

Universidade Federal de Minas Gerais  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Clínica Médica  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical  
Departamento de Bioquímica e Imunologia - ICB

FUNÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DURANTE A  
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma cruzi*: PAPEL DE  
SOCS2

Lísia Maria Esper

Belo Horizonte

2016

Lísia Maria Esper

FUNÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DURANTE A  
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma cruzi*: PAPEL DE  
SOCS2

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

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

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle da Glória de Souza

Belo Horizonte

2016

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

## **REITOR**

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

## **VICE-REITORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Regina Goulart Almeida

## **PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

## **PRÓ-REITORA DE PESQUISA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adéline Martha dos Reis

## **DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA**

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

## **VICE-DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA**

Prof. Dr. Humberto José Alves

## **COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Luiz Armando Cunha de Marco

## **SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Cortes Gama

## **CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

Prof. Dr. Unai Tupinambás

## **COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

## **SUBCOORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

## **COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Pereira Nunes

Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Jr.

Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Dr<sup>a</sup>. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Prof. Dr. Unai Tupinambás

Lourena Emanuele Costa (Representante Discente)

*“You have to learn the rules of the game. And then, you have to play better than anyone else”*

*(Albert Einstein)*

*Aos meus amados pais, Regina e José Carmo,  
Por todos os valores ensinados e demonstrados no decorrer da vida.  
Com vocês, aprendi a cair, levantar e prosseguir após a queda; a  
sorrir depois da tormenta e chorar perante a injustiça; a ter palavra e  
respeito com o próximo e, acima de tudo, ser leal comigo mesma.  
Meus maiores e mais sólidos exemplos de luta, honestidade, caráter e  
bondade. Eu amo vocês.*

***“A humildade é a única base sólida de todas as virtudes”***  
***(Confúcio)***

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Simão Machado, por todo caminho percorrido e pela leveza da caminhada ao longo desses tantos anos. Pela precisão e simplicidade admiráveis com que conduziu este e tantos outros trabalhos. Por ensinar Ciência com doçura, alegria, clareza e ética. Exemplo de profissionalismo, conhecimento científico, humildade e dedicação. É uma honra poder fazer parte de sua equipe.

À Danielle da Glória de Souza, co-orientadora durona e imprescindível amiga que consegue transformar qualquer momento inesperado em alegria total, risadas contagiantes e abraços confortantes. Afinal de contas, “nós precisamos de muito pouco para sermos felizes”.

Aos Professores Mauro Martins Teixeira, Leda Quércia Vieira, Vanessa Pinho e Milene Rachid por todo apoio, ajuda, incentivo e acolhimento desde o início.

Aos Professores Manoel Otávio C. Rocha e Herbert Bernard Tanowitz por todo carinho e incentivo. Exemplos admiráveis a serem seguidos.

Aos membros do LIDIN – Fátima, Renata, Melisa, Ronan, Andreia, Bruno, Cynthia, Pollyana, Diego, Allysson, Ana Carol, Lorryne, Paulo e Katherine – o convívio diário com vocês, tornaram os ensinamentos mais interessantes.

Ao GAF (grupo de apoio ao FACs): Fatinha, Renatinha, Melisa e Pollyana. Poder trabalhar e conviver com vocês é um imenso privilégio. Muito obrigada por toda ajuda durante todo esse período.

Aos membros dos grupos Imunofar, Limho e Larri em especial a Frank e Ilma.

Aos queridos Fatinha, Renatchêinha, Melisa, Vivian Murr, Gatinsky, Ana Carol, Barbarela, Willian, Luquinha, Paty Campi e Caio... com vocês, até a tristeza é alegre!!!!

Aos Professores André Talvani, Flávio Amaral, Maria Aparecida Souza, Maria do Carmo Pereira Nunes, Vanessa Carregaro Pereira e Vanessa Pinho, por aceitarem participar da banca. É uma honra poder contar com vocês... muito obrigada de coração.

Ao animal experimental, todo meu respeito e gratidão.

As secretárias e técnica administrativas Jussara Magalhães, Tânia Colina e Jacqueline Viana, por toda ajuda sempre acompanhada de boa vontade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e PRPq- UFMG pelo apoio financeiro.



## DEDICATÓRIA

Ao meu DEUS, por fazer bem todas as coisas e por estar tão perto de mim.

Aos meus pais Regina e José Carmo, cujos ensinamentos ultrapassam as mais belas teorias e encurtam os mais árduos dos percursos.

Ao meu irmão Juninho, cuja alma e coração irradiam beleza e humildade. Você sorri com os olhos...e esse, é o sorriso mais lindo do mundo! Sara Eliza e Samirah..minhas flores!!!

`A minha madrinha Carminha Esper...guerreira incansável e fiel escudeira. Por me mostrar os encantos de “Paulo Freire e Jean Piaget”.

Aos queridos Benedito, Fabiana, Flávia, Emerson e Giovanna (linda da titia)!!! Por todo amor, respeito, carinho, apoio e consideração. Muito obrigada por tudo, para sempre.

`A minha irmã e comadre Solange...minha referência de generosidade, beleza, ternura, e amor. Quem me dera, por um segundo, ser igual a você!!! Te amo, te amo e te amo.

`A minha querida amiga Josiane Vicentini...”a melhor parte da vida de uma pessoa está nas suas amizades” – Abraham Lincoln.

Ao irmão que a vida me presenteou: Ivan Souza...”um irmão pode não ser um amigo, mas um amigo será sempre um irmão”- Benjamin Franklin.

`A minha família de quatro patas...Sufy, com você aprendi o verdadeiro sentido da palavra amor e fidelidade.

Aos meus tios, tias, primos e primas que torcem sempre por mim.

## **DEDICATÓRIA ESPECIAL**

*Fabiana Simão Machado*

*“If I have seen further it is by standing on the shoulders of giants”*

*(Isaac Newton)*

***Por ser a “estrela mais brilhante dentro da noite mais escura”.***

*Obrigada pela oportunidade, confiança e inestimáveis conselhos!!!*

*Por tudo, para sempre, muito obrigada.*

## RESUMO

A infecção por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), causador da doença de Chagas, induz uma reação inflamatória e a eficiência da resposta imune (RI) do hospedeiro é importante para que a infecção persista ou seja eliminada. A expressão de SOCS2 (*Supressor de Sinalização de Citocinas*)<sup>2</sup>, uma proteína intracelular, é parcialmente mediada por lipoxinas (LXA<sub>4</sub>, eicosanoide anti-inflamatório) em células dendríticas (DCs), a principal célula apresentadora de antígeno (APC). Demonstramos que SOCS2 é fundamental durante a infecção por *T. cruzi* modulando a geração/expansão de células Th1, Treg e de memória e no controle da função cardíaca. No presente trabalho, nós pesquisamos o papel de SOCS2 na função de DCs e na indução/manutenção da RI durante a infecção experimental por *T. cruzi*. Camundongos CD11cDTR transgênicos (depleção de DCs), selvagens (WT) e deficientes de SOCS2 (*knockout*/KO) foram infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Nossos resultados demonstraram um aumento da parasitemia nos animais depletados de DCs, ressaltando que DCs são cruciais no controle da infecção por *T. cruzi*. Durante a RI inata a ausência de SOCS2 resultou na redução da frequência de DCs produtoras de citocinas inflamatórias (IL-12 e TNF- $\alpha$ ), mas não de IL-10, sem alterar a expressão dos receptores do tipo Toll (TLR2 e TLR4) e de MHC II. Em contraste, uma diminuição na expressão da molécula co-estimuladora CD80 foi observada em DCs deficientes de SOCS2. Durante a RI adaptativa a ausência de SOCS2 em DCs resultou no aumento dos níveis de expressão de TLR2 e TLR4 e na redução da frequência de DCs expressando MHCII. A transferência adotiva de DCs deficientes de SOCS2 ocasionou aumento da parasitemia e mudanças do perfil da RI frente a infecção por *T. cruzi*, principalmente: i) reduzindo a frequência de células NK produtoras de IFN- $\gamma$  e de IL-17; ii) diminuindo a frequência de células T CD8 produtoras de IFN- $\gamma$  e de T CD4 produtoras de IL-17, apesar de aumentar células T CD4 produtoras de IFN- $\gamma$ ; ausência de SOCS2 em DCs também resultou em redução de células produtoras de IL-10, como T CD4 e CD19, além das células Treg. Nossos resultados também demonstraram que SOCS2 é importante na modulação da apoptose durante a infecção por *T. cruzi*, onde a deficiência de SOCS2 leva a um aumento da apoptose de neutrófilos durante a RI inata, de macrófagos nas RI inata e adaptativa e de linfócitos na RI adaptativa. Nossos resultados *in vitro* demonstraram um aumento de caspase 3 total e clivada em neutrófilos deficientes em SOCS2. Em conjunto, nossos resultados demonstraram que SOCS2 é crucial na modulação das funções de DCs durante a geração e regulação da RI inata e adaptativa durante a infecção por *T. cruzi*.  
Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*, SOCS2, Células Dendríticas, Resposta imune.

## ABSTRACT

The infection by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), which causes Chagas' disease, induces an inflammatory reaction and the efficacy of the host immune response (IR) is important to persist or eliminate the infection. SOCS2 (suppressor of cytokine signaling)<sup>2</sup> expression, an intracellular protein, is partially mediated by lipoxins (LXA<sub>4</sub>, anti-inflammatory eicosanoid) in dendritic cells (DCs), the main antigen-presenting cell (APC). We demonstrated that SOCS2 is fundamental during *T. cruzi* infection by modulating the generation/expansion of Th1, Treg and memory cells and in the control of heart function. In the present work, we investigated the role of SOCS2 in DCs function and induction/maintenance of IR during experimental *T. cruzi* infection. CD11cDTR transgenic mice (DCs depletion), wild type (WT) and SOCS2 (*knockout*/KO) were infected with Y strain of *T. cruzi*. Our results demonstrated an increased parasitemia in depleted DCs animals, emphasizing that DCs are crucial in control of *T. cruzi* infection. During innate IR, absence of SOCS2 resulted in decreased frequency of inflammatory cytokines (IL-12 and TNF- $\alpha$ ), but not IL-10 by DCs, without change the Toll-like receptor expression (TLR2 and TLR4) and MHCII. In contrast, a decreased expression of CD80 costimulatory molecule was observed in SOCS2 deficient DCs. During adaptive IR, absence of SOCS2 in DCs resulted in increased levels of TLR2 and TLR4 expression and reduced frequency of DCs expressing MHCII. Adoptive transfer of SOCS2 deficient DCs caused increased parasitemia and changes in IR profile against *T. cruzi* infection, specifically: i) reducing the frequency of NK cells producing IFN- $\gamma$  and IL-17; ii) reducing the frequency of CD8 T cells producing IFN- $\gamma$  and CD4 T cells producing IL-17, despite increasing CD4 T cells producing IFN- $\gamma$ ; absence of SOCS2 in DCs also resulted in reduction of cells producing IL-10 such as CD4 and CD19, besides Treg cells. Our results also demonstrated that SOCS2 is important in apoptosis modulation during *T. cruzi* infection, where absence of SOCS2 leads to increased apoptosis in neutrophils during innate IR, macrophages in innate and adaptive IR and lymphocytes in adaptive IR. Our *in vitro* results demonstrated an increase in cleaved and total caspase 3 in SOCS2 deficient neutrophils. Together, our results demonstrated that SOCS2 is crucial in the modulation of DCs' function during generation/regulation of innate and adaptive IR during *T. cruzi* infection. Keywords: *Trypanosoma cruzi*, SOCS2, Dendritic Cells, Immune Response.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-LO - 5-Lipoxigenase

AA – Ácido Aracdônico

ACK – Tampão de lise de hemácias (Acetato de Potássio)

AhR - Receptor Aril Hidrocarbono (*Aryl hydrocarbon receptor*)

APC – Célula apresentadora de antígenos (*Antigen-presenting cell*)

APC – Aloficocianina (*Allophycocyanina*)

ATL – (*Aspirin Triggered Lipoxin*)

BSA – Albumina sérica bovina (*Bovine Serum Albumine*)

BV – 450 – Violeta brilhante (*Brilliant Violet*)

CD3 – Células TCD3

CD4 – Células TCD4

CD8 – Células TCD8

CD11cDTR-Tg – Animais CD11c DTR transgênicos

CD19 – Marcador de superfície de células B

CD80 - Molécula co-estimuladora

CEBIO - Centro de Bioterismo

CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

DCs – Células Dendríticas

DP - Desvio padrão

DT – Toxina diftérica (*Diphtheria Toxin from Corynebacterium diphtheriae*)

dpi - Dias após-infecção (*days post-infection*)

EDTA - Ácido etil-diamino-tetra-acético

F4/80 – Marcador para Macrófagos

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*)

GPCRs – Receptor acoplado a proteína G

GR1 – Marcador para Neutrófilos

Hs - horas

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

IFN- $\gamma$  - Interferon gamma

IgE – Imunoglobulina E

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta

IL-4 Interleucina 4  
IL-5 Interleucina 5  
IL-6 - Interleucina 6  
IL-10 - Interleucina 10  
IL-12 - Interleucina 12  
IL-13 – Interleucina 13  
IL-17 – Interleucina 17  
IL-18 – Interleucina 18  
i.p. – Intraperitoneal  
KIR – do inglês Small Kinase inhibitory region  
KCl – Cloreto de Potássio  
KO – *knockout* (deficientes)  
LIDIN – Laboratório de Imunorregulação de Doenças Infecciosas  
LT - Leucotrieno  
LTB<sub>4</sub> - Leucotrieno B<sub>4</sub> (*Leukotriene B<sub>4</sub>*)  
LXA<sub>4</sub> - Lipoxina A<sub>4</sub>  
M - Molar  
µg – Micrograma  
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade  
µL - Microlitro  
mL - Mililitro  
mM – Millimolar  
MO – Macrófagos  
NaCl - Cloreto de Sódio  
NK - Células assassinas naturais (*Natural killer*)  
NKT – Células assassinas naturais T (*Natural killer*)  
NO – Óxido nítrico  
PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos  
PE – Ficoeritrina (*Phycoerythrina*)  
PGs - Prostaglandinas  
PeCy5 – Ficoeritrina cianina 5 (*Phycoerythrin Cyanine 5*)  
PeCy7 – Ficoeritrina cianina 7 (*Phycoerythrin Cyanine 7*)  
PerCP – Proteína Clorofílica Peridina (*Peridinin Chlorophyll Protein Complex*)  
PBS - Tampão fosfato de salina (*Phosphate buffered saline*)

RI – Resposta imune

RPM – Rotação por minuto

RPMI - Meio de cultura (*Roswell Park Memorial Institute 1640 medium*)

RPMI 10% - Meio de cultura acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino

SBF - Soro bovino fetal

SOCS1 - (*Supressor de sinalização de citocina*) 1

SOCS2 - (*Supressor de sinalização de citocina*) 2

SOCS3 - (*Supressor de sinalização de citocina*) 3

STATS – do inglês (*Signal transducer and activators of transcription*)

*T. cruzi* - *Trypanosoma cruzi*

T CD4 - Células T CD4

T CD8 – Células T CD8

*T. gondii* – *Toxoplasma gondii*

TGF-  $\beta$  - Fator de transformação de crescimento (*Transforming growth factor*)

Th1 - Linfócito T *helper* tipo 1

Th2 - Linfócito T *helper* tipo 2

TLR – Receptores do tipo Toll

TLR2 - Receptores do tipo Toll 2

TLR4 – Receptores do tipo Toll 4

TNF-  $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

TRAF - Fator associado ao receptor de TNF

Treg - Células T reguladoras

TX - tromboxanos

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WHO – Organização Mundial da Saúde

WT - Wild type (*animal selvagem WT*)

## SUMÁRIO

1- Considerações Iniciais.....	17
2- Introdução.....	19
3- Revisão da Literatura .....	22
3.1- A doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
3.2- Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
3.3 - Epidemiologia.....	25
3.4- Manifestações clínicas da doença.....	26
3.5- Imunidade `a infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	27
3.6- Mediadores lipídicos da resposta imune.....	29
3.7- SOCS ( <i>Supressor de sinalização de citocinas</i> ).....	30
3.8- As células dendríticas.....	32
3.9- Apoptose.....	33
4- Justificativa e Objetivo Geral .....	35
5- Material e Métodos .....	37
6- Resultados .....	43
7- Discussão .....	70
8- Conclusões .....	80
9- Referências .....	82
10- Anexos .....	102



## *1- Considerações Iniciais*

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana, constitui uma doença negligenciada causada pelo parasito protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade na América Central e do Sul. Contudo, mesmo após 106 anos de sua descoberta, esta enfermidade ainda acomete cerca de 10 milhões de pessoas ao redor do mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), com uma maior incidência na América Latina. Em décadas recentes, fatores como imigração, transfusões de sangue e transplante de órgãos, aumentaram o número de casos da doença em áreas não endêmicas como Europa, América do Norte, Japão e Austrália. Durante a doença de Chagas, ocorre uma resposta inflamatória que libera a expressão de mediadores inflamatórios (como citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos) que ativam e recrutam leucócitos para diversos tecidos com o intuito de eliminar o parasito. Portanto, o conhecimento das estratégias empregadas pelo parasito (para sua persistência no hospedeiro) e os mecanismos de defesa do hospedeiro contra a infecção causada por *T. cruzi* é de extrema relevância. Deste modo, nosso estudo está diretamente relacionado com a linha de pesquisa básica em imunologia visando elucidar parte da via imunológica envolvida na resolução da inflamação e desenvolvimento de patologias. Nosso estudo foi realizado em modelo experimental murino, no Laboratório de Imunorregulação de Doenças Infecciosas (LIDIN) do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas – ICB - da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob a orientação da Professora Doutora Fabiana Simão Machado. Todos os experimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob os números de protocolos 49/2009 e 89/2010. Os dados obtidos durante o período de execução do projeto foram debatidos em diversos congressos internacionais, por meio de apresentações orais, pôsteres e recebimento de prêmios.

## *2- Introdução*

Para que uma resposta imunológica seja eficiente contra diversos micro-organismos, esta requer a ativação de fatores imunes inato e adquirido. Estas imunidades, além de estarem fortemente conectadas (a resposta imune inata contra micro-organismos estimula a resposta imune adaptativa e influencia a natureza dessa resposta), apresentam uma inter-regulação (a resposta imune adaptativa aumenta os mecanismos protetores da imunidade inata). A resposta imune inata (presente em todos os organismos multicelulares) inicia-se com o reconhecimento do agente invasor, produção de agentes inflamatórios, processamento dos antígenos, que estimulam a resposta adaptativa (presente nos vertebrados) com ativação principalmente dos linfócitos.

A eficiência de uma resposta imune contra patógenos como por exemplo, *T. cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Mycobacterium tuberculosis* depende da indução de mediadores pró-inflamatórios como IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . A resposta imune do hospedeiro é determinante para a persistência ou eliminação do agente causador da doença, onde, o controle da intensidade dessa resposta é dependente de mecanismos inibitórios e/ou repressores. Com isso, torna-se necessário o entendimento dos mecanismos de controle da resposta imune durante a infecção por *T. cruzi*, uma vez que essas respostas são complexas, ocorrendo em distintos compartimentos do sistema imune, incluindo ativação/expansão celular, produção de citocinas, quimiocinas, anticorpos e morte celular. Portanto, a patogênese da doença de Chagas parece ser uma decorrência da interação do sistema imune do hospedeiro versus parasito, ocorrendo em diversas etapas onde podemos encontrar uma hiperativação da resposta imune, imunossupressão da resposta Th1, perda de células B imaturas na medula óssea e comprometimento dessas células na periferia. Esse cenário de imunossupressão está relacionado, entre outros fatores, com o aumento da apoptose. Várias células do sistema imune como células dendríticas (DCs), macrófagos (MO) e *natural killer* (NK) possuem um importante papel no controle da infecção por *T. cruzi*. DCs são as principais células apresentadoras de antígeno (APC), sendo definidas por sua potente capacidade em iniciar uma resposta imune adaptativa. Estas são células derivadas da medula óssea, encontradas em tecidos epiteliais e linfoides, responsáveis pela ativação de linfócitos T naïve além de ser um componente crucial da resposta imune inata relacionado com a modulação da resposta imune adquirida.

Supressor de sinalização de citocinas (SOCS) constituem um grupo de proteínas intracelulares que tem sido intensamente estudadas devido a sua capacidade de regular vias de sinalização de citocinas e também de controlar respostas celulares e fatores de crescimento. Nossos estudos mostraram que SOCS2 possui papel fundamental no balanço da resposta

imune e função cardíaca durante a infecção por *T. cruzi* (Esper *et al.*, 2012) (artigo em anexo #1). De fato, o balanço entre citocinas T helper (Th1 e Th2) é indispensável para promover a imunidade e reduzir o desenvolvimento de patologia cardíaca em indivíduos infectados por *T. cruzi*, onde ocorre supressão da imunidade mediada por células T e aumento da apoptose de linfócitos, o que pode contribuir para a persistência do parasito no hospedeiro. Lipoxinas (LXA) são mediadores lipídicos derivados de eicosanoides com propriedades anti-inflamatórias, capazes de induzir a expressão de SOCS2 durante a infecção por *T. gondii* (Machado *et al.*, 2006). Sendo assim, devido a expressão de SOCS2 ser parcialmente mediada pela geração de LXA<sub>4</sub> em DCs, compreender o papel de SOCS2 nos mecanismos que regulam a ativação e função das DCs e subsequente ativação de linfócitos envolvidos no controle da infecção por *T. cruzi*, pode fornecer informações importantes acerca da patogênese e resistência à infecção, sendo um modelo apropriado para o entendimento do balanço entre uma eficiente resposta imune e imuno-patologia.

### 3- Revisão da Literatura

### 3 – Revisão da Literatura

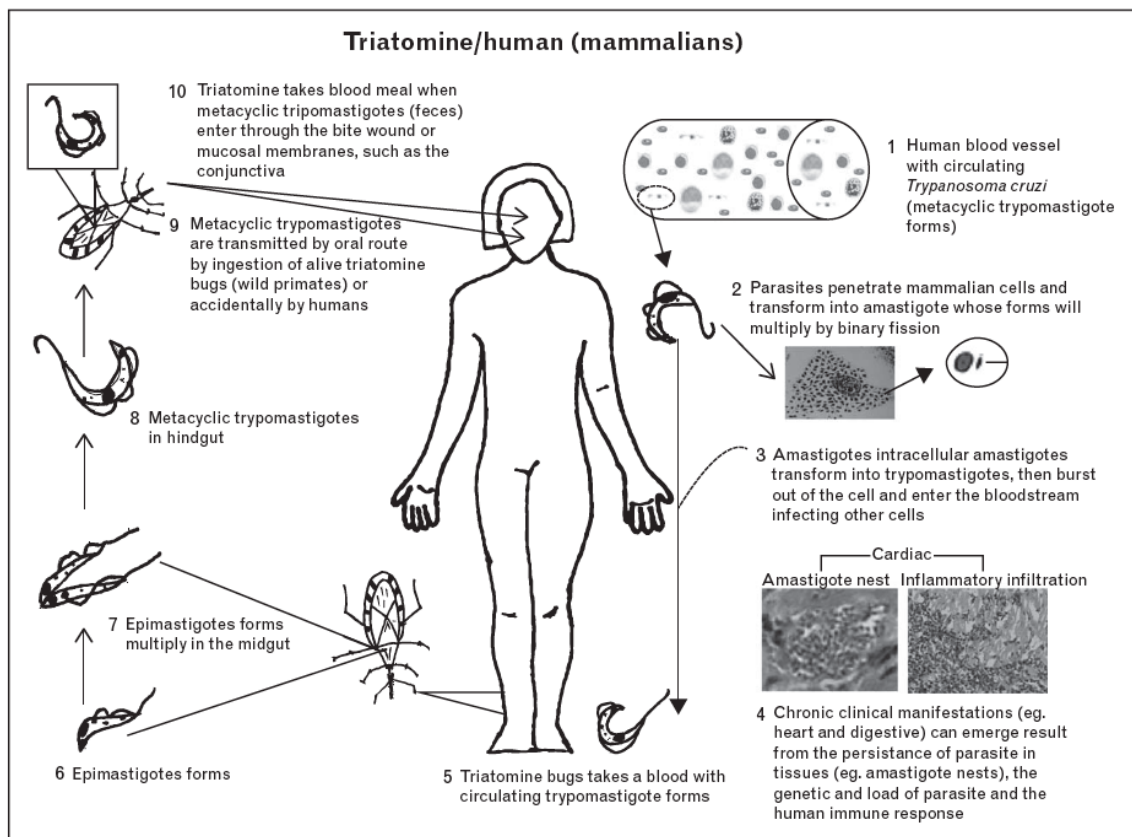
#### 3.1- A doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

A Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana foi inserida na comunidade científica em Abril de 1909 através de um relato minucioso descrito pelo médico mineiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934). Durante sua expedição à pequena cidade de Lassance (interior do Estado de Minas Gerais), examinando o sangue de uma criança de dois anos (chamada Berenice e que seria então considerada o primeiro caso da doença que levaria o nome do pesquisador – a doença de Chagas) em estado febril, deparou-se com um parasito flagelado para o qual sugeriu o nome de *Trypanosoma cruzi* em tributo ao seu amigo e mentor Oswaldo Cruz (Chagas, 1909; Coura *et al.*, 2014). Tal feito foi considerado o maior marco da história da medicina, onde o mesmo pesquisador, em um curto intervalo de tempo, descobriu não apenas uma nova doença humana, mas também seu vetor (inseto comumente chamado de barbeiro ou chupão) e o agente etiológico da doença (*T. cruzi*) (Chagas, 1909; Coura *et al.*, 2014). Conforme ilustrado na nobre frase de Oswaldo Cruz, “o descobrimento desta moléstia constitui o mais belo exemplo do poder da lógica a serviço da ciência. Nunca até agora, nos domínios das pesquisas biológicas, se tinha feito um descobrimento tão complexo e brilhante e, o que mais, por um só pesquisador” (Malafaia e Rodrigues, 2010). Em prestígio a sua nobre descoberta, em 1921 Carlos Chagas recebeu o título de doutor *honoris causa* da Harvard University e, em seguida, igual benefício lhe foi conferido pela Universidade de Paris. Em 1913 e 1921, Carlos Chagas foi indicado a láurea máxima, o Prêmio Nobel, porém, não o recebeu por razões mal compreendidas (Lewinsohn, 2003; Malafaia e Rodrigues, 2010; Steverding, 2014). O parasito hemoflagelado *T. cruzi* pertence a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero Trypanosoma (Honiberg, 1963; Simpson *et al.*, 2006; Rassi *et al.*, 2012; Lukes *et al.*, 2014) que infecta animais mamíferos, incluindo humanos. Mesmo após 107 anos de sua descoberta, a doença de Chagas ainda é considerada uma das principais causas de doenças cardíacas e gastrointestinais em áreas endêmicas do México, América Central e do Sul, onde estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas estejam infectadas com o parasito (Bonney, 2014; Virgilio, 2014) e outras 100 milhões de pessoas expostas a possibilidade de contrair a doença (WHO, 2010; Sesti-Costa *et al.*, 2014).

### 3.2 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo e envolve ambos hospedeiros (vertebrado mamífero e invertebrado hematófago da subfamília Triatominae) em estágios de desenvolvimento bem definidos. O parasito (no hospedeiro vertebrado) encontra-se em duas formas: (i) tripomastigota que caracteriza-se sendo a forma sanguínea não replicativa infectante de células nucleadas (incluindo células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, musculares e nervosas) e (ii) amastigota que se encontra nos tecidos e que se replica no citosol das células do hospedeiro (Epting *et al.*, 2010; Machado, Dutra, *et al.*, 2012; Machado, Jelicks, *et al.*, 2012; Duran-Rehbein *et al.*, 2014). No triatomíneo, é possível encontrar no tubo digestivo as formas epimastigotas replicativas e tripomastigotas metacíclicas, sendo ambas flageladas (Machado, Dutra, *et al.*, 2012; Esper *et al.*, 2015). A infecção natural do hospedeiro mamífero ocorre (durante o repasto sanguíneo) quando o inseto vetor (barbeiro) elimina nas fezes e na urina as formas tripomastigotas metacíclicas (infectantes) que submergem na pele lesada ou nas mucosas (Machado, Jelicks, *et al.*, 2012; Rassi *et al.*, 2012; Steverding, 2014). Após a infecção, as formas tripomastigotas penetram nas células do hospedeiro e se transformam em amastigotas. Tais formas, em aproximadamente 5 dias, se diferenciam em tripomastigotas e iniciam um intenso movimento que coopera para a ruptura da célula hospedeira levando a liberação dos parasitos e infecção de novas células (Machado, Jelicks, *et al.*, 2012; Rassi *et al.*, 2012; Esper *et al.*, 2015).





**FIGURE 1.** *Trypanosoma cruzi* life cycle. Description of human and triatomine stages of *T. cruzi* during its life cycle.

Curr Opin Infect Dis 2015, 28:246–252  
DOI:10.1097/QCO.0000000000000157

Ainda não está totalmente esclarecido quais são os mecanismos moleculares de invasão das células do hospedeiro pelo parasito e as vias reguladoras associadas a invasão, tem sido objeto de intensa investigação. O *T. cruzi* interage com diversos receptores celulares do hospedeiro mamífero como por exemplo os receptores do tipo Toll (TLRs), mucinas, manose, tirosina-kinase, TGF onde as atividades desses receptores são essenciais para a ligação e/ou invasão do parasito (Kahn *et al.*, 1995; Ming *et al.*, 1995; Camargo *et al.*, 1997; De Diego *et al.*, 1997; Gazzinelli e Denkers, 2006).

### 3.3 - Epidemiologia

Inicialmente, a doença de Chagas era limitada ao Continente Americano (desde o Sul dos Estados Unidos até o norte do Chile e Argentina) especialmente em áreas rurais empobrecidas. Atualmente, a doença de Chagas atravessou fronteiras e constitui um importante problema de saúde pública em países não endêmicos (como Estados Unidos, Austrália, Espanha e Japão) devido ao grande influxo de imigrantes onde, na ausência do

vetor, a infecção pode ser transmitida através de transfusão de sangue e transplante de órgãos provindos de doadores infectados, congênita e mais raramente por acidentes laboratoriais (Perez-Molina *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2014). A maioria dos indivíduos com sorologia positiva nessas áreas não endêmicas, usualmente possuem a forma indeterminada da doença. Alguns fatores influenciam o curso da infecção, como a cepa do parasito, fatores ambientais, metabólicos, nutricionais e genéticos do hospedeiro humano.

Atualmente, vem ocorrendo um intenso controle da transmissão da doença de Chagas através de estratégias de eliminação do vetor e melhora na segurança das transfusões sanguíneas em áreas endêmicas (Perez-Molina *et al.*, 2012). Outro aspecto relevante sugere que em áreas endêmicas, a contaminação por via oral da doença não constitui uma ideia recente. O primeiro caso desse tipo de contaminação foi documentado em 1965 (Da Silva *et al.*, 1968) quando a infecção ocorreu após a ingestão de alimentos (cana-de-açúcar e açaí) contaminados com o triatomíneo e/ou com suas fezes (Perez-Molina *et al.*, 2012; Coura, 2015).

### **3.4 – Manifestações Clínicas da doença**

O curso clínico da doença de Chagas pode ser dividido em duas fases distintas sendo elas aguda e crônica. A fase aguda ocorre em um período de 4 a 8 semanas e, na maioria dos casos, é assintomática em adultos. Em crianças, podem aparecer sintomas como febre, mal estar, vômitos e adenomegalia. Em um número menor de casos, ocorre o desenvolvimento de problemas mais graves como miocardite aguda acompanhada de cardiomegalia ou meningoencefalite, podendo ser fatal em alguns casos (Rassi *et al.*, 2010; Machado, Jelicks, *et al.*, 2012; Esper *et al.*, 2015). A fase aguda caracteriza-se por elevada parasitemia, parasitismo de vários tipos celulares e inflamação. Em casos de transmissão vetorial é possível observar o sinal de porta de entrada do *T. cruzi* através do chagoma de inoculação (na pele ou próximo a mucosa ocular) que se manifesta como uma reação da conjuntiva com edema de pálpebras de um lado da face denominado sinal de Romaña (Machado, Dutra, *et al.*, 2012; Perez-Molina *et al.*, 2012). As manifestações clínicas da fase aguda da doença se resolvem em aproximadamente 90% dos casos de indivíduos infectados, mesmo na ausência de tratamento. A fase crônica da doença pode ser dividida em assintomática ou indeterminada onde cerca de 60-70% dos pacientes nunca desenvolverão os sinais clínicos aparentes da doença. Os pacientes remanescentes (30-40%) irão subsequentemente desenvolver a fase crônica sintomática da doença, usualmente cerca de 10 a 30 anos após a infecção inicial com

comprometimento de órgãos como coração, trato digestivo ou ambos (Rassi *et al.*, 2010; Nagajyothi *et al.*, 2012; Morilla e Romero, 2015). A reativação da fase aguda da doença de Chagas pode ocorrer em pacientes cronicamente infectados e imunologicamente comprometidos como, por exemplo, em pacientes com HIV que são tratados com drogas imunossupressoras (Braz *et al.*, 2008; Rassi *et al.*, 2010). A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é a manifestação mais importante e severa da doença de Chagas em humanos, causando arritmias, tromboembolismo, insuficiência cardíaca e morte súbita (Rocha *et al.*, 2003; Rassi *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2013; Morilla e Romero, 2015). No que diz respeito a miocardite chagásica crônica, esta se caracteriza por um infiltrado de células mononucleares, destruição de fibras miocárdicas no foco inflamatório, presença de áreas de fibrose e raros parasitos nas lesões. Apesar de algumas controvérsias envolvendo os mecanismos que desencadeiam a resposta inflamatória no coração, numerosos estudos demonstram que a reação inflamatória é dependente de linfócitos T sensibilizados. Um exemplo da importância de linfócitos T na resposta imune no coração é vista em camundongos atímicos infectados com *T. cruzi*, onde, embora tenha um intenso parasitismo tecidual, não exibem resposta inflamatória no miocárdio (Gonçalves Da Costa *et al.*, 1984). Foi demonstrado por Higuchi e colaboradores que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são a maioria das células presentes no infiltrado inflamatório de pacientes com formas cardíacas da doença (Higuchi Mde *et al.*, 1993).

### **3.5 – Imunidade à infecção por *Trypanosoma cruzi***

A indução rápida da imunidade contra *T. cruzi* é um passo essencial para o estabelecimento da relação entre patógeno/hospedeiro, a qual permite que ambos sobrevivam a fase inicial da doença e progridam para a fase latente. Estudos em modelos experimentais de infecção por *T. cruzi* mostraram que uma eficiente resposta Th1 mediada por células T (TCD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>) no controle do parasitismo depende da produção de citocinas como IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e também de outras citocinas como IL-18, demonstrado recentemente por nosso grupo (Abrahamsohn e Coffman, 1996; Silva *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 1999; Rassi *et al.*, 2010; Esper *et al.*, 2014) (artigo em anexo #2). Dentre estas citocinas, IFN- $\gamma$  (citocina pró-inflamatória) possui um papel crítico no controle inicial da replicação do parasito onde, na ausência da resposta imune inata, este controle dependente de IFN- $\gamma$  é comprometido. A citocina IL-12 (ativadora de células NK) é fundamental para induzir uma resposta imune dependente de IFN- $\gamma$ , em ambas as respostas (inata e adaptativa) contra o *T. cruzi* (Torricco *et*

*al.*, 1991; Silva *et al.*, 1995; Machado, Dutra, *et al.*, 2012). Essa cascata de ativação celular e produção de citocinas possui um papel protetor principalmente devido à indução da produção de óxido nítrico (NO) (por macrófagos), que é responsável pelo controle do crescimento intracelular do parasito através de sua forte atividade tripanocida (Cardoni *et al.*, 1990; Gazzinelli *et al.*, 1992; Chandra *et al.*, 2002; Gutierrez *et al.*, 2009; Machado, Dutra, *et al.*, 2012). Além disso, a regulação da expressão de quimiocinas e de IFN- $\gamma$ , associados ao decréscimo do parasitismo tecidual, pode ser responsável pelo controle da inflamação e imunopatologia no coração em infecções experimentais por *T. cruzi* (Talvani *et al.*, 2000). A produção de IFN- $\gamma$  também participa na indução da produção de TNF- $\alpha$  e de IL-1 $\beta$  por macrófagos. Macrófagos peritoneais e cardiomiócitos produzem *in vitro*, quantidades significativas de TNF- $\alpha$  na presença de *T. cruzi* e IFN- $\gamma$  desempenhando papel fundamental no controle da replicação dos parasitos e na modulação da produção de quimiocinas (Machado *et al.*, 2000). Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$  inibem a ativação de macrófagos mediada por IFN- $\gamma$ , inibindo a produção de NO, quimiocinas e diferenciação de células produtoras de IFN- $\gamma$  (Oswald *et al.*, 1992; Esper *et al.*, 2015). Com esses estudos, foi demonstrado que o favorecimento da diferenciação de linfócitos Th1 depende da produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , levando a uma diminuição da síntese de IL-10 o qual é um mecanismo chave para a indução e manutenção do controle da infecção aguda induzida pelo parasito (Torrice *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1992; Reed *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1995; Silva, 2003). Importante lembrar que a resposta imune contra a infecção por *T. cruzi* é complexa e pode ocorrer em diferentes compartimentos do sistema imune como por exemplo, a indução e proliferação de células B. Uma das características de inúmeras infecções é a ativação policlonal de células B, onde ocorre uma hiperglobulinemia que pode ser crucial para uma defesa primária do hospedeiro em resposta a um microorganismo, devido a presença de antígenos específicos presentes em estruturas conservadas nos patógenos. Camundongos deficientes de células B infectados por *T. cruzi* possuem uma mortalidade elevada na infecção tardia devido a impossibilidade de eliminar formas tripomastigotas da circulação (Cardillo *et al.*, 2007). Por outro lado, a ativação policlonal de células B participa nas alterações patológicas observadas na doença de Chagas (Minoprio *et al.*, 1988; Minoprio, 2001; De Meis *et al.*, 2009). Com isso, existem diversas controvérsias quanto ao papel dos anticorpos em conferir resistência à infecção causada por *T. cruzi*.

### 3.6 – Mediadores lipídicos da resposta imune

Além da importância da produção de citocinas (pró e anti-inflamatórias) para que haja um controle da resposta imune que promova a sobrevivência do hospedeiro, tem sido demonstrado que a liberação de eicosanoides regula a resposta imune do hospedeiro e controla a progressão da doença de Chagas (Pinge-Filho *et al.*, 1999; Ashton *et al.*, 2007; Pavanelli *et al.*, 2010; Freire e Van Dyke, 2013).

Os eicosanoides ou eicosanoides (do Grego *eikosi* para “vinte”) são uma classe de mediadores lipídicos que atuam de maneira importante na manutenção da homeostase fisiológica, em condições patológicas e são relevantes em quase todos os sistemas e tecidos dos mamíferos (Leslie, 2004; Brock e Peters-Golden, 2007; Freire e Van Dyke, 2013; Tessaro *et al.*, 2015). São metabólitos oxigenados derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA) que agem em pequenas concentrações nas células alvo tipicamente via receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (Drachman e Rothstein, 2000). Os eicosanoides foram reconhecidos primeiramente por sua habilidade em causar respostas biológicas como agregação plaquetária, edema e contração da musculatura lisa; ultimamente, outras funções como participação na inflamação, câncer e resposta imune sob diversas condições lhe foram conferidas (Ferreira, 1973; Brock e Peters-Golden, 2007). Como exemplos desses eicosanoides, podemos citar as prostaglandinas (PGs), prostaciclina, tromboxanos (TX), leucotrienos (LT) e lipoxinas (LXA) (Serhan *et al.*, 1984; Harris *et al.*, 2002; Levin *et al.*, 2002; Wada *et al.*, 2007; Buckley *et al.*, 2014; Tessaro *et al.*, 2015).

Os leucotrienos são mediadores lipídicos eicosanoides com envolvimento fundamental nos processos inflamatórios, sendo moléculas essenciais nos processos de manutenção da homeostasia vascular e respiratória e também na inflamação (Yokomizo *et al.*, 2000; Shimizu, 2009). O primeiro passo na síntese dos leucotrienos envolve a oxidação do ácido AA realizado pela enzima 5-Lipoxigenase (5-LO) (Ferguson *et al.*, 2007).

A enzima 5-LO pertence a uma família de enzimas (lipoxigenases) que contém ferro não associado a um grupo heme e que catalisam a oxidação de ácidos graxos poliênicos para hidroperóxidos de lipídeos (Rouzer *et al.*, 1985; Claria e Serhan, 1995; Hedi e Norbert, 2004; Shimizu, 2009). Através de sua ação no metabolismo do AA, esta enzima possui um importante papel não somente no desencadeamento de atividades pró-inflamatórias mediadas pela produção de leucotrienos (LTB<sub>4</sub>), como também pela promoção da síntese de fatores anti-inflamatórios como as LXAs. LXAs são mediadores eicosanoides que possuem potentes atividades anti-inflamatórias em inúmeras desordens do sistema imunológico como sepsis,

periodontite, nefrite, asma, fibrose cística, e infecções como tuberculose e toxoplasmose que inibem a função de LT, migração de leucócitos, de células NK, produção de quimiocinas induzidas por TNF- $\alpha$  e produção de IL-12 induzida por patógenos (Serhan *et al.*, 1984; McMahon *et al.*, 2001; Kieran *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2006; Romano *et al.*, 2015). Lipoxinas são capazes de se ligarem a dois receptores distintos: um receptor acoplado a proteína G (LXAR-FPRL) e um receptor citoplasmático aril hidrocarbono (AhR) nas células do organismo incluindo neutrófilos e macrófagos (Maddox *et al.*, 1997; Schaldach *et al.*, 1999; Devchand *et al.*, 2003; Petasis *et al.*, 2005). Nosso grupo demonstrou em 2006 que a sinalização de LXA<sub>4</sub> e ATL (*Aspirin Triggered Lipoxin*) através da ativação de seus receptores ALX e AhR, em DCs, induzem a expressão de SOCS2 (*Supressor de sinalização de citocinas*)<sup>2</sup> o qual regulou a produção de citocinas e quimiocinas induzida por *T. gondii* (Machado *et al.*, 2006).

### 3.7- SOCS (*Supressor de sinalização de citocinas*)

Supressor de sinalização de citocinas (SOCS) compreendem uma família de proteínas intracelulares identificadas em 1997 constituída de oito membros até o momento (CIS e SOCS1-SOCS7) (Endo *et al.*, 1997; Naka *et al.*, 1997; Starr *et al.*, 1997). Essas proteínas caracterizam-se por um domínio central SH2, um domínio carboxi (C) terminal conservado chamado SOCS box e um domínio variável no extremo denominado N-terminal (Endo *et al.*, 1997; Starr *et al.*, 1997; Starr e Hilton, 1998). A atividade principal dos membros da família SOCS é atenuar a transdução de sinal desencadeada por citocinas, através de sua interação com cadeias citoplasmáticas de receptores ou via inibição de intermediários de sinalização da família Janus cinases (JAKs, *Janus Kinase*) e das STATs (*Signal Transducer and Activators of Transcription*) (Endo *et al.*, 1997; Starr *et al.*, 1997; Starr e Hilton, 1998; Strebovsky *et al.*, 2012; Wilson, 2014). Dentre os genes induzidos por STATs, estão presentes principalmente os genes da família SOCS (SOCS1, SOCS2 e SOCS3). SOCS podem modular a sinalização dos receptores de citocinas por diversos mecanismos complementares: SOCS1 e SOCS3 podem inibir a atividade de JAKs através da atividade do domínio conhecido como KIR (*small Kinase Inhibitory Region*) localizado em suas porções N-terminais (Yasukawa *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 2000; Giordanetto e Kroemer, 2003; Strebovsky *et al.*, 2012) e também podem regular a transdução de sinal mediante a poliubiquitinação, induzindo assim a degradação via proteossoma de vários componentes de sinalização intracelular (Kile e Alexander, 2001; Kile *et al.*, 2002; Rico-Bautista *et al.*, 2006; Strebovsky *et al.*, 2012).

Em geral, as proteínas SOCS estão presentes constitutivamente em níveis baixos nas células não estimuladas, entretanto, sua expressão pode ser induzida rapidamente através de estímulos como por exemplo citocinas, onde essa indução se difere entre os diferentes genes SOCS (Starr e Hilton, 1998; Rico-Bautista *et al.*, 2006). Diversos estudos apontam SOCS2 como um regulador importante no: crescimento somático através do controle da sinalização do hormônio de crescimento; no desenvolvimento do sistema nervoso central; na regulação do metabolismo; no desenvolvimento de glândulas mamárias; nas respostas imunes e em outras vias de sinalização dependentes de citocinas (Kopchick *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004; Rico-Bautista *et al.*, 2006). A expressão de SOCS2 ocorre em uma grande variedade de tecidos e células do sistema imune incluindo DCs, células T, hepatócitos, macrófagos entre outros (Starr *et al.*, 1997; Brender *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2006; Rico-Bautista *et al.*, 2006). Desde a primeira descrição das proteínas SOCS, foi observado um considerável progresso no entendimento de suas funções na saúde e na doença.

Em relação a função de SOCS2 durante infecções, nosso grupo tem demonstrado importantes contribuições. Como mencionado anteriormente, SOCS2 está envolvido na regulação da resposta imune associada à infecção por *T. gondii* (Machado *et al.*, 2006). No modelo experimental com *T. cruzi*, encontramos que ubíqua expressão de SOCS2 pode exercer ações tecido específica. De fato, nossos resultados demonstraram, em adição a redução de citocinas pró-inflamatórias, que a deficiência de SOCS2 também resultou na diminuição dos níveis de expressão de SOCS1 e SOCS3 no baço e coração (Esper *et al.*, 2012). Demonstramos também que SOCS2 além de ser crítico na modulação de vias intracelulares de sinalização em cardiomiócitos, sua expressão desbalanceada resulta em várias alterações de respostas celulares incluindo na geração/expansão de células T reguladoras e redução do número de células de memórias durante a infecção por *T. cruzi*. O aumento de células Treg poderia ter causado a redução da resposta Th1 que encontramos em camundongos SOCS2 KO infectados (Esper *et al.*, 2012). O balanço entre citocinas tipo 1 que ativam macrófagos a matarem o parasito e citocinas reguladoras do tipo 2 são necessários para promoverem a imunidade e reduzir danos no coração de indivíduos infectados com *T. cruzi*. Durante a infecção com esse patógeno, ocorre supressão da imunidade mediada por células T e aumento da apoptose de linfócitos, o que pode contribuir para a persistência do parasito no hospedeiro. Todavia, a supressão da resposta Th1 que encontramos nos animais deficientes de SOCS2 pode estar associada a uma exacerbada resposta Th2. De fato, recentemente foi demonstrado no modelo de asma alérgica o papel de SOCS2 na modulação da resposta Th2. Na ausência de SOCS2 ocorre uma exacerbação da resposta de linfócitos

CD4<sup>+</sup> Th2 associado a um aumento de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 que, por sua vez, levam um aumento de IgE no soro e infiltração de células Th2, eosinófilos e basófilos. Portanto, animais SOCS2 KO são altamente susceptíveis a dermatite atópica sugerindo um novo papel de SOCS2 em controlar respostas imunes alérgicas do tipo 2 (Knosp *et al.*, 2011). Também foi demonstrado que SOCS2 está envolvido na regulação da estabilidade e plasticidade de células Foxp3<sup>+</sup>iTreg (células T reguladoras induzidas) (Knosp *et al.*, 2013).

### 3.8- As células dendríticas (DCs)

Dentre as inúmeras células que expressam SOCS2, as DCs são as principais células apresentadoras de antígenos (APC) do sistema imune, fundamentais para iniciar uma resposta imune adaptativa (Schram e Reis E Sousa, 2015). O controle de uma infecção é dirigido pelo desenvolvimento de uma eficiente resposta imune iniciada por DCs através do reconhecimento imune de diversos patógenos invasores durante infecções. As DCs foram primeiramente identificadas em 1868 na epiderme e receberam o nome de seu descobridor Paul Langerhans (células de Langerhans). Sua denominação deve-se a formação de finos dendritos em sua membrana citoplasmática (morfologia única em formato de estrela) a qual se diferenciavam dos macrófagos (Steinman e Cohn, 1973; Jaitley e Saraswathi, 2012).

Presentes na maioria de tecidos e órgãos, as DCs agem como sentinelas do sistema imunológico, onde capturam e processam microrganismos infecciosos e/ou moléculas antigênicas oriundas desses microrganismos. As DCs são consideradas como sendo as APCs mais potentes, sendo capazes de iniciar uma resposta imune através da ativação de linfócitos T naïve, regulando a sua diferenciação e respostas do tipo Th1, Th2, Th17 e T reguladoras (De Jong *et al.*, 2005). São caracterizadas por expressarem altos níveis da molécula MHC II e também a integrina CD11c (Nussenzweig *et al.*, 1981; Nussenzweig e Steinman, 1982; Metlay *et al.*, 1990; Poltorak e Schraml, 2015) e por sua habilidade em migrar de órgãos não linfoides para órgãos linfoides (Heath e Carbone, 2009). Importante salientar que, em algumas situações, as DCs atuam na resposta imune inata independente da ativação de células T ou da migração para órgãos linfoides secundários (Mashayekhi *et al.*, 2011; Satpathy *et al.*, 2013; Arora *et al.*, 2014).

Durante o processo de conexão entre a indução da resposta imune inata e subsequente desenvolvimento da resposta imune adaptativa, as DCs sofrem o processo de maturação (induzido por quimiocinas, citocinas e componentes microbianos) para que ocorra a indução da imunidade (Steinman *et al.*, 2003; Batalla *et al.*, 2013). A maturação das DCs leva a um



processo de aumento da expressão de MHC I e II assim como de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86) e produção de citocinas próinflamatórias como IL-12 e IFN- $\gamma$ . As DCs são continuamente produzidas a partir de precursores hematopoiéticos da medula óssea e podem ser divididas de vários tipos com funções biológicas distintas (Wu e Liu, 2007). Alguns patógenos como *Leishmania major*, *T. gondii* e *Plasmodium falciparum* podem modular a apresentação de antígenos e sinais co-estimuladores das APCs, sugerindo que parasitos intracelulares podem utilizar diversas estratégias para escapar ou modular a apresentação de antígenos e a atividade mediada por células T no hospedeiro (Fruth *et al.*, 1993; Urban *et al.*, 1999; Brodskyn *et al.*, 2001; Luder *et al.*, 2001).

O mecanismo imune engatilhado logo após a infecção por *T. cruzi* é essencial para o controle da replicação do parasito na fase inicial da doença. Nesse contexto, a infecção por *T. cruzi* modula a maturação e função das DCs dependendo da cepa do parasito (Alba Soto *et al.*, 2003; Poncini *et al.*, 2008). O reconhecimento inato de patógenos intracelulares como o *T. cruzi* pode operar pelo menos de três maneiras distintas para controlar a infecção: (i) detecção e destruição direta por células do sistema imune, especialmente DCs e macrófagos, (ii) ativação de DCs e macrófagos para se tornarem potentes APC e ativadores de uma apropriada resposta imune adaptativa e (iii) respostas de células não hematopoiéticas (miócitos e adipócitos) que são alvos da infecção por *T. cruzi* (Tarleton, 2007). Jackson e colaboradores demonstraram que a diferenciação de DCs a partir de precursores da medula óssea é dependente das proteínas SOCS, onde os sinais engatilhados por citocinas para posterior maturação de DCs ocorre (no núcleo) através de STATs ativadas e a duração ou intensidade desses sinais é dependente de SOCS (Jackson *et al.*, 2004). As proteínas SOCS1 e SOCS3 são induzidas como consequência da sinalização via receptores do tipo Toll sendo capazes de modificar as propriedades funcionais das APCs (Dalpke *et al.*, 2001).

### 3.9- Apoptose

Um mecanismo proposto para que haja ação do parasito no sistema imune do hospedeiro é o mecanismo da apoptose através da liberação de fatores que irão matar células do sistema imune pela ativação da maquinaria da morte celular programada. Apoptose é descrita como sendo um processo ordenado de morte celular, disparado por enzimas denominadas Caspases em respostas a estresses incluindo lesões bioquímicas ou a sinais provenientes de receptores de superfície, possuindo um papel importante na homeostase de organismos multicelulares e na defesa contra patógenos (Assunção Guimarães e Linden,

2004). A superfície glicoconjugada de *T. cruzi*, GIPL, induz apoptose de macrófagos através do domínio lipídico de ceramida (Freire-De-Lima *et al.*, 1998). Estudos demonstraram que o processo de apoptose ocorre em diversos órgãos como baço, linfonodo e coração durante o curso da infecção na doença de Chagas (Lopes *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1999; De Meis *et al.*, 2006) e, paradoxalmente, que o bloqueio da apoptose pode ser um potente alvo para intervenções terapêuticas (Silva *et al.*, 2007). Durante sua diferenciação terminal, diversas células de origem hematopoiética como linfócitos T e B, neutrófilos e outros entram em processo de apoptose, contribuindo para a extinção das respostas imunes. Estudos sugerem que a apoptose possui papel patogênico durante a infecção causada por *T. cruzi* e que, o bloqueio da apoptose pode ser alvo de influência para o tratamento da doença. Os efeitos funcionais de SOCS2 na indução ou inibição da apoptose durante uma infecção ainda não foram estabelecidos.

#### 4- Justificativa e Objetivo geral

Para que ocorra o sucesso de uma resposta imune frente a um patógeno, como por exemplo, *T. cruzi*, é de extrema importância a indução de mediadores pró-inflamatórios, onde a intensidade dessa resposta é dependente de mecanismos repressores e/ou inibitórios. Portanto, o entendimento dos mecanismos de controle da resposta imune durante a infecção por *T. cruzi* é indispensável, uma vez que estas respostas são complexas, incluindo expansão celular, produção de citocinas, quimiocinas, eicosanoides, anticorpos e morte celular, e parecem estar relacionadas à patogênese associada a infecção.

SOCS constituem um grupo de proteínas intracelulares que regulam vias de sinalização de citocinas e controlam respostas celulares e fatores de crescimento. Demonstramos que SOCS2 é importante para a função cardíaca durante a infecção por *T. cruzi*, onde sua deficiência leva a redução de citocinas pró-inflamatórias, secundário ao aumento de células Treg e nível de LXA<sub>4</sub> (Esper *et al.*, 2012). Demonstramos também que LXA<sub>4</sub> exerce um importante papel biológico no controle da ativação de DCs contra *T. gondii*, através da indução de SOCS2 (Machado *et al.*, 2006).

Sendo assim, os estudos propostos aqui irão caracterizar os mecanismos pelos quais SOCS2 regula a ativação e função da resposta imune inata, principalmente de DCs, e “orquestra” a geração/diferenciação/expansão de células efetoras e reguladoras durante a infecção experimental por *T. cruzi*, fornecendo informações importantes acerca da patogênese e resistência à infecção, sendo um modelo apropriado para o entendimento do balanço entre uma eficiente resposta imune e imuno-patologia.

Tendo em mente esta hipótese, o presente trabalho tem como **objetivo geral** estudar o papel de SOCS2 na função e ativação das DCs durante a infecção experimental por *T. cruzi*.

Como **objetivos específicos**, avaliamos (i) o curso da infecção na ausência de DCs, (ii) produção de citocinas na ausência de SOCS2, (iii) expressão de receptores do tipo Toll e de moléculas co-estimuladoras, (iv) papel de SOCS2 na indução da resposta imune adaptativa em animais que receberão DCs oriundas de animais WT e/ou SOCS2 KO, (v) o impacto da transferência de DCs no perfil de linfócitos e o envolvimento de SOCS2 na modulação da apoptose durante a infecção.

## 5- Material e Métodos

## **1- Animais de experimentação**

Foram utilizados camundongos CD11cDTR-Tg (DTR) (os quais possuem o receptor da toxina diftérica associado a expressão do promotor CD11c), C57BL/6 (WT) e SOCS2 “Knockout”(KO), machos, com 6 a 8 semanas de idade em todos os experimentos. Os animais C57BL/6 foram obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO - ICB - UFMG) e os camundongos CD11cDTR-Tg e SOCS2 KO foram obtidos junto a colônia mantida no biotério de criação do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB - UFMG). Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob os números de protocolos 49/2009 e 89/2010. Todos os experimentos foram planejados de forma a minimizar o sofrimento dos animais.

## **2- Amostras de *Trypanosoma cruzi* e infecção experimental**

Foram utilizados parasitos da cepa Y de *T. cruzi* (mantidos em camundongos Swiss) em todos os experimentos. Os animais foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y, diluída em PBS 1X. A parasitemia foi acompanhada diariamente, coletando-se 5  $\mu$ l de sangue da veia caudal de cada animal.

## **3- Purificação de esplenócitos**

O baço de animais WT e SOCS2 KO controles (não infectados) e/ou infectados com a cepa Y de *T. cruzi* foram removidos, digeridos com solução de Collagenase D (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) diluída em PBS 1X (10 mg/ml) e mantidos por 30 minutos a 37<sup>0</sup>C, na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os baços foram macerados usando-se Cell Strainer – 100  $\mu$ m (Becton Dickinson, Brasil) e PBS 1X acrescido de EDTA (5mM) seguidos de centrifugação a 3500 rpm durante 5 minutos. Logo após, as células foram submetidas à incubação com tampão de lise de hemácias - ACK - Acetato de Potássio 5M (NH<sub>4</sub>Cl/KHCO<sub>3</sub>) durante 4 minutos a 4<sup>0</sup>C. Acrescentou-se 10 ml de meio RPMI com 10% de SBF (RPMI 10%) seguido por centrifugação de 3500 rpm durante 5 minutos. Ressuspendeu-se o sobrenadante (RPMI 10%) e as células foram contadas e ajustadas para uma concentração final de  $2 \times 10^6$  células/poço.

#### 4- Citometria de fluxo

Resumidamente, esplenócitos foram obtidos como descrito acima, plaqueados e incubados com Brefeldina A (10 µg/ml) (Invitrogen) durante 4 horas a 37<sup>0</sup>C, na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram fixadas (formaldeído 2% em PBS 1X) e marcadas com combinações específicas de anticorpos (CD11b FITC, IL-12 PE, CD8 PerCP-Cy5, CD11c PECy7); (GR1 FITC, TNF-α PE, CD11c PECy7, IL-10 APC, F4/80 APC-Cy7); (GR1 FITC, TLR4 PE, CD11c PECy7, TLR2 APC, F4/80 APC-Cy7); (GR1 FITC, CD80 PE, MHC PerCPCy5, CD11c PECy7); (CD3 PeCy5, CD4 FITC, NK1.1 PeCy7, CD8 BV450, IFN-γ PE, IL-17 APC); (CD11c PeCy7, CD11b PeCy5, CD8 BV450, IL-12 PE, GR1 APC); (CD19 PeCy5, CD25 Biotina, Streptavidina PeCy7, CD4 FITC, Foxp3 PE, IL-10 APC) e controles de isotipo (todos da BD Pharmingen). O protocolo de marcação foi realizado de acordo com o manual do fabricante. Para cada amostra, 100.000 células (eventos) foram adquiridas por Citometria de Fluxo usando-se o citômetro FACSCanto II (Becton, Dickinson) e analisadas usando-se o software FlowJo (version 8.7) através da delimitação de gates onde as populações celulares em estudo situam-se de acordo com seu tamanho e granulosidade e com os marcadores específicos de cada população.

#### 5- Depleção e Transferência de Células Dendríticas

Para a realização da depleção sistêmica de células dendríticas, camundongos CD11cDTR-Tg foram tratados com 100 µl de Toxina Diftérica (i.p.) (DT- 1µg/camundongo) (Sigma-Aldrich) e após um período de 6 hs, realizou-se a transferência adotiva (i.p.) de células dendríticas (4x10<sup>6</sup> células/camundongo) oriundas de animais WT e/ou SOCS2 KO para os camundongos CD11cDTR-Tg que receberam a toxina. Após um período de 24 hs, inoculou-se os animais com 1x10<sup>3</sup> formas da cepa Y de *T. cruzi*.

#### 6- Purificação de Células Dendríticas

Em síntese, o baço de animais WT e SOCS2 KO foram removidos, digeridos com Collagenase D (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) diluída em PBS 1X (10 mg/ml) e

mantidos por 30 minutos a 37<sup>0</sup>C, na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os baços foram macerados usando-se Cell Strainer – 100 µm (Becton Dickinson, Brasil) e PBS 1X acrescido de EDTA (5mM) seguidos de centrifugação a 1200 rpm durante 10 minutos. As células foram então obtidas logo após centrifugação da suspensão celular com gradiente de BSA (1:1), a 7000 rpm durante 20 minutos. As DCs logo se separam por densidade e encontram-se na interface da suspensão celular (anel de células). Retirou-se as DCs, completou-se o volume com RPMI e centrifugou-se a 1200 rpm durante 10 minutos. Ressuspendeu-se em 1 ml de RPMI 10% para contagem em corante Azul de Tripán na Câmara de Neubauer.

### **7- Isolamento de Neutrófilos**

Os neutrófilos foram obtidos a partir do corte da epífise do fêmur e da tíbia de cada animal seguidos de injeção de RPMI para lavagem dos ossos. Transferiu-se a suspensão de células para o Cell Strainer (70 µm) em um tubo cônico estéril de 50 ml com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Centrifugou-se a 1150 rpm durante 12 minutos a 4<sup>0</sup>C. Ressuspendeu-se o sedimento com 12 ml de água deionizada gelada. Dissolveu-se o sedimento durante 20 segundos com a ajuda de uma pipeta Pasteur. Em seguida, adicionou-se 4 ml da solução de KCl 0,6 M (homogeneizando sempre) completando para um volume de 50 ml com PBS 1X. Centrifugou-se a 1300 rpm durante 6 minutos a 4<sup>0</sup>C e ressuspendeu-se o sedimento com 5 ml de PBS 1X. Transferiu-se a suspensão celular para dentro de um tubo cônico com 3 ml de Ficoll-Hypaque (Sigma 1077). Centrifugou-se a 1500 rpm durante 30 minutos a 4<sup>0</sup>C. Ressuspendeu-se o pellet em 1 ml de RPMI e realizou-se a contagem em corante Azul de Tripán diluído 50 vezes em Câmara de Neubauer. Realizou-se a contagem diferencial dos neutrófilos (método Citospin) para certificação da pureza do isolamento. Usou-se a concentração de 1x10<sup>6</sup> células por poço nos experimentos.

### **8- Detecção de Apoptose**

Para detecção de Apoptose de células esplênicas, usou-se o kit comercial PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen/559763). Resumidamente, as células foram lavadas 1X com PBS/BSA 1% para retirada do RPMI. Centrifugou-se a 3500 rpm durante 5 minutos. Fez-se a marcação com os anticorpos específicos (CD11b Alexa 488, GR1 APC,



F4/80 PeCy7 (10  $\mu$ l/poço) e incubou-se durante 20 minutos a 4<sup>0</sup>C na ausência de luz. Logo após, lavou-se uma vez com PBS gelado (200  $\mu$ l) e, em seguida, ressuspendeu-se as células em tampão (providenciado pelo kit) em uma concentração de 1x10<sup>6</sup> células/ml. Adicionou-se a Annexina (PE) e o 7AAD (PerCP), incubando-se durante 15 minutos a temperatura ambiente para posterior leitura no citômetro de fluxo em até uma hora.

## 9- Western Blotting

Logo após o isolamento dos neutrófilos da medula óssea como descrito acima, as células foram plaqueadas (2x10<sup>6</sup> células/poço) e, em seguida, pré- tratadas com ou sem LXA<sub>4</sub> (1 $\mu$ g/ml) durante 8 horas. Logo após este período, esses neutrófilos foram cultivados na presença ou ausência de TNF (100 ng/ml) durante 20 hs e então a expressão Caspase 3 total e Caspase 3 clivada foram avaliadas. Adicionou-se 200  $\mu$ l de uma solução de lise (Triton X-100 1%; Tris/HCl 100 mM, pH 8.0; glicerol 10%; EDTA 0.2 mM; NaCl 200 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM, NaF 25mM; leupeptina 2,5  $\mu$ g/ml; aprotinina 5  $\mu$ g/ml e ortovanadato de sódio 1 mM) e deixou-se em banho de gelo durante 15 minutos. Posteriormente, centrifugou-se o lisado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4<sup>o</sup> C, sendo o sobrenadante coletado e armazenado à -20<sup>o</sup>C até o momento de uso. Determinou-se a concentração das proteínas totais por espectrofotometria através do “Kit Bio-Rad Assay” (Bio-Rad Laboratories USA), por método de Bradford. Aplicou-se 50  $\mu$ g de proteínas, onde estas foram separadas em gel de poliacrilamida a 12% e em seguida transferidas para membrana de nitrocelulose. Correu-se em paralelo com as amostras, o padrão de proteínas (BenchMark Prestained Protein Ladder – Invitrogen 10748010). Logo após a transferência, bloqueou-se a membrana com 5% de leite em pó (Molico – Nestle) + TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,1% Tween 20) durante 2 horas sob agitação a temperatura ambiente. Em seguida lavou-se a membrana três vezes com TBS-T durante 30 minutos (10 minutos cada lavagem). Logo após, foram adicionados os anticorpos primários monoclonais Beta actina na diluição de 1:5000 (Sigma/A5316), Caspase 3 total na diluição de 1:2000 ( Cell Signaling/9665) e Caspase 3 clivada na diluição de 1:2000 (Cell Signaling/9664) diluídos em TBS-T e leite em pó 1% com posterior incubação “overnight” a 4<sup>0</sup>C. No dia seguinte, repetiu-se a lavagem da membrana e adicionou-se os anticorpos secundários (camundongo e coelho) nas diluições de 1:6000 e 1:3000 respectivamente com posterior incubação durante 4 horas a temperatura ambiente. A

membrana foi então lavada e incubada com o reagente ECL (ECL westenr blotting detection reagentes/GE healthcare – UK-Amersham/RPN 2209) durante 2 minutos sendo posteriormente exposta ao filme de raio-X (Hyper Film/Kodak) durante 20 minutos na ausência de luz. A densidade óptica de cada banda foi analisada pelo programa de imagens Image-J.

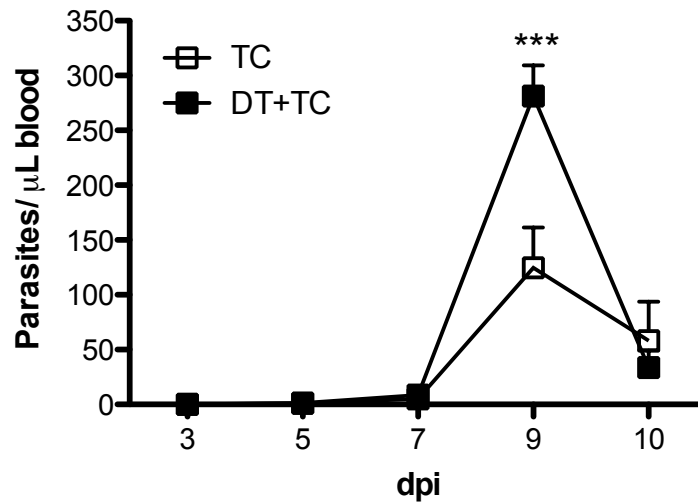
## **10- Análise estatística**

A significância estatística das diferenças nos valores entre as amostras controles ou tratadas/infectadas foram analisadas pelo teste Two-way ANOVA com o pós-teste de Bonferroni quando necessário comparações múltiplas e variáveis paramétricas. As diferenças foram consideradas ser significantes com um  $p$  igual ou  $< 0,05$ . Todos os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Para análise estatística, usou-se o Graph Prism Software 5.0.

## 6- Resultados

### 1) Depleção de DCs aumenta a susceptibilidade a infecção por *T. cruzi*

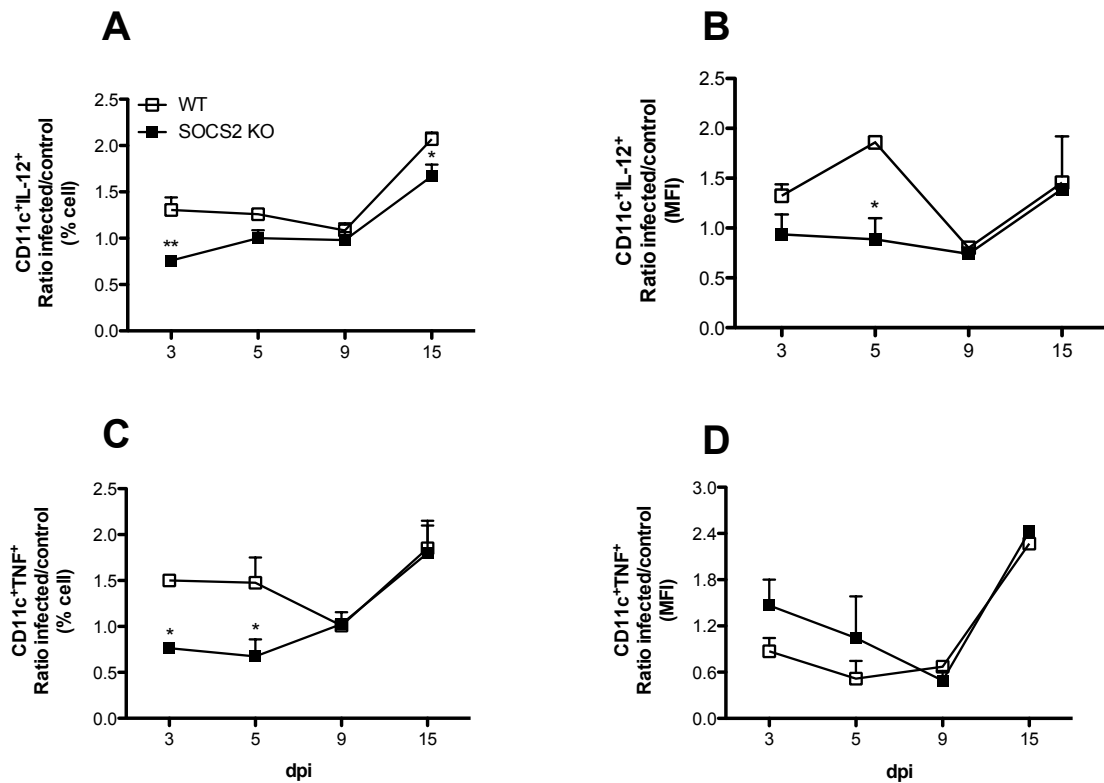
Previamente demonstramos que SOCS2 é importante para a função cardíaca durante a infecção por *T. cruzi* e que a sua deficiência leva a redução de citocinas pró-inflamatórias, secundário ao aumento de células Treg e nível de LXA<sub>4</sub> (Esper *et al.*, 2012). Entretanto, devido ao fato que várias células do nosso organismo expressam SOCS2, torna-se necessário investigar as características imunológicas das diferentes populações celulares durante a infecção por *T. cruzi* na presença ou ausência de SOCS2. Como discutido anteriormente, DCs são as principais células apresentadoras de antígenos onde, juntamente com outras células (como macrófagos), iniciam uma resposta imune inata através da liberação de mediadores pró-inflamatórios (citocinas) que são essenciais para o controle inicial da replicação do parasito. Primeiramente, com o intuito de analisarmos o papel das DCs durante o curso natural da infecção experimental por *T. cruzi in vivo*, nós utilizamos animais CD11c/DTR-Tg, os quais possuem o receptor da toxina diftérica (DT) associado a expressão do promotor CD11c. Assim, a injeção da DT nesses animais causa uma depleção temporária de DCs. Os animais CD11c/DTR-Tg receberam ou não intraperitonealmente (i.p.) a dose de 1µg de DT e, após um período de 6 horas, foram infectados i.p. com 1000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. A parasitemia foi acompanhada em diferentes dias após a infecção. Observamos que a depleção de DCs ocasionou um aumento significativo do número de parasitos nesses animais, mostrando assim o papel fundamental dessas células para que haja um controle inicial da replicação do parasito *in vivo* (Figura 1).



**Figura 1. Depleção de DCs aumenta a susceptibilidade a infecção por *T. cruzi*.** Animais CD11cDTR-Tg foram tratados ou não com toxina diftérica e após um período de 6 hs, foram infectados intraperitonealmente com 1000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. A parasitemia foi acompanhada em diferentes dias após a infecção. Para a análise estatística usou-se o teste two-way ANOVA com o pós- teste de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$  para comparação de camundongos CD11cDTR-Tg que foram infectados (quadrado aberto) versus camundongos CD11cDTR-Tg que tiveram suas DCs depletadas seguidos de infecção com *T. cruzi* (quadrado fechado). Os dados mostram a média e o desvio padrão do número de parasitos/microlitro de sangue e são representativos de três experimentos independentes (8 animais/grupo).

## **2) Papel de SOCS2 na produção de citocinas pró-inflamatórias por DCs durante a infecção experimental por *T. cruzi***

A família de proteínas SOCS regulam as vias de transdução de sinal através da ativação de citocinas e receptores de hormônios. Nosso grupo demonstrou que as funções imuno-reguladoras de lipoxinas são parcialmente dependentes da indução e atividade da proteína SOCS2 que são expressas em DCs (Machado *et al.*, 2006). Como as citocinas inflamatórias IL-12 e TNF- $\alpha$  são fundamentais para um controle inicial da infecção e também para direcionar uma resposta efetiva Th1, nosso próximo passo foi investigar a produção dessas citocinas por DCs deficientes de SOCS2. Os baços de animais WT e SOCS2 KO infectados por *T. cruzi* foram removidos (nos tempos indicados), processados e a produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  foi avaliada por citometria de fluxo. Observamos durante a imunidade inata uma redução na frequência de DCs produtoras de IL-12 (Figura 2A) e de TNF- $\alpha$  (Figura 2C), além da diminuição na média de intensidade de IL-12 (Figura 2B), mas não de TNF- $\alpha$  (Figura 2D), em animais deficientes de SOCS2 quando comparados com animais WT. Durante a imunidade adaptativa (15 dpi), foi observado apenas uma redução na frequência de DCs produtoras de IL-12 em animais SOCS2 KO infectados quando comparados com WT (Figura 2A). Esses resultados sugerem que SOCS2 é importante, principalmente durante a imunidade inata (3dpi), na indução/regulação da produção de IL-12 e TNF- $\alpha$ .

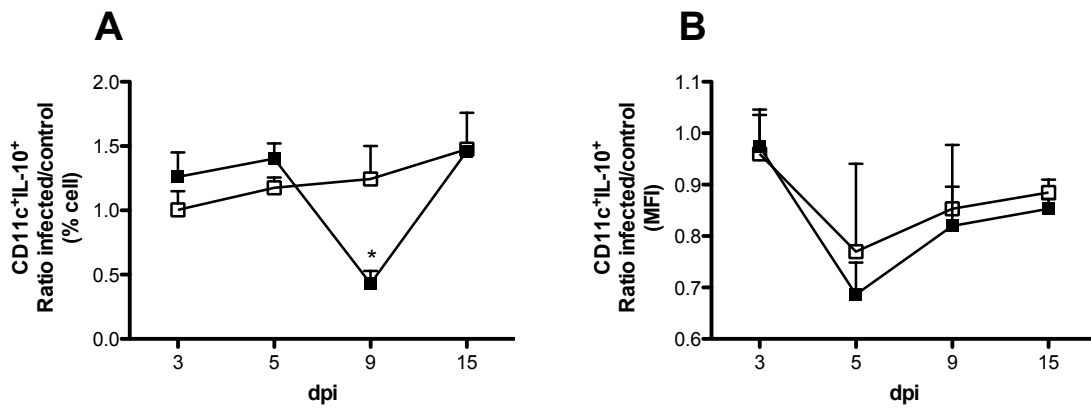


**Figura 2. Papel de SOCS2 na produção de citocinas pró-inflamatórias por DCs durante a infecção experimental por *T. cruzi*.** Animais WT e deficientes de SOCS2 foram infectados intraperitonealmente com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) e, em diferentes dias após a infecção (3, 5, 9 e 15 dpi), foram mortos e as células do baço purificadas e preparadas para a detecção intracelular de IL-12 e TNF- $\alpha$  (em células F4/80<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> e F4/80<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>) por citometria de fluxo. Para a análise estatística usou-se o teste two-way ANOVA com o pós- teste de Bonferroni. \*\*  $p < 0,01$  para comparação de camundongos WT versus SOCS2 KO infectados. Os dados são representativos da média (+/- SEM) de dois experimentos independentes (4 animais/grupo).

### **3) Deficiência de SOCS2 resulta na diminuição da produção de IL-10 por DCs durante a infecção por *T. cruzi***

Uma resposta imune ágil e eficaz durante a infecção por *T. cruzi* é fundamental para o estabelecimento da relação parasito-hopedeiro. Com isso, a resposta Th1 é imprescindível para que haja o controle da infecção enquanto mediadores anti-inflamatórios como a citocina IL-10, são essenciais para haver um balanço dessa resposta imune. A IL-10 é uma citocina imunossupressora produzidas por diversos tipos celulares incluindo as DCs durante a infecção por *T. cruzi* (Abrahamsohn e Coffman, 1996; Poncini *et al.*, 2008; Alba Soto *et al.*, 2010; Batalla *et al.*, 2013). Como SOCS2 modula a produção de citocinas, ambas pró- e anti-inflamatórias que são fundamentais na patogênese da infecção causada por *T. cruzi*, nosso próximo passo foi investigar a produção de IL-10 por DCs deficientes de SOCS2 durante o curso da infecção. Os baços de animais WT e SOCS2 KO infectados por *T. cruzi* foram removidos, processados e a produção da citocina IL-10 foi avaliada por citometria de fluxo. Não observamos diferenças significativas entre os grupos durante a resposta inata (Figuras 3A, B). Entretanto, na fase adaptativa da resposta imune foi observada uma redução na frequência de DCs produzindo IL-10 em animais SOCS2 KO quando comparados com animais WT (Figura 3A). Não houve diferenças na média de intensidade de fluorescência de IL-10 entre os dois grupos (Figura 3B). Esses resultados, juntamente com os resultados apresentados anteriormente, sugerem que a redução da frequência de DCs produtoras de IL-12 e TNF- $\alpha$  não está associada a um aumento de DCs produtoras de IL-10.

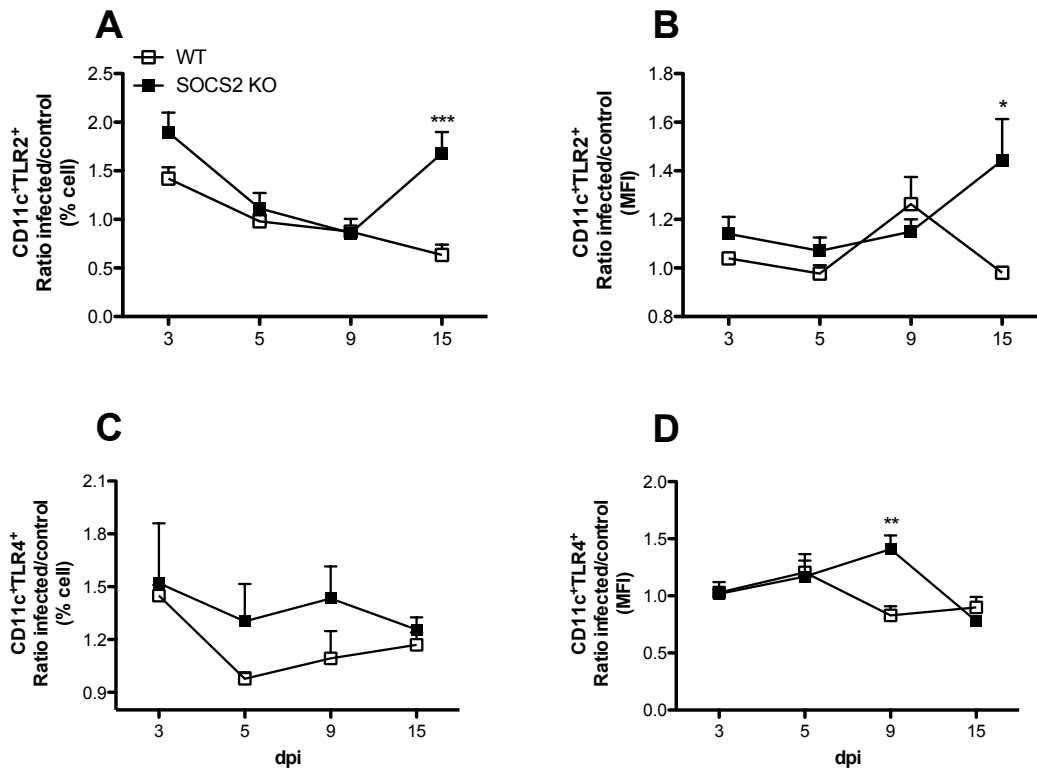




**Figura 3. Deficiência de SOCS2 resulta na diminuição da produção de IL-10 por DCs durante a infecção por *T. cruzi*.** Animais WT e deficientes de SOCS2 foram infectados via intraperitoneal com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) e, em diferentes dias após a infecção (3, 5, 9 e 15 dpi), foram sacrificados e as células do baço purificadas e preparadas para a detecção intracelular de IL-10 em células F4/80<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> por citometria de fluxo. Para a análise estatística usou-se o teste two-way ANOVA com o pós- teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  para comparação de camundongos WT versus SOCS2 KO infectados. Os dados são representativos da média (+/- SEM) de dois experimentos independentes (4 animais/grupo).

#### **4) Expressão de receptores do tipo Toll em DCs deficientes de SOCS2 durante a infecção por *T. cruzi***

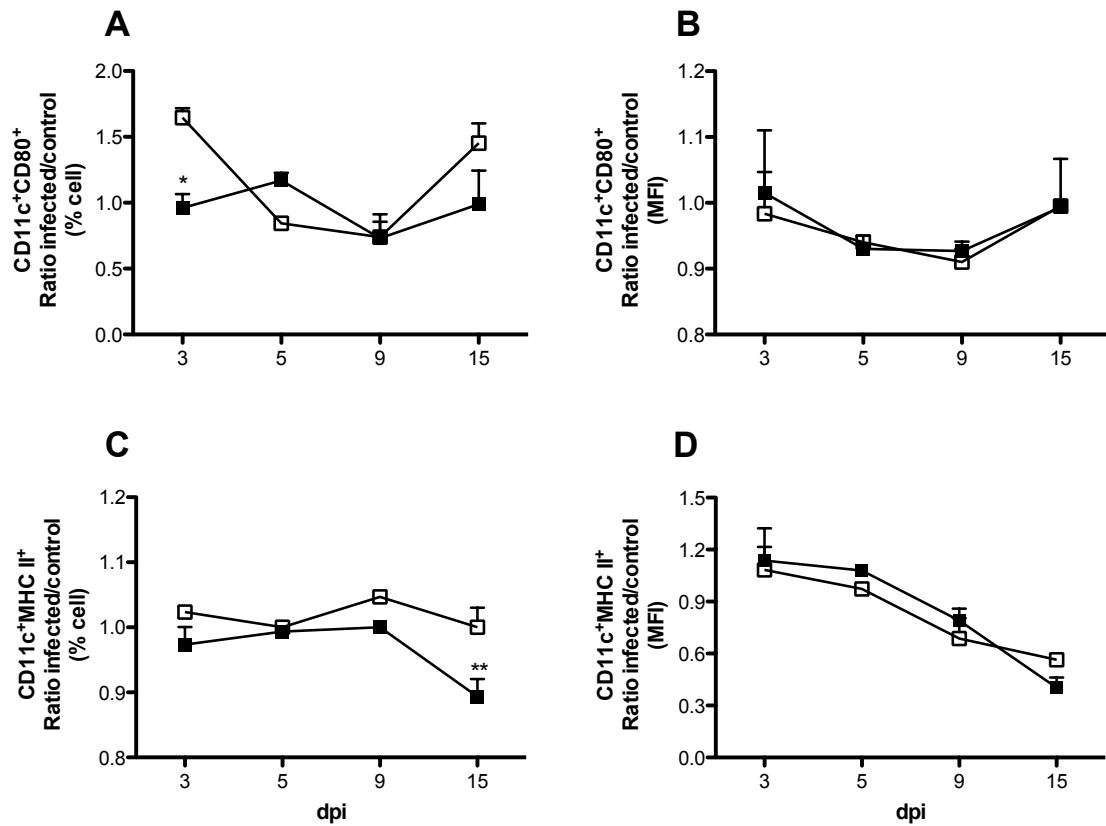
Os receptores do tipo Toll (TLR) são importantes componentes do sistema imune inato expressos nas superfícies celulares que desempenham um relevante papel no reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), promovendo ativação de uma série de cascatas de sinalização intracelular que levam a produção de citocinas. As proteínas SOCS são induzidas através da sinalização de citocinas e também pela estimulação de TLR (Baetz, 2004; Hanada *et al.*, 2005; Mansell *et al.*, 2006; Posselt *et al.*, 2011), além de regularem negativamente e/ou modificarem os sinais que ativam as DCs (Yoshimura *et al.*, 2007). Desta maneira, nosso próximo objetivo foi avaliar a expressão de TLR2 e TLR4 em DCs deficientes de SOCS2 durante a infecção experimental por *T. cruzi*. Os baços de animais WT e SOCS2 KO infectados por *T. cruzi* foram removidos, processados e a expressão dos receptores TLR2 e TLR4 foi avaliada por citometria de fluxo. No início da infecção (3 dpi) foi observado um aumento na frequência de DCs expressando TLR2 e TLR4 e na média de intensidade de fluorescência desses receptores (Figuras 4A-D). Entretanto, não foi observado diferenças significativas entre os animais SOCS2 KO e WT. Durante a imunidade adaptativa (15 dpi) a deficiência de SOCS2 resultou no aumento da frequência de DCs expressando TLR2, mas não de TLR4 (Figuras 4A, C), e no aumento da média de intensidade de fluorescência de TLR2 e TLR4 (15 e 9 dpi, respectivamente) quando comparado com WT (Figuras 4B, D). Esses resultados sugerem que SOCS2 modula tanto a geração de DCs expressando TLR2 e TLR4 como o nível de expressão desses receptores, principalmente durante a imunidade adaptativa.



**Figura 4. Expressão de receptores do tipo Toll em DCs deficientes de SOCS2 durante a infecção por *T. cruzi*.** Animais WT e deficientes de SOCS2 foram infectados via intraperitoneal com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) e, em diferentes dias após a infecção (3, 5, 9 e 15 dpi), foram sacrificados e as células do baço purificadas e preparadas para a detecção da expressão dos receptores do tipo Toll (TLR2 e TLR4) em células F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> por citometria de fluxo. Para a análise estatística usou-se o teste two-way ANOVA com o pós- teste de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$  para comparação de camundongos WT versus SOCS2 KO infectados. Os dados são representativos da média (+/- SEM) de dois experimentos independentes (4 animais/grupo).

### **5) Expressão de MHC II e da molécula co-estimuladora CD80 em DCs deficientes de SOCS2 durante a infecção experimental por *T. cruzi***

DCs são consideradas como as APCs profissionais/mais potentes, sendo capazes de iniciar a resposta imune adaptativa através da ativação de linfócitos T naïve. O estímulo de células T requer a interação entre o receptor destas células (TCR) e o complexo peptídeo-MHC presente nas APCs. Nesse sentido, o principal papel das APCs é tornar o antígeno “aparente” para o linfócito T, logo após sua captação e processamento em pequenas partículas que o ligam a moléculas MHC de classe I e II. Entretanto, é necessário um segundo sinal para que as células T tenham sua resposta otimizada. Este segundo sinal é desencadeado por moléculas co-estimuladoras (como CD80, CD86, CD40), presentes nas membranas das APCs que se ligam a receptores específicos presentes na superfície de linfócitos T. Entretanto, pouco se conhece sobre o papel de SOCS2 na sinalização/expressão de moléculas co-estimuladoras. Desta maneira, como a ativação de células T constitui um passo fundamental para o desenvolvimento da doença de Chagas, nosso próximo passo foi investigar a expressão de CD80 e de MHC II na superfície de DCs deficientes de SOCS2 durante a infecção experimental por *T. cruzi*. Os baços de animais WT e SOCS2 KO infectados por *T. cruzi* foram removidos, processados e a expressão da molécula co-estimuladora CD80 e MHC II foi avaliada por citometria de fluxo. Nossos resultados demonstraram que a infecção com *T. cruzi* em animais WT, tanto durante a imunidade inata (3dpi) como adaptativa (15 dpi), induz o aumento da frequência de DCs expressando CD80, sem alterar a média de intensidade de fluorescência dessa molécula (Figuras 5A, B). Entretanto, na ausência de SOCS2 foi observado uma redução de DCs positivas para CD80 no início da infecção (3 dpi) quando comparado com WT (Figura 5A). Nossos resultados também demonstraram que a infecção por *T. cruzi* não altera a frequência de DCs positivas para MHCII em animais WT, mas reduz a frequência dessas células nos animais SOCS2 KO durante a imunidade adaptativa (15 dpi) (Figura 5C). Importante, observamos que a infecção induziu uma redução progressiva da expressão de MHCII nos dois grupos (Figura 5D). Esses resultados sugerem que SOCS2 é importante na indução de parte da maquinaria necessária para a ativação de células T naïve durante a infecção por *T. cruzi*.

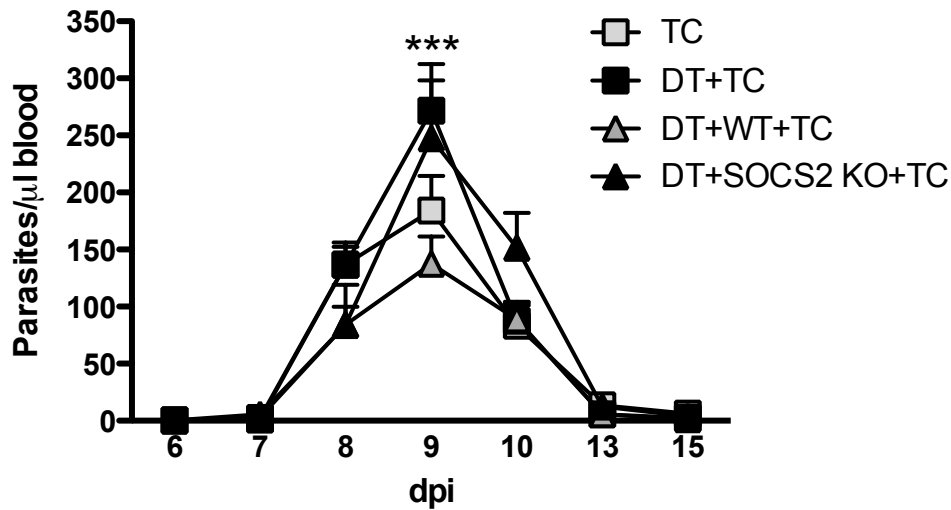


**Figura 5. Expressão da molécula co-estimuladora CD80 e MHC II em DCs deficientes de SOCS2 durante a infecção experimental por *T. cruzi*.**

Animais WT e deficientes de SOCS2 foram infectados via intraperitoneal com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) e, em diferentes dias após a infecção (3, 5, 9 e 15 dpi), foram sacrificados e as células do baço purificadas e preparadas para a detecção da expressão da molécula co-estimuladora CD80 e de MHC II em células F4/80<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> por citometria de fluxo. Para a análise estatística usou-se o teste two-way ANOVA com o pós- teste de Bonferroni. \*\*  $p < 0,01$  para comparação de camundongos WT versus SOCS2 KO infectados. Os dados são representativos da média (+/- SEM) de dois experimentos independentes (4 animais/grupo).

## **6) Transferência adotiva de DCs deficientes de SOCS2 resulta no aumento da parasitemia durante a infecção por *T. cruzi***

Com o intuito de investigar o impacto da ação de SOCS2 diretamente em DCs e na habilidade dessas células em induzir/conduzir uma resposta imune contra a infecção causada por *T. cruzi*, utilizamos camundongos CD11cDTR-Tg os quais expressam receptores da Toxina Diftérica (DT) sob controle de seu promotor CD11c. Como mencionado anteriormente, nesses animais, a administração da DT leva a uma depleção temporária das DCs (Jung *et al.*, 2002), permitindo a transferência adotiva de DCs oriundas de animais WT ou deficientes de SOCS2. Foram utilizados quatro grupo de animais onde, no primeiro grupo, esses foram infectados com 1000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* (grupo TC). Em um segundo grupo (grupo DT+TC), esses animais tiveram suas DCs depletadas e, logo após um período de 24 horas, foram infectados com *T. cruzi*. No terceiro e quarto grupos (grupo DT+WT+TC e grupo DT+SOCS2 KO+TC respectivamente), esses animais tiveram suas DCs depletadas e após um período de 6 horas, receberam a transferência adotiva de DCs provenientes de animais WT e SOCS2 KO, onde 24 horas após, estes dois grupos de animais foram infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. A parasitemia foi analisada diariamente. Observamos que o grupo de animais que tiveram suas DCs depletadas e o grupo que recebeu DCs originárias de animais SOCS2 KO não foram capazes de controlar a infecção aos 9 dpi (Figura 6), demonstrando assim a importância da presença de DCs e de SOCS2 nessas células para o controle da infecção com *T. cruzi*.

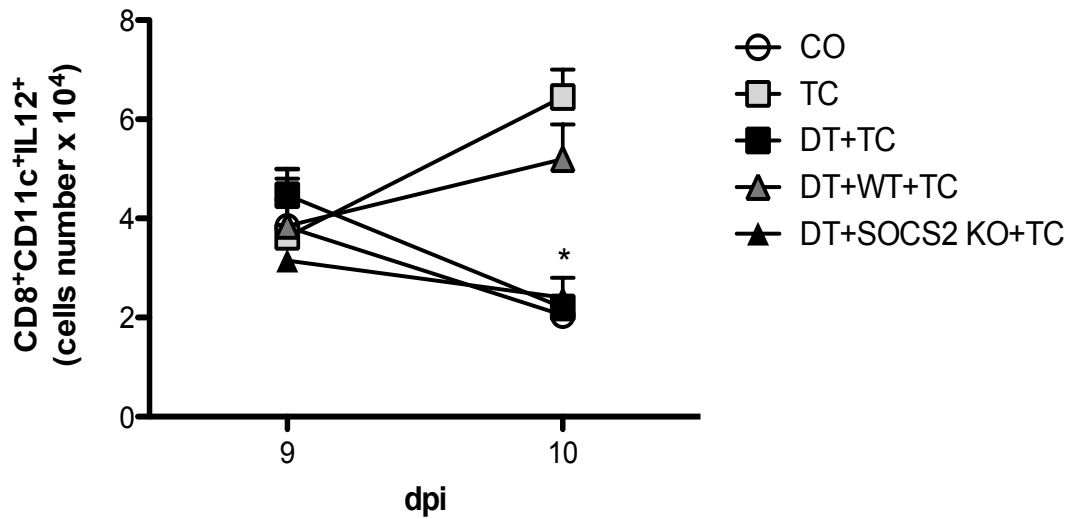


**Figura 6. Transferência adotiva de DCs deficientes de SOCS2 resulta no aumento da parasitemia durante a infecção por *T. cruzi*.** Animais CD11cDTR-Tg depletados (DT+TC) ou não (TC) com DT e que receberam transferência adotiva de DCs oriundas de animais WT (DT+WT+TC) ou deficientes de SOCS2 (DT+SOCS2KO+TC) foram infectados i.p. com 1000 formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. A parasitemia foi acompanhada em diferentes dias após a infecção. Para a análise estatística usou-se o teste two-way ANOVA com o pós- teste de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$  para comparação de camundongos CD11cDTR-Tg depletados seguidos de transferência adotiva de DCs oriundas de animais WT (DT+WT+TC) versus camundongos CD11cDTR-Tg depletados que receberam transferência adotiva de DCs oriundas de animais deficientes de SOCS2 KO (DT+SOCS2KO+TC) infectados com *T. cruzi*. Os dados mostram a média e o desvio padrão (+/- SEM) do número de parasitos/microlitro de sangue e são representativos de três experimentos independentes (8 animais/grupo).

### **7) Deficiência de SOCS2 em DCs resulta na redução da produção de IL-12 por essas células durante a infecção por *T. cruzi***

Como mencionado anteriormente DCs são cruciais na indução da resposta imune adaptativa fundamental para que ocorra resistência à infecção por *T. cruzi*, principalmente através da indução de um perfil predominantemente Th1 (Nickell *et al.*, 1993; Rodrigues *et al.*, 2012). Assim, nosso próximo objetivo foi investigar o papel da proteína SOCS2 na indução da resposta imune adaptativa em animais CD11cDTR-Tg que receberam transferência adotiva de DCs provenientes de animais WT ou deficientes de SOCS2. Primeiramente, os baços dos animais foram removidos aos 9 e 10 dpi, processados e a produção de IL-12 foi avaliada por citometria de fluxo. Nós observamos que nesse período de infecção, onde é considerado encontrar a resposta imune adaptativa, ainda é possível detectar DCs produtoras de IL-12. Camundongos que tiveram suas DCs depletadas e que receberam DCs oriundas de animais SOCS2 KO apresentaram uma diminuição da produção da citocina IL-12 por essas células aos 10 dpi quando comparados com os animais que receberam DCs oriundas de animais WT (Figura 7). Esses resultados sugerem que a presença de SOCS2 é importante para a produção eficaz de IL-12 por DCs durante a fase adaptativa da resposta imune contra *T. cruzi*.



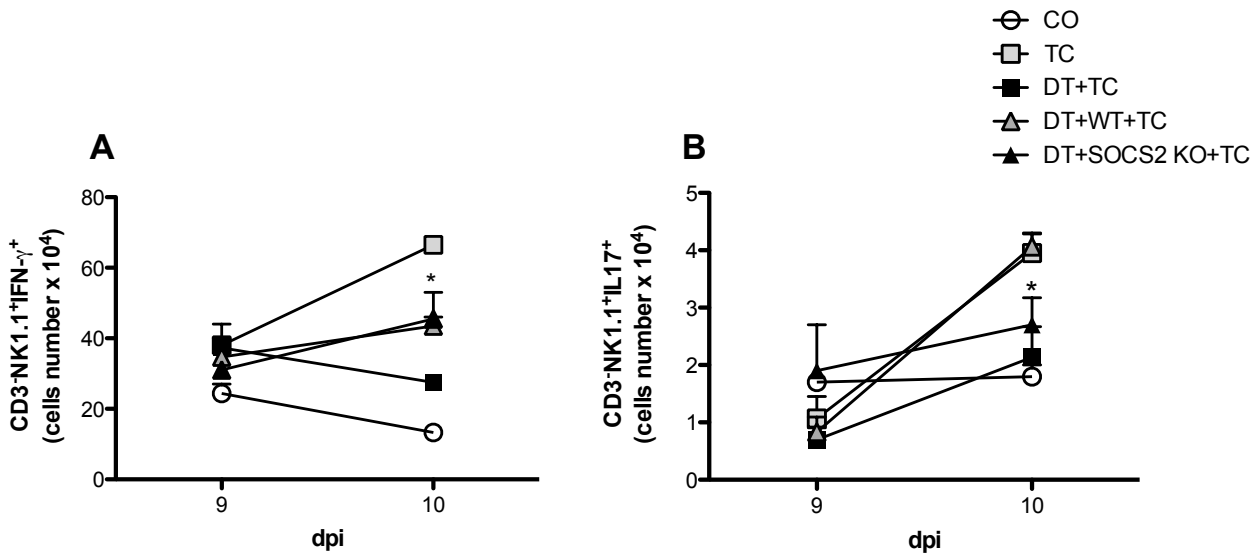


**Figura 7. Deficiência de SOCS2 em DCs resulta na redução da produção de IL-12 por essas células durante a infecção por *T. cruzi*.** Animais CD11cDTR-Tg depletados (DT+TC) ou não (TC) e que receberam transferência adotiva de DCs provenientes de animais deficientes de SOCS2 (DT+SOCS2KO+TC) ou WT (DT+WT+TC) foram infectados intraperitonealmente com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) e, em diferentes dias após a infecção (9 e 10 dpi), foram sacrificados, as células do baço purificadas e preparadas para a detecção intracelular de IL-12 em células CD8<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> por citometria de fluxo. Para a análise estatística usou-se o teste two-way ANOVA com o pós-teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  para comparação de camundongos CD11cDTR-Tg depletados que receberam células dendríticas oriundas de camundongos WT (DT+WT+TC) versus camundongos CD11cDTR-Tg depletados que receberam células dendríticas oriundas de camundongos SOCS2 KO (DT+SOCS2KO+TC). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (6 animais/grupo).

## 8) A expressão de SOCS2 em DCs é essencial para ativação de células NK

Célula NK quando ativada por IL-12 é uma das principais produtoras de IFN- $\gamma$  durante a infecção por *T. cruzi*, sendo capazes de acionar a diferenciação da resposta Th1 (Silva *et al.*, 1992; Abrahamsohn e Coffman, 1996). Trabalhos recentes, demonstraram que esse subtipo celular também é capaz de produzir IL-17 (Weaver *et al.*, 2007; Da Matta Guedes *et al.*, 2010; Passos *et al.*, 2010; Sutton *et al.*, 2012). Paralelamente a produção de citocinas Th1, as células efectoras Th17, estão sendo relacionadas com a infecção por *T. cruzi* sendo capazes de modular a resposta Th1 (Da Matta Guedes *et al.*, 2010). A IL-17 é uma citocina inflamatória que induz a produção de quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão, acúmulo de neutrófilos estando envolvida também na resposta imune inata (Kolls e Linden, 2004; Linden *et al.*, 2005).

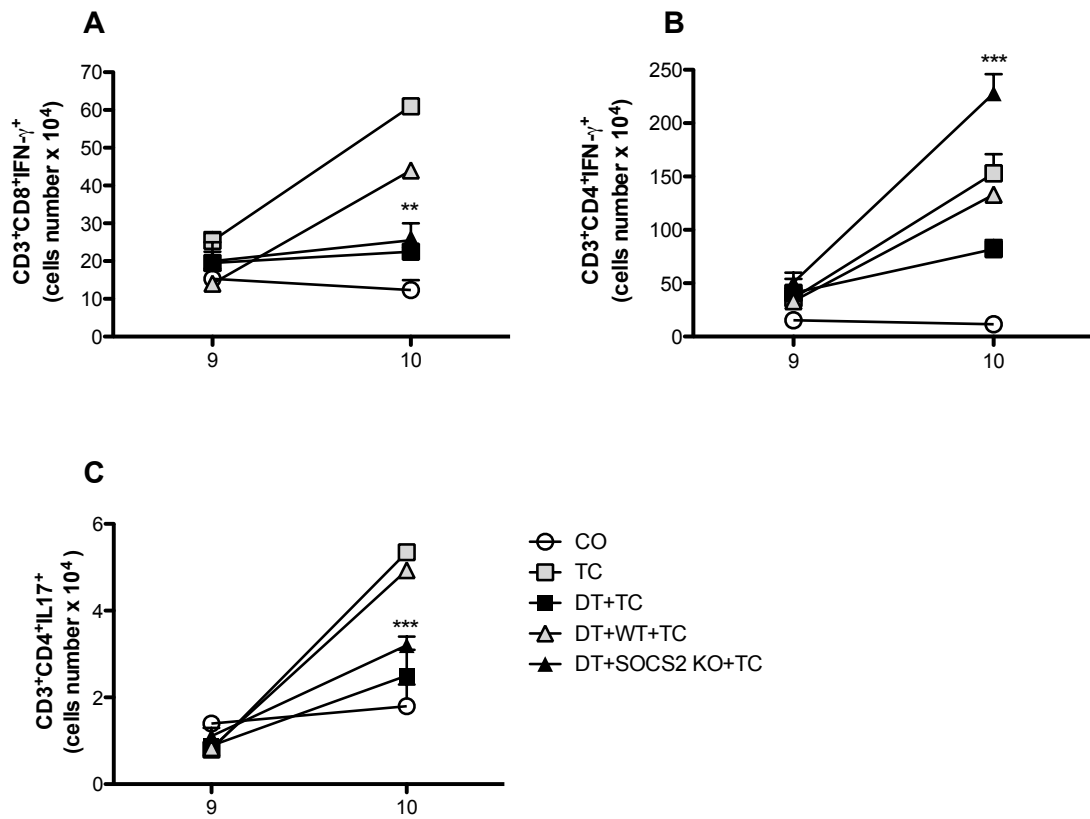
Com isso, nosso próximo passo foi investigar o papel de SOCS2 em DCs na indução da produção de IFN- $\gamma$  e IL-17 por células NK durante a infecção por *T. cruzi*. Nossa hipótese é devido ao fato de que se a ausência de SOCS2 em DCs resultou na redução da produção de IL-12 por essas células, a ativação de células NK dependente dessa citocina estaria alterada. Para isso, os baços dos animais foram removidos (9 e 10 dpi), processados e a produção de IFN- $\gamma$  e IL-17 por células NK foi avaliada por citometria de fluxo. Nossos resultados demonstraram que camundongos que tiveram suas DCs depletadas, reduziram a frequência de NK produtoras de IFN- $\gamma$  e de IL-17 aos 10 dpi (Figura 8A, B) enquanto animais que receberam DCs oriundas de animais SOCS2 KO reduziram a frequência de NK produtoras de IL-17 quando comparado com animais que receberam DCs oriundas de animais WT (Figura 8B).



**Figura 8. A expressão de SOCS2 em DCs é essencial para ativação de células NK.** Animais CD11cDTR depletados (DT+TC) ou não (TC) e que receberam transferência adotiva de DCs provenientes de animais deficientes de SOCS2 (DT+SOCS2KO+TC) ou WT (DT+WT+TC) foram infectados intraperitonealmente com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) e, em diferentes dias após a infecção (9 e 10 dpi), foram sacrificados, as células do baço purificadas e preparadas para a detecção intracelular de IFN- $\gamma$  e IL-17 em células CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup> por citometria de fluxo. Para a análise estatística usou-se o teste two-way ANOVA com o pós-teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  para comparação de camundongos depletados e infectados (DT+TC) versus camundongos que receberam células dendríticas oriundas de camundongos SOCS2 KO (DT+SOCS2KO+TC) (Fig. 8A) e para comparação de camundongos depletados que receberam células dendríticas oriundas de camundongos WT (DT+WT+TC) versus camundongos depletados que receberam células dendríticas oriundas de camundongos SOCS2 KO (DT+SOCS2KO+TC) (Fig. 8B). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (6 animais/grupo).

### **9) SOCS2 em DCs é fundamental para indução/ativação de células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> durante a infecção por *T. cruzi***

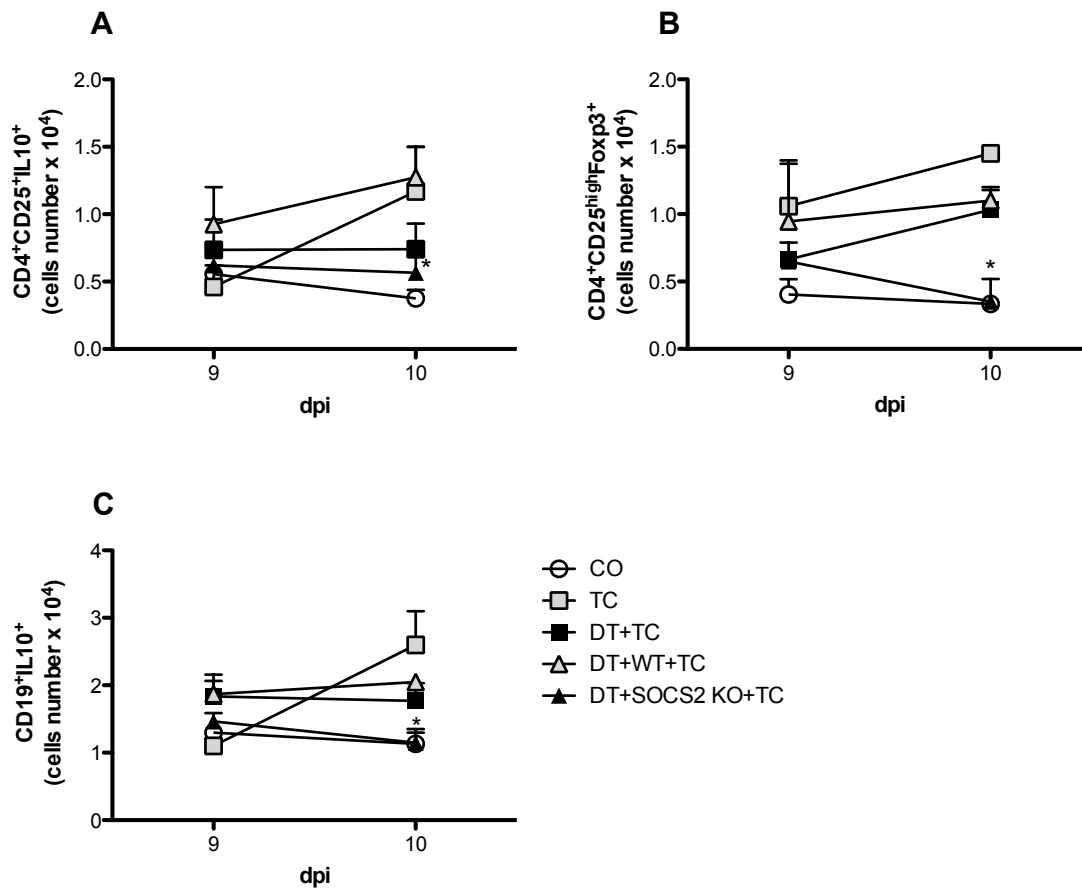
Para que os linfócitos exerçam suas atividades funcionais com eficiência, eles precisam ser ativados adequadamente. Como nossos resultados anteriores demonstraram que a ausência de SOCS2 em DCs altera seu perfil de expressão de importantes moléculas reguladoras da ativação de linfócitos, nosso próximo passo foi analisar o impacto da transferência adotiva de DCs oriundas de SOCS2 KO no perfil dos linfócitos durante a infecção por *T. cruzi*. Nossos resultados demonstraram que a depleção de DCs e a transferência de DCs deficientes de SOCS2 resulta na redução de linfócitos CD8 produtores de IFN- $\gamma$  (Figura 9A) e de CD4 produtores de IL-17 (Figura 9C). Entretanto, animais que receberam DCs deficientes de SOCS2 aumentaram os números de CD4 produtoras de IFN- $\gamma$  (Figura 9B), diferente dos camundongos que tiveram apenas suas DCs depletadas e que não foram reconstituídos com essas células, que apresentaram uma redução de CD4 produtores de IFN- $\gamma$  (Figura 9B). Esses resultados sugerem que DCs são essenciais para a indução de linfócitos CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> e que a expressão de SOCS2 em DCs é importante para a indução/ativação eficiente e regulada desses linfócitos.



**Figura 9. SOCS2 em DCs é fundamental para indução/ativação de células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> durante a infecção por *T. cruzi*.** Animais CD11cDTR depletados (DT+TC) ou não (TC) e que receberam transferência adotiva de DCs provenientes de animais deficientes de SOCS2 (DT+SOCS2KO+TC) ou WT (DT+WT+TC) foram infectados intraperitonealmente com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) e, em diferentes dias após a infecção (9 e 10 dpi), foram sacrificados, as células do baço purificadas e preparadas para a detecção intracelular de IFN- $\gamma$  e IL-17 por citometria de fluxo. Para a análise estatística usou-se o teste two-way ANOVA com o pós- teste de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$  para comparação de camundongos CD11cDTR depletados que receberam células dendríticas oriundas de camundongos WT (DT+WT+TC) versus camundongos CD11cDTR depletados que receberam dendríticas oriundas de SOCS2 KO (DT+SOCS2KO+TC). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (6 animais/grupo).

### **10) Ausência de SOCS2 em DCs causa disfunção na geração de células reguladoras/supressoras da resposta imune durante a infecção por *T. cruzi***

O sistema imunológico possui mecanismos efetores para haver eliminação de microrganismos patogênicos e células infectadas; também possui mecanismos reguladores para que as células efetoras se mantenham em controle durante condições fisiológicas e após ativação induzida por processos inflamatórios (Kondelkova *et al.*, 2010). O equilíbrio entre mecanismos efetores e reguladores pode determinar o progresso da infecção podendo ser benéfico em alguns casos tanto para o parasito quanto para o hospedeiro. As células Treg foram demonstradas estar envolvidas no controle da inflamação no coração, replicação do parasito e resistência do hospedeiro frente a infecção por *T. cruzi* (Mariano *et al.*, 2008). Com isso, nós investigamos o papel de SOCS2 em DCs na geração de células Treg, Th2 e B produtoras de IL-10 durante a infecção por *T. cruzi*. Nossos resultados demonstram que, aos 10 dpi, camundongos que receberam DCs deficientes de SOCS2 reduziram a frequência de células Th2, Treg e B todas produtoras de IL-10 quando comparado com animais que receberam DCs WT (Figuras 10A, B,C). Esses resultados indicam que a falta de SOCS2 em DCs resulta no prejuízo/redução da geração de células consideradas moduladoras/reguladoras da resposta imune frente a infecção por *T. cruzi*.

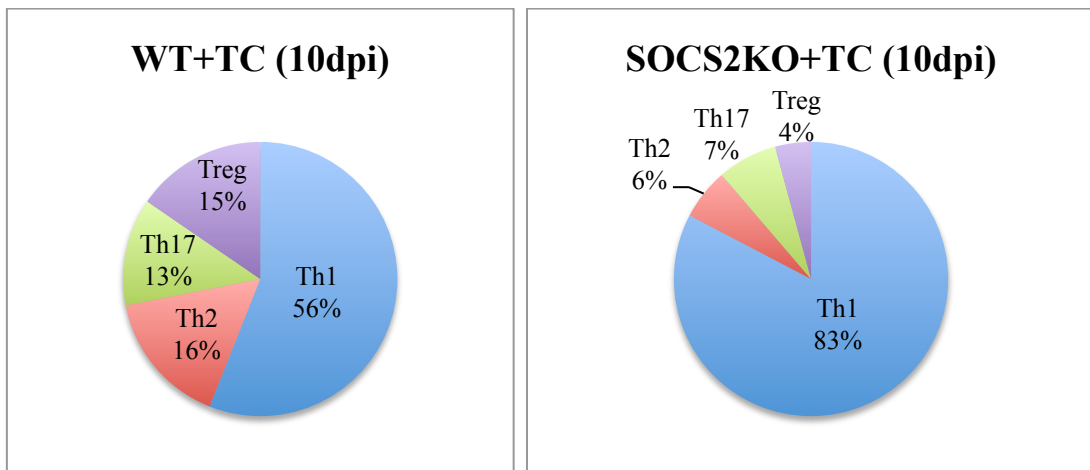


**Figura 10. Ausência de SOCS2 em DCs causa disfunção na geração de células reguladoras/supressoras da resposta imune durante a infecção por *T. cruzi*.** Animais CD11cDTR depletados (DT+TC) ou não (TC) e que receberam transferência adotiva de DCs provenientes de animais deficientes de SOCS2 (DT+SOCS2KO+TC) ou WT (DT+WT+TC) foram infectados intraperitonealmente com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) e, em diferentes dias após a infecção (9 e 10 dpi), foram sacrificados, as células do baço purificadas e preparadas para a detecção intracelular de IL-10 e Foxp3 por citometria de fluxo. Para a análise estatística usou-se o teste two-way ANOVA com o pós- teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  para comparação de camundongos CD11cDTR depletados que receberam células dendríticas oriundas de camundongos WT (DT+WT+TC) versus camundongos CD11cDTR depletados que receberam células dendríticas oriundas de SOCS2 KO (DT+SOCS2KO+TC). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (6 animais/grupo).

**11) Proporção das respostas Th1, Th2, Th17 e Treg em animais infectados por *T. cruzi* que receberam transferência adotiva de DCs deficientes de SOCS2**

Sabendo da importância de SOCS2 na resposta imune e no possível controle da diferenciação/geração e/ou expansão de células T e com o intuito de facilitar a visualização do perfil da resposta imune nos animais CD11cDTR-Tg que receberam a transferência adotiva de DCs provenientes de SOCS2 KO, nós avaliamos a proporção de células Th1, Th2, Th17 e Treg. Nós podemos observar que nos animais que receberam a transferência adotiva de DCs provenientes de SOCS2 KO, houve um aumento de Th1 associado a uma supressão da resposta Th2, Th17 e de Treg aos 10 dpi (Figura 11). Esses resultados sugerem que a presença de SOCS2 em DCs regula a ativação/diferenciação de células T.



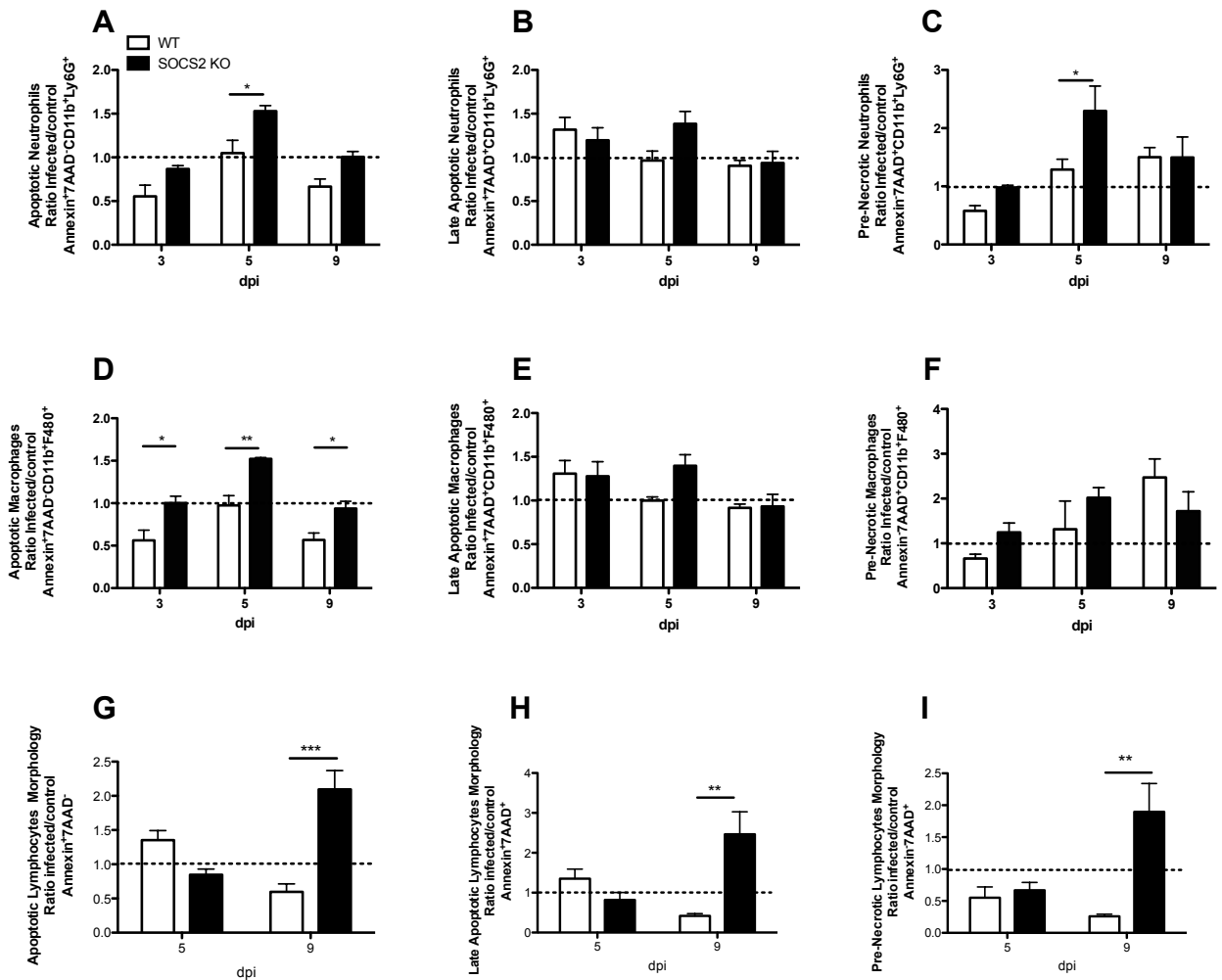


**Figura 11. Proporção das respostas Th1, Th2, Th17 e Treg em animais infectados por *T. cruzi* que receberam transferência adotiva de DCs deficientes de SOCS2.** Animais CD11cDTR depletados ou não e que receberam transferência adotiva de DCs provenientes de animais deficientes de SOCS2 ou WT foram infectados intraperitonealmente com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) e, aos 10 dpi, foram sacrificados, as células do baço purificadas e preparadas para a determinação da proporção dos perfis Th1, Th2, Th17 e Treg analisadas por citometria de fluxo. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (6 animais/grupo).

## 12) Modulação da apoptose por SOCS2 durante a infecção por *T. cruzi*

Durante a infecção por *T. cruzi*, macrófagos removem células apoptóticas prevenindo a liberação de substâncias inflamatórias após a morte celular. A indução de apoptose de neutrófilos, macrófagos, linfócitos B e T contribui para a extinção das respostas imunes durante uma infecção podendo ser prejudicial, por exemplo durante a infecção por *T. cruzi*, por inibir a imunidade contra o parasito. Com isso, nosso próximo objetivo foi verificar se SOCS2 está envolvido na modulação da apoptose e/ou fagocitose de células apoptóticas durante a infecção.

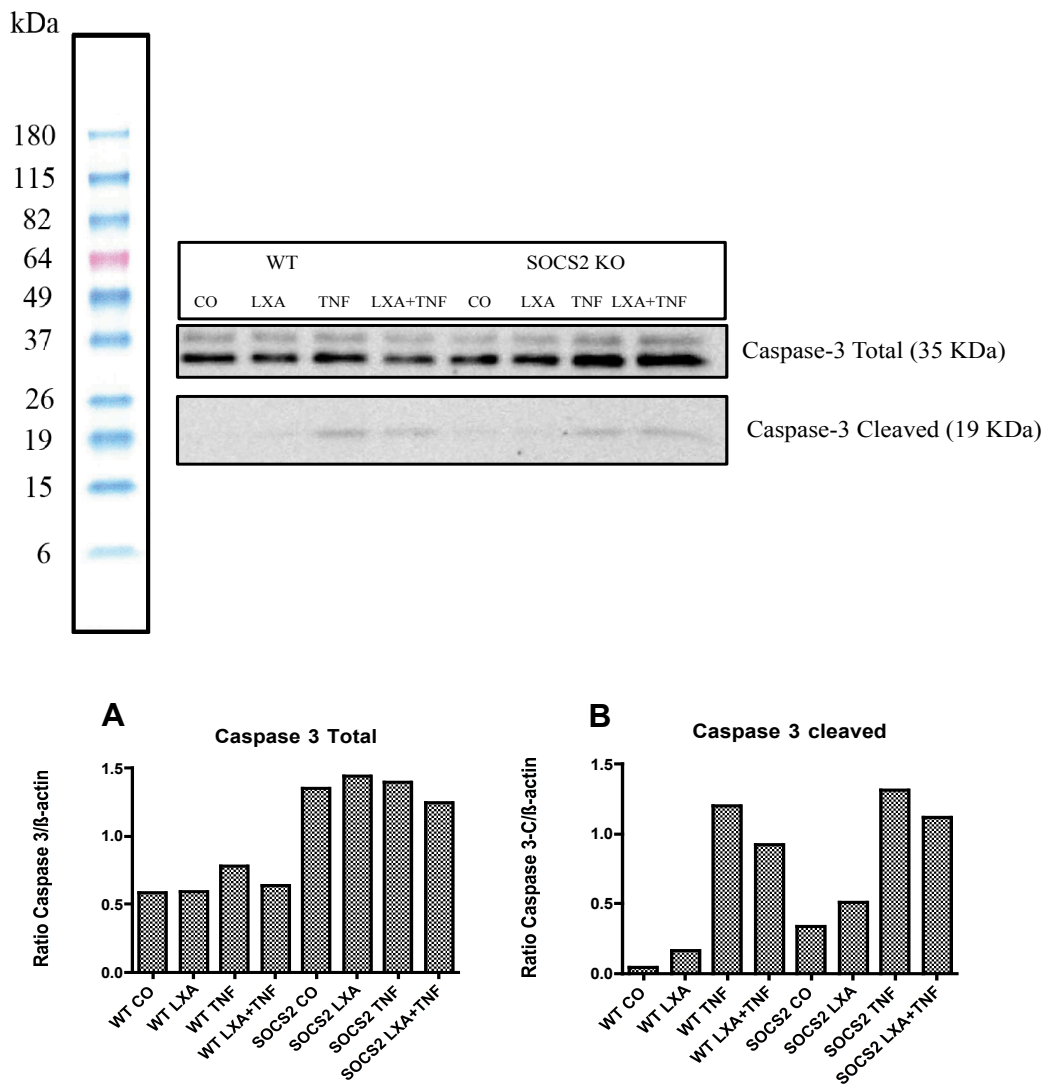
Nossos resultados sugerem que a deficiência de SOCS2 resulta no aumento de neutrófilos apoptóticos aos 5 dpi (Figura 12A) e de macrófagos apoptóticos aos 3, 5 e 9 dpi (Figura 12D), quando comparados aos WT. A população de linfócitos foi identificada com base em suas características morfológicas através de um gráfico de dot plot (FSCxSSC). Nos linfócitos, a ausência de SOCS2 resultou no aumento de apoptose nesse subtipo celular durante a resposta imune adaptativa (Figura 12G). A apoptose tardia foi observada aumentada nos animais SOCS2 KO infectados em neutrófilos e macrófagos aos 5 dpi, mas sem diferença significativa entre os grupos WT e SOCS2 KO (Figura 12B, C). Nos linfócitos, a ausência de SOCS2 resultou no aumento da apoptose tardia durante a resposta imune adaptativa (Figura 12H). A morte celular em um estágio mais avançado, considera como necrose (“pré-necrose”), foi observada aumentada nos animais SOCS2 KO infectados em neutrófilos aos 5 dpi quando comparado com WT (Figura 12C). Como observado, a infecção por *T. cruzi* aumenta progressivamente a pré-necrose de macrófagos durante os tempos de infecção analisados, mas sem diferença significativa entre os grupos de SOCS2 KO e WT (Figura 12F). Nos linfócitos, a ausência de SOCS2 resultou no aumento de necrose nesse subtipo celular aos 9 dpi (Figura 12I).



**Figura 12. Modulação da apoptose por SOCS2 durante a infecção por *T. cruzi*.** Animais WT e deficientes de SOCS2 foram infectados com 1000 formas da cepa Y de *T. cruzi* e a apoptose (Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I, BD, Pharmingen) de células esplênicas foi analisada em diferentes dias após a infecção por citometria de fluxo. Para análise estatística usou-se o teste two-way ANOVA com o pós-teste de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$  para comparação de animais WT versus SOCS2 KO infectados. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (4 animais/grupo).

### **13) Ausência de SOCS2 na atividade anti-apoptótica de neutrófilos**

Com intuito de identificar as bases moleculares inter-relacionadas com o aumento de apoptose observado nos animais SOCS2 KO, iniciamos experimento *in vitro* visando primeiramente a expressão e “ativação” de uma enzima chave na indução de apoptose, a Caspase 3. Nossos resultados sugerem que a deficiência de SOCS2 em neutrófilos resulta no aumento da expressão de caspase 3 (basal) (Figura 13A). Também foi observado o aumento da presença de caspase 3 clivada (Figura 13B). A presença de LXA nas culturas resultou no aumento de caspase 3 clivada nos neutrófilos deficientes de SOCS2 quando comparado com WT (Figura 13B). Não foi observado diferenças significativas entre os grupos de células SOCS2 KO e WT que receberam LXA e TNF- $\alpha$  simultaneamente (Figura 13B). Esses resultados sugerem que SOCS2 em neutrófilos modula a expressão de caspase 3 e sua ativação, entretanto, esses experimentos serão repetidos para possibilitar uma conclusão final dos mesmos.



**Figura 13. Ausência de SOCS2 na atividade anti-apoptótica de neutrófilos.** Neutrófilos foram isolados da medula óssea de animais WT e deficientes de SOCS2, purificados, plaqueados e tratados ou não com LXA (1mg/ml) por 8 horas e cultivados na presença ou ausência de TNF (100ng/ml) durante 20 horas. Os níveis de Caspase 3 total e Caspase 3 clivada foram analisados por Western Blotting. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (8 animais/grupo).

## 7- Discussão

Uma das principais células do sistema imune capazes de gerar uma resposta rápida e eficiente são as DCs. Nossos resultados evidenciados até o momento demonstraram que: i) DCs exercem um papel fundamental no controle inicial da replicação do *T. cruzi in vivo*; ii) SOCS2 é importante, principalmente durante a imunidade inata, na indução/regulação da produção de IL-12 e TNF- $\alpha$ , mas não de IL-10, por DCs; iii) SOCS2 modula tanto a geração de DCs expressando TLR2 e TLR4 como o nível de expressão desses receptores, principalmente durante a imunidade adaptativa; iv) SOCS2 é importante na indução de parte da maquinaria necessária em DCs para uma ativação eficiente de células T naïve durante a infecção por *T. cruzi*; v) SOCS2 em DCs é importante para a produção eficaz de IL-12 por essas células, controle da frequência de NK produtoras de IL-17 e para a indução/ativação eficiente de linfócitos CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> durante a fase adaptativa da resposta imune contra *T. cruzi*; vi) deficiência de SOCS2 em DCs resulta no prejuízo/redução da geração de células consideradas moduladoras/reguladoras (Th2 e Treg) da resposta imune frente a infecção por *T. cruzi* e vii) SOCS2 participa na modulação de apoptose durante a infecção.

Primeiramente o SOCS2 foi descrito como um membro da família SOCS importante no controle da sinalização do receptor de hormônio de crescimento. Entretanto, atualmente é reconhecido por possuir grande importância na regulação da produção de várias citocinas, metabolismo e respostas a infecções (Machado *et al.*, 2006; Rico-Bautista *et al.*, 2006). Nosso grupo demonstrou que a expressão de SOCS2 é parcialmente mediada pela geração de LXA<sub>4</sub> e pela ativação do receptor citoplasmático aril hidrocarbono (AhR) em DCs (Machado *et al.*, 2006). Previamente, demonstramos que SOCS2 exerce diferentes funções, dependendo do tecido e de diferentes tipos celulares, durante a infecção experimental por *T. cruzi* (Esper *et al.*, 2012). A deficiência de SOCS2 resulta na diminuição dos níveis de expressão de SOCS1 e SOCS3 no baço e coração e redução de citocinas pró-inflamatórias. Demonstramos também que SOCS2 além de ser crítico na modulação de vias intracelulares de sinalização em cardiomiócitos, sua deficiência resulta em várias alterações de respostas celulares incluindo a geração/expansão de células T reguladoras, nível de LXA<sub>4</sub> e redução do número de células de memórias durante a infecção por *T. cruzi* (Esper *et al.*, 2012). No presente estudo nosso intuito foi compreender os mecanismos envolvidos na modulação da resposta inflamatória/resolutiva por SOCS2 durante a infecção por *T. cruzi*. Entretanto, devido ao fato de que várias células do nosso organismo expressam SOCS2, torna-se necessário investigar as características imunológicas das diferentes populações celulares durante a infecção por *T.*

*cruzi* na presença ou ausência de SOCS2. Nos propusemos a investigar o papel de SOCS2 na ativação e função de DCs e manutenção da resposta imune durante essa infecção.

A resposta imune frente a infecções é altamente complexa e envolve diversos componentes efetores e reguladores, onde a diversidade dos mecanismos abrangentes ainda não foram totalmente esclarecidos. Para que uma resposta imunológica seja eficaz, esta requer a ativação das respostas imunes inata e adquirida onde as DCs são “peças” fundamentais na maquinaria que envolve essas imunidades (promovendo a ligação entre ambas) onde desempenham um papel importante na resposta contra infecções causadas por parasitos intracelulares como por exemplo o *T. cruzi* e *Leishmania* (Alba Soto *et al.*, 2003; Koga *et al.*, 2006; Liu e Uzonna, 2012; Batalla *et al.*, 2013). Nossos resultados demonstraram que depleção de DCs em camundongos resulta no aumento significativo do número de parasitos durante a infecção, mostrando/confirmando que esse subtipo celular exerce um papel fundamental no controle inicial da replicação do *T. cruzi in vivo*. De fato, as células da imunidade inata especialmente as DCs, conhecidas como sendo uma das principais APCs, e macrófagos, possuem uma participação expressiva no controle da replicação e propagação do parasito durante as fases aguda e crônica da infecção através da produção de mediadores pró-inflamatórios como citocinas e óxido nítrico (NO). DCs são potentes produtoras de citocinas inflamatórias como a IL-12 e TNF- $\alpha$  (Reis E Sousa *et al.*, 1997; Verhasselt *et al.*, 1997; Gerosa *et al.*, 2002; Poncini *et al.*, 2008; Batalla *et al.*, 2013). Demonstramos que durante a infecção com *T. gondii*, SOCS2 é expresso em DCs e regula a produção de citocinas e quimiocinas (Machado *et al.*, 2006).

Nossos novos resultados demonstraram que a deficiência de SOCS2 resulta na redução de DCs produtoras de IL-12 e de TNF- $\alpha$ , mas não de IL-10, durante a resposta imune inata. A produção das citocinas IL-12 e TNF- $\alpha$  por DCs é uma das principais responsáveis em direcionar o controle da replicação do parasito. Esses resultados corroboram com os resultados recentemente publicados por nosso grupo que demonstraram que durante a infecção causada por *T. cruzi*, há uma redução de citocinas (como IL-12 e TNF- $\alpha$ ) no baço durante a fase adaptativa da resposta imune (Esper *et al.*, 2012) e sugerem que essa redução pode estar associada com uma falha da produção dessas citocinas por DCs no início da infecção. Logo no início da infecção por *T. cruzi*, diversas moléculas oriundas do parasito estimulam a síntese de citocinas como IL-12 e TNF- $\alpha$  por macrófagos e DCs (Almeida e Gazzinelli, 2001; Shoda *et al.*, 2001; Brodskyn *et al.*, 2002) influenciando tanto a resposta imune inata (células NK) quanto a resposta adquirida (linfócitos T e B). Outros estudos



mostraram que SOCS2 regula a via de sinalização de citocinas modulando a produção de mediadores como IL-12 e TNF- $\alpha$  favorecendo a diferenciação de células Th2 (Machado *et al.*, 2006; Rico-Bautista *et al.*, 2006; Knosp *et al.*, 2011).

Estudos demonstraram que durante o início da infecção por *T. cruzi* e *T. gondii* a produção de IL-12 por DC é induzida principalmente por via dependente de receptores do tipo Toll (Yarovinsky *et al.*, 2005; Junqueira *et al.*, 2010; Gravina *et al.*, 2013). O descobrimento dos TLR contribuiu para um novo entendimento da complexidade do papel da resposta imune inata em doenças infecciosas, sendo descritos como sendo a primeira linha de defesa contra infecções causadas por protozoários, vírus, bactérias e fungos (Kopp e Medzhitov, 2003; Gazzinelli e Denkers 2006; Takeuchi e Akira, 2010). De fato, a principal função da imunidade inata visa a eliminação de agentes invasores, assim, o conhecimento dos mecanismos pelo qual o sistema imune inato detecta e responde a infecções parasitárias é essencial para o entendimento de como essas infecções são controladas. Neste contexto, nós investigamos se SOCS2 modula a expressão de TLR2 e TLR4 influenciando o balanço das respostas pró e anti-inflamatórias em DCs. Nossos resultados demonstraram que durante a resposta imune inata frente a infecção por *T. cruzi* a deficiência de SOCS2 não altera o aumento da frequência de DCs expressando TLR2 e TLR4 observados. Entretanto, durante a imunidade adaptativa, foi demonstrado um aumento de DCs expressando TLR2 e TLR4 assim como o nível de expressão desses receptores. Na infecção por *T. cruzi* foi descrito que diferentes moléculas presentes no parasito são capazes de ativar TLRs em DCs e MO como por exemplo, a participação da ativação de TLR2 através da molécula glicosilfosfatidilinositol (tGPI-mucina) presente na membrana do parasito (Almeida *et al.*, 1999; Almeida e Gazzinelli, 2001; Campos *et al.*, 2001; Gravina *et al.*, 2013), assim como a ativação de TLR4 através de glicoinositolfosfolípide (eGIPL) durante o primeiro estágio da infecção (Oliveira *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2012). Durante a fase aguda da doença de Chagas diferentes TLRs são ativados para combater a infecção sem causar danos ao hospedeiro através de um rápido e eficiente controle de uma resposta inflamatória. Ativação de TLR2 e TLR4 em DCs resulta na produção de IL-12 que subsequentemente exerce um importante papel na resposta imune induzindo a produção de IFN- $\gamma$  por NK (Re e Strominger, 2001; Basso, 2013). A cooperação entre diferentes tipos de Tolls tem sido evidenciada *in vivo* (como TLR2, TLR4 e TLR9) na indução de citocinas e quimiocinas dependentes da via MyD88 em resposta ao modelo de *S. Pneumoniae* (Lee *et al.*, 2007). Em um outro modelo de infecção pulmonar com bactéria Gram negativa, Bhan e colaboradores mostraram que a cooperação entre TLR4 e TLR9 induzem a produção de IL-23 e IL-17 confirmando a importância da cooperação entre

diferentes tipos de Tolls (Bhan *et al.*, 2010). SOCS2 tem sido mostrado como sendo inibidor da ativação de DCs induzido por TLR (Posselt *et al.*, 2011). Portanto, nossos resultados sugerem que a expressão de SOCS2 em DCs é essencial, principalmente durante a imunidade adquirida, na modulação da expressão de TLR2 e TLR4 como da frequência de DCs expressando esses receptores, sugerindo que a função de DCs em relação a ativação de linfócitos poderia estar alterada. De fato, DCs são as APCs mais eficazes em iniciar respostas antígeno-específicas dos linfócitos T, onde sua ativação é um processo vital no início da regulação da resposta imune.

A aptidão das DCs em gerar a proliferação e diferenciação de linfócitos T está associada ao seu estado de maturação. Na ausência de uma estimulação adequada, DCs são consideradas imaturas e apresentam uma enorme capacidade endocítica, expressando baixos níveis de MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e CD40, sendo impossibilitadas de ativar linfócitos T naive. Por outro lado, uma sinalização desregulada/exacerbada enviada por moléculas presentes em DCs resulta em anergia de linfócitos T. Para que uma ativação eficiente de linfócitos T ocorra, são necessários sinais principalmente enviados através de: i) reconhecimento do antígeno associado a moléculas de MHC e ii) um segundo sinal gerado por moléculas co-estimuladoras que estão presentes na superfície das APCs. Moléculas co-estimuladoras como CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) expressas nas APCs e o receptor CD28 (expresso nos linfócitos T), são indispensáveis para o desenvolvimento da resposta imune adquirida (Elloso e Scott, 1999). Nesse contexto, ocorrerá uma proliferação e ativação celular através da produção de IL-2 pelos linfócitos T ativados e diferenciação desses linfócitos em células efetoras e de memória (Van Gool *et al.*, 1996; Pletinckx *et al.*, 2011). Nossos resultados demonstraram que durante a resposta imune inata frente a infecção por *T. cruzi* a deficiência de SOCS2 resulta na redução de DCs positivas para CD80 sem alteração em relação a MHCII. Entretanto, durante a imunidade adaptativa da infecção, observamos uma redução progressiva e similar da expressão de MHCII nos dois grupos, mas apenas nos SOCS2 KO foi observado uma redução da frequência de DCs positivas para essa molécula, sugerindo que durante a infecção por *T. cruzi*, SOCS2 é importante na indução de parte da maquinaria necessária para a ativação de células T. A interação de CD28-CD80/86 constitui um dos sinais co-estimuladores mais importantes para a ativação e função de linfócitos T (Lenschow *et al.*, 1996; Salomon e Bluestone, 2001). Estudos relatam que a estimulação de células T na ausência da co-estimulação mediada pela ligação CD28-CD80/CD86 resulta em falhas da proliferação, produção reduzida de citocinas e alteração do balanço Th1/Th2 (Shahinian *et al.*, 1993; Lucas *et al.*, 1995; Thompson, 1995).

Na fase aguda da doença de Chagas o CD28 está envolvido diretamente na modulação da resposta imune e controle da parasitemia, sendo um importante mediador na ativação de células T e consequente produção de IFN- $\gamma$  e NO (Miyahira *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2004). Estudos realizados em macrófagos (derivados da medula óssea) infectados com *T. cruzi* mostram que ocorre a estimulação da ligação CD28-CD80/CD28-CD86 (Frosch *et al.*, 1997), embora tenha sido comprovado que durante a infecção aguda, as DCs possuem baixa expressão de CD86 e permanecem imaturas (Chaussabel *et al.*, 2003) sugerindo que a infecção pode causar profundas alterações no processo de migração e maturação das DCs. Em relação a modulação da frequência de DCs positivas para CD86, como o nível de expressão dessa molécula por SOCS2, permanece por ser investigada e está dentro das futuras perspectivas do nosso laboratório. Entretanto, sabe-se que a diferenciação e maturação das DCs, além de um efetivo direcionamento da resposta imune, dependem de mediadores cuja sinalização envolve a via JAK/STAT que está submetida a regulação por proteínas da família SOCS e nossos resultados demonstraram que, no início da infecção, camundongos deficientes de SOCS2 reduzem a frequência de DCs expressando a molécula co-estimuladora CD80. Assim, demonstrando a importância da presença de SOCS2 para que haja uma geração eficiente de DCs capazes de induzir ativação de células T durante a infecção. De fato, demonstramos uma redução de linfócitos T CD4 e CD8 produtores de IFN- $\gamma$  em animais deficientes de SOCS2 durante a infecção por *T. cruzi* (Esper *et al.*, 2012).

A expressão de SOCS2 é encontrada em diferentes subtipos celulares que fazem parte da resposta imune frente a infecção por *T. cruzi*, assim dificultando a conclusão se as alterações observadas em DCs nos camundongos deficientes de SOCS2 seria; i) um “defeito” intrínseco diretamente nas funções de DCs na ausência de SOCS2 ou ii) se as alterações em DCs estariam relacionadas com a falta da produção, por outros subtipos celulares, de mediadores importantes para a ativação de DCs, assim sendo um efeito indireto da deficiência de SOCS2 nas funções de DCs. Nossos resultados de transferência adotiva de DCs mostraram que animais que receberam DCs oriundas de SOCS2 KO não foram capazes de controlar a parasitemia no início da infecção, demonstrando um papel importante de SOCS2 em DCs para que ocorra uma resposta eficaz na fase inicial da infecção. Também foi demonstrado que a presença de SOCS2 é importante para a produção eficaz de IL-12 por DCs durante a fase adaptativa da resposta imune contra *T. cruzi*. Como mencionado anteriormente DCs são cruciais na indução da resposta imune adaptativa fundamental para que ocorra a resistência a infecção por *T. cruzi*, principalmente através da indução de um perfil predominantemente Th1 (Nickell *et al.*, 1993; Rodrigues *et al.*, 2012). A redução da capacidade de produção de

IL-12 por DCs, ainda encontrada durante a fase inicial da resposta imune adaptativa, poderia estar associada com a redução de uma resposta Th1 observado em camundongos SOCS2 KO infectados com *T. cruzi* (Esper *et al.*, 2012). Durante infecções a produção de IFN- $\gamma$  por células NK ativadas por IL-12 induz preferencialmente a diferenciação da resposta imune Th1 (Silva *et al.*, 1992; Abrahamsohn e Coffman, 1996). Trabalhos recentes demonstraram que as células NK produzem IL-17 (Weaver *et al.*, 2007; Passos *et al.*, 2010; Sutton *et al.*, 2012). Camundongos que tiveram suas DCs depletadas, reduziram a frequência de NK produtoras de IFN- $\gamma$  e de IL-17 aos 10 dpi. Entretanto, animais que receberam DCs oriundas de animais SOCS2 KO reduziram a frequência de NK produtoras de IL-17 quando comparado com animais que receberam DCs oriundas de animais WT.

A ativação de células NK pode ser potencializada através do contato com o patógeno e/ou indiretamente pelo “cross-talk” com células mielóides que por sua vez engatilham sinais dependentes de contato e/ou de citocinas. Nossos resultados mostraram uma comunicação entre DCs e NK para o aumento da produção de IL-17 e que a presença de SOCS2 em DCs é importante nesse processo. IL-17 também está envolvida na regulação da resposta imune e no desenvolvimento de lesões no coração durante a infecção por *T. cruzi* (Da Matta Guedes *et al.*, 2010). Estudos sugeriram que a produção de IL-17 está relacionada com a produção de IL-23 por DCs ativadas via TLR4 (Vanden Eijnden *et al.*, 2006). Entretanto, não se sabe a consequência da deficiência de SOCS2 na produção de IL-23 durante a infecção por *T. cruzi*, mas estudos mostraram que DCs derivadas de monócitos e estimuladas por ligantes de NOD1 e NOD2 combinados com o agonista de TLR7/8 produzem altos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-23 (IL-23 promove uma forte produção de IL-17) e SOCS2. Além disso, o silenciamento de SOCS2 resulta no aumento de IL-23, indicando que SOCS2 está envolvido na regulação da produção de IL-23 e IL-17 dependente de TLR (Schwarz *et al.*, 2013).

As alterações encontradas na produção de citocinas chaves no controle da ativação/diferenciação/expansão de linfócitos nos camundongos que receberam DCs oriundas de animais SOCS2 KO sugeriram que SOCS2 é essencial em DCs para uma indução adequada de uma imunidade celular específica, corroborando com os nossos resultados que DCs de animais SOCS2 KO durante a infecção por *T. cruzi* alteram seu perfil de expressão de importantes moléculas reguladoras da ativação de linfócitos. De fato, camundongos que receberam DCs deficientes de SOCS2 reduziram seus linfócitos CD8 produtores de IFN- $\gamma$  e de CD4 produtores de IL-17, mas aumentaram os números de CD4 produtores de IFN- $\gamma$ ,

reforçando a evidência que a expressão de SOCS2 em DCs é importante para a indução/ativação eficiente e regulada de células T (CD8<sup>+</sup>IFN<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IFN<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>).

O sistema imunológico possui mecanismos efetores para eliminação de microrganismos patogênicos e células infectadas; também possui mecanismos reguladores para que as células efetoras se mantenham sobre controle durante condições fisiológicas e após ativação induzida por processos inflamatórios (Kondelkova *et al.*, 2010). O equilíbrio entre mecanismos efetores e reguladores pode determinar o progresso da infecção podendo ser benéfico em alguns casos tanto para o parasito quanto para hospedeiro. Outro papel importante atribuído as DCs foi demonstrado por Steinman e colaboradores, onde essas células induzem a diferenciação de células Treg (Steinman *et al.*, 2003). Células Treg constituem uma população heterogênea oriundas de linfócitos T com importante atividade imunossupressora (Kotner e Tarleton, 2007; De Araujo *et al.*, 2011) através da produção de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  (Liu e Zhao, 2007). Alguns estudos demonstram que muitos patógenos induzem a expansão de células Treg (Belkaid, 2007; Guilliams *et al.*, 2008). Vários estudos sugerem que células Treg estão envolvidas na progressão e patogênese durante a infecção experimental por *T. cruzi* (Flores-Garcia *et al.*, 2013). De fato, estudos provenientes de diversos grupos de pesquisa (Vitelli-Avelar *et al.*, 2008; De Araujo *et al.*, 2011; De Araujo *et al.*, 2012) indicam que o balanço entre células T efetoras e reguladoras é um fator determinante da progressão da doença de Chagas. Quando analisamos o papel de SOCS2 em DCs na geração de células Treg, Th2 e B produtoras de IL-10 durante a infecção por *T. cruzi*, encontramos que a falta de SOCS2 em DCs resulta no prejuízo/redução da geração desses subtipos celulares considerados moduladores/reguladores da resposta imune frente a infecção por *T. cruzi*. Estes resultados podem estar relacionados com o aumento da produção de células T CD4 produtoras de IFN- $\gamma$  durante a infecção por *T. cruzi* encontrado nos animais que receberam DCs oriundas de animais SOCS2 KO. Entretanto, o papel de células Treg na infecção experimental por *T. cruzi* ainda é controverso (Tonelli *et al.*, 2011). Alguns trabalhos demonstraram a alta frequência de células Treg circulantes em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas, sendo um resultado oposto ao quadro de pacientes com a doença cardíaca (Vitelli-Avelar *et al.*, 2005; Vitelli-Avelar *et al.*, 2006; Sathler-Avelar *et al.*, 2009). Entretanto, nossos resultados anteriores com camundongos deficientes de SOCS2 demonstraram um aumento de células Treg o qual possivelmente estaria relacionado com redução da resposta Th1 encontrada nesses animais durante a infecção por *T. cruzi* (Esper *et al.*, 2012). De fato, foi demonstrado que SOCS2 influencia a estabilidade de células Treg induzidas (iTregs), aquelas que são ativadas após um processo inflamatório. Nesse estudo,

Knosp e colaboradores demonstraram que células Treg naturais (nTregs) deficientes de SOCS2 apresentam fenótipo normal em comparação com células do tipo selvagem. Porém, frente a um estímulo, as iTregs, apesar de expressarem FoxP3 inicialmente de forma normal, perdem a expressão desta molécula porque a deficiência de SOCS2 resulta na instabilidade da expressão de FoxP3, o que prejudica a ação dessas células no ambiente inflamatório (Knosp *et al.*, 2013).

Durante a infecção por *T. cruzi*, além de DCs, os macrófagos são extremamente importantes no controle da infecção, atuando como APCs e potentes produtores de citocinas inflamatórias e mediadores tóxicos para os parasitos, como por exemplo o NO (Cardoni *et al.*, 1990; Chandra *et al.*, 2002). Outra função crucial dos macrófagos durante a infecção por *T. cruzi* é a remoção de células apoptóticas prevenindo a liberação de substâncias inflamatórias após a morte celular. Entretanto, células apoptóticas induzem uma resposta anti-inflamatória ativa devido a secreção de citocinas reguladoras como IL-10 e TGF- $\beta$ . Durante a infecção, alguns patógenos induzem a apoptose de macrófagos para evitar sua atividade microbicida. Macrófagos apoptóticos, por outro lado, podem causar inflamação por secreção de citocinas pró-inflamatórias. Estudos sugerem que a apoptose possui um papel patogênico na infecção por *T. cruzi* e que manobras terapêuticas que previnam a apoptose poderiam promover imunidade ao parasito. Nossos resultados preliminares demonstraram que a deficiência de SOCS2 resulta no aumento de neutrófilos apoptóticos durante a imunidade inata frente a infecção por *T. cruzi* e de macrófagos apoptóticos tanto durante a imunidade inata como no início da imunidade adaptativa quando comparados aos WT. Em relação aos linfócitos, a falta de SOCS2 resultou no aumento de apoptose nesse subtipo celular durante a resposta imune adaptativa. A morte celular em um estágio mais avançada, considerada como necrose, foi observada aumentada nos animais SOCS2 KO infectados principalmente em neutrófilos durante a resposta imune inata e em linfócitos na resposta adaptativa quando comparado com WT. Esses resultados sugerem que a redução de alguns subtipos de linfócitos T durante a infecção por *T. cruzi* em animais deficientes de SOCS2 podem estar associados também com o aumento de apoptose dessas células. Realmente, o balanço entre citocinas Th1 e Th2 é necessário para promover imunidade e reduzir danos no hospedeiro onde ocorre supressão da imunidade mediada por células T e aumento da apoptose de linfócitos, o que pode contribuir para a persistência do parasito no hospedeiro. Durante sua diferenciação terminal, células de origem hematopoiética sofrem apoptose incluindo linfócitos T, B e neutrófilos, contribuindo para a extinção das respostas imunes. Nossos resultados *in vitro* os quais iniciamos na tentativa de identificar as bases moleculares do aumento de apoptose observado nos animais

SOCS2 KO, mostraram um aumento basal da expressão de Caspase 3 total e da presença de Caspase 3 clivada em neutrófilos deficientes de SOCS2. Esses dados preliminares sugerem que SOCS2 em neutrófilos modula a expressão de uma enzima “chave” na indução de apoptose, a Caspase 3.

## 8- Conclusões



Em conjunto, nossos resultados demonstrados até aqui sugerem que SOCS2 é crucial na modulação das funções de DCs durante a geração e regulação das respostas imunes inata e adaptativa durante a infecção por *T. cruzi*.

## 9- Referências

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp Parasitol**, v. 84, n. 2, p. 231-44, Nov 1996. ISSN 0014-4894 (Print) 0014-4894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8932773> >.

ALBA SOTO, C. D. et al. Trypanosoma cruzi infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. **Infect Immun**, v. 71, n. 3, p. 1194-9, Mar 2003. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12595432> >.

ALBA SOTO, C. D. et al. Dendritic cells devoid of IL-10 induce protective immunity against the protozoan parasite Trypanosoma cruzi. **Vaccine**, v. 28, n. 46, p. 7407-13, Oct 28 2010. ISSN 1873-2518 (Electronic) 0264-410X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20850535> >.

ALMEIDA, I. C. et al. Trypanosoma cruzi mucins: potential functions of a complex structure. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 173-6, 1999. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677709> >.

ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from Trypanosoma cruzi: structural and functional analyses. **J Leukoc Biol**, v. 70, n. 4, p. 467-77, Oct 2001. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11590183> >.

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 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25077613> >.

ARORA, P. et al. A single subset of dendritic cells controls the cytokine bias of natural killer T cell responses to diverse glycolipid antigens. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 105-16, Jan 16 2014. ISSN 1097-4180 (Electronic) 1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412610> >.

ASHTON, A. W. et al. Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during Trypanosoma cruzi infection. **J Exp Med**, v. 204, n. 4, p. 929-40, Apr 16 2007. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17420269> >.

ASSUNCAO GUIMARAES, C.; LINDEN, R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. **Eur J Biochem**, v. 271, n. 9, p. 1638-50, May 2004. ISSN 0014-2956 (Print) 0014-2956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15096203> >.

BAETZ, A. F., M.; HEEG, K.; DALPKE, AH. Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins Indirectly Regulate Toll-like Receptor Signaling in Innate Immune Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 52, p. 54708-54715, 2004.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World J Exp Med**, v. 3, n. 1, p. 1-10, Feb 20 2013. ISSN 2220-315X (Electronic) 2220-315X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24520540> >.

BATALLA, E. I. et al. Impairment in natural killer cells editing of immature dendritic cells by infection with a virulent *Trypanosoma cruzi* population. **J Innate Immun**, v. 5, n. 5, p. 494-504, 2013. ISSN 1662-8128 (Electronic) 1662-811X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23689360> >.

BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 11, p. 875-88, Nov 2007. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17948021> >.

BHAN, U. et al. Cooperative interactions between TLR4 and TLR9 regulate interleukin 23 and 17 production in a murine model of gram negative bacterial pneumonia. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9896, 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20360853> >.

BONNEY, K. M. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? **Parasite**, v. 21, p. 11, 2014. ISSN 1776-1042 (Electronic) 1252-607X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24626257> >.

BRAZ, L. M.; AMATO NETO, V.; OKAY, T. S. Reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in immunosuppressed patients: contributions for the laboratorial diagnosis standardization. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 50, n. 1, p. 65-6, Jan-Feb 2008. ISSN 0036-4665 (Print) 0036-4665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18327492> >.

BRENDER, C. et al. Interferon-alpha induces transient suppressors of cytokine signalling expression in human T cells. **Exp Clin Immunogenet**, v. 18, n. 2, p. 80-5, 2001. ISSN 0254-9670 (Print) 0254-9670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11340296> >.

BROCK, T. G.; PETERS-GOLDEN, M. Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. **ScientificWorldJournal**, v. 7, p. 1273-84, 2007. ISSN 1537-744X (Electronic) 1537-744X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17767350> >.

BRODSKYN, C. et al. Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. **Infect Immun**, v. 70, n. 7, p. 3736-43, Jul 2002. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065516> >.

BRODSKYN, C. I.; DEKREY, G. K.; TITUS, R. G. Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro. **Infect Immun**, v. 69, n. 2, p. 665-72, Feb 2001. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159953> >.

BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SERHAN, C. N. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 315-27, Mar 20 2014. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24656045> >.

CAMARGO, M. M. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **J Immunol**, v. 158, n. 12, p. 5890-901, Jun 15 1997. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9190942> >.

CAMPOS, M. A. et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J Immunol**, v. 167, n. 1, p. 416-23, Jul 1 2001. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11418678> >.

CARDILLO, F. et al. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 122, n. 4, p. 584-95, Dec 2007. ISSN 1365-2567 (Electronic)

0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17635611> >.

CARDONI, R. L.; ROTTENBERG, M. E.; SEGURA, E. L. Increased production of reactive oxygen species by cells from mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Cell Immunol**, v. 128, n. 1, p. 11-21, Jun 1990. ISSN 0008-8749 (Print)

0008-8749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2111736> >.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 150-218, 1909.

CHANDRA, M. et al. Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). **Int J Parasitol**, v. 32, n. 7, p. 897-905, Jun 15 2002. ISSN 0020-7519 (Print)

0020-7519 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12062561> >.

CHAUSSABEL, D. et al. Alteration of migration and maturation of dendritic cells and T-cell depletion in the course of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Lab Invest**, v. 83, n. 9, p. 1373-82, Sep 2003. ISSN 0023-6837 (Print)

0023-6837 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679445> >.

CLARIA, J.; SERHAN, C. N. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 21, p. 9475-9, Oct 10 1995. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7568157> >.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-82, May 2015. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25466622> >.

COURA, J. R.; VINAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 0, p. 0, Oct 21 2014. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25338155> >.

DA MATTA GUEDES, P. M. et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 2, p. e604, 2010. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169058> >.

DA SILVA, N. N. et al. [Epidemic outbreak of Chagas disease probably due to oral contamination]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 10, n. 5, p. 265-76, Sep-Oct 1968. ISSN 0036-4665 (Print)

0036-4665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4178818> >.

DALPKE, A. H. et al. Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs. **J Immunol**, v. 166, n. 12, p. 7082-9, Jun 15 2001. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390452> >.

DE ARAUJO, F. F. et al. Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. **Immunobiology**, v. 217, n. 8, p. 768-77, Aug 2012. ISSN 1878-3279 (Electronic)

0171-2985 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22672991> >.

DE ARAUJO, F. F. et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 5, p. e992, 2011. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21655351> >.

DE DIEGO, J. et al. Alteration of macrophage function by a *Trypanosoma cruzi* membrane mucin. **J Immunol**, v. 159, n. 10, p. 4983-9, Nov 15 1997. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9366425> >.

DE JONG, E. C.; SMITS, H. H.; KAPSENBERG, M. L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. **Springer Semin Immunopathol**, v. 26, n. 3, p. 289-307, Jan 2005. ISSN 0344-4325 (Print)

0344-4325 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15609003> >.

DE MEIS, J. et al. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFRI/TNF pathways. **Microbes Infect**, v. 8, n. 1, p. 221-31, Jan 2006. ISSN 1286-4579 (Print)

1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239119> >.

DE MEIS, J. et al. Differential regional immune response in Chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 7, p. e417, 2009. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19582140> >.

DEVCHAND, P. R. et al. Human ALX receptor regulates neutrophil recruitment in transgenic mice: roles in inflammation and host defense. **FASEB J**, v. 17, n. 6, p. 652-9, Apr 2003. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12665478> >.

DRACHMAN, D. B.; ROTHSTEIN, J. D. Inhibition of cyclooxygenase-2 protects motor neurons in an organotypic model of amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol**, v. 48, n. 5, p. 792-5, Nov 2000. ISSN 0364-5134 (Print)  
0364-5134 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11079544> >.

DURAN-REHBEIN, G. A. et al. Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma cruzi* infection: a review of the published literature. **Parasite**, v. 21, p. 38, 2014. ISSN 1776-1042 (Electronic)  
1252-607X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25083732> >.

ELLOSO, M. M.; SCOTT, P. Expression and contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection. **J Immunol**, v. 162, n. 11, p. 6708-15, Jun 1 1999. ISSN 0022-1767 (Print)  
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10352289> >.

ENDO, T. A. et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. **Nature**, v. 387, n. 6636, p. 921-4, Jun 26 1997. ISSN 0028-0836 (Print)  
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202126> >.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol**, v. 126, n. 3, p. 283-91, Nov 2010. ISSN 1090-2449 (Electronic)  
0014-4894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599990> >.

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 (Electronic)  
0002-9440 (Linking). 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 (Electronic)  
0951-7375 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25887609> >.

ESPER, L. et al. Regulatory effects of IL-18 on cytokine profiles and development of myocarditis during *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect**, v. 16, n. 6, p. 481-90, Jun 2014. ISSN 1769-714X (Electronic)  
1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24704475> >.

FERGUSON, A. D. et al. Crystal structure of inhibitor-bound human 5-lipoxygenase-activating protein. **Science**, v. 317, n. 5837, p. 510-2, Jul 27 2007. ISSN 1095-9203 (Electronic)  
0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17600184> >.

FERREIRA, S. H. Inflammation, prostaglandins and aspirin-like drugs. **Trans Med Soc Lond**, v. 89, p. 20-31, 1973. ISSN 0076-6011 (Print)  
0076-6011 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4617949> >.

FLORES-GARCIA, Y. et al. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg cells induced by rSSP4 derived from *T. cruzi* amastigotes increase parasitemia in an experimental Chagas disease model.

**Biomed Res Int**, v. 2013, p. 632436, 2013. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23509755> >.

FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontol** **2000**, v. 63, n. 1, p. 149-64, Oct 2013. ISSN 1600-0757 (Electronic) 0906-6713 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23931059> >.

FREIRE-DE-LIMA, C. G. et al. Proapoptotic activity of a Trypanosoma cruzi ceramide-containing glycolipid turned on in host macrophages by IFN-gamma. **J Immunol**, v. 161, n. 9, p. 4909-16, Nov 1 1998. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794425> >.

FROSCH, S.; KUNTZLIN, D.; FLEISCHER, B. Infection with Trypanosoma cruzi selectively upregulates B7-2 molecules on macrophages and enhances their costimulatory activity. **Infect Immun**, v. 65, n. 3, p. 971-7, Mar 1997. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9038305> >.

FRUTH, U.; SOLIOZ, N.; LOUIS, J. A. Leishmania major interferes with antigen presentation by infected macrophages. **J Immunol**, v. 150, n. 5, p. 1857-64, Mar 1 1993. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8436821> >.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 12, p. 895-906, Dec 2006. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110955> >.

GAZZINELLI, R. T. et al. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against Trypanosoma cruzi involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur J Immunol**, v. 22, n. 10, p. 2501-6, Oct 1992. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1396957> >.

GEROSA, F. et al. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. **J Exp Med**, v. 195, n. 3, p. 327-33, Feb 4 2002. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11828007> >.

GIORDANETTO, F.; KROEMER, R. T. A three-dimensional model of Suppressor Of Cytokine Signalling 1 (SOCS-1). **Protein Eng**, v. 16, n. 2, p. 115-24, Feb 2003. ISSN 0269-2139 (Print) 0269-2139 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12676980> >.

GONCALVES DA COSTA, S. C. et al. Role of T lymphocytes in the resistance and immunopathology of experimental Chagas' disease. I. Histopathological studies. **Ann Immunol (Paris)**, v. 135C, n. 3, p. 317-32, May-Jun 1984. ISSN 0300-4910 (Print) 0300-4910 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6433773> >.

GRAVINA, H. D. et al. Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with Trypanosoma cruzi. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63100, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)



1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23650544> >.

GUILLIAMS, M. et al. Experimental expansion of the regulatory T cell population increases resistance to African trypanosomiasis. **J Infect Dis**, v. 198, n. 5, p. 781-91, Sep 1 2008. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18627271> >.

GUTIERREZ, F. R. et al. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 236-45, Jul 2009. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753479> >.

HANADA, T. et al. Induction of hyper Th1 cell-type immune responses by dendritic cells lacking the suppressor of cytokine signaling-1 gene. **J Immunol**, v. 174, n. 7, p. 4325-32, Apr 1 2005. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778397> >.

HARRIS, S. G. et al. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends Immunol**, v. 23, n. 3, p. 144-50, Mar 2002. ISSN 1471-4906 (Print)

1471-4906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11864843> >.

HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. **Nat Immunol**, v. 10, n. 12, p. 1237-44, Dec 2009. ISSN 1529-2916 (Electronic)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915624> >.

HEDI, H.; NORBERT, G. 5-Lipoxygenase Pathway, Dendritic Cells, and Adaptive Immunity. **J Biomed Biotechnol**, v. 2004, n. 2, p. 99-105, 2004. ISSN 1110-7251 (Electronic)

1110-7243 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240920> >.

HIGUCHI MDE, L. et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v. 423, n. 3, p. 157-60, 1993. ISSN 0174-7398 (Print)

0174-7398 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7901937> >.

HONIGBERG, B. M. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. **J Protozool**, v. 10, p. 20-63, Feb 1963. ISSN 0022-3921 (Print)

0022-3921 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13961576> >.

JACKSON, S. H. et al. Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling. **J Immunol**, v. 172, n. 4, p. 2307-15, Feb 15 2004. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764699> >.

JAITLEY, S.; SARASWATHI, T. Pathophysiology of Langerhans cells. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 16, n. 2, p. 239-44, May 2012. ISSN 1998-393X (Electronic)

0973-029X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22923897> >.

JUNG, S. et al. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. **Immunity**, v. 17, n. 2, p. 211-20, Aug 2002. ISSN 1074-7613 (Print)  
1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12196292> >.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med**, v. 12, p. e29, 2010. ISSN 1462-3994 (Electronic)  
1462-3994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20840799> >.

KAHN, S. et al. Trypanosoma cruzi amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. **J Exp Med**, v. 182, n. 5, p. 1243-58, Nov 1 1995. ISSN 0022-1007 (Print)  
0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7595195> >.

KIERAN, N. E.; MADERNA, P.; GODSON, C. Lipoxins: potential anti-inflammatory, proresolution, and antifibrotic mediators in renal disease. **Kidney Int**, v. 65, n. 4, p. 1145-54, Apr 2004. ISSN 0085-2538 (Print)  
0085-2538 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15086453> >.

KILE, B. T.; ALEXANDER, W. S. The suppressors of cytokine signalling (SOCS). **Cell Mol Life Sci**, v. 58, n. 11, p. 1627-35, Oct 2001. ISSN 1420-682X (Print)  
1420-682X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11706989> >.

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 (Print)  
0968-0004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076535> >.

KNOSP, C. A. et al. SOCS2 regulates T helper type 2 differentiation and the generation of type 2 allergic responses. **J Exp Med**, v. 208, n. 7, p. 1523-31, Jul 4 2011. ISSN 1540-9538 (Electronic)  
0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646394> >.

KNOSP, C. A. et al. Regulation of Foxp3+ inducible regulatory T cell stability by SOCS2. **J Immunol**, v. 190, n. 7, p. 3235-45, Apr 1 2013. ISSN 1550-6606 (Electronic)  
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23455506> >.

KOGA, R. et al. TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against Trypanosoma cruzi. **J Immunol**, v. 177, n. 10, p. 7059-66, Nov 15 2006. ISSN 0022-1767 (Print)  
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082622> >.

KOLLS, J. K.; LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 467-76, Oct 2004. ISSN 1074-7613 (Print)  
1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15485625> >.

KONDELKOVA, K. et al. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v. 53, n. 2, p. 73-7, 2010. ISSN 1211-4286 (Print)  
1211-4286 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20672742> >.

KOPCHICK, J. J.; BELLUSH, L. L.; COSCHIGANO, K. T. Transgenic models of growth hormone action. **Annu Rev Nutr**, v. 19, p. 437-61, 1999. ISSN 0199-9885 (Print) 0199-9885 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10448532> >.

KOPP, E.; MEDZHITOV, R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. **Curr Opin Immunol**, v. 15, n. 4, p. 396-401, Aug 2003. ISSN 0952-7915 (Print) 0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900270> >.

KOTNER, J.; TARLETON, R. Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of Trypanosoma cruzi infection in mice. **Infect Immun**, v. 75, n. 2, p. 861-9, Feb 2007. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17101658> >.

LEE, K. S. et al. TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to Streptococcus pneumoniae. **Cell Immunol**, v. 245, n. 2, p. 103-10, Feb 2007. ISSN 0008-8749 (Print) 0008-8749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17521621> >.

LENSCHOW, D. J. et al. CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. **Immunity**, v. 5, n. 3, p. 285-93, Sep 1996. ISSN 1074-7613 (Print) 1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8808683> >.

LESLIE, C. C. Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production. **Biochem Cell Biol**, v. 82, n. 1, p. 1-17, Feb 2004. ISSN 0829-8211 (Print) 0829-8211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15052324> >.

LEVIN, G. et al. Differential metabolism of dihomo-gamma-linolenic acid and arachidonic acid by cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2: implications for cellular synthesis of prostaglandin E1 and prostaglandin E2. **Biochem J**, v. 365, n. Pt 2, p. 489-96, Jul 15 2002. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11939906> >.

LEWINSOHN, R. Prophet in his own country: Carlos Chagas and the Nobel Prize. **Perspect Biol Med**, v. 46, n. 4, p. 532-49, Fall 2003. ISSN 0031-5982 (Print) 0031-5982 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14593222> >.

LINDEN, A.; LAAN, M.; ANDERSON, G. P. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. **Eur Respir J**, v. 25, n. 1, p. 159-72, Jan 2005. ISSN 0903-1936 (Print) 0903-1936 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15640338> >.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 83, 2012. ISSN 2235-2988 (Electronic) 2235-2988 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919674> >.

LIU, G.; ZHAO, Y. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4+ CD25+ T cells. **Immunology**, v. 122, n. 2, p. 149-56, Oct 2007. ISSN 0019-2805 (Print) 0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17848162> >.

LOPES, M. F. et al. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. **J Immunol**, v. 154, n. 2, p. 744-52, Jan 15 1995. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7814881> >.

LUCAS, P. J. et al. Naive CD28-deficient T cells can initiate but not sustain an in vitro antigen-specific immune response. **J Immunol**, v. 154, n. 11, p. 5757-68, Jun 1 1995. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7751626> >.

LUDER, C. G. et al. Toxoplasma gondii down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha. **Eur J Immunol**, v. 31, n. 5, p. 1475-84, May 2001. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11465104> >.

LUKES, J. et al. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Mol Biochem Parasitol**, v. 195, n. 2, p. 115-22, Jul 2014. ISSN 1872-9428 (Electronic) 0166-6851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24893339> >.

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 (Electronic) 1863-2297 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23076807> >.

MACHADO, F. S. et al. Chagas heart disease: report on recent developments. **Cardiol Rev**, v. 20, n. 2, p. 53-65, Mar-Apr 2012. ISSN 1538-4683 (Electronic) 1061-5377 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22293860> >.

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 (Print) 1078-8956 (Linking). 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. 3003-8, Dec 12 2000. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113053> >.

MACHADO, F. S.; TANOWITZ, H. B.; RIBEIRO, A. L. Pathogenesis of chagas cardiomyopathy: role of inflammation and oxidative stress. **J Am Heart Assoc**, v. 2, n. 5, p. e000539, Oct 2013. ISSN 2047-9980 (Electronic) 2047-9980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24152984> >.

MADDOX, J. F. et al. Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor. **J Biol Chem**, v. 272, n. 11, p. 6972-8, Mar 14 1997. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054386> >.

MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. [Centenary of the discovery of Chagas disease: challenges and prospects]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 5, p. 483-5, Sep-Oct 2010. ISSN 1678-9849 (Electronic)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085853> >.

MANSELL, A. et al. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. **Nat Immunol**, v. 7, n. 2, p. 148-55, Feb 2006. ISSN 1529-2908 (Print)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415872> >.

MARIANO, F. S. et al. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect**, v. 10, n. 7, p. 825-33, Jun 2008. ISSN 1286-4579 (Print)

1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538611> >.

MARTINS, G. A. et al. CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect**, v. 6, n. 13, p. 1133-44, Nov 2004. ISSN 1286-4579 (Print)

1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15488732> >.

MARTINS, G. A. et al. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. **Infect Immun**, v. 67, n. 8, p. 3864-71, Aug 1999. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417150> >.

MASHAYEKHI, M. et al. CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Immunity**, v. 35, n. 2, p. 249-59, Aug 26 2011. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21867928> >.

MCMAHON, B. et al. Lipoxins: revelations on resolution. **Trends Pharmacol Sci**, v. 22, n. 8, p. 391-5, Aug 2001. ISSN 0165-6147 (Print)

0165-6147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11478982> >.

METLAY, J. P. et al. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. **J Exp Med**, v. 171, n. 5, p. 1753-71, May 1 1990. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2185332> >.

MING, M.; EWEN, M. E.; PEREIRA, M. E. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. **Cell**, v. 82, n. 2, p. 287-96, Jul 28 1995. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628017> >.

MINOPRIO, P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? **Int J Parasitol**, v. 31, n. 5-6, p. 588-91, May 1 2001. ISSN 0020-7519 (Print)

0020-7519 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334946> >.

MINOPRIO, P. et al. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. **Scand J Immunol**, v. 28, n. 5, p. 553-61, Nov 1988. ISSN 0300-9475 (Print)

0300-9475 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2463663> >.

MIYAHIRA, Y. et al. Critical contribution of CD28-CD80/CD86 costimulatory pathway to protection from *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun**, v. 71, n. 6, p. 3131-7, Jun 2003. ISSN 0019-9567 (Print)  
0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12761091> >.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine (Lond)**, v. 10, n. 3, p. 465-81, Feb 2015. ISSN 1748-6963 (Electronic)  
1743-5889 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25707979> >.

NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 5, p. 634-43, May 2012. ISSN 1462-5822 (Electronic)  
1462-5814 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22309180> >.

NAKA, T. et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. **Nature**, v. 387, n. 6636, p. 924-9, Jun 26 1997. ISSN 0028-0836 (Print)  
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202127> >.

NICKELL, S. P.; KEANE, M.; SO, M. Further characterization of protective *Trypanosoma cruzi*-specific CD4+ T-cell clones: T helper type 1-like phenotype and reactivity with shed trypomastigote antigens. **Infect Immun**, v. 61, n. 8, p. 3250-8, Aug 1993. ISSN 0019-9567 (Print)  
0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8335358> >.

NUSSENZWEIG, M. C.; STEINMAN, R. M. The cell surface of mouse lymphoid dendritic cells. **Immunol Today**, v. 3, n. 3, p. 65-8, Mar 1982. ISSN 0167-5699 (Print)  
0167-5699 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25291249> >.

NUSSENZWEIG, M. C. et al. Studies of the cell surface of mouse dendritic cells and other leukocytes. **J Exp Med**, v. 154, n. 1, p. 168-87, Jul 1 1981. ISSN 0022-1007 (Print)  
0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7252426> >.

OLIVEIRA, A. C. et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. **J Immunol**, v. 173, n. 9, p. 5688-96, Nov 1 2004. ISSN 0022-1767 (Print)  
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494520> >.

OSWALD, I. P. et al. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. **J Immunol**, v. 148, n. 11, p. 3578-82, Jun 1 1992. ISSN 0022-1767 (Print)  
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1588047> >.

PASSOS, S. T. et al. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. **J Immunol**, v. 184, n. 4, p. 1776-83, Feb 15 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic)  
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20083665> >.

PAVANELLI, W. R. et al. 5-lipoxygenase is a key determinant of acute myocardial inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect**, v. 12, n. 8-9, p. 587-97, Aug 2010. ISSN 1769-714X (Electronic)

1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20381637> >.

PEREZ-MOLINA, J. A.; NORMAN, F.; LOPEZ-VELEZ, R. Chagas disease in non-endemic countries: epidemiology, clinical presentation and treatment. **Curr Infect Dis Rep**, v. 14, n. 3, p. 263-74, Jun 2012. ISSN 1534-3146 (Electronic)

1523-3847 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22477037> >.

PETASIS, N. A. et al. Design, synthesis and bioactions of novel stable mimetics of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 73, n. 3-4, p. 301-21, Sep-Oct 2005. ISSN 0952-3278 (Print)

0952-3278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16098719> >.

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute Trypanosoma cruzi infection. **Cell Immunol**, v. 193, n. 1, p. 90-8, Apr 10 1999. ISSN 0008-8749 (Print)

0008-8749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10202116> >.

PLETINCKX, K. et al. Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. **Front Immunol**, v. 2, p. 39, 2011. ISSN 1664-3224 (Electronic)

1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566829> >.

POLTORAK, M. P.; SCHRAML, B. U. Fate mapping of dendritic cells. **Front Immunol**, v. 6, p. 199, 2015. ISSN 1664-3224 (Electronic)

1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25999945> >.

PONCINI, C. V. et al. Trypanosoma cruzi induces regulatory dendritic cells in vitro. **Infect Immun**, v. 76, n. 6, p. 2633-41, Jun 2008. ISSN 1098-5522 (Electronic)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18347042> >.

POSSELT, G. et al. Suppressor of cytokine signaling 2 is a feedback inhibitor of TLR-induced activation in human monocyte-derived dendritic cells. **J Immunol**, v. 187, n. 6, p. 2875-84, Sep 15 2011. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21844389> >.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 275-91, Jun 2012. ISSN 1557-9824 (Electronic)

0891-5520 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632639> >.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 17 2010. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399979> >.

RE, F.; STROMINGER, J. L. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. **J Biol Chem**, v. 276, n. 40, p. 37692-9, Oct 5 2001. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11477091> >.

REED, S. G. et al. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 153, n. 7, p. 3135-40, Oct 1 1994. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8089491> >.

REIS E SOUSA, C. et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. **J Exp Med**, v. 186, n. 11, p. 1819-29, Dec 1 1997. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9382881> >.

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 (Electronic) 1759-5002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847166> >.

RICO-BAUTISTA, E.; FLORES-MORALES, A.; FERNANDEZ-PEREZ, L. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 17, n. 6, p. 431-9, Dec 2006. ISSN 1359-6101 (Print) 1359-6101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17070092> >.

RICO-BAUTISTA, E. et al. Suppressor of cytokine signaling-2 deficiency induces molecular and metabolic changes that partially overlap with growth hormone-dependent effects. **Mol Endocrinol**, v. 19, n. 3, p. 781-93, Mar 2005. ISSN 0888-8809 (Print) 0888-8809 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15563548> >.

ROCHA, M. O.; RIBEIRO, A. L.; TEIXEIRA, M. M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. **Front Biosci**, v. 8, p. e44-54, Jan 1 2003. ISSN 1093-9946 (Print) 1093-4715 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12456332> >.

RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. **J Parasitol Res**, v. 2012, p. 507874, 2012. ISSN 2090-0031 (Electronic) 2090-0023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22496959> >.

ROMANO, M. et al. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in resolution of inflammation. **Eur J Pharmacol**, v. 760, p. 49-63, Aug 5 2015. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25895638> >.

ROUZER, C. A.; SHIMIZU, T.; SAMUELSSON, B. On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: characterization of a membrane-associated stimulatory factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 22, p. 7505-9, Nov 1985. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3934662> >.

SALOMON, B.; BLUESTONE, J. A. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 225-52, 2001. ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244036> >.

SATHLER-AVELAR, R. et al. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 246-51, Jul 2009. ISSN 1678-8060 (Electronic) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753480> >.



SATPATHY, A. T. et al. Notch2-dependent classical dendritic cells orchestrate intestinal immunity to attaching-and-effacing bacterial pathogens. **Nat Immunol**, v. 14, n. 9, p. 937-48, Sep 2013. ISSN 1529-2916 (Electronic) 1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23913046> >.

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 8 1999. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10360957> >.

SCHMITZ, J. et al. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. **J Biol Chem**, v. 275, n. 17, p. 12848-56, Apr 28 2000. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10777583> >.

SCHRAML, B. U.; REIS E SOUSA, C. Defining dendritic cells. **Curr Opin Immunol**, v. 32, p. 13-20, Feb 2015. ISSN 1879-0372 (Electronic) 0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25553392> >.

SCHWARZ, H. et al. TLR8 and NOD signaling synergistically induce the production of IL-1beta and IL-23 in monocyte-derived DCs and enhance the expression of the feedback inhibitor SOCS2. **Immunobiology**, v. 218, n. 4, p. 533-42, Apr 2013. ISSN 1878-3279 (Electronic) 0171-2985 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22795647> >.

SERHAN, C. N.; HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 17, p. 5335-9, Sep 1984. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6089195> >.

SESTI-COSTA, R. et al. Ruthenium complex with benznidazole and nitric oxide as a new candidate for the treatment of chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 10, p. e3207, Oct 2014. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25275456> >.

SHAHINIAN, A. et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. **Science**, v. 261, n. 5121, p. 609-12, Jul 30 1993. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7688139> >.

SHIMIZU, T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 49, p. 123-50, 2009.

SHODA, L. K. et al. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. **Infect Immun**, v. 69, n. 4, p. 2162-71, Apr 2001. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11254571> >.

SILVA, E. M. et al. Caspase inhibition reduces lymphocyte apoptosis and improves host immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 3, p. 738-46, Mar 2007. ISSN 0014-2980 (Print)  
0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17295391> >.

SILVA, J. M., FS; MARTINS, GA. The Role Of Nitric Oxide In The Pathogenesis of Chagas Disease. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. 314-325, 2003.

SILVA, J. S. et al. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 1, p. 111-5, Jan 1998. ISSN 0100-879X (Print)  
0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9686186> >.

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 1 1992. ISSN 0022-1007 (Print)  
0022-1007 (Linking). 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 (Print)  
0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7591147> >.

SIMPSON, A. G.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 4, p. 168-74, Apr 2006. ISSN 1471-4922 (Print)  
1471-4922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504583> >.

STARR, R.; HILTON, D. J. SOCS: suppressors of cytokine signalling. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 30, n. 10, p. 1081-5, Oct 1998. ISSN 1357-2725 (Print)  
1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9785473> >.

STARR, R. et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. **Nature**, v. 387, n. 6636, p. 917-21, Jun 26 1997. ISSN 0028-0836 (Print)  
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202125> >.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J Exp Med**, v. 137, n. 5, p. 1142-62, May 1 1973. ISSN 0022-1007 (Print)  
0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4573839> >.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 685-711, 2003. ISSN 0732-0582 (Print)  
0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615891> >.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 317, 2014. ISSN 1756-3305 (Electronic)  
1756-3305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25011546> >.

STREBOVSKY, J.; WALKER, P.; DALPKE, A. H. Suppressor of cytokine signaling proteins as regulators of innate immune signaling. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 17, p. 1627-39, 2012. ISSN 1093-4715 (Electronic)

1093-4715 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201825> >.

SUTTON, C. E.; MIELKE, L. A.; MILLS, K. H. IL-17-producing gammadelta T cells and innate lymphoid cells. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 9, p. 2221-31, Sep 2012. ISSN 1521-4141 (Electronic)

0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22949320> >.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-20, Mar 19 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303872> >.

TALVANI, A. et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect**, v. 2, n. 8, p. 851-66, Jul 2000. ISSN 1286-4579 (Print)

1286-4579 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962268> >.

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 4, p. 430-4, Aug 2007. ISSN 0952-7915 (Print)

0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651955> >.

TESSARO, F. H.; AYALA, T. S.; MARTINS, J. O. Lipid mediators are critical in resolving inflammation: a review of the emerging roles of eicosanoids in diabetes mellitus. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 568408, 2015. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25866794> >.

THOMPSON, C. B. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation? **Cell**, v. 81, n. 7, p. 979-82, Jun 30 1995. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7541314> >.

TONELLI, R. R. et al. In vivo infection by *Trypanosoma cruzi*: the conserved FLY domain of the gp85/trans-sialidase family potentiates host infection. **Parasitology**, v. 138, n. 4, p. 481-92, Apr 2011. ISSN 1469-8161 (Electronic)

0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21040619> >.

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 15 1991. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1902858> >.

URBAN, B. C. et al. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. **Nature**, v. 400, n. 6739, p. 73-7, Jul 1 1999. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403251> >.

VAN GOOL, S. W. et al. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. **Immunol Rev**, v. 153, p. 47-83, Oct 1996. ISSN 0105-2896 (Print)

0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010719> >.

VANDEN EIJNDEN, S. et al. Preferential production of the IL-12(p40)/IL-23(p19) heterodimer by dendritic cells from human newborns. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 1, p. 21-6, Jan 2006. ISSN 0014-2980 (Print)  
0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16342235> >.

VERHASSELT, V. et al. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. **J Immunol**, v. 158, n. 6, p. 2919-25, Mar 15 1997. ISSN 0022-1767 (Print)  
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9058830> >.

VIRGILIO, F., ; PONTES, C.; DOMINGUEZ, MR.; ERSCHING, J.; RODRIGUES, MM.; VASCONCELOS, JR. CD8+T Cell-MEDiated Immunity during Trypanosoma cruzi Infection: A Path for Vaccine Development? **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 12, 2014.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. **Scand J Immunol**, v. 62, n. 3, p. 297-308, Sep 2005. ISSN 0300-9475 (Print)  
0300-9475 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16179017> >.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? **Clin Exp Immunol**, v. 145, n. 1, p. 81-92, Jul 2006. ISSN 0009-9104 (Print)  
0009-9104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16792677> >.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. **Scand J Immunol**, v. 68, n. 5, p. 516-25, Nov 2008. ISSN 1365-3083 (Electronic)  
0300-9475 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18803607> >.

WADA, M. et al. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. **J Biol Chem**, v. 282, n. 31, p. 22254-66, Aug 3 2007. ISSN 0021-9258 (Print)  
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17519235> >.

WANG, L. et al. Erythropoietin up-regulates SOCS2 in neuronal progenitor cells derived from SVZ of adult rat. **Neuroreport**, v. 15, n. 8, p. 1225-9, Jun 7 2004. ISSN 0959-4965 (Print)  
0959-4965 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15167538> >.

WEAVER, C. T. et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 821-52, 2007. ISSN 0732-0582 (Print)  
0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17201677> >.

WILSON, H. M. SOCS Proteins in Macrophage Polarization and Function. **Front Immunol**, v. 5, p. 357, 2014. ISSN 1664-3224 (Electronic)  
1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25120543> >.

WU, L.; LIU, Y. J. Development of dendritic-cell lineages. **Immunity**, v. 26, n. 6, p. 741-50, Jun 2007. ISSN 1074-7613 (Print)  
1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582346> >.

YAROVINSKY, F. et al. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1626-9, Jun 10 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic)  
0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15860593> >.

YASUKAWA, H. et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. **EMBO J**, v. 18, n. 5, p. 1309-20, Mar 1 1999. ISSN 0261-4189 (Print)  
0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10064597> >.

YOKOMIZO, T. et al. A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. **J Exp Med**, v. 192, n. 3, p. 421-32, Aug 7 2000. ISSN 0022-1007 (Print)  
0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10934230> >.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 6, p. 454-65, Jun 2007. ISSN 1474-1733 (Print)  
1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525754> >.

ZHANG, J. et al. Apoptosis in a canine model of acute Chagasic myocarditis. **J Mol Cell Cardiol**, v. 31, n. 3, p. 581-96, Mar 1999. ISSN 0022-2828 (Print)  
0022-2828 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10198189> >.