrachlorodibenzo---p---dioxin. **J Biol Chem**, v. 272, n. 47, p. 29614---9, Nov 1997. ISSN 0021---9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9368027> >.
- DOOLEY, R. K.; HOLSAPPLE, M. P. Elucidation of cellular targets responsible for tetrachlorodibenzo---p---dioxin (TCDD)---induced suppression of antibody responses: I. The role of the

- B lymphocyte. **Immunopharmacology**, v. 16, n. 3, p. 167---80, 1988 Nov---Dec 1988. ISSN 0162---3109. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3267010> >. DORING, A.; YONG, V. W. The good, the bad and the ugly. Macrophages/microglia with a focus on myelin repair. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 3, p. 846---56, 2011. ISSN 1945---0524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622236> >.
- DÄUBENER, W. et al. Induction of toxoplasmosis in a human glioblastoma by interferon gamma. **J Neuroimmunol**, v. 43, n. 1---2, p. 31---8, Mar 1993. ISSN 0165---5728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8384636> >.
- EGWUAGU, C. E.; LARKIN III, J. Therapeutic targeting of STAT pathways in CNS autoimmune diseases. **JAKSTAT**, v. 2, n. 1, p. e24134, Jan 2013. ISSN 2162---3988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24058800> >.
- ELIZONDO, G. et al. Deletion of the aryl hydrocarbon receptor enhances the inflammatory response to Leishmania major infection. **Int J Biol Sci**, v. 7, n. 9, p. 1220---9, 2011. ISSN 1449---2288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22110376> >.
- ESPER, L. et al. Role of SOCS2 in modulating heart damage and function in a murine model of acute Chagas disease. **Am J Pathol**, v. 181, n. 1, p. 130---40, Jul 2012. ISSN 1525---2191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22658486> >.
- ESPER, L. et al. Molecular mechanisms of myocarditis caused by Trypanosoma cruzi. **Curr Opin Infect Dis**, v. 28, n. 3, p. 246---52, Jun 2015. ISSN 1473---6527. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25887609> >.
- ESSER, C.; RANNUG, A. The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology. **Pharmacol Rev**, v. 67, n. 2, p. 259---79, 2015. ISSN 1521---0081. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25657351> >.
- FABRINO, D. L. et al. Rat models to investigate host macrophage defense against Trypanosoma cruzi. **J Innate Immun**, v. 3, n. 1, p. 71---82, 2011. ISSN 1662---8128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21051863> >.

FERNANDEZ---SALGUERO, P. et al. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin---binding Ah receptor. **Science**, v. 268, n. 5211, p. 722---6, May 1995. ISSN 0036---8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7732381> >.

FERREIRA, M. L. et al. [Epidemiology of 118 cases of multiple sclerosis after 15 years of follow---up on the reference center of Hospital da Restauração, Recife, Pernambuco, Brazil]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 62, n. 4, p. 1027---32, Dec 2004. ISSN 0004---282X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15608964> >.

FIFE, B. T. et al. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Exp Med**, v. 192, n. 6, p. 899---905, Sep 2000. ISSN 0022---1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10993920> >.

FRAGOSO, Y. D.; FIORE, A. P. Description and characteristics of 81 patients attending the Reference Center for Multiple Sclerosis of the coastal region of the state of São Paulo---Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 63, n. 3B, p. 741---4, Sep 2005. ISSN 0004---282X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16258647> >.

FRERICKS, M.; MEISSNER, M.; ESSER, C. Microarray analysis of the AHR system: tissue---specific flexibility in signal and target genes. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 220, n. 3, p. 320---32, May 2007. ISSN 0041---008X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17350064> >.

FRIESE, M. A. et al. The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. **Brain**, v. 129, n. Pt 8, p. 1940---52, Aug 2006. ISSN 1460---2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16636022> >.

FUNATAKE, C. J. et al. Expression of constitutively---active aryl hydrocarbon receptor in T---cells enhances the down---regulation of CD62L, but does not alter expression of CD25 or suppress the allogeneic CTL response. **J Immunotoxicol**, v. 6, n. 3, p. 194---203, Sep 2009. ISSN 1547---6901. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635034> >.

FUNATAKE, C. J. et al. Early consequences of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on the activation and survival of antigen-specific T cells. **Toxicol Sci**, v. 82, n. 1, p. 129-42, Nov 2004. ISSN 1096-6080. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15310856> >.

FUNATAKE, C. J. et al. Cutting edge: activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of CD4+ CD25+ cells with characteristics of regulatory T cells. **J Immunol**, v. 175, n. 7, p. 4184-8, Oct 2005. ISSN 0022-1767. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177056> >.

GEISSMANN, F. et al. Development of macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-61, Feb 2010. ISSN 1095-9203. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133564> >.

GOES, G. R. et al. Trypanosoma cruzi Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 4, p. e0004555, Apr 2016. ISSN 1935-2735. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27035573> >.

GOLDHABER, J. I. et al. Effects of TNF-alpha on [Ca2+]i and contractility in isolated adult rabbit ventricular myocytes. **Am J Physiol**, v. 271, n. 4 Pt 2, p. H1449-55, Oct 1996. ISSN 0002-9513. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8897939> >.

GOVERMAN, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 6, p. 393-407, Jun 2009. ISSN 1474-1741. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19444307> >.

GRIGORIADIS, N.; VAN PESCH, V.; GROUP, P. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. **Eur J Neurol**, v. 22 Suppl 2, p. 3-13, Oct 2015. ISSN 1468-1331. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26374508> >.

GUPTA, S. et al. ROS signalling of inflammatory cytokines during Trypanosoma cruzi infection. **Adv**

- Parasitol, v. 76, p. 153---70,  
2011. ISSN 0065---308X. Disponible em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884891> >.
- GUTIÉRREZ---VÁZQUEZ, C.; QUINTANA, F. J. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. **Immunity**, v. 48, n. 1, p. 19---33, Jan 2018. ISSN 1097---4180. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29343438> >.
- HAHN, M. E. et al. Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 25, p. 13743---8, Dec 1997. ISSN 0027---8424. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9391097> >.
- HEINK, S. et al. Trans---presentation of IL---6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic T. **Nat Immunol**, v. 18, n. 1, p. 74---85, 01 2017. ISSN 1529---2916. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27893700> >.
- HJELMSTRÖM, P. et al. B---cell---deficient mice develop experimental allergic encephalomyelitis with demyelination after myelin oligodendrocyte glycoprotein sensitization. **J Immunol**, v. 161, n. 9, p. 4480---3, Nov 1998. ISSN 0022---1767. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794370> >.
- HUANG, H. et al. Activation of transcription factors AP---1 and NF---kappa B in murine Chagasic myocarditis. **Infect Immun**, v. 71, n. 5, p. 2859---67, May 2003. ISSN 0019---9567. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704159> >.
- HUCKE, C. et al. Nitric oxide---mediated regulation of gamma interferon---induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3---dioxygenase. **Infect Immun**, v. 72, n. 5, p. 2723---30, May 2004. ISSN 0019---9567. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102781> >.
- JACKSON, D. P.; JOSHI, A. D.; ELFERINK, C. J. Ah Receptor Pathway Intricacies; Signaling Through Diverse Protein Partners and DNA---Motifs. **Toxicol Res (Camb)**, v. 4, n. 5, p. 1143---1158, Sep 2015. ISSN 2045---452X. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26783425> >.



- JARONEN, M.; QUINTANA, F. J. Immunological Relevance of the Coevolution of IDO1 and AHR. **Front Immunol**, v. 5, p. 521, 2014. ISSN 1664---3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25368620> >.
- JIN, G. B. et al. New insights into the role of the aryl hydrocarbon receptor in the function of CD11c<sup>+</sup> cells during respiratory viral infection. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 6, p. 1685---98, Jun 2014. ISSN 1521---4141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24519489> >.
- JOLIVEL, V. et al. Modulation of dendritic cell properties by laquinimod as a mechanism for modulating multiple sclerosis. **Brain**, v. 136, n. Pt 4, p. 1048---66, Apr 2013. ISSN 1460---2156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23518712> >.
- KATZ---LEVY, Y. et al. Temporal development of autoreactive Th1 responses and endogenous presentation of self myelin epitopes by central nervous system---resident APCs in Theiler's virus---infected mice. **J Immunol**, v. 165, n. 9, p. 5304---14, Nov 2000. ISSN 0022---1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11046065> >.
- KAYE, J. et al. Laquinimod arrests experimental autoimmune encephalomyelitis by activating the aryl hydrocarbon receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 41, p. E6145---E6152, 10 2016. ISSN 1091---6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27671624> >.
- KERKVLIIET, N. I. AHR---mediated immunomodulation: the role of altered gene transcription. **Biochem Pharmacol**, v. 77, n. 4, p. 746---60, Feb 2009. ISSN 1873---2968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19100241> >.
- KILE, B. T. et al. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. **Trends Biochem Sci**, v. 27, n. 5, p. 235---41, May 2002. ISSN 0968---0004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076535> >.
- KIMURA, A. et al. Aryl hydrocarbon receptor protects against bacterial infection by promoting macrophage survival and reactive oxygen species production. **Int Immunol**, v. 26, n. 4, p. 209---20, Apr 2014. ISSN 1460---2377. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24343818> >.

KIMURA, A. et al. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 28, p. 9721---6, Jul 2008. ISSN 1091---6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18607004> >.

KNUBEL, C. P. et al. Indoleamine 2,3---dioxigenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*. **FASEB J**, v. 24, n. 8, p. 2689---701, Aug 2010. ISSN 1530---6860. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233946> >.

KOBAYASHI, K.; HAYASHI, K.; SONO, M. Effects of tryptophan and pH on the kinetics of superoxide radical binding to indoleamine 2,3---dioxigenase studied by pulse radiolysis. **J Biol Chem**, v. 264, n. 26, p. 15280---3, Sep 1989. ISSN 0021---9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2549057> >.

KOOY, N. W. et al. Peroxynitrite---mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. **Free Radic Biol Med**, v. 16, n. 2, p. 149---56, Feb 1994. ISSN 0891---5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8005510> >.

KOTTER, M. R. et al. Macrophage---depletion induced impairment of experimental CNS remyelination is associated with a reduced oligodendrocyte progenitor cell response and altered growth factor expression. **Neurobiol Dis**, v. 18, n. 1, p. 166---75, Feb 2005. ISSN 0969---9961. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15649707> >.

KROWN, K. A. et al. TNF alpha receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF alpha inhibition of L---type Ca<sup>2+</sup> current and Ca<sup>2+</sup> transients. **FEBS Lett**, v. 376, n. 1---2, p. 24---30, Nov 1995. ISSN 0014---5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521959> >.

KUMAR, D. R. et al. Jean---Martin Charcot: the father of neurology. **Clin Med Res**, v. 9, n. 1, p. 46---9, Mar 2011. ISSN 1554---6179. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20739583> >.

KUTZELNIGG, A. et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. **Brain**, v. 128, n. Pt 11, p. 2705---12, Nov 2005. ISSN 1460---2156. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16230320> >.

LAHVIS, G. P. et al. Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 19, p. 10442-7, Sep 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973493> >.

LASSMANN, H. Multiple Sclerosis Pathology. **Cold Spring Harb Perspect Med**, Jan 2018. ISSN 2157-1422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29358320> >.

LAUCELLA, S. A. et al. Frequency of interferon-gamma producing T cells specific for Trypanosoma cruzi inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. **J Infect Dis**, v. 189, n. 5, p. 909-18, Mar 2004. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14976609> >.

LEBAR, R. et al. Studies on autoimmune encephalomyelitis in the guinea pig. II. An in vitro investigation on the nature, properties, and specificity of the serum-demyelinating factor. **J Immunol**, v. 116, n. 5, p. 1439-46, May 1976. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/58035> >.

LEE, H. U. et al. Host-microbiome interactions: the aryl hydrocarbon receptor and the central nervous system. **J Mol Med (Berl)**, v. 95, n. 1, p. 29-39, Jan 2017. ISSN 1432-1440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27858116> >.

LIOCHEV, S. I.; FRIDOVICH, I. Reversal of the superoxide dismutase reaction revisited. **Free Radic Biol Med**, v. 34, n. 7, p. 908-10, Apr 2003. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654479> >.

LÜHDER, F. et al. Laquinimod enhances central nervous system barrier functions. **Neurobiol Dis**, v. 102, p. 60-69, Jun 2017. ISSN 1095-953X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28235673> >.

MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 6, p. 753-70, Nov 2012. ISSN 1863-2300. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23076807> >.

MACHADO, F. S. et al. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nat Med**, v. 12, n. 3, p. 330-4, Mar 2006. ISSN 1078-8956. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415877> < >.

MACHADO, F. S. et al. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, n. 24, p. 1524-4539, 3003-8, Dec 2000. ISSN 1524-4539. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113053> < >.

MACKENZIE, C. R.; HADDING, U.; DÄUBENER, W. Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. **J Infect Dis**, v. 178, n. 3, p. 875-8, Sep 1998. ISSN 0022-1899. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9728563> < >.

MACKENZIE, C. R. et al. Growth inhibition of multiresistant enterococci by interferon-gamma-activated human uro-epithelial cells. **J Med Microbiol**, v. 48, n. 10, p. 935-41, Oct 1999. ISSN 0022-2615. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10510970> < >.

MARCHAND, A.; BAROUKI, R.; GARLATTI, M. Regulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression by CYP1A1 activity. **Mol Pharmacol**, v. 65, n. 4, p. 1029-37, Apr 2004. ISSN 0026-895X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044633> < >.

MARTEY, C. A. et al. The aryl hydrocarbon receptor is a regulator of cigarette smoke induction of the cyclooxygenase and prostaglandin pathways in human lung fibroblasts. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 289, n. 3, p. L391-9, Sep 2005. ISSN 1040-0605. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863442> < >.

MASUDA, K. et al. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates LPS-induced IL-6 production through suppression of histamine production in macrophages. **Int Immunol**, v. 23, n. 10, p. 637-45, Oct 2011. ISSN 1460-2377. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21930594> < >.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; NÚÑEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem**,

v. 32, n. 8, p. 595---603, Nov 1999. ISSN 0009---9120.  
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10638941> >.

MAYO, L.; QUINTANA, F. J.; WEINER, H. L. The innate immune system in demyelinating disease. **Immunol Rev**, v. 248, n. 1, p. 170---87, Jul 2012. ISSN 1600---065X.  
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22725961> >.

MBONGUE, J. et al. The role of dendritic cells in tissue---specific autoimmunity. **J Immunol Res**, v. 2014, p. 857143, 2014. ISSN 2314---7156.  
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24877157> >.

MCBERRY, C. et al. SOCS2---induced proteasome---dependent TRAF6 degradation: a common anti---inflammatory pathway for control of innate immune responses. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38384, 2012. ISSN 1932---6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693634> >.

MCCMAHON, E. J. et al. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. **Nat Med**, v. 11, n. 3, p. 335---9, Mar 2005. ISSN 1078---8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15735651> >.

MEGNA, B. W. et al. The aryl hydrocarbon receptor as an antitumor target of synthetic curcuminoids in colorectal cancer. **J Surg Res**, v. 213, p. 16---24, Jun 2017. ISSN 1095---8673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28601309> >.

MENNA---BARRETO, R. F.; DE CASTRO, S. L. The Double---Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 614014, 2014. ISSN 2314---6141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24800243> >.  
MEZRICH, J. D. et al. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. **J Immunol**, v. 185, n. 6, p. 3190---8, Sep 2010. ISSN 1550---6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20720200> >.

MILDNER, A.; JUNG, S. Development and function of dendritic cell subsets. **Immunity**, v. 40, n. 5, p. 642---56, May 2014. ISSN 1097---4180.  
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24837101> >.

MILLER, S. D.; KARPUS, W. J. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. **Curr Protoc Immunol**, v. Chapter 15, p. Unit 15.1, May 2007. ISSN 1934---368X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18432984> >.

MILLER, S. D. et al. Virus-induced autoimmunity: epitope spreading to myelin autoepitopes in Theiler's virus infection of the central nervous system. **Adv Virus Res**, v. 56, p. 199---217, 2001. ISSN 0065---3527. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11450300> >.

MISHRA, M. K. et al. Laquinimod reduces neuroaxonal injury through inhibiting microglial activation. **Ann Clin Transl Neurol**, v. 1, n. 6, p. 409---22, Jun 2014. ISSN 2328---9503. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25356411> >.

MOURA---ALVES, P. et al. AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence. **Nature**, v. 512, n. 7515, p. 387---92, Aug 2014. ISSN 1476---4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25119038> >.

N'DIAYE, M. et al. Aryl hydrocarbon receptor--- and calcium---dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo[a]pyrene. **J Biol Chem**, v. 281, n. 29, p. 19906---15, Jul 2006. ISSN 0021---9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16679317> >.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 16, p. 8841---8, Aug 2000. ISSN 0027---8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10922044> >.

NEBERT, D. W. The Ah locus. A gene with possible importance in cancer predictability. **Arch Toxicol Suppl**, v. 3, p. 195---207, 1980. ISSN 0171---9750. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6994686> >.

NEUBERT, R. et al. Chlorinated dibenzo---p---dioxins and dibenzofurans and the human immune system. 1. Blood cell receptors in volunteers with moderately increased body burdens. **Life Sci**, v.

- 53, n. 26, p. 1995---2006,  
1993. ISSN 0024---3205. Disponible em:  
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8255162> >.
- NEBERT, D. W. et al. The Ah phenotype. Survey of forty---eight rat strains and twenty inbred mouse strains. **Genetics**, v. 100, n. 1, p. 79---87, Jan 1982. ISSN 0016---6731. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7095422> >.
- et al. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine---dependent mechanism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 46, p. 19961---6, Nov 2010. ISSN 1091---6490. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21041655> >.
- NGUYEN, N. T. et al. Aryl hydrocarbon receptor and kynurenine: recent advances in autoimmune disease research. **Front Immunol**, v. 5, p. 551, 2014. ISSN 1664---3224. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25400638> >.
- NISHIMURA, N. et al. Altered thyroxin and retinoid metabolic response to 2,3,7,8---tetrachlorodibenzo---p---dioxin in aryl hydrocarbon receptor---null mice. **Arch Toxicol**, v. 79, n. 5, p. 260---7, May 2005. ISSN 0340---5761. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15902423> >.
- NOHARA, K. et al. Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed specifically in T---lineage cells causes thymus involution and suppresses the immunization---induced increase in splenocytes. **J Immunol**, v. 174, n. 5, p. 2770---7, Mar 2005. ISSN 0022---1767. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728486> >.
- NOVAIS, F. O. et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of Leishmania braziliensis by reactive oxygen species. **J Infect Dis**, v. 209, n. 8, p. 1288---96, Apr 2014. ISSN 1537---6613. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24403561> >.
- OBREGON, C. et al. Update on Dendritic Cell---Induced Immunological and Clinical Tolerance. **Front Immunol**, v. 8, p. 1514, 2017. ISSN 1664---3224. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29250057> >.

- OESCH---BARTLOMOWICZ, B. et al. Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 26, p. 9218---23, Jun 2005. ISSN 0027---8424. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972329> >.
- OGURA, J. et al. Carbidopa is an activator of aryl hydrocarbon receptor with potential for cancer therapy. **Biochem J**, v. 474, n. 20, p. 3391---3402, 09 2017. ISSN 1470---8728. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28963435> >.
- OKEY, A. B. et al. Temperature---dependent cytosol---to---nucleus translocation of the Ah receptor for 2,3,7,8---tetrachlorodibenzo---p---dioxin in continuous cell culture lines. **J Biol Chem**, v. 255, n. 23, p. 11415---22, Dec 1980. ISSN 0021---9258. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6254968> >.
- PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 315---424, Jan 2007. ISSN 0031---9333. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237348> >.
- PAIVA, C. N.; BOZZA, M. T. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 6, p. 1000---37, Feb 2014. ISSN 1557---7716. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23992156> >.
- PAIVA, C. N. et al. Oxidative stress fuels Trypanosoma cruzi infection in mice. **J Clin Invest**, v. 122, n. 7, p. 2531---42, Jul 2012. ISSN 1558---8238. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22728935> >.
- PARNELL, G. P.; BOOTH, D. R. The Multiple Sclerosis (MS) Genetic Risk Factors Indicate both Acquired and Innate Immune Cell Subsets Contribute to MS Pathogenesis and Identify Novel Therapeutic Opportunities. **Front Immunol**, v. 8, p. 425, 2017. ISSN 1664---3224. Disponible em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28458668> >.
- PETRULIS, J. R. et al. The hsp90 Co---chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. **J Biol Chem**, v. 278, n. 4, p. 2677---85, Jan 2003.



ISSN 0021---9258. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12431985> >.

PFEFFERKORN, E. R. Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 3, p. 908---12, Feb 1984. ISSN 0027---8424. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6422465> >.

PIACENZA, L. et al. Peroxiredoxins play a major role in protecting Trypanosoma cruzi against macrophage--- and endogenously---derived peroxynitrite. **Biochem J**, v. 410, n. 2, p. 359---68, Mar 2008. ISSN 1470---8728. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17973627> >.

POLAND, A.; GLOVER, E.; KENDE, A. S. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8---tetrachlorodibenzo---p---dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. **J Biol Chem**, v. 251, n. 16, p. 4936---46, Aug 1976. ISSN 0021---9258. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/956169> >.

POLAND, A. P. et al. Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity. Induction of monooxygenase activities and cytochrome P1---450 formation by 2,3,7,8---tetrachlorodibenzo---p---dioxin in mice genetically "nonresponsive" to other aromatic hydrocarbons. **J Biol Chem**, v. 249, n. 17, p. 5599---606, Sep 1974. ISSN 0021---9258. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4370044> >.

PUNUKOLLU, G. et al. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **Int J Cardiol**, v. 115, n. 3, p. 279---83, Feb 2007. ISSN 1874---1754. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16769134> >.

QIU, J. et al. Group 3 innate lymphoid cells inhibit T---cell---mediated intestinal inflammation through aryl hydrocarbon receptor signaling and regulation of microflora. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 386---99, Aug 2013. ISSN 1097---4180. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23954130> >.

QIU, J. et al. The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid

cells. **Immunity**, v. 36, n. 1, p. 92---104, Jan 2012.  
 ISSN 1097---4180. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22177117> >.

QUINTANA, F. J. Regulation of central nervous system autoimmunity by the aryl hydrocarbon receptor. **Semin Immunopathol**, v. 35, n. 6, p. 627---35, Nov 2013a.  
 ISSN 1863---2300. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23999753> >.

QUINTANA, F. J. The aryl hydrocarbon receptor: a molecular pathway for the environmental control of the immune response. **Immunology**, v. 138, n. 3, p. 183---9, Mar 2013b. ISSN 1365---2567. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190340> >.

QUINTANA, F. J. et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v. 453, n. 7191, p. 65---71, May 2008. ISSN 1476---4687. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18362915> >.

QUINTANA, F. J. et al. An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 48, p. 20768---73, Nov 2010. ISSN 1091---6490. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21068375> >.

QUINTANA, F. J.; SHERR, D. H. Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. **Pharmacol Rev**, v. 65, n. 4, p. 1148---61, Oct 2013. ISSN 1521---0081. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23908379> >.

RAMAGOPALAN, S. V. et al. Congenital abnormalities and multiple sclerosis. **BMC Neurol**, v. 10, p. 115, Nov 2010. ISSN 1471---2377. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21080921> >.

RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clin Cardiol**, v. 23, n. 12, p. 883---9, Dec 2000. ISSN 0160---9289. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11129673> >.

RASSI, A.; MARIN, J. A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 224---235, Mar 2017. ISSN 1678---8060. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28225900> >.

REED, S. G. et al. IL---10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 153, n. 7, p. 3135---40, Oct 1994. ISSN 0022---1767. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8089491> >.

REIS E SOUSA, C. Dendritic cells in a mature age. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 6, p. 476---83, Jun 2006. ISSN 1474---1733. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16691244> >.

RIBEIRO, A. L. et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nat Rev Cardiol**, v. 9, n. 10, p. 576---89, Oct 2012. ISSN 1759---5010. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847166> >.

ROMAN---CAMPOS, D. et al. Cardiac structural changes and electrical remodeling in a thiamine--deficiency model in rats. **Life Sci**, v. 84, n. 23---24, p. 817---24, Jun 2009. ISSN 1879---0631. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345230> >.

et al. Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. **Nat Med**, v. 22, n. 6, p. 586---97, Jun 2016. ISSN 1546---170X. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27158906> >.

SAFE, S.; CHENG, Y.; JIN, U. H. The Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) as a Drug Target for Cancer Chemotherapy. **Curr Opin Toxicol**, v. 2, p. 24---29, Feb 2017. ISSN 2468---2934. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28459113> >.

SANCHEZ, Y. et al. The unexpected role for the aryl hydrocarbon receptor on susceptibility to experimental toxoplasmosis. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 505694,

2010. ISSN 1110---7251. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20111744> >.
- SAWCER, S. et al. Genetic risk and a primary role for cell---mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. **Nature**, v. 476, n. 7359, p. 214---9, Aug 2011. ISSN 1476---4687. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21833088> >.
- SCHALDACH, C. M.; RIBY, J.; BJELDANES, L. F. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. **Biochemistry**, v. 38, n. 23, p. 7594---600, Jun 1999. ISSN 0006---2960. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10360957> >.
- SCHAPIRO, R. T. The symptomatic management of multiple sclerosis. **Ann Indian Acad Neurol**, v. 12, n. 4, p. 291---5, Oct 2009. ISSN 1998---3549. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20182577> >.
- SCHULTE, K. W. et al. Structural Basis for Aryl Hydrocarbon Receptor---Mediated Gene Activation. **Structure**, v. 25, n. 7, p. 1025---1033.e3, Jul 2017. ISSN 1878---4186. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28602820> >.
- SHEPHERD, D. M. et al. Anti---CD40 Treatment of 2,3,7,8---tetrachlorodibenzo---p---dioxin (TCDD)--exposed C57Bl/6 mice induces activation of antigen presenting cells yet fails to overcome TCDD--induced suppression of allograft immunity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 170, n. 1, p. 10---22, Jan 2001. ISSN 0041---008X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11141351> >.
- SHI, L. Z. et al. The aryl hydrocarbon receptor is required for optimal resistance to Listeria monocytogenes infection in mice. **J Immunol**, v. 179, n. 10, p. 6952---62, Nov 2007. ISSN 0022---1767. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982086> >.
- SILVA, J. S.; MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Front Biosci**, v. 8, p. s314---25, May 2003. ISSN 1093---4715. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12877141> >.
- SILVA, J. S. et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental Trypanosoma cruzi infection. **J Exp Med**, v. 175, n. 1, p. 169---74, Jan 1992. ISSN

- 0022---1007. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730915> >.
- SILVA, J. S. et al. 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**, v. 63, n. 12, p. 4862---7, Dec 1995. ISSN 0019---9567. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7591147> >.
- SIMPSON, S. et al. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta---analysis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 82, n. 10, p. 1132---41, Oct 2011. ISSN 1468---330X. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21478203> >.
- SINGH, N. P.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. Primary peripheral T cells become susceptible to 2,3,7,8---tetrachlorodibenzo---p---dioxin---mediated apoptosis in vitro upon activation and in the presence of dendritic cells. **Mol Pharmacol**, v. 73, n. 6, p. 1722---35, Jun 2008. ISSN 1521---0111. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18334599> >.
- SLAVIN, A. et al. Induction of a multiple sclerosis---like disease in mice with an immunodominant epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein. **Autoimmunity**, v. 28, n. 2, p. 109---20, 1998. ISSN 0891---6934. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9771980> >.
- SONG, J. et al. A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 23, p. 14694---9, Nov 2002. ISSN 0027---8424. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12409613> >.
- STADELMANN, C. et al. BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? **Brain**, v. 125, n. Pt 1, p. 75---85, Jan 2002. ISSN 0006---8950. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834594> >.
- STEJSKALOVA, L.; DVORAK, Z.; PAVEK, P. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. **Curr Drug Metab**, v. 12, n. 2, p. 198---212, Feb 2011. ISSN 1875---5453. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21395538> >.

- STOCKINGER, B. et al. The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 403---32, 2014. ISSN 1545---3278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24655296> >.
- SVEJGAARD, A. The immunogenetics of multiple sclerosis. **Immunogenetics**, v. 60, n. 6, p. 275---86, Jun 2008. ISSN 0093---7711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18461312> >.
- TANOWITZ, H. B. et al. Chagas' disease. **Clin Microbiol Rev**, v. 5, n. 4, p. 400---19, Oct 1992. ISSN 0893---8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1423218> >.
- TARLETON, R. L. Immune system recognition of Trypanosoma cruzi. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 4, p. 430---4, Aug 2007. ISSN 0952---7915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651955> >.
- TAVERNIER, S. J. et al. Isolation of Splenic Dendritic Cells Using Fluorescence---activated Cell Sorting. **Bio Protoc**, v. 5, n. 5, Mar 2015. ISSN 2331---8325. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27376108> >.
- TEIXEIRA, A. R. et al. Chagas disease. **Postgrad Med J**, v. 82, n. 974, p. 788---98, Dec 2006. ISSN 1469---0756. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17148699> >.
- et al. In vivo susceptibility to benznidazole of Trypanosoma cruzi strains from the western Brazilian Amazon. **Trop Med Int Health**, v. 18, n. 1, p. 85---95, Jan 2013. ISSN 1365---3156. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23130989> >.
- THOMAS, S. R.; MOHR, D.; STOCKER, R. Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3---dioxygenase activity in interferon---gamma primed mononuclear phagocytes. **J Biol Chem**, v. 269, n. 20, p. 14457---64, May 1994. ISSN 0021---9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7514170> >.
- THÖNE, J.; LINKER, R. A. Laquinimod in the treatment of multiple sclerosis: a review of the data so far. **Drug Des Devel Ther**, v. 10, p. 1111---8, 2016. ISSN 1177---8881. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27042003> >.

TONN, T. et al. Persistence of decreased T--helper cell function in industrial workers 20 years after exposure to 2,3,7,8--tetrachlorodibenzo--p--dioxin. **Environ Health Perspect**, v. 104, n. 4, p. 422--6, Apr 1996. ISSN 0091--6765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8732953> >.

TORRICO, F. et al. Endogenous IFN--gamma is required for resistance to acute Trypanosoma cruzi infection in mice. **J Immunol**, v. 146, n. 10, p. 3626--32, May 1991. ISSN 0022--1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1902858> >.

TREBST, C. et al. CCR1+/CCR5+ mononuclear phagocytes accumulate in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. **Am J Pathol**, v. 159, n. 5, p. 1701--10, Nov 2001. ISSN 0002--9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11696431> >.

VECCHI, A. et al. The effect of acute administration of 2,3,7,8--tetrachlorodibenzo--p--dioxin (TCDD) on humoral antibody production and cell--mediated activities in mice. **Arch Toxicol Suppl**, v. 4, p. 163--5, 1980. ISSN 0171--9750. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6933896> >.

VELDHOEN, M. et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17--cell--mediated autoimmunity to environmental toxins. **Nature**, v. 453, n. 7191, p. 106--9, May 2008. ISSN 1476--4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18362914> >.

VELDHOEN, M. et al. Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4+ T cells. **J Immunol**, v. 176, n. 10, p. 6202--10, May 2006. ISSN 0022--1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16670330> >.

VOGEL, C. F. et al. Cross--talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: a role for nuclear factor--kB. **J Biol Chem**, v. 289, n. 3, p. 1866--75, Jan 2014. ISSN 1083--351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24302727> >.

WEGNER, C. et al. Laquinimod interferes with migratory capacity of T cells and reduces IL--17 levels, inflammatory demyelination and acute axonal damage in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmunol**, v. 227, n. 1--2, p. 133--43, Oct 2010. ISSN

1872--8421. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20684995> >.

WEINER, H. L. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. **J Neurol**, v. 255 Suppl 1, p. 3--11, Mar 2008. ISSN 0340--5354. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18317671> >.

WHO, W. H. O. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2014. Disponível em: <  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> >. Acesso em: July 27th, 2014.

YANG, J. S. et al. Laquinimod (ABR--215062) suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, modulates the Th1/Th2 balance and induces the Th3 cytokine TGF--beta in Lewis rats. **J Neuroimmunol**, v. 156, n. 1--2, p. 3--9, Nov 2004. ISSN 0165--5728. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15465591> >.

ZHANG, H. et al. Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. **J Transl Med**, v. 12, p. 125, May 2014. ISSN 1479--5876. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24886492> >.

XU, Y. et al. Differential development of murine dendritic cells by GM--CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. **J Immunol**, v. 179, n. 11, p. 7577--84, Dec 2007. ISSN 0022--1767. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025203> >.