



Universidade de Brasília

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**ANÁLISE PRELIMINAR DO TRANSCRIPTOMA DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS HUMANAS APÓS INFECÇÃO POR *Trypanosoma
cruzi***

NATALIA GIL JARAMILLO

Brasília - DF, 2016.



Universidade de Brasília

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ANÁLISE PRELIMINAR DO TRANSCRIPTOMA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS APÓS INFECÇÃO POR *Trypanosoma* *cruzi*

NATALIA GIL JARAMILLO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina-UnB como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: **Prof. Dr. Jaime Martins de Santana**

Brasília - DF, 2016.



Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro (LIPH) do Departamento de Biologia Celular da UnB.

Apoio financeiro:

Curso de mestrado realizado com bolsa da Capes

Projeto PRONEX “Interface entre biotecnologia, genômica funcional e garimpagem molecular de drogas para tratamento de leishmaniose e doença de Chagas” financiado por CNPq e FAPDF.



**Dedico este trabalho a Margarita Jaramillo,
meu eterno exemplo a seguir.**



AGRADECIMENTOS

Eu agradeço...

À minha mãe, que sempre me deu forças para continuar. Seu amor e compreensão sempre recarregaram minhas baterias, e seu exemplo sempre tem sido uma inspiração para mim.

À minha irmã, que sempre teve uma história engraçada para colocar um sorriso no meu rosto. Sua cumplicidade foi fundamental no processo.

Aos meus amigos de Medellín: Julian, Sebastián, Jorge, Sara e Alejandro, a companhia apesar da distância. Obrigada por escutar minhas histórias e me encher de conselhos bons, suportando às vezes (espero que não sempre) certo nível de monotonia nas minhas conversas. Sempre terei vocês no meu coração.

Aos amigos maravilhosos que fiz no Brasil, especialmente a Luz e Grazi, que com a sua alegria e companhia aliviaram o peso de certos dias complicados. Aproveito também para agradecer a família da Grazi: dona Graciete, Diego Henrique, Lorena, Diego e Anna Laura, a acolhida no seu lar como mais uma de vocês. Prometo não esquecer nunca minha família brasileira.

Às minhas amigas e colegas de laboratório: Milene, Camila, Clênia, Yanna e Paula, os conselhos, apoio e companhia que me foram dados. Não posso esquecer a Raquel, de quem aprendi muito e por quem sinto muita admiração.

Aos meus professores de ciência e de vida: Izabela, Carla, Cecília, David, meu orientador Jaime, e, especialmente, Flávia, quem me ajudou infinitamente não só no âmbito acadêmico, mas também no meu processo de amadurecimento pessoal. Assim como às professoras Claudia e Gloria pela formação inicial.



LISTA DE ABREVIATURAS

- APCs: Células apresentadoras de antígenos
- CCL2: Ligante de quimiocina 2
- CCR5: Receptor de quimiocina 5
- CCR7: Receptor de quimiocina 7
- cDNA: DNA complementar
- CMSP: Células mononucleares de sangue periférico
- CTLA-4: Antígeno 4 do linfócito T citotóxico
- DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole
- DCs: Células dendríticas
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- DTU: Discrete typing units
- EST: Expressed sequence tag
- FACS: Separação de células ativada por fluorescência
- Fc: Fração constante dos anticorpos
- GM-CSF: Fator estimular de colônias de macrófagos e granulócitos
- gp35/50: Glicoproteína de superfície 35/50 do *Trypanosoma cruzi*
- gp82: Glicoproteína de superfície 82 do *T. cruzi*
- gp90: Glicoproteína de superfície 90 do *T. cruzi*
- GPI: Glicosilinositol fosfato
- HLA: Antígeno leucocitário humano
- IFN- γ : Interferon gama
- IgG: Imunoglobulina G
- IgM: Imunoglobulina M
- IL-10: Interleucina 10
- IL-12: Interleucina 12
- IL-12p40: Interleucina 12 subunidade p40
- IL-12p70: Interleucina 12 subunidade p70
- IL-17: Interleucina 17
- IL-1 β : Interleucina 1 beta



IL-4: Interleucina 4
IL-6: Interleucina 6
kDNA: DNA mitocondrial
LPS: molécula de lipopolissacarídeo
MHC I/ II: Complexo principal de histocompatibilidade de classe I/ II
MyD88: Proteína de resposta primária da diferenciação mielóide 88
mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro
NF- κ B: Fator de transcrição nuclear κ B
NK: Células Natural Killer
PAMPs: Padrões moleculares associados ao patógeno
pb: pares de bases
PBS: Tampão fosfato salino
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PD-1: Proteína de morte celular programada 1
PD-L1: Ligante de morte celular programada 1
PE: Ficoeritrina
PIP₃: Fosfatidil inositol trifosfato
PRR: Receptor de reconhecimento padrão
qPCR: PCR em tempo real
RIN: Número de integridade do RNA
RNA: Ácido ribonucléico
SFB: Soro Fetal bovino
Siglec-E: sialic acid-binding Ig-like lectin-E
TAU: Traitomine artificial urine medium
TAU3AAG: Traitomine artificial urine medium com glicose, prolina, glutamato, aspartato
Tc: *Trypanosoma cruzi*
TcMUC: Glicoproteínas tipo mucinas do *T. cruzi*
TGF- β : Fator de crescimento transformante beta
Th1: T auxiliador tipo I
Th2: T auxiliador tipo II



TLR: Receptores tipo Toll

TM: Tripomastigota metacíclico

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas de migração e número estimado de casos reportados em outros continentes.	4
Figura 2. Diferentes estágios de desenvolvimento de <i>T. cruzi</i>	6
Figura 3. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	8
Figura 4. Distribuição geográfica dos seis DTUs de <i>T. cruzi</i> na América	9
Figura 5. A produção de citocinas pode afetar o desenvolvimento da doença	14
Figura 6. Os três sinais emitidos pelas APCs para ativação de linfócitos T	17
Figura 7. Morfologia das DCs derivadas de monócito. a). DC imatura b). DC ativada	18
Figura 8. Metodologia de sequenciamento por Illumina.....	25
Figura 9. Fluxograma da metodologia realizada durante cada experimento.....	28
Figura 10. Microscopia óptica de cultura (com 35 dias) de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa G) contendo TMs.....	39
Figura 11. Microscopia óptica de tripomastigotas metacíclicos (cepa G) após incubação em SFB ativo.....	40
Figura 12. Produtos de PCR visualizados em gel de agarose 1,5%.....	43
Figura 13. Citometria de fluxo representativa dos PBMCs totais	44
Figura 14. Citometria de fluxo representativa da fração positiva após passagem na coluna de separação magnética para células CD14+.....	45
Figura 15. Citometria de fluxo representativa da fração negativa após passagem na coluna de separação magnética para células CD14+.....	46
Figura 16. Microscopia de luz para observação simples da morfologia das células durante a diferenciação em cultura	47
Figura 17. Citometria de fluxo representativa da diferenciação de monócitos para DCs com marcação para HLA.....	48
Figura 18. Citometria de fluxo representativa da diferenciação de monócitos para DCs com marcação para CD1a	48
Figura 19. Porcentagem de marcadores de superfície após 12h de infecção com <i>T. cruzi</i> , Cepa CL Brener.....	50
Figura 20. Fotografias representativas das DCs a). Controle não-infectadas b). Infectadas após 12 horas de infecção	50
Figura 21. a). Taxa de infecção das DCs por doador, b). Número de amastigotas por DC infectada de cada doador.....	52
Figura 22. a). Porcentagem global de ativação das DCs controle e infectadas; b). Porcentagem de ativação por doador	52
Figura 23. Micrografias representativas dos ensaios de imunofluorescência em diferentes tempos de infecção na presença/ausência de LPS.....	54
Figura 24. Medida da fluorescência total da faloidina por célula dendrítica (DC) quando incubadas com formas tripomastigotas metacíclicas	55
Figura 25. Medida da fluorescência total da faloidina por célula dendrítica (DC) quando incubadas com formas tripomastigotas metacíclicas	56



Figura 26. Medida da fluorescência total da faloidina nas células dendríticas (DC) quando incubadas com LPS e as formas tripomastigotas metacíclicas	56
Figura 27. Taxa de infecção das DCs pela cepa CL Brener na presença ou não de LPS.	57
Figura 28. Número de amastigotas por célula infectada nos diferentes tempos de incubação na presença ou não de LPS	58
Figura 29. Análise por Bioanalyzer da integridade do RNA extraído de DCs após infecção com o parasito.....	59
Figura 30. Distribuição dos fragmentos de cDNAs obtidos a partir das bibliotecas.	60
Figura 31. Quantificação da concentração dos fragmentos de cDNA obtidos na produção de bibliotecas	61
Figura 32. Distribuição dos reads obtidos a partir do doador A nos cromossomas humanos	66
Figura 33. Distribuição dos reads obtidos a partir do doador B nos cromossomas humanos	67
Figura 34. Distribuição dos reads obtidos a partir do doador C nos cromossomas humanos	68
Figura 35. Matriz de correlação entre todas as amostras usando o coeficiente de correlação de Pearson.	69
Figura 36. Correlação entre as duplicatas biológicas de cada doador baseado no nível de expressão dos genes humanos nas amostras (FPKM.....	70
Figura 37. Vulcano plot para os genes humanos diferencialmente expressos nas amostras	72
Figura 38. Análise de agrupamento dos genes humanos diferencialmente expressos nas amostras controle e infectadas dos três doadores	73



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de metaciclogênese de acordo com o tempo de cultura da cepa G.	38
Tabela 2. Porcentagens de metaciclogênese para o protocolo de Canavaci e colaboradores	41
Tabela 3. Resumo da padronização de metaciclogênese	42
Tabela 4. Porcentagem de DCs infectadas ou controle que expressando HLA-DR e CD1a nos diferentes doadores	49
Tabela 5. Dados da infecção de DCs pelo <i>T. cruzi</i> nas 4 réplicas biológicas realizadas... ..	51
Tabela 6. Quantificação e qualidade do RNA total extraído das DCs após infecção com o parasito.	60
Tabela 7. Resumo do resultado dos sequenciamentos usando a plataforma Illumina HiSeq 2500.....	62
Tabela 8. Resultado do mapeamento dos reads obtidos usando o genoma humano de referência.....	62
Tabela 9. Resultado do mapeamento dos reads obtidos usando o genoma de referência do <i>T. cruzi</i>	64
Tabela 10. Número de genes humanos com diferentes níveis de expressão nas 12 amostras.	71



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.2. Resposta imune do hospedeiro humano durante a doença de Chagas.....	12
1.3. Importância das células dendríticas na imunidade	15
1.4. Interação entre as Células dendríticas e <i>T. cruzi</i>	20
1.5. Fagocitose e <i>T. cruzi</i>	22
1.6. Transcriptoma e tecnologias de sequenciamento.....	24
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVO	27
3.1. Atividades	27
4. METODOLOGIA	28
4.1. Parasitos	29
4.1.1. Epimastigotas.....	29
4.1.2. Padronização da obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas	29
4.2. Teste para descartar infecção prévia pelo <i>T. cruzi</i> nos doadores.....	30
4.3. Obtenção das células dendríticas humanas	32
4.3.1. Obtenção de monócitos de sangue periférico	32
4.3.2. Separação de monócitos a partir das CMSP.....	32
4.3.3. Diferenciação das células dendríticas a partir de monócitos	33
4.4. Coleta das células dendríticas e interação com <i>T. cruzi</i>	33
4.5. Determinação da taxa de infecção	33
4.6. Avaliação da diferenciação das DCs por citometria de fluxo	34
4.7. Ensaio de imunofluorescência.....	35
4.8. Extração de RNA total das DCs após ensaios de interação	36
4.9. Concentração e integridade do RNA.....	37
4.10. Parâmetros para produção do transcriptoma de células dendríticas após 12 horas de infecção por formas tripomastigotas metacíclicas.....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1. Obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i>	38
5.1.1. Envelhecimento da cultura.....	38



5.1.2. Cultivo em meio Schneider	39
5.1.3. Lise em SFB ativo de uma cultura em fase estacionária	40
5.1.4. Indução da metaciclologênese utilizando o protocolo de Canavaci e colaboradores (2010)	40
5.2. Teste para descarte da infecção por <i>T. cruzi</i> nos doadores	42
5.3. Diferenciação e obtenção de células dendríticas	43
5.3.1. Verificação de mononucleares de sangue periférico	43
5.3.2. Enriquecimento da amostra com monócitos	44
5.3.3 Diferenciação de células dendríticas	46
5.4. Coleta das células dendríticas diferenciadas e infecção pelo <i>T. cruzi</i>	49
5.5. Taxa de infecção	50
5.6. Imunofluorescência das DCs ativadas após infecção por <i>T. cruzi</i>	53
5.7. Extração e controle de qualidade do RNA total das DCs extraído após infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
5.8. Transcriptoma preliminar das DCs após infecção com <i>T. cruzi</i>	60
5.9. Revisão bibliográfica da interação DCs- <i>T. cruzi</i> em forma de manuscrito	73
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÃO	85
8. PERSPECTIVAS	86
9. REFERÊNCIAS	87
10. APÊNDICE	101
10.1. Manuscrito aceito	101



RESUMO

As células dendríticas (DCs) são um dos mais importantes componentes do sistema imunológico e desempenham funções essenciais como reconhecimento do antígeno no local da infecção bem como sua internalização e apresentação de forma eficiente. Estas células tem papel central na ligação das respostas imunes naturais e adquiridas contra *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas. As DCs podem modular a resposta imunológica do hospedeiro, dependendo da sua subpopulação, do seu nível de maturação, das citocinas presentes no meio e do receptor dessas células envolvido nas interações com o *T. cruzi*, influenciando o desenvolvimento das formas clínicas da doença. Dentro deste contexto, esta dissertação apresenta a padronização da obtenção de DCs provenientes de monócitos de três doadores voluntários e otimização da diferenciação da forma tripomastigota metacíclica (TM) do parasito *in vitro* para posterior interação entre ambas as células e extração do RNA total para sequenciamento e montagem do transcriptoma por duplicata. Entre as cepas G e CL Brener de *T. cruzi*, a 2ª mostrou um melhor rendimento no que diz respeito a velocidade de crescimento em cultura, porcentagens finais de metaciclogênese e taxa de infecção. Durante a obtenção e diferenciação das DCs, três técnicas foram aplicadas para confirmação, incluindo citometria de fluxo, visualização em microscópio óptico e de fluorescência. O tempo estabelecido para interação parasito-célula hospedeira foi de 12 h, depois de transcorrido esse tempo obteve-se 39% de taxa de infecção, média de 2,4 amastigotas/DC infectada e 80% de DCs infectadas ativadas contra 47% das células controle. O passo seguinte foi a extração do RNA total das amostras controle e infectadas para sequenciamento e a montagem dos reads. Os resultados provenientes deste processo mostram ser confiáveis devido à cobertura satisfatória dos reads dentro do genoma humano com ~23.000.000 reads por amostra, e ao coeficiente de correlação próximo a 1 entre as duplicatas, fortes indícios da qualidade dos dados. A obtenção de uma visão detalhada da biologia das células apresentadoras de antígenos após os contatos iniciais com *T. cruzi* poderá proporcionar novos alvos para o tratamento da doença e ajudará no entendimento da evolução diferencial da doença nos pacientes e nos mecanismos de resistência e tolerância ao *T. cruzi*.



ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are one of the most important components of human immunologic system and are able to develop essential functions like antigen recognition at the infection site and its internalization and presentation are accomplished with high efficiency. These cells play a central role in linking natural and acquired immune response against *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease. DCs can modulate host immunologic response depending on their subset, maturation level, cytokine milieu and DC receptor involved in the interactions with *T. cruzi*, influencing the development of the disease clinic forms. Therefore, this dissertation presents the standardization of DCs derived from monocyte obtained from three voluntaries and the optimization of *in vitro* metacyclic trypomastigote form differentiation to proceed to interaction between both cells and subsequently total RNA extraction for sequencing and transcriptome assembly. Among G and CL Brener *T. cruzi* strains, the second yielded more with respect to culture grow velocity, final metacyclogenesis percentages and infection rate. During DCs obtainment and differentiation, three technics were applied to confirmation, including flow cytometry and optic or fluorescence microscopy visualization. A parasite-host cell interaction time of 12 h was established and after it, infection rates of about 39%, an average of 2.4 amastigotes/infected DC were obtained and also 80% of DCs from infected assays were activated. The next step was extraction of total RNA from control and infected samples for sequencing and assembly of the reads accordingly to human reference genome. These results showed good reliability because of the satisfactory human genome coverage obtained with ~23,000,000 reads per sample, and correlation coefficient of ~1 between duplicates, which are strong indications of data quality. A detailed vision of antigen presenting cells biology after initial contacts with *T. cruzi* could provide new targets for the disease treatment and it will help understanding the differential evolutions of Chagas disease in patients and in resistance and tolerance to parasite.



1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é caracterizada por uma fase aguda com grande quantidade de parasitos circulantes no sangue e sintomas leves, imprecisos ou ausentes, e uma fase crônica que se apresenta com problemas cardíacos em 30% dos casos e desordens digestivas em 10% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Foi descrita pela primeira vez por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, quem entre outros sintomas descreveu uma anemia profunda com grande decadência orgânica, edemas em zonas determinadas, às vezes esplenomegalia considerável, hepatomegalia e perturbações funcionais especialmente no sistema nervoso, sintomas agora conhecidos como pertencentes ao quadro grave da fase aguda (BASTOS et al., 2010; CHAGAS, 1909).

Embora seja pouco usual, depois de uma a três semanas de incubação, o paciente infectado pode apresentar febre, calafrios, náuseas, vômito, diarreia, erupções cutâneas e irritação meníngea. Uma lesão inflamatória cutânea (chagoma) pode se desenvolver na área de entrada do parasito, assim como o sinal de Romana, um tipo de conjuntivite unilateral cuja presença é um indicativo da doença de Chagas (DELAPORTE, 1997; HOFF et al., 1978). A maior parte dos pacientes consegue controlar os sintomas sem necessidade de tratamento entre dois e quatro meses após a infecção, mas uma pequena porcentagem (aproximadamente 2%) não sobrevive à fase aguda (MACHADO et al., 2013). Quando a parasitemia é controlada e os sintomas desaparecem, os pacientes entram na fase crônica indeterminada, caracterizada por sorologia positiva, mas nenhuma manifestação clínica. O indivíduo pode permanecer nessa fase durante o resto da sua vida ou apresentar uma das formas clínicas conhecidas. A cardiomiopatia congestiva dilatada é a manifestação clínica de maior importância, que pode se apresentar aos poucos como uma falha cardíaca ou abruptamente como uma arritmia e/ou uma apoplexia (CAROD-ARTAL; VARGAS; FALCAO, 2011). As manifestações gastrointestinais não são tão comuns quanto às cardíacas, mas têm se reportado algumas síndromes dos megas relacionadas às estruturas tubulares do trato digestivo, sendo elas mais frequentes no centro do Brasil, menos

vistas na Bolívia, e quase inexistentes em países ao norte da bacia amazônica (MACHADO et al., 2013; PINAZO et al., 2010).

Se calcula que existam entre 7 e 8 milhões de pessoas infectadas, principalmente na América Latina, onde a transmissão do parasito causador da doença pode acontecer por meio do contato com as fezes contaminadas de insetos da subfamília Triatominae (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). No entanto, nos últimos anos, devido às abundantes migrações, tem-se reportado múltiplos casos em outros continentes, com 300.000 infectados nos Estados Unidos (MANNE-GOEHLER; REICH; WIRTZ, 2015), uma estimativa de 59.000 a 108.000 casos da doença na Europa (ANGHEBEN et al., 2011), mais de 3.000 casos no Japão e 1.500 reportados na Austrália (COURA; ALBAJAR-VIÑAS, 2010). Além da transmissão vetorial, já foram confirmados casos de transmissão oral, congênita e por transfusão de sangue ou transplante de órgãos e existem suspeitas de transmissão sexual (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; RIBEIRO et al., 2016), motivos pelos quais a doença de Chagas tem se tornado um problema de saúde de importância mundial (Figura 1).

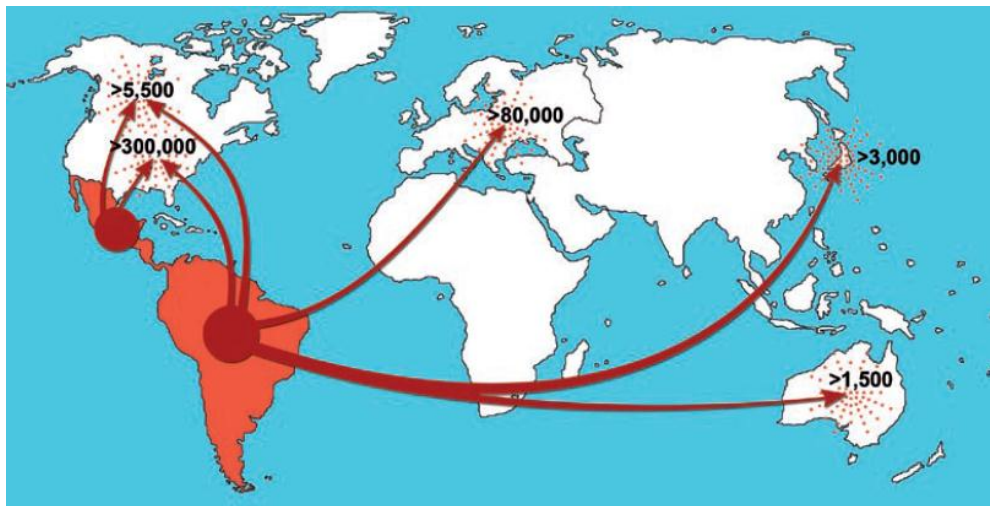


Figura 1. Rotas de migração e número estimado de casos reportados em outros continentes. Tomada de (COURA; ALBAJAR-VIÑAS, 2010).

O Brasil tem realizado com sucesso um plano de controle da transmissão vetorial da doença pelo *Triatoma infestans*, e em 2006 obteve a certificação da



interrupção desta via pela Organização Panamericana da Saúde. Embora ainda exista uma predominância dos casos crônicos de infecção pela via vetorial de décadas passadas, os casos de transmissão oral devido ao suco de cana e açaí contaminado, agora são de grande importância, tendo sido reportados principalmente na região norte do país, e em especial no estado do Pará. Adicionalmente, a transmissão por transfusão sanguínea foi eliminada graças a triagem atualmente realizada no sangue dos doadores (DA SILVA; LUNA, 2013; MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2015).

O tratamento da doença de Chagas é administrado preferencialmente durante a fase aguda, mas também em casos de reativação da infecção ou de transmissão congênita sempre com o objetivo de eliminar os parasitos circulantes no sangue (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). O Benzonidazol é o medicamento de primeira escolha e o único administrado no Brasil; isso se deve ao fato de ser o mais eficiente e causar menos efeito colateral para o paciente do que o Nifurtimox, medicamento proibido no país. No entanto, esses fármacos podem induzir vários efeitos colaterais como dermatite, particularmente depois de uso prolongado, polineuropatia, leucopenia, danos no fígado e granulocitose (FRAGATA-FILHO et al., 2016; VIOTTI et al., 2009). Além disso, as cepas de *T. cruzi* possuem grande capacidade para desenvolver resistência aos medicamentos, motivo pelo qual somente cerca de 50% dos pacientes respondem bem ao tratamento atual (MUÑOZ-SARAVIA et al., 2012).

A administração de Benzonidazol ou Nifurtimox é realizada em adultos e crianças, mas não está indicada para mulheres grávidas, pois pode induzir danos renais ou hepático. Em adição, não é recomendada para etapas avançadas da doença de Chagas, sendo o transplante o único tratamento possível em alguns casos (HABERLAND et al., 2013).

1.1. *Trypanosoma cruzi*

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas. Pertence à Ordem Kinetoplastida e à Família Trypanosomatidae e se caracteriza por ter um flagelo e uma única mitocôndria denominada cinetoplasto,

que contém grande quantidade DNA organizado em forma circular como minicírculos e maxicírculos (DE LANA; MARQUES; MACHADO, 2010).

O *T. cruzi* apresenta diferentes estágios de desenvolvimento morfológicos e fisiológicos que podem ser identificados pela posição relativa do núcleo e cinetoplasto referente ao flagelo: os tripomastigotas são conhecidos classicamente como as formas infecciosas, mas não são replicativos. Podem estar presentes no sangue do hospedeiro mamífero (tripomastigota sanguíneo) ou nas fezes e urina do triatomíneo (tripomastigota metacíclico/TM). Seu flagelo se origina depois do núcleo alongado, e o cinetoplasto se desloca até a parte posterior (Figura 2a). As formas amastigotas são intracelulares e multiplicam-se no hospedeiro mamífero; elas apresentam um flagelo interno, núcleo grande e cinetoplasto com formato de bastão (Figura 2b). Epimastigotas, formas não infectivas em mamífero, também são capazes de se replicar por fissão binária; estão localizados no trato intestinal e na urina do inseto vetor. Seu cinetoplasto em forma de bastão está localizado na parte anterior do núcleo (Figura 2c) (DE LANA; MARQUES; MACHADO, 2010; DE SOUZA, 2002).

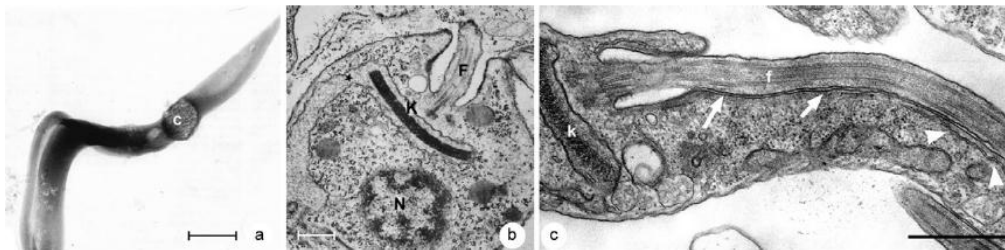


Figura 2. Diferentes estágios de desenvolvimento de *T. cruzi*: a. Forma tripomastigota, b. Forma amastigota, c. Forma epimastigota. F: flagelo, C ou K: cinetoplasto, N: núcleo. Barras = 1 μ m. Tomada de (DE SOUZA, 2009).

Das formas descritas acima, os TMs foram utilizados no trabalho para os ensaios de infecção. A metaciclogênese acontece no intestino posterior do triatomíneo, onde epimastigotas se aderem na camada superficial da cutícula para se diferenciar em TM (BOKER; SCHAUB, 1984). Durante a metaciclogênese acontecem mudanças na estrutura nuclear, estabilidade diferencial do mRNA, e remodelamento da cromatina, tendo como resultado uma expressão proteica

diferente, mudanças na morfologia, infectividade e proliferação (BAYER-SANTOS et al., 2013). A molécula de superfície gp82 é um exemplo de expressão diferencial estágio dependente. Esta glicoproteína confere capacidade de adesão à mucosa gástrica ajudando na invasão das células epiteliais, ou seja, a invasão e replicação em células do epitélio gástrico é exclusiva dos TMs (BAYER-SANTOS et al., 2013; RAMIREZ et al., 1993). A gp82 é uma trans-sialidase que induz fluxo de Ca^{2+} , indispensável para a entrada do parasito de forma receptor dependente (MANCHOLA et al., 2015). Este processo pode ser reproduzido *in vitro* usando os meios TAU e TAU3AAG, que contêm os aminoácidos prolina, glutamato e aspartato requeridos e, adicionalmente, simulam condições de adesão ao substrato e estresse nutricional do intestino posterior do triatomíneo (BONALDO et al., 1988; CONTRERAS et al., 1985).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é desenvolvido em dois hospedeiros – mamífero (incluindo humanos) e triatomíneo (várias espécies da família Reduviidae). Este se inicia quando o triatomíneo se alimenta do sangue do hospedeiro mamífero infectado por formas tripomastigotas sanguíneas (1). Dentro do intestino médio do inseto vetor, estas formas se diferenciam em epimastigotas, replicam-se (2) e migram para o intestino posterior, aonde irão se transformar em TMs (3), sendo excretados nas fezes e urina do triatomíneo após repasto do invertebrado (4). As formas metacíclicas entram através da lesão provocada pela picada do inseto ou por contato com membranas mucosas do hospedeiro mamífero, invadindo múltiplos tipos de células nucleadas (5), envolvidos por um vacúolo parasitóforo. Uma vez dentro da célula, em pH baixo, os tripomastigotas diferenciam-se na forma amastigota, secretam proteínas que conseguem destruir o vacúolo, e no citoplasma, sofrem vários ciclos de multiplicação (6), sendo estes limitados possivelmente pelo espaço da célula hospedeira e por um lapso de tempo que depende da cepa. Acontecem várias transformações até virarem tripomastigotas, lesarem a célula (7) e serem liberados no sangue circulante (8). Estes tripomastigotas podem reiniciar o ciclo no momento em que um inseto vetor se alimentar do sangue deste hospedeiro infectado (BERN, 2015; DE LANA; MARQUES; MACHADO, 2010). Na natureza, o *T. cruzi* apresenta este ciclo de maneira silvestre quando o parasito infecta

mamíferos silvestres como, por exemplo, gambás, morcegos, tatus e macacos. Esses animais também podem atuar como hospedeiro-reservatório (COURA et al., 2002; MILES; FELICIANGELI; DE ARIAS, 2003).

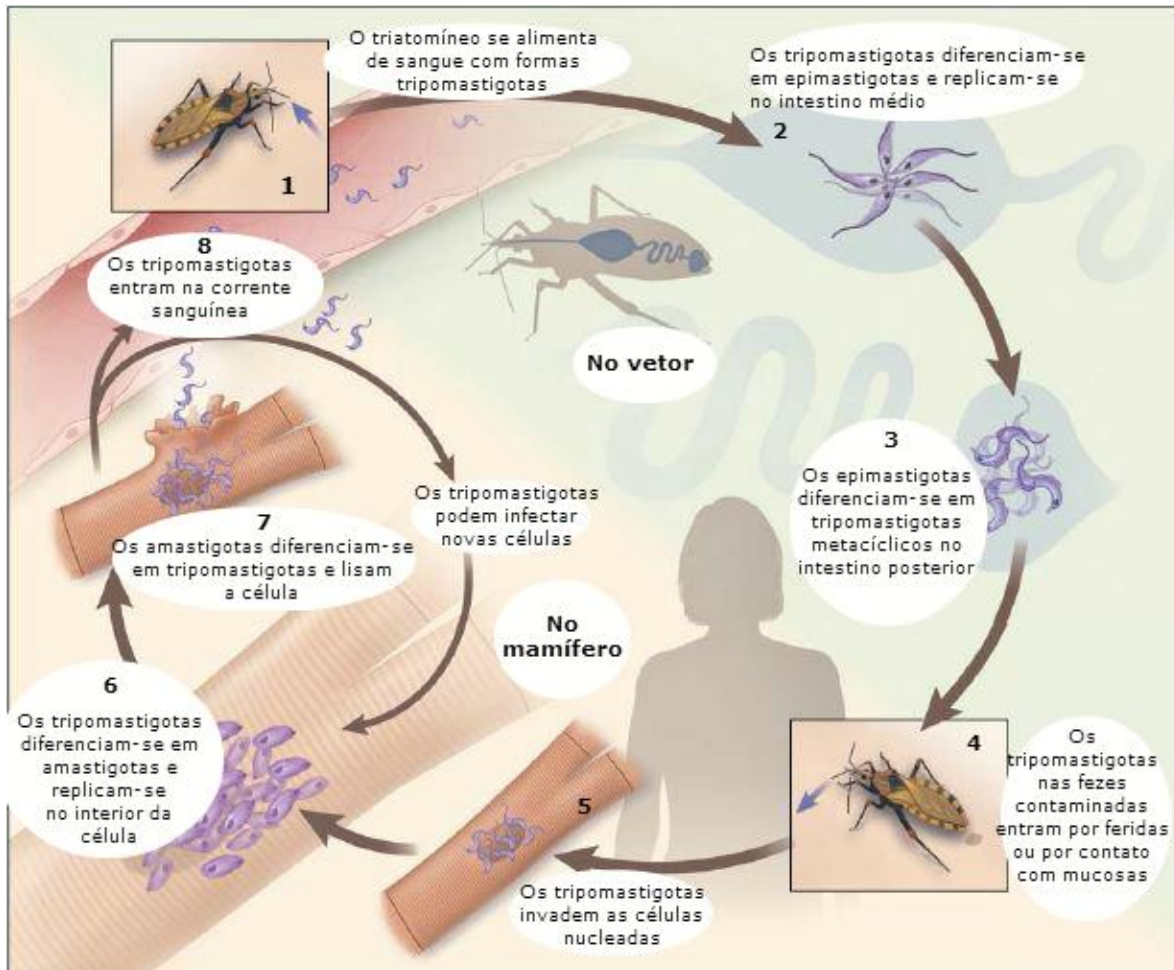


Figura 3. Ciclo de vida do *T. cruzi*. Modificada de (BERN, 2011)

O *T. cruzi* apresenta uma população geneticamente heterogênea que se propaga clonalmente durante vários ciclos com a capacidade de realizar troca de material genético, justificando assim sua ampla diversidade biológica (DE LANA; MARQUES; MACHADO, 2010; RAMÍREZ et al., 2010). O parasito apresenta também um grande polimorfismo decorrente de vários aspectos morfológicos, bioquímicos e da capacidade de infecção em vertebrados e invertebrados. Por tudo isto, diversos sistemas de classificação das diferentes cepas de *T. cruzi* já foram sugeridos, como zimodemas, schizodemas, biodemas, linhagens e, mais

recentemente, DTUs. Os DTUs são definidos como os conjuntos de populações que se encontram mais relacionados entre si que com qualquer outra população e são identificáveis por aspectos genéticos ou moleculares, ou marcadores imunológicos em comum (TIBAYRENC, 1998). Atualmente, isolados e cepas deste protozário são classificados em seis diferentes DTUs (TcI a TcVI) de acordo com a genotipagem multilocus, sistema estabelecido no *Second Satellite Meeting* realizado no Brasil em 2009 (ZINGALES et al., 2009). A distribuição dos diferentes DTUs nas Américas é apresentada na Figura 4, ressaltando os lugares com predominância de ciclos de transmissão silvestres e domésticos.

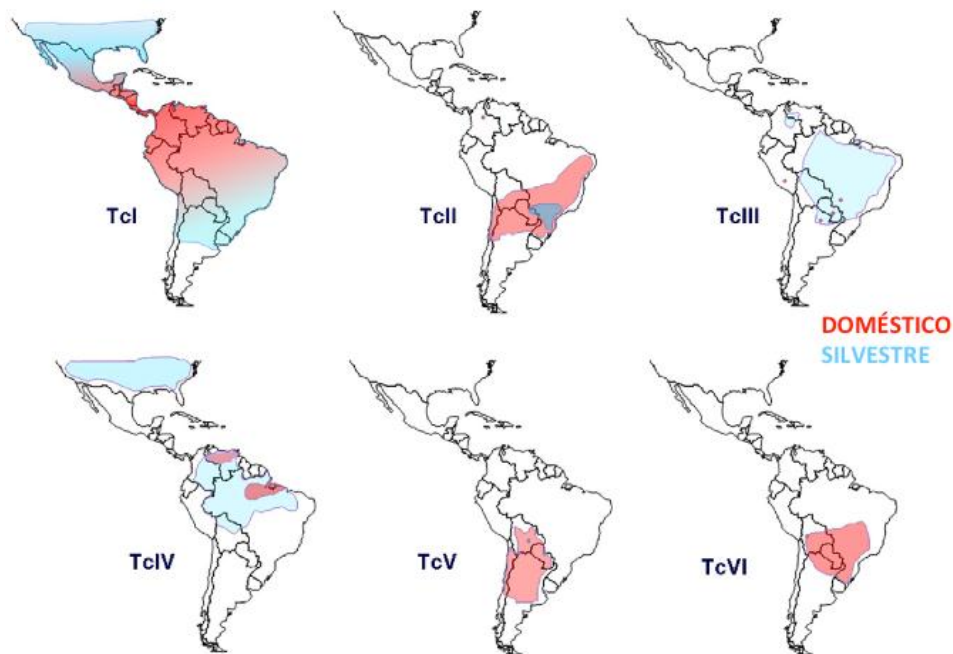


Figura 4. Distribuição geográfica dos seis DTUs de *T. cruzi* na América, apresentando os ciclos doméstico e silvestre. Modificada de (ZINGALES et al., 2012).

Como ilustrado na Figura 4, o DTU dominante na região da Amazônia brasileira, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, América Central e sul da América do Norte é o TcI, grupo mais encontrado tanto nos vetores invertebrados quanto em mamíferos, e mais relacionado aos casos de cardiomiopatia crônica e aguda (CARRASCO et al., 2012; OCANA-MAYORGA et al., 2010; RAMÍREZ et al., 2010; SANTANA et al., 2014). Este genótipo é considerado grande causador de infecções por via oral, graças à alta expressão da molécula de superfície gp82 nas formas

TMs, que ainda persiste na membrana destas cepas mesmo após certo grau de degradação da membrana celular do parasito pela pepsina gástrica do hospedeiro mamífero. A gp82 também permite a adesão do *T. cruzi* à mucina gástrica do hospedeiro para que ele possa atravessar esta camada e alcançar às células epiteliais (YOSHIDA, 2006). Estudos de genética de populações demonstraram que o TcI possui menor quantidade de DNA e cromossomos pequenos em comparação com outros DTUs, mas apresenta grande variabilidade genética (CURA et al., 2011). Alguns representantes deste grupo são as cepas G, Colombiana, PALC, Sylvio/X10 c11 (ZINGALES et al., 2009).

A cepa G, uma das estudadas no presente trabalho, foi isolada de gambá da Amazônia brasileira (YOSHIDA, 1983). Embora algumas das cepas do TcI sejam consideradas como virulentas, nenhum caso de infecção em humanos por parasitos da cepa G foi reportado até o momento apesar da possibilidade de transmissão por via oral após contato com secreção das glândulas anais de gambás, talvez por contaminação de alimentos com suas fezes (DEANE; LENZI; JANSEN, 1984). A baixa virulência desta cepa se deve, possivelmente, à alta expressão da molécula de superfície gp35/50, que induz uma resposta de Ca^{2+} deficiente, e da gp90 que impede a interação da glicoproteína gp82 com a mucina gástrica, resultando na dificuldade do parasito em atravessar esta camada e alcançar às células epiteliais (RUIZ et al., 1998; YOSHIDA, 2006). Estudos *in vivo* demonstraram a sensibilidade da cepa G ao IFN- γ , citocina produzida por linfócitos T e células *Natural Killer* (NK) para induzir a ativação de mecanismos antiparasitários em células do sistema imune. Esta ativação dependente de IFN- γ por si só pode controlar a infecção (RODRIGUES et al., 2012). No entanto, alguns estudos *in vitro* têm demonstrado a virulência de amastigotas da cepa G (RODRIGUES et al., 2012). Estas formas extracelulares se mostraram grandes indutores de fagocitose em fagócitos não profissionais, estimulando sua própria internalização por um processo que envolve a polimerização de actina, similar àquela presente em fagócitos profissionais, desde que as moléculas de superfície do parasito estejam intactas. Segundo esta observação, Fernandes e colaboradores sugerem considerar a hipótese de que a persistência do *T. cruzi* no hospedeiro mamífero pode também estar relacionada ao



mecanismo de fagocitose por fagócitos não profissionais juntamente com a lise de células infectadas, este último favoreceria a liberação de amastigotas que poderiam ser internalizados por células adjacentes (FERNANDES et al., 2013).

O DTU TcVI, associado com a doença na área central da América do Sul, é conhecido como um grupo híbrido oriundo dos DTUs TcII e TcIII que provavelmente hibridizaram numa coinfecção em humanos, em mamíferos peridomésticos ou em *Triatoma infestans* domiciliados (ZINGALES et al., 2012). Segundo o modelo atual, a evolução de um novo DTU envolve a acumulação de mutações discretas devido à replicação clonal mais do que a eventos de intercâmbio genético. No entanto, tendo em conta a possibilidade de recombinação, múltiplas provas da heterozigosidade têm sido coletadas (BOGLIOLO; LAURIA-PIRES; GIBSON, 1996; BRISSE et al., 1998; CHAPMAN et al., 1984). O TcVI ainda não foi encontrado em infecções silvestres e estudos ecológicos precisam ser aprofundados para aumentar o conhecimento do seu comportamento em vetores silvestres e sinantrópicos, o que poderia alterar sua classificação (ZINGALES et al., 2012). As cepas Tulahuen, CL e CL Brener são exemplos típicos deste DTU.

A cepa CL Brener é um clone derivado da cepa CL, que foi isolada a partir de *T. infestans* no Rio Grande do Sul, Brasil (ZINGALES et al., 2009). Brener e Pereira obtiveram a cepa a partir de um processo de clonagem de tripomastigotas sanguíneos da cepa CL. Este clone é o organismo de referência usado no projeto Genoma de *Trypanosoma cruzi* (EL-SAYED et al., 2005), e sua grande importância reside na presença de características interessantes do *T. cruzi*, como ter sido isolada de um vetor doméstico, virulência em camundongo, tropismo para células cardíacas e musculares, suscetibilidade ao tratamento com fármacos e sintomas claros na fase aguda (ZINGALES et al., 1997). O genoma haplóide da cepa CL Brener tem um tamanho de aproximadamente 55 Mpb (EL-SAYED et al., 2005) e a análise de suas sequências confirma o genoma híbrido rico em regiões repetitivas conservadas presentes também em *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*. Essa natureza híbrida e repetitiva do seu genoma dificulta a montagem das sequências, deixando o genoma de *T. cruzi* incompleto e impedindo comparações (FRANZÉN et al., 2011).

1.2. Resposta imune do hospedeiro humano durante a doença de Chagas

O estudo da resposta imunitária humana durante a fase aguda é de grande importância na doença de Chagas, devido ao fato de que os eventos imunológicos durante esta fase podem influenciar de maneira ainda desconhecida o desenvolvimento da fase crônica. Além disso, o tratamento terapêutico só é efetivo durante este período, embora o diagnóstico seja complicado pela falta de sintomas que sejam característicos da doença (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014).

Uma resposta imunitária robusta é desencadeada durante a fase aguda para conseguir controlar a alta parasitemia que se apresenta durante a etapa. Embora não se tenha o conhecimento completo das respostas relacionadas com o controle do parasito, acredita-se que células da resposta inata como macrófagos, células dendríticas (DCs), neutrófilos e células NK sejam de grande importância. O Interferon- γ (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) produzidos pelas células NK são fundamentais para a correta ativação de macrófagos e DCs e, portanto, para a eliminação do parasito. As células NK seriam ativadas para a produção dessas citocinas mediante o reconhecimento de moléculas de superfície do patógeno, como as GPI-mucinas de *T. cruzi*, as glicoproteínas mais expressas na sua membrana, e interleucina-12 (IL-12), citocinas produzida pelos fagócitos (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; ARGIBAY et al., 2002; BUSCAGLIA et al., 2006).

Macrófagos e DCs reconhecem os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) do *T. cruzi*, após serem ativados pelo IFN- γ das células NK; ambas as células degradam o parasito dentro do fagolisossoma e produzem IL-12, necessária para a formação do ambiente inflamatório. Os TLRs (receptores tipo Toll), presentes na superfície destas células imunológicas, também encarregados deste reconhecimento, transmitem o sinal para o interior da célula, via domínio Toll/IL-1R, para o recrutamento de moléculas adaptadoras como MyD88 (proteína de resposta primária da diferenciação mielóide 88) até a membrana e a indução do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B). Este último induz a síntese de citocinas pró-

inflamatórias necessárias para a ativação da resposta adaptativa (MACHADO et al., 2013).

O IFN- γ é importante para o recrutamento dos linfócitos T (CAMARGO et al., 1997). Durante a fase aguda, linfócitos T auxiliares são ativados, embora os T citotóxicos específicos para os antígenos do *T. cruzi* apresentem uma ativação retardada, talvez devido à imunossupressão mediada pelo parasito para evadir a resposta imune do hospedeiro mamífero, o que facilita sua entrada nas células e sua propagação (OUAISSI et al., 2001). A resposta adaptativa para a infecção aguda também inclui o aumento de linfócitos B circulantes, além disso são achados anticorpos tipo IgM e IgG contra o protozoário no soro do paciente durante tal fase (ANTAS et al., 1999).

Por outro lado, a forma indeterminada e assintomática da doença de Chagas encontra-se associada com a produção de interleucinas do tipo regulatória como IL-10 o que representa um equilíbrio entre a eliminação do parasito e a proteção contra os danos em tecidos (DUTRA et al., 2009). Suprimidas durante a primeira etapa da infecção, as células T CD8⁺ circulam em grande quantidade no sangue durante o desenvolvimento da fase indeterminada. Estes linfócitos citotóxicos adquirem um fenótipo ativado, exercem sua função como efetores, e se transformam em células de memória, perpetuando a resposta para os próximos encontros com antígenos (BASSO, 2013; TZELEPIS; PERSECHINI; RODRIGUES, 2007). A presença do *T. cruzi* em alguns tecidos pode ser devido à falta de estimulação para o recrutamento dos linfócitos T CD8⁺ ou à inibição mediada por outras populações linfocitárias como CD4⁺, CD25⁺ e produtoras de TGF- β (PADILLA; BUSTAMANTE; TARLETON, 2009).

Apesar de que a maioria dos pacientes indeterminados permanece assintomática durante o resto da sua vida, estima-se que cerca de 2% destes indivíduos evoluem para forma clínica a cada ano, onde a cardiomiopatia crônica representa a maior causa de morte entre os pacientes infectados por *T. cruzi* (ALVAREZ et al., 2014). Alguns estudos demonstraram que a predominância de citocinas pró-inflamatórias na fase indeterminada está relacionada com as formas crônicas (anomalias cardíacas e digestivas), enquanto que citocinas reguladoras do

tipo de IL-10 e IL-17 se relacionam com a permanência na fase assintomática (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; DUTRA et al., 2015).

Desta forma, um ambiente pró-inflamatório para o controle do parasito durante a fase aguda seguido de um ambiente mais regulatório que previne danos teciduais após o controle da parasitemia parece ser necessário para não desenvolvimento da doença (Figura 5).

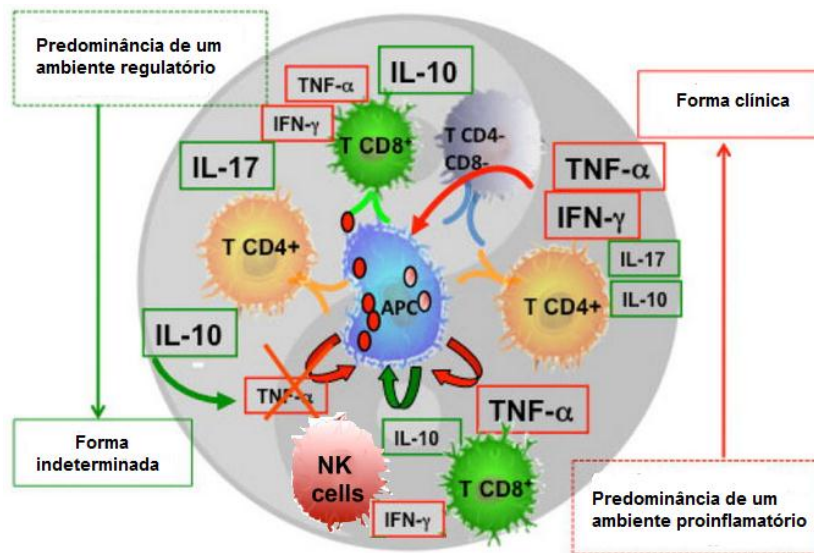


Figura 5. A produção de citocinas pode afetar o desenvolvimento da doença. Ambientes pró-inflamatórios (em vermelho) favorecem a eliminação do parasito, mas desencadeiam respostas exacerbadas que causam as formas sintomáticas; os ambientes regulatórios (em verde) evitariam esse resultado. Modificada de (DUTRA et al., 2015).

O fato do parasito não ser encontrado em corações inflamados de pacientes chagásicos tem levado à comunidade científica a sugerir a existência de mecanismos autoimunes envolvidos na patogênese da doença de Chagas, devido a reações cruzadas de receptores anti-antígenos do parasito contra epítomos próprios (mimetismo molecular). Segundo este pensamento, as formas clínicas seriam consequências de uma resposta auto-imune (ALVAREZ et al., 2014; CUNHA-NETO et al., 1995). A teoria da autoimunidade encontra-se baseada também na interação citotóxica acelerada dos linfócitos com células cardíacas não infectadas vista em alguns estudos (TEIXEIRA et al., 2011). Adicionalmente, este ataque imunológico é específico para células cardíacas e neurônios (TEIXEIRA et al., 1983), uma razão a mais para pensar que as lesões características da doença

são causadas por uma reação autoimune. Esta autoimunidade poderia ser provocada pelo contato inicial entre o parasito e a célula hospedeira que desencadearia um dano tecidual por reação cruzada em caso de uma sobrecarga parasitária, mas a falta de sintomas nas fases iniciais leva a pensar na hipótese que a autoimunidade é desenvolvida em fases posteriores. Dessa forma, parece ser mais provável uma citotoxicidade dependente de anticorpos ou uma ativação direta autoreativa dos linfócitos T (TEIXEIRA et al., 2011).

Outra hipótese considera que durante a infecção, danos mecânicos importantes são causados pela liberação dos tripomastigotas, liberando antígenos próprios em meio com altas quantidades de mediadores de inflamação como citocinas, quimiocinas, linfotoxinas, grânulos, etc. Esta situação pode superar o limite de ativação gerando uma reação contra os antígenos próprios (BONNEY; ENGMAN, 2015). A transferência do DNA mitocondrial (kDNA) do *T. cruzi* ao genoma das células hospedeiras tem sido contemplada como outra explicação plausível. O DNA exógeno pode induzir alterações genotípicas e fenotípicas que desencadeiam a resposta autoreativa (TEIXEIRA et al., 2011). Para investigar esta hipótese, aves que possuem a capacidade de eliminar totalmente o parasito depois da saída do ovo foram utilizadas. Ao inocular as formas infectivas em ovos fecundados, o kDNA do *T. cruzi* foi encontrado inserido no genoma das células do embrião, que na etapa adulta apresenta uma reação autoimune contra a células cardíacas sem a presença do parasito. Adicionalmente, a eliminação específica das células com mutações provocadas pela inserção do kDNA, e o transplante de células de medula óssea saudáveis inibiu a patologia nas galinhas kDNA⁺, sendo isto uma prova forte a favor da teoria da autoimunidade (GUIMARO et al., 2014).

1.3. Importância das células dendríticas na imunidade

As células apresentadoras de antígenos (APCs) representam uma ponte importante entre a imunidade inata e adaptativa. Este grupo inclui principalmente DCs, macrófagos e linfócitos B (PLANELLES et al., 2003). Estas são células ativadoras de linfócitos T virgens, que se diferenciam em células T efetoras, de suma importância no controle da parasitemia, ajudando na degradação do *T. cruzi*

dentro da célula hospedeira (JANEWAY et al., 2001). Essa apresentação de antígenos é um primeiro sinal de ativação das células T e acontece por meio do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), proteína de superfície que expõe os antígenos do parasito para que sejam reconhecidos pelo receptor do linfócito T (KIERSZENBAUM; MORETTI; SZTEIN, 1993). Após este reconhecimento, os linfócitos T são ativados com ajuda das moléculas co-estimuladoras produzidas também pelas APCs (segundo sinal) (ALBA SOTO et al., 2003).

O MHC classe I, presente na maioria das células nucleadas do corpo, é reconhecido por linfócitos T citotóxicos ou T CD8⁺, cuja função é eliminar células infectadas ou cancerígenas (SCHLIENGER et al., 2000). Esses antígenos de origem intracelular são processados e, posteriormente, apresentados no MHC classe I, mostrando na superfície celular aquilo que está acontecendo no interior da célula (NEEFJES et al., 2011). O processamento clássico de antígenos para sua montagem no MHC classe I consiste na degradação de proteínas intracelulares pelo proteassoma, os peptídeos resultantes são transportados até o retículo endoplasmático onde são carregados no MHC classe I e, finalmente, os complexos MHC-peptídeo são transportados para membrana celular via Golgi (NEEFJES et al., 2011; VYAS; VAN DER VEEN; PLOEGH, 2008). No entanto, as células dendríticas possuem uma capacidade única de apresentação de antígenos extracelulares (fagocitados) por meio do seu MHC de classe I, processo chamado de apresentação cruzada, onde as proteínas exógenas tem acesso ao citoplasma da DC para serem processadas pelo proteassoma e seguirem na via de montagem e apresentação (VYAS; VAN DER VEEN; PLOEGH, 2008).

Por outro lado, o MHC classe II é praticamente exclusivo das APCs e é reconhecido pelos linfócitos T auxiliares ou T CD4⁺ (SCHLIENGER et al., 2000). Neste processo, os antígenos de origem extracelular são capturados pelas APCs e levados via fagossomos que serão fusionados aos lisossomos formando o fagolisossoma, local de interação do MHC classe II com os peptídeos exógenos; por último, os complexos MHC-peptídeo são levados até a superfície celular (NEEFJES et al., 2011; VYAS; VAN DER VEEN; PLOEGH, 2008).

Um terceiro sinal necessário para a ativação completa das células T consiste na presença de citocinas pró-inflamatórias, que também podem ser produzidas pelas APCs (DEN HAAN; ARENS; VAN ZELM, 2014). A Figura 6 representa a interação entre linfócitos T e as APCs, mostrando os três sinais necessários para a ativação linfocitária.

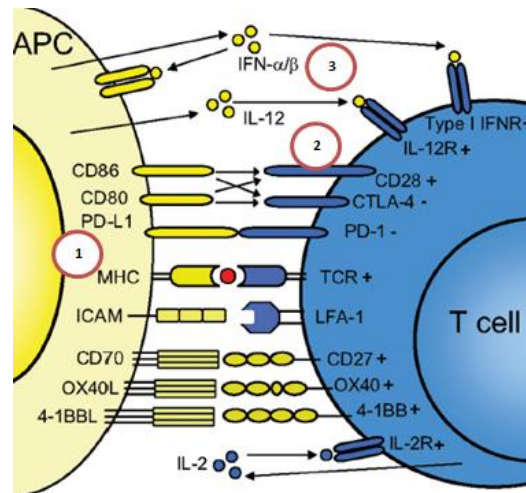


Figura 6. Os três sinais emitidos pelas APCs para ativação de linfócitos T. O primeiro sinal é o reconhecimento do complexo peptídeo-MHC pelo TCR. O segundo é a ligação das proteínas das APCs, CD80/CD86, ao CD28, proteína dos linfócitos T. E por fim, para a ativação completa, a ligação de citocinas aos seus receptores específicos. Modificada de (DEN HAAN; ARENS; VAN ZELM, 2014).

As DCs são as APCs mais importantes, mostrando uma alta especialização na internalização de antígenos ao reconhecê-los no local da infecção. Esse processo induz a migração destas células até o linfonodo e a sua maturação para que as mesmas apresentem antígenos eficientemente para as células T. A DC madura expressará na sua superfície moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 (conhecida também como B7.1), CD86 (ou B7.2) e CD83, necessárias para enviar o segundo sinal de ativação para a célula T (DA COSTA et al., 2014; DEN HAAN; ARENS; VAN ZELM, 2014). Características morfológicas também podem ser úteis para identificar DCs maduras, como extensões citoplasmáticas e grande quantidade de estruturas intracelulares (lisossomas, endossomas, grânulos, etc)

relacionadas com o processamento de antígenos (Figura 7) (DUBSKY et al., 2005; O'NEILL; ADAMS; BHARDWAJ, 2004).

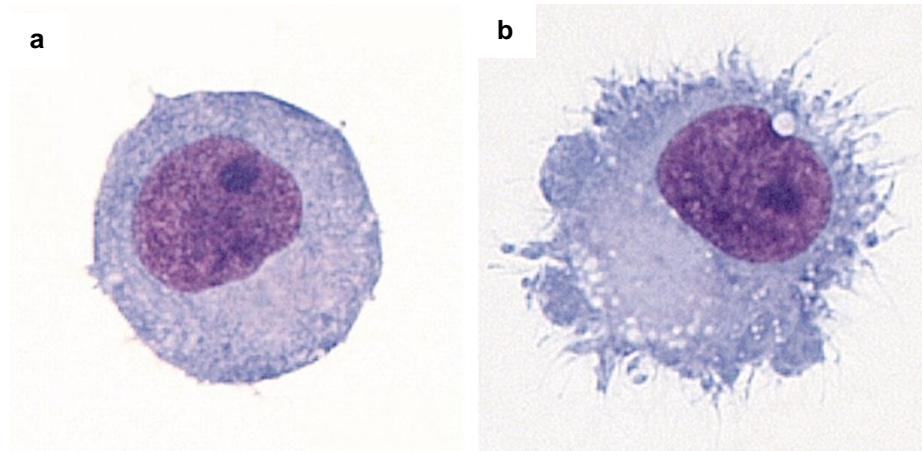


Figura 7. Morfologia das DCs derivadas de monócito. a). DC imatura b). DC ativada. Modificada de (O'NEILL; ADAMS; BHARDWAJ, 2004).

As DCs também podem ser um ponto chave na tolerância e no controle de reações contra antígenos próprios por conta da estimulação de expressão de receptores na célula T que emitem sinais inibitórios, como o CTLA-4, que reconhece os CD80 e CD86 com maior afinidade, ou PD-1, que reconhece a molécula PD-L1 expressa na superfície das DCs chamadas de tolerogênicas (Figura 6) (LEWIS; REIZIS, 2012; MCGOVERN; CHAN; GINHOUX, 2015). Além disso, as DCs podem apresentar antígenos próprios para induzir a geração e proliferação de linfócitos T regulatórios ou deleção clonal daqueles linfócitos que as reconheçam (LEWIS; REIZIS, 2012). A produção de citocinas anti-inflamatórias pelas DCs (principalmente IL-10 e TGF- β) é mais uma forma de regulação da resposta imune ou indução de tolerância (PONCINI et al., 2008). Estas citocinas podem limitar a ação antimicrobiana das DCs e dos macrófagos suprimindo sua capacidade fagocitária, limitar a produção de espécies reativas de oxigênio ou a migração até os linfonodos (CORINTI et al., 2001; DEMANGEL; BERTOLINO; BRITTON, 2002; MACHADO et al., 2013).

As DCs, junto com os monócitos e macrófagos formam o grupo dos fagócitos mononucleares. As primeiras se diferenciam dos outros principalmente por suas moléculas de superfície e por sua capacidade de circular entre tecidos, pois os últimos são considerados residentes, ou seja, fixos nos tecidos (HANIFFA et al.,

2009). Diferentes análises taxonômicas também demonstraram uma separação entre monócitos e DCs, reforçando o fato da DC ser considerada uma população independente (HANIFFA et al., 2012). Existem também múltiplas subpopulações de DCs que estão relacionadas aos diferentes níveis de ativação dos linfócitos T e com o direcionamento para resposta imunitária com perfil T auxiliar 1 (Th1) ou 2 (Th2). Em geral, todas as DCs expressam na sua superfície as moléculas MHC classe II, mas carecem de CD3 (linfócitos T), CD19/20 (células B) e CD56 (células NK). Dentre as subpopulações de DCs temos: mielóides, plasmocitóides, derivadas de monócito e células de Langerhans que se diferenciam pela expressão de marcadores de superfície, mostrando a grande diversidade e, possivelmente, funções variáveis para as DCs.

Em camundongos, as DCs mielóides são compostas por células residentes e migratórias, que por sua vez são subdivididas em dependentes do fator de transcrição Batf3 ou IRF4. As DCs mielóides migratórias/dependentes de Batf3 expressam CD11c, Clec9A, XCR1, CD103 e CD207; as residentes dependentes do mesmo fator de transcrição são identificadas pela expressão de CD11c, Clec9A, XCR1 e CD8. Por outra parte, as residentes/dependentes de IRF4 expressam CD11c, CD11b e CD172a; as migratórias expressam os mesmos marcadores junto com o CD206. Para as DCs plasmocitóides, os principais marcadores CD11c, Ly6c, B220 e SiglecH, enquanto que para as DCs derivadas de monócito são CD11c, CD11b, CD64, FcεRI, CD206, CD14, CD172a e Ly6c. Para células de Langerhans, população associada aos tecidos epiteliais, CD11c, CD207, EpCAM e E-caderina são os marcadores característicos (SEGURA, 2016).

Em humanos, as DCs mielóides expressam CD1c+, Dectina 1 (CLEC 7A) e Dectina 2 (CLEC6A); as plasmocitóides expressam CD303 (CLEC4C), CD304 (neuropilina) e CD123 (IL-3R). As células de Langerhans apresentam como principais marcadores CD1a e Langerina (COLLIN; MCGOVERN; HANIFFA, 2013). As DCs derivadas de monócito são positivas para CD14 e podem ser identificadas também pelas moléculas de superfície CD209 (DC-SIGN), CD16 e CD1c. Estas também são precursoras das DCs inflamatórias, cuja população aumenta drasticamente tanto nos tecidos quanto nos linfonodos durante uma infecção

(COLLIN; MCGOVERN; HANIFFA, 2013). Elas expressam altas quantidades de MHC classe II, CD11c, CD40, CD80 e CD86. Porém, um marcador de superfície importante na sua caracterização é o CD1a, pois DCs derivadas de monócito que não expressam esta molécula não são consideradas produtoras de IL-12, porém produzem elevadas quantidades de IL-10, induzindo um ambiente regulatório Th2 (CHANG; WRIGHT; PUNNONEN, 2000).

1.4. Interação entre as Células dendríticas e *T. cruzi*

Infecções *in vitro* de DCs humanas derivadas de monócitos com a cepa Tehuantepec de *T. cruzi* mostraram uma redução significativa na expressão de moléculas co-estimulatórias e na produção de citocinas próinflamatórias (VAN OVERTVELT et al., 1999). A expressão das moléculas de MHC classe I também é afetada pela infecção pelo *T. cruzi*, inibindo a ação dos linfócitos T CD8⁺ na doença de Chagas (VAN OVERTVELT et al., 2002). De forma semelhante, camundongos infectados com a cepa altamente infectiva RA apresentaram DCs com inibição de sua ativação, mostrando indução, pela presença do parasito, de populações de DCs inibitórias (PONCINI et al., 2008). Outro estudo com camundongos usando a mesma cepa de *T. cruzi* mostrou a presença de DCs mielóides com funções diminuídas e redução na expressão do MHC classe II (ALBA SOTO et al., 2003), característica vista também nas DCs murinas, proveniente do baço, quando infectadas com a cepa Y (PLANELLES et al., 2003). Ao impedir as funções clássicas das células dendríticas, o *T. cruzi* pode induzir um estado anérgico reduzindo a estimulação dos linfócitos T e, por tanto, a habilidade de defesa do hospedeiro contra a infecção (BOUSSIOTIS et al., 1996; VAN OVERTVELT et al., 2002).

No entanto, parece que a redução na expressão destas moléculas depende da cepa presente na infecção. Van Overtvelt e colaboradores (1999) observaram essa redução em infecções com a cepa Tehuantepec do México; Rodríguez e colaboradores (2011) observaram o aumento na expressão de CD40, CD83, CD80 e MHC-II em DCs de feto e de adulto que interagiram com a cepa Tulahuen (TcVI). Interessantemente, a maioria das DCs apresentou um fenótipo de maturação embora não tivessem sido infectadas pelo *T. cruzi* (RODRIGUEZ; CARLIER;

TRUYENS, 2012a, 2012b). Outro estudo comparou a infecção de cepas pertencentes aos DTUs TcI (AQ1.7 e MUTUM) e TcII (1849 e 2369) em células dendríticas murinas derivadas de medula. As cepas do TcI apresentaram uma taxa de infecção menor, e a cepa 2369 do TcII mostrou uma correlação maior entre taxa de invasão e o incremento da produção de IL-10 e PD-L1 (ligante de morte programada 1), sem mudança significativa na expressão de MHC classe II e CD40 ou na produção de TNF- α . Por outro lado, os níveis de expressão de CD40, CD80, MHC-II, CCR5 (receptor de quimiocina tipo 5), CCR7 (receptor de quimiocina tipo 7), TNF- α , IL-12, IL-6 e CCL2 (quimiocina ligante 2) dependem da cepa em questão. Segundo os autores, essa ativação diferenciada poderia significar o desenvolvimento de diferentes estratégias de escape entre as cepas de *T. cruzi* (DA COSTA et al., 2014).

No que concerne os receptores de reconhecimento de padrões, existe sinergia entre os sinais induzidos por TLR2 e TLR4 nas DCs murinas derivadas de medula, que induzem a produção de citocinas anti-inflamatórias (HIRATA et al., 2008). No entanto, Poncini e colaboradores (2010) demonstraram o papel importante para o TLR4 em associação ao NF- κ B na produção de IL-10 pelo mesmo tipo celular, induzida pela presença do *T. cruzi* mediante um mecanismo ainda desconhecido na interação DCs-parasito (PONCINI et al., 2010). TLR9 parece ter grande importância no reconhecimento do *T. cruzi* pelas DCs; o estudo da interação DCs-*T. cruzi* mostrou forte relação entre este receptor e motivos CpG presentes nos genes de glicoproteínas tipo mucinas (TcMUC) no interior dos lisossomas dessas APCs. Esses motivos ficam expostos para reconhecimento no momento da destruição do parasito dentro do lisossoma (BARTHOLOMEU et al., 2008). O TLR9 age como um importante ativador de inflamação nas DCs obtidas de camundongos infectados pela cepa Y, induzindo produção de IL-12/IL-23p40 e contribuindo na defesa contra *T. cruzi* (GRAVINA et al., 2013).

Outros receptores expressos pela DC têm sido reportados no reconhecimento do *T. cruzi*. O receptor de bradiquinina 2 (B2R) mostrou um papel importante na ativação das DCs ao reconhecer quininas e moléculas C5a liberadas pelo *T. cruzi* por ação da cruzipaina. A ligação destas moléculas ao B2R induz

produção de IL-12 ou IL-12p40/70, favorecendo a ativação de resposta Th1 (MONTEIRO et al., 2006; SCHMITZ et al., 2014). Por outro lado, receptores do tipo lectinas como as galectinas e o Siglec-E apresentaram um efeito imunossupressor em DCs, diminuindo sua capacidade de migração e tornando-as tolerogênicas (ERDMANN et al., 2009; PONCINI et al., 2015; VRAY et al., 2004).

Contudo, os estudos realizados sobre a interação da DC humana e o *T. cruzi* são poucos e a maioria se limita à medição de citocinas e moléculas de superfície. É necessário aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de entrada e escape do parasito, sobre as proteínas envolvidas em processos que ocorrem dentro e fora do fagolisossoma, sobre os genes expressos ou reprimidos durante a interação, entre outros aspectos.

1.5. Fagocitose e *T. cruzi*

Diversos estudos têm demonstrado que o *T. cruzi* utiliza uma grande variedade de mecanismos para entrar na célula hospedeira. A endocitose mediada por clatrina, caveolina ou flotilina, a fagocitose e a autofagia são alguns dos mecanismos já descritos (BARRIAS; DE CARVALHO; DE SOUZA, 2013). Sabe-se que o *T. cruzi* é internalizado no vacúolo parasitóforo, onde permanece tempo considerável (ANDRADE; ANDREWS, 2005; DE SOUZA; ULISSES DE CARVALHO, 2013). Outra via de entrada descrita é independente de lisossomas, em que o parasito induz sua internalização estimulando o acúmulo de fosfatidil inositol trifosfato (PIP₃) na membrana celular do hospedeiro (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; KIPNIS; CALICH; DA, 1979).

A fagocitose é um processo dependente do remodelamento dos filamentos de actina. Este mecanismo é de grande importância para a internalização do patógeno em macrófagos, DCs e outros fagócitos, sendo desencadeado pelo reconhecimento de diferentes tipos de ligantes (BARRIAS; DE CARVALHO; DE SOUZA, 2013). A superfície dos fagócitos apresenta receptores do tipo Fc (reconhecem imunoglobulinas), receptores do complemento, de manose, e de componentes da matriz extracelular, e receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptors* - PRR) que reconhecem moléculas típicas nos



patógenos e ativam sua internalização por meio de fagocitose (RITTIG et al., 1998). A fagocitose clássica ou tipo zíper forma prolongações bilaterais da membrana plasmática que engolfam o patógeno formando um vacúolo parasitóforo; esta é tipicamente desencadeada quando ligantes são reconhecidos pelos receptores Fc ou do complemento (RITTIG; BURMESTER; KRAUSE, 1998). Mas existem outros tipos de fagocitose não convencionais como a macropinocitose e fagocitose por enrolamento, que são características de fagócitos profissionais. O reconhecimento de ligantes multivalentes leva à fosforilação de tirosina quinases que ativam o remodelamento do citoesqueleto de actina, processo em que os fosfoinositídeos desempenham um papel importante (BARRIAS; DE CARVALHO; DE SOUZA, 2013).

Estudos usando citocalasina B (que bloqueia a formação dos filamentos de actina), diferentes linhagens celulares, e microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que os tripomastigotas induzem a fagocitose clássica e que o PRR TLR2 está envolvido no processo (BARBOSA; MEIRELLES, 1995; HALL; FURTADO; JOINER, 1991; NOGUEIRA; COHN, 1976). No entanto, a entrada da forma amastigota parece depender da cepa, por exemplo, há indução da fagocitose por parasitos da cepa G em fagócitos não profissionais, mas não da cepa Y, cujos amastigotas são amplamente fagocitados por macrófagos (FERNANDES et al., 2013; MORTARA et al., 2008). As formas tripomastigotas metacíclicas, de outro modo, parecem apresentar um tipo de penetração ativa, com consumo de energia do parasito e reconhecimento e intervenção da célula hospedeira (DE SOUZA; ULISSES DE CARVALHO, 2013).

Possivelmente, a escolha do mecanismo de entrada do parasito depende da natureza da célula hospedeira ou do receptor que reconhece determinado ligante, assim como da cepa ou a forma de desenvolvimento do *T. cruzi*. Mas pouco é conhecido sobre essas relações até o momento e poucas linhagens celulares foram utilizadas nos experimentos (BARRIAS; DE CARVALHO; DE SOUZA, 2013; DE SOUZA; ULISSES DE CARVALHO, 2013). Nesse contexto, um estudo utilizando técnicas de imagem de fluorescência da interação entre a célula dendrítica humana



e diferentes cepas e formas de vida de *T. cruzi* poderá ampliar o conhecimento atual sobre o contato inicial e os estágios iniciais da infecção pelo parasito.

1.6. Transcriptoma e tecnologias de sequenciamento

Todas as células de um organismo multicelular apresentam um genoma, mas não todos os genes ali presentes são expressos da mesma forma em cada tecido, o que é conhecido como expressão gênica. Um transcriptoma é então a parte do genoma que é transcrita em forma de moléculas de RNA em determinado momento e condições da vida célula. Em humanos, o transcriptoma representa só 5% do que o genoma pode codificar. Além de genes transcritos e não transcritos, uma célula pode expressar (dependendo do momento) certo gene em maior quantidade, ou fazer mais modificações do tipo *splicing* alternativo. Por tanto, o transcriptoma atinge níveis de complexidade que o estudo do genoma não consegue atingir (ADAMS, 2008).

Existem diversas metodologias para o estudo do transcriptoma, um exemplo são as análises de expressão gênica global clássicas que consistem em arranjos de hibridização de RNA de alta densidade ou *microarrays*. Estas permitem conhecer o perfil dos genes expressos entre diferentes tecidos, mas são limitadas devido ao fato de que os mesmos só podem ser comparados a genes já conhecidos. Outra metodologia de anotação de um transcriptoma é a clonagem do cDNA ou EST (Expressed Sequence Tag), que proporciona sequencias parciais de clones individuais de cDNA mas é um processo custoso, complicado e sensível aos erros na clonagem (SULTAN et al., 2008).

O sequenciamento *High-throughput* de RNA ou RNA-Seq se apresenta como uma ferramenta para o entendimento detalhado do transcriptoma, pois permite a anotação e a quantificação de genes e de suas isoformas. Sua análise é um desafio computacional, que se aperfeiçoa com o desenvolvimento de novas ferramentas a cada dia (GARBER et al., 2011). O RNA-Seq permite o sequenciamento em massa de cDNAs sintetizados a partir dos RNAs celulares (CLOONAN; GRIMMOND, 2008). Essa abordagem pode ser usada para a construção de um mapa completo dos genes transcritos, facilitando comparações entre tecidos diferentes ou

condições distintas. Estudos atuais usam esta ferramenta para responder alguns problemas biológicos específicos como a quantificação de *splicings* alternativos entre tecidos, populações e doenças (MELÉ et al., 2015).

O sequenciamento pelo sistema Illumina, usado para o RNA-Seq, é uma técnica que aproveita a incorporação de cada base dentro de uma fita que está sendo sintetizada a partir do cDNA molde da amostra; essa incorporação emitirá um sinal reconhecido pelo equipamento para identificar a base que foi adicionada. Para garantir a leitura de todos os fragmentos na amostra, adaptadores complementares aos *primers* usados são ligados a estes antes do sequenciamento, homogeneizando assim a leitura de cada transcrito (Figura 8) (KIRCHER; KELSO, 2010).

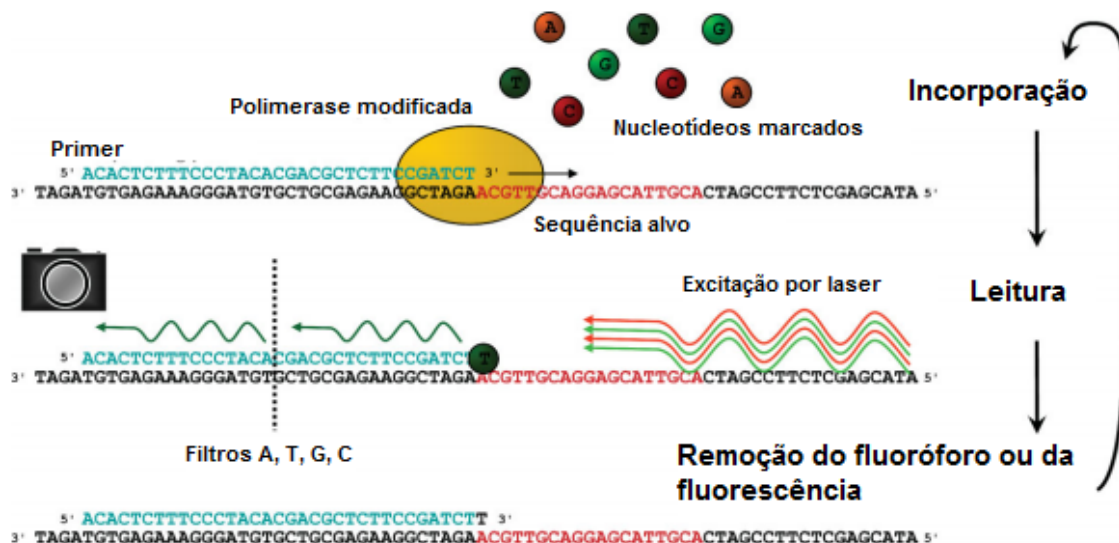


Figura 8. Metodologia de sequenciamento por Illumina. Os nucleotídeos marcados são incorporados e detectados simultaneamente em uma PCR que usa como molde cDNA sintetizado a partir do RNA das amostras e, como iniciador, um oligonucleotídeo complementar aos adaptadores previamente ligados aos fragmentos de cDNA. Modificada de (KIRCHER; KELSO, 2010)



2. JUSTIFICATIVA

As DCs são células importantes na modulação da resposta imunológica e no desenvolvimento da doença de Chagas. Baseado no que se conhece sobre os processos que ocorrem no início da interação dessas células com o *T. cruzi*, e tendo em conta que grande parte desse conhecimento se limita à medição de citocinas ou de expressão de marcadores de superfície, o transcriptoma diferencial do contato inicial faz-se necessário para o melhor conhecimento dos mecanismos moleculares que o hospedeiro utiliza para se defender. Além disso, a obtenção de uma visão detalhada da biologia das células apresentadoras de antígenos profissionais após os contatos iniciais com *T. cruzi* poderia proporcionar novos alvos para o tratamento da doença e ajudará no entendimento da evolução diferencial da doença nos pacientes e nos mecanismos de resistência e tolerância ao *T. cruzi*.

A cepa CL Brener, sendo uma cepa de referência que apresenta boa infectividade, crescimento relativamente rápido em cultura e rendimento no processo de meatciclogênese, foi escolhida para os ensaios de interação e infecção. Adicionalmente, embora seja uma cepa heterozigótica, a cepa CL Brener possui genoma sequenciado, o que pode facilitar a exclusão das suas sequencias durante a análise dos genes diferencialmente expressos nas DCs.

Não existe transcriptoma das células do sistema imune humano durante sua infecção/interação com o *T. cruzi*. De igual maneira, o transcriptoma do parasito durante a infecção de células imunes nunca antes foi feito.



3. OBJETIVO

Estudar a modulação da expressão gênica de DCs humanas após a interação inicial com as formas TMs de *T. cruzi* *in vitro*.

3.1. Atividades

- Padronização da obtenção de TMs com capacidade de infecção usando as cepas G e CL Brener;
- Obtenção de populações homogêneas de DCs derivadas de monócito para a infecção;
- Validação da interação DCs-TMs por meio da quantificação da expressão de moléculas de superfície, nível de ativação das DCs, taxa de infecção e amastigotas/DC infectada;
- Estudo usando técnica de imagem de fluorescência da infecção de células dendríticas humanas por tripomastigotas metacíclicos da cepa CL Brener em tempos de 0 até 24 h;
- Extração do RNA total das células após interação durante 12h para sequenciamento e montagem do transcriptoma;
- Análise preliminar da expressão diferencial de genes de DCs infectadas e não infectadas pelas formas TMs da cepa CL Brener de *T. cruzi*.

4. METODOLOGIA

O fluxograma da metodologia proposta para a realização do presente trabalho após a padronização das condições apresenta-se na Figura 9.

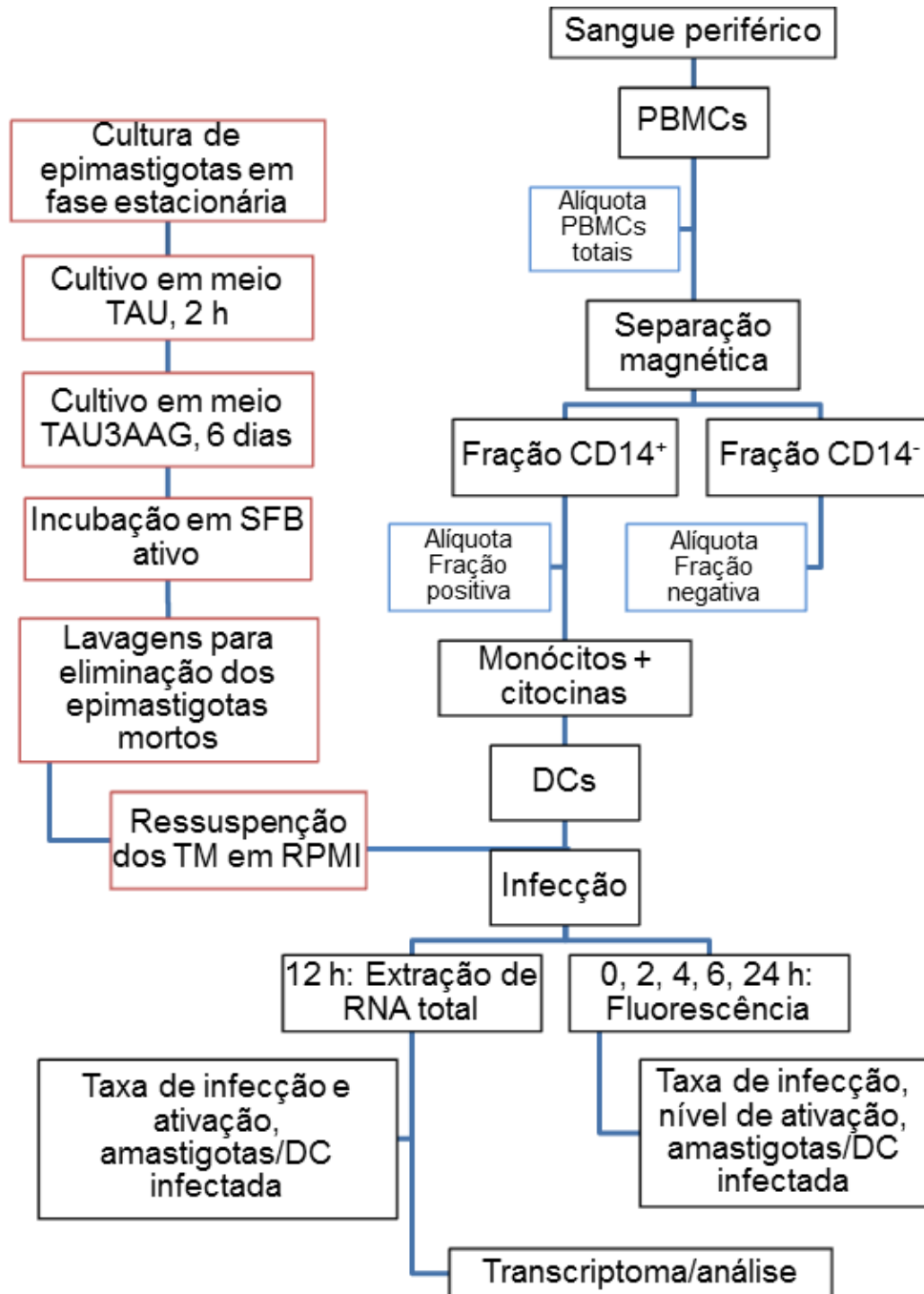


Figura 9. Fluxograma da metodologia realizada durante cada experimento



4.1. Parasitos

4.1.1. Epimastigotas

As infecções das células dendríticas foram realizadas com as cepas G e CL Brener de *T. cruzi*. As formas epimastigotas destas cepas foram mantidas em meio LIT pH 7,3 contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) e 100 µg/ml de gentamicina a 28°C.

4.1.2. Padronização da obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas

Para a obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas foram testadas quatro metodologias, avaliando a porcentagem da diferenciação final bem como a capacidade de infecção:

- Depois da fase estacionária de crescimento, os tripomastigotas metacíclicos podem ser encontrados na cultura de epimastigotas, de forma que o primeiro método foi o de permitir o envelhecimento da cultura em meio LIT a 28°C por até 35 dias. A coloração de panótico foi realizada a cada cinco dias para calcular a porcentagem de metaciclogênese (YOSHIDA, 1983);

- O meio Schneider, pouco nutritivo, foi utilizado para recriar as condições do intestino posterior do triatomíneo. Os parasitos foram cultivados nesse meio a 28°C durante 10 dias. A porcentagem de metaciclogênese foi determinada no quinto dia usando corante panótico;

- A terceira metodologia testada foi adição de SFB ativo para induzir a lise dos epimastigotas no final da fase estacionária. 15 ml de cultura celular nesta fase de crescimento foram centrifugados a 1.600 x g por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, o sedimento foi ressuscitado em 7 ml de SFB ativo e incubado a 37°C durante 24 h. Após esse período, os epimastigotas lisados sedimentam, enquanto que os tripomastigotas metacíclicos nadam na parte líquida. Lavagens sucessivas desse sobrenadante foram feitas com PBS 1X, centrifugando a 740 x g durante 10 min. A porcentagem de metaciclogênese foi determinada pela coloração de panótico e os parasitos ressuscitados em PBS para a infecção;



- Por último, a metaciclogênese foi induzida usando uma modificação do protocolo de Canavaci e colaboradores (2010). A cultura das formas epimastigotas no final da fase estacionária foi centrifugada a 1.660 x g durante 10 min a temperatura ambiente e ressuspensa em 20 ml de meio TAU (190 mM de NaCl, 17 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, 8 mM de Na₂HPO₄ e 0,035% de NaHCO₃) pH 6,9 e incubada por 2 h a 27°C em garrafa de cultura em posição horizontal para permitir a aderência dos parasitos à parede do frasco. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e adicionou-se 20 ml de meio TAU3AAG (meio TAU com adição de 10 mM de L-prolina, 50 mM de L-glutamato de sódio, 2 mM de L-aspartato de sódio e 10 mM de glicose). A incubação foi realizada a 27°C durante 6 - 9 dias (dependendo da cepa) sempre com a garrafa na mesma posição. No final, os parasitos foram ressuspensados no meio TAU3AAG, e centrifugados a 1.660 x g por 10 min seguido de incubação em SFB ativo por 24 h a 37°C (CANAVACI et al., 2010). Lavagens sucessivas a 600 x g foram feitas para eliminar as proteínas dos epimastigotas lisados e os parasitos foram ressuspensados em PBS para determinação da porcentagem de metaciclogênese e infecção.

Para determinar as porcentagens de metaciclogênese, uma lâmina foi montada tomando uma alíquota de 200 µl de cultura. As lâminas foram coradas por corante panótico permitindo identificar a localização e forma do núcleo e o cinetoplasto para o reconhecimento das formas TMs. 300 parasitos foram contados em campos aleatórios.

4.2. Teste para descartar infecção prévia pelo *T. cruzi* nos doadores

Células dendríticas derivadas de monócito de doadores saudáveis foram usadas nesta pesquisa. Os critérios de seleção incluíram: faixa etária de entre 20 e 30 anos, indivíduos que não fumam nem bebem, boa alimentação e exercício regular. Para descartar a infecção prévia foi feita uma PCR usando primers para *tcz* região exclusiva do DNA genômico do parasito, usando o par de *primers* TCZ1 e TCZ2 (MOSER; KIRCHHOFF; DONELSON, 1989). Quatro ml de sangue foram coletados de cada doador, e incubados a temperatura ambiente para separar o



plasma das hemácias. O plasma e a camada leucocitária entre este e as hemácias foram coletados e centrifugados a 600 x g para obter uma separação grossa dos leucócitos no sangue. 200 µl de tampão de lise (10 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, 1% Triton X-100) foram adicionados em cada amostra, junto com 2 µl de proteinase-K 10 mg/ml para incubação *overnight* a 37°C. Após este período, o mesmo volume de fenol-clorofórmio foi adicionado às amostras seguindo para a homogeneização por 30 seg em um agitador de tubos do tipo vortex. Por mais duas vezes, um volume de fenol-clorofórmio foi adicionado às amostras, as mesmas foram centrifugadas a 14.000 x g durante 10 min e a fase aquosa, separada. Devido à difícil separação das fases, uma última centrifugação a 14.000 x g por 20 min foi feita e a fase aquosa foi novamente recuperada.

Para obtenção do DNA genômico do parasito, 2,5 volumes de etanol 100% gelado foram adicionados invertendo o tubo três vezes com cuidado para homogeneizar. Durante 2 h, as amostra foram incubadas a -20°C e, após este tempo, elas foram centrifugadas a 12.000 x g durante 20 min para precipitação do DNA. Cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado e 1 ml de etanol 70% gelado foi adicionado ao precipitado para lavagem do DNA. Uma última centrifugação a 12.000 x g por 10 min foi realizada e o sobrenadante descartado cuidadosamente. O DNA seco foi ressuscitado em 20 µl de água MilliQ. As amostras foram quantificadas e analisadas em gel de agarose 1% (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

A PCR para amplificar o alvo *tcz* de *T. cruzi* foi feita usando 200 ng de DNA. Os controles positivo e negativo da reação foram gentilmente cedidos pelo laboratório Interdisciplinar de Biociências da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. A PCR foi realizada usando as seguintes condições: Volume final de 25 µl, 200 ng de DNA, 2,5 µl de tampão 10X, 0,2 µl de dNTPs a 25 mM, 1 µl de MgCl₂, 0,5 µl de ambos os *primers* e 0,3 µl da Taq polimerase. As condições no termociclador otimizadas pelo laboratório Interdisciplinar de Biociências foram seguidas: 95°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a 68°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. Uma extensão final de 5 min e uma incubação a 4°C até a retirada das amostras do termociclador. O resultado da PCR foi visualizado em gel de agarose 1%.

4.3. Obtenção das células dendríticas humanas

4.3.1. Obtenção de monócitos de sangue periférico

Para cada ensaio, aproximadamente 60 ml de sangue de cada doador foram coletados. Para a obtenção das células mononucleares de sangue periférico (CMSP), o sangue foi diluído numa proporção de 1:2 (PBS:sangue) e vertido cuidadosamente pelas paredes do tubo sobre o Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), necessário para a separação por gradiente de densidade. Os tubos de sangue-Ficoll foram centrifugados a 400 x g durante 30 min a temperatura ambiente com freio desligado, formando três fases diferenciadas: soro na parte superior, Ficoll no centro e hemácias no fundo; as CMSP foram obtidas da camada leucocitária resultante entre o soro e o Ficoll e lavadas três vezes com PBS 1X gelado por meio de centrifugação a 400 x g a 4°C durante 10 min. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e sua viabilidade avaliada pela técnica de exclusão do azul de tripan 0,4% p/v (Sigma).

4.3.2. Separação de monócitos a partir das CMSP

As CMSP foram centrifugadas a 400 x g por 10 min a 4°C e ressuspendidas no tampão MACS (PBS pH 7,2 contendo 0,5% de BSA e 2 mM de EDTA) contendo microesferas magnéticas conjugadas a anticorpos anti-CD14 (marcador de superfície de monócito), numa proporção de 1:8 (microesferas:MACS), em uma concentração máxima de 10^8 CMSP/ml. O ensaio foi realizado seguindo as instruções do fabricante do Kit CD14 MicroBeads Human (Miltenyi Biotec). A solução foi aplicada em uma coluna magnética para a separação da fração positiva para CD14 (EBSTEIN et al., 2009). Essa coluna permite a separação de aproximadamente 80% de células CD14⁺ presentes na amostra, porcentagem aceitável para a continuação do ensaio. A contagem dos monócitos com azul de Tripan foi realizada para determinação da concentração de citocinas necessária para a diferenciação de, aproximadamente, 3 a 5×10^5 monócitos/ml.



4.3.3. Diferenciação das células dendríticas a partir de monócitos

De 3 a 5 x 10⁵ monócitos/ml foram cultivados em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado com L-glutamina (2 mM) (Gibco, Grand Island, NY), estreptomicina (100 mg/ml), penicilina (100 U/ml), 10% SFB inativado, 800 UI/ml de IL-4 e 50 ng/ml de GM-CSF (PeProtec, Rocky Hill, NJ). A cultura foi realizada em placas de 24 poços a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ durante 7 dias. A cada três dias, 150 µl da cultura eram retirados para reposição de 200 µl de RPMI suplementado com as citocinas necessárias para a diferenciação das células dendríticas.

4.4. Coleta das células dendríticas e interação com *T. cruzi*

Após sete dias de diferenciação, as células foram coletadas com PBS 1X gelado e centrifugadas a 400 x g durante 10 min a 4°C para retirada do meio contendo as citocinas. A quantificação com azul de Tripán foi feita para contagem das células viáveis e a concentração final foi ajustada para 5 x 10⁵ células/poço contendo RPMI suplementado com L-glutamina (2 mM) (Gibco, Grand Island, NY), estreptomicina (100 mg/ml), penicilina (100 U/ml), e 10% de SFB inativado. Para os estudos de interação, as formas tripomastigotas metacíclicas foram adicionadas aos poços numa proporção de 10 parasitos/célula dendrítica (MOI 1:10). Antes da adição aos poços, os parasitos foram lavados com PBS 1X a temperatura ambiente e a quantidade necessária foi ressuspensa em 100 µl de RPMI para a infecção.

4.5. Determinação da taxa de infecção

Para calcular a taxa de infecção, 10⁵ células infectadas ou controles foram coletadas 12 h após o início do experimento, centrifugadas a 400 x g, durante 10 min a 4°C e ressuspensas em 200 µl de PBS. As lâminas para microscopia de luz foram preparadas mediante cytospin, por centrifugação a 415 x g durante 5 min. Em seguida, as lâminas foram coradas por panótico e pelo menos 100 células foram contadas em campos diferentes para determinação da porcentagem de células ativadas, infectadas e do número de amastigotas por célula. Quatro réplicas



biológicas foram realizadas para a determinação da taxa de infecção em cada doador.

4.6. Avaliação da diferenciação das DCs por citometria de fluxo

Para a avaliação do processo de diferenciação das células dendríticas, as marcações com anticorpos anti-CD14 (clone 61D3) (monócito), HLA-DR (clone LN3) (complexo de histocompatibilidade em células apresentadoras de antígenos), e CD1a (clone SK9) (molécula de superfície presente em células dendríticas TH1) foram realizadas como descrito abaixo. Os anticorpos utilizados eram conjugados a PE (ficoeritrina) (eBioscience).

- CMSP obtidos a partir do gradiente de separação por centrifugação (Fração total);
 - Fração positiva – com seleção para CD14 após passagem pela coluna magnética;
 - Fração negativa - sem seleção para CD14 após passagem pela coluna magnética;
- Células dendríticas (provenientes da fração positiva) sete dias após a diferenciação;

- Células dendríticas infectadas e controles depois de 12 h de infecção.

A quantidade de 1×10^5 células foi lavada com PBS, centrifugada a $400 \times g$ por 10 min, a 4°C e incubada por 20 min na mesma temperatura com tampão FACS (PBS, albumina bovina (BSA) 1% (Sigma) e azida sódica 0,001%) para bloqueio dos sítios de ligação. O tampão foi eliminado por centrifugação e as células foram incubadas em 20 μl do anticorpo diluído 20X por 30 min a 4°C protegidas da luz. Em seguida, 100 μl do tampão FACS foram acrescentados antes de centrifugar novamente para retirar o excesso de anticorpo. O sedimento foi ressuspendido em 400 μl do mesmo tampão. As amostras foram mantidas em gelo e protegidas da luz até a realização da leitura no citômetro de fluxo FACSVerse (BD Bioscience). A análise dos dados foi realizada no programa FACSsuite (BD Bioscience).

4.7. Ensaio de imunofluorescência

Para os ensaios de fluorescência, as células foram lavadas com PBS gelado e centrifugadas a 400 x g durante 10 min a 4°C. Em seguida, adicionou-se formaldeído 3,7%. Após a fixação com o formaldeído, as células foram mantidas a 4°C ao abrigo da luz até realizar cytospin para sua fixação nas lâminas, sendo centrifugadas e ressuspendidas em 200 µl de PBS. Os grupos estudados foram: 1) DCs controle, 2) DCs incubadas com as formas tripomastigotas metacíclicas da cepa CL Brener, 3) DCs incubadas com os mesmos parasitos inativados após 30 min de exposição à luz UV (comprovando a morte dos parasitos mediante observação por microscopia de luz em uma lâmina em fresco), e 4) DCs incubadas com LPS (100 ng/ml) por 30 min antes da incubação com o parasito (DA COSTA et al., 2014). Todos os grupos foram analisados nos tempos de 0, 2, 4, 6 e 24 h pós-infecção.

Para preparação das lâminas, as células foram depositadas em círculos previamente desenhados com DakoCytomation Pen (DAKO). Os potenciais sítios de ligação foram bloqueados com PBS contendo 5% de leite durante 1 h, seguido de três lavagens de 5 min com PBS. Em seguida, as células foram incubadas por 1 h com soro de camundongo infectado com *T. cruzi* (doado gentilmente pelo Laboratório Interdisciplinar de Biociências) na diluição de 1:2000 (anticorpo:PSB 1% leite). Ao término da incubação, três lavagens de 5 min com PBS foram realizadas e adicionou-se o anticorpo anti-camundongo-Alexa Fluor 488 (Invitrogen) na diluição de 1:100 (anticorpo:PSB 1% leite). A incubação foi realizada por 1 h seguida de três lavagens com PBS por 5 min. Então, as amostras foram tratadas com 0,5% Triton X-100 durante 10 min, lavadas três vezes com PBS e incubadas com Faloidina-Atto 565 (Sigma) (25:1000 Faloidina:PBS) durante 1 h. Após três lavagens com PBS, DAPI, na concentração final de 5 µg/ml (Invitrogen), foi adicionado às lâminas por 10 min, seguido de lavagem com PBS. O meio de montagem (DAKO) foi aplicado e as lamínulas foram montadas para a observação em microscópio de fluorescência Eclipse Ti (Nikon). As fotos foram obtidas sob as mesmas condições de abertura do diafragma, tempo de exposição e número de filtros, para efeitos de comparações.



Usando as imagens de fluorescência, foi possível determinar a taxa de infecção, quantidade de amastigotas por célula infectada e porcentagem de ativação das células dendríticas. Cinco campos diferentes com pelo menos 100 células foram analisados para cada condição. No caso da taxa de infecção e número de amastigotas por célula, foi possível diferenciar entre os parasitos que foram internalizados e os que não foram porque a incubação com o soro anti-*T. cruzi* foi realizada antes de permeabilizar as células e, por tanto, só os parasitos extracelulares serão marcados pelo segundo anticorpo com fluorescência emitida no comprimento de onda de 488 nm (verde). Para a medição da ativação das células, foi usado o programa ImageJ (National Institute of Health), que permite a quantificação da fluorescência total numa imagem. Após a quantificação da fluorescência emitida no comprimento de onda 565 nm, a divisão deste valor pelo número de células total na imagem tornou possível obter uma medida de fluorescência média por célula dendrítica.

4.8. Extração de RNA total das DCs após ensaios de interação

Após as 12 h de interação, as células foram removidas da placa de cultura, lavadas com PBS 1X gelado e centrifugadas a 400 x g a 4°C durante 10 min. A extração de RNA total foi realizada com material RNase free para evitar a degradação do mesmo. Um ml de Trizol (Ambion) foi acrescentado ao sedimento, e as amostras armazenadas a -80°C até a extração do RNA. Para a extração, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e o protocolo recomendado pelo fabricante do Trizol foi seguido. Brevemente, 200 µl de clorofórmio RNase free foram acrescentados, as amostras foram homogeneizadas em um agitador de tubos do tipo vortex, e centrifugadas a 12.000 x g, 15 min, 4°C. Após este passo, três fases foram obtidas: uma superior que contém o RNA, a do meio que onde estão as proteínas e a inferior com o Trizol. A fase superior foi transferida para um novo tubo, ao qual acrescentou-se 500 µl de isopropanol RNase free, seguido de nova homogeneização, e incubação a temperatura ambiente durante 10 min. Os tubos foram centrifugados a 12.500 x g, 15 min, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µl de etanol 75% gelado. As amostras foram novamente



centrifugadas a 10.000 x g por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi deixado no fluxo até secar completamente, e depois dissolvido em 30 µl de água Milli-Q estéril. Três alíquotas de 1 µl de cada amostra foram separadas para quantificação e avaliação da integridade do material. O restante foi estocado a -80°C até o envio para sequenciamento. O sequenciamento foi realizado pela empresa Novogene.

4.9. Concentração e integridade do RNA

As concentrações de RNA foram medidas por espectrofotometria usando o Nanodrop (Thermo Scientific). A integridade do RNA foi analisada mediante leitura no Bioanalyzer (Agilent Technologies) no Centro de Genômica de Alto Desempenho do DF da Universidade Católica de Brasília, usando 1 ng de amostra e seguindo as recomendações do fabricante. Um gel virtual é gerado pelo aparelho quando as amostras passam pelos nanocapilares do chip usado. O número de integridade do RNA (RIN) foi obtido mediante a identificação das subunidades ribossomais nas amostras. Um RIN maior que 8 é o ideal para sequenciamento.

4.10. Parâmetros para produção do transcriptoma de células dendríticas após 12 horas de infecção por formas tripomastigotas metacíclicas.

Para a produção do transcriptoma, doze amostras foram preparadas e sequenciadas: duplicata de células dendríticas de três diferentes doadores após infecção ou não (controle). A purificação do mRNA, produção de bibliotecas e sequenciamento foram feitos pela empresa Novogene (<http://en.novogene.com/>) seguindo seus próprios protocolos. Brevemente, após controle de qualidade, o enriquecimento de mRNA foi realizado nas amostras de RNA total usando beads de oligo(dT). O mRNA resultante foi fragmentando, aleatoriamente, usando buffer de fragmentação, os fragmentos foram utilizados para produção do cDNA. O cDNA foi purificado, as extremidades reparadas, por último, adaptadores de poliA adicionados. Os adaptadores desenhados para o sequenciamento foram ligados em ambas fitas obtidas e os fragmentos resultantes foram selecionados segundo seu



tamanho. Finalmente, as amostras foram enriquecidas mediante nova PCR para preparação de bibliotecas com insertos de 250 bp de comprimento. O controle de qualidade foi realizado após preparação das bibliotecas para garantir o tamanho e concentração dos fragmentos, assim como a ligação dos adaptadores (Tamanho do fragmento mais adaptadores = 400 ± 20 bp). O sequenciamento foi realizado em plataforma Illumina HiSeq 2500 obtendo leituras de reads de 150 pb de comprimento em modalidade *paired-end*. Os genomas de referência de *Homo sapiens* e *T. cruzi* foram usados para o alinhamento dos reads, montagem das sequências e anotação dos genes. Para este último processo, as bases de dados GO e KEGG foram utilizadas. O programa DESeq foi utilizado para a filtração dos genes diferencialmente expressos nas réplicas biológicas com $p\text{-adj} < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*

Abaixo estão apresentados os resultados dos quatro protocolos propostos para obtenção das formas tripomastigotas metacíclicas do parasito juntamente com a avaliação da sua capacidade de infecção.

5.1.1. Envelhecimento da cultura

Formas epimastigotas da cepa G foram incubadas a 28°C em LIT 5% SFB sem renovação do meio de cultura durante, pelo menos, 35 dias. A Tabela 1 apresenta as porcentagens de tripomastigotas metacíclicos obtidas em até 35 dias de cultura. Após 40 dias, os parasitos morreram.

Tabela 1. Porcentagem de metaciclogênese de acordo com o tempo de cultura da cepa G.

Tempo (dias)	Porcentagem de metaciclogênese
--------------	--------------------------------

10	1,1%
15	9,3%
25	30%
35	37%

No 35° dia, a maioria das formas epimastigotas não apresentava boas condições, a movimentação era limitada com alta mortalidade. No entanto, os TMs ainda apresentavam motilidade razoável quando vistos em fresco por microscopia óptica. A Figura 10 mostra os TMs obtidos neste método de diferenciação.

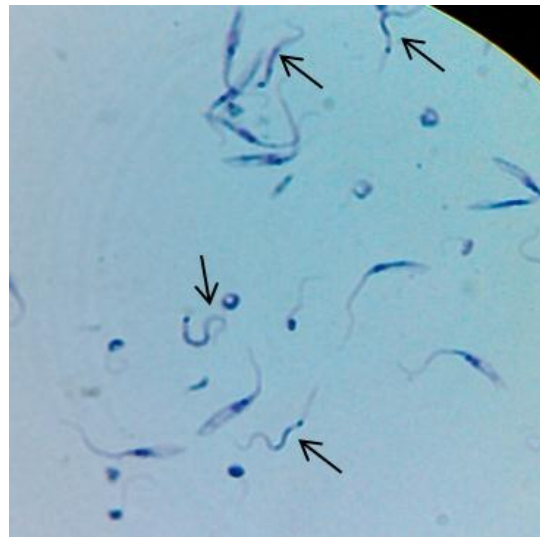


Figura 10. Microscopia óptica de cultura (com 35 dias) de epimastigotas de *T. cruzi* (cepa G) contendo TMs. Setas: TMs.

5.1.2. Cultivo em meio Schneider

A metaciclogênese da cepa G também foi avaliada durante cultivo em meio Schneider. Após 5 dias, 1,4% dos parasitos haviam se diferenciado em tripomastigotas metacíclicos. No sétimo dia de cultura, os parasitos estavam menos ativos e a porcentagem de metaciclogênese foi de 1,6%. No décimo dia, a garrafa não apresentava nenhum parasito vivo. Por tanto, a cultura em meio Schneider não foi útil para induzir metaciclogênese.

5.1.3. Lise em SFB ativo de uma cultura em fase estacionária

A cultura celular da cepa G, no final da fase estacionária, foi incubada em SFB ativo para outra tentativa de obtenção de TMs. Após esta incubação, a cultura de células apresentou lise de grande parte das formas epimastigotas e porcentagem de metaciclogênese de 85% com os TMs em boas condições (Figura 11) e ativos. Para verificar se os TMs obtidos com este método eram infectivos, um teste de infecção em DCs foi realizado. A taxa de infecção observada foi de $17,4 \pm 5,3\%$ com $1,9 \pm 1,1$ amastigotas/célula (MOI 1:10), e de $51 \pm 8,1\%$ com $4 \pm 2,3$ amastigotas/célula (MOI 1:25) após 12h de interação (ver Tabela 3).

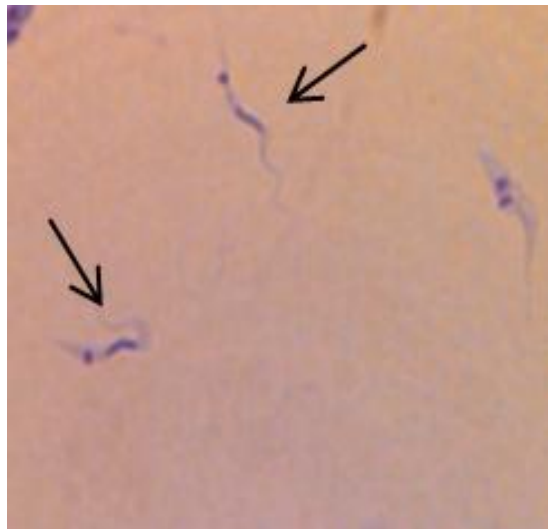


Figura 11. Microscopia óptica de tripomastigotas metacíclicos (cepa G) após incubação em SFB ativo. Setas: tripomastigotas metacíclicos.

5.1.4. Indução da metaciclogênese utilizando o protocolo de Canavaci e colaboradores (2010)

Para este protocolo de diferenciação foi necessário começar com uma cultura na fase Lag de crescimento. Como controle, para determinar se a metaciclogênese da cepa G era tão viável como em outra cepa, o protocolo de Canavaci e colaboradores foi realizado em paralelo com a cepa CL Brener. A incubação no meio TAU3AAG foi realizada por 6 dias para a cepa CL Brener e 9 dias para a cepa G e, posteriormente, SFB foi adicionado durante 24 h para causar a lise dos



epimastigotas. Este método permitiu a diferenciação de 49,5% de TMs para cepa G e 48,4% para CL Brener (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagens de metaciclogênese para o protocolo de Canavaci e colaboradores

Etapa do protocolo	Porcentagem de metaciclogênese (cepa G)	Porcentagem de metaciclogênese (cepa CL Brener)
Início	1,1%	1,0
Antes do meio TAU	2,0%	1,1%
Após 3 dias no meio TAU3AAG	2,2%	15,4%
Após 6 dias no meio TAU3AAG	6,3%	25,2%
Após 9 dias no meio TAU3AAG	27,1%	Não se aplica
Após lise no SFB	49,5%	48,4%

Esta última metodologia mostrou que a baixa diferenciação apresentada anteriormente não parece estar relacionada à cepa. Ainda, a cepa CL Brener apresentou um rendimento maior, pois demanda menos tempo de incubação no meio TAU3AAG para obtenção de TMs que, inclusive, são mais ativos quando observados ao microscópio. Além disso, os epimastigotas da cepa CL Brener apresentam um crescimento mais rápido, o que facilita a obtenção de quantidades iniciais de células para a metaciclogênese.

Como feito na metodologia anterior, um teste de infecção foi realizado para verificar infectividade. TMs da cepa G apresentaram $50 \pm 11,3\%$ de células infectadas (MOI 1:10) com $5 \pm 1,4$ amastigotas/célula, a cepa CL Brener apresentou $43 \pm 7,6\%$ e $2 \pm 0,9$ amastigotas/célula (MOI 1:10) e, para MOI 1:25, $35 \pm 10,7\%$ de taxa de infecção com $7 \pm 3,1$ amastigotas/célula (ver Tabela 3).

Tendo em conta a velocidade de crescimento da cultura de epimastigotas, a porcentagem de infecção com um MOI 1:10 e a possibilidade de recuperar mais parasitos no processo, a cepa CL Brener foi escolhida para os demais experimentos. Para a metaciclogênese, o protocolo de Canavaci e colaboradores

foi o eleito, mas o processo foi iniciado com culturas no final da fase estacionária, essa modificação proporcionou até 70% de metaciclologênese e $39,2\% \pm 17,3\%$ de infecção. A Tabela 3 apresenta o resumo da padronização da diferenciação dos parasitos.

Tabela 3. Resumo da padronização de metaciclologênese

Metodologia	Envelhecimento*	Meio Schneider*	Lise com SFB*	Protocolo de Canavaci <i>et al.</i> , 2010*	Protocolo de Canavaci <i>et al.</i> , 2010**	Protocolo final (Canavaci <i>et al.</i> , 2010, modificado)**
Porcentagem inicial de metaciclologênese	1,1%	2%	14%	1,1%	1%	1,2%
Porcentagem final de metaciclologênese	37%	5%	85%	49,5%	48,4%	70%
Dias	35	15	10	13	10	10
Estado dos parasitos	Pouco ativos, morfologia comprometida	Pouco ativos	Ativos	Muito ativos, condições boas	Muito ativos, condições ótimas	Muito ativos, condições ótimas
Taxa de infecção	Porcentagem muito baixa para infectar	Morreram	17,4% (1:10) e 51% (1:25) 2	50% (1:10)	43% (1:10) e 35% (1:25)	$39,2 \pm 17,3\%$ (1:10)
Amastigota/DC	Não aplica	Não aplica	(1:10) e 4 (1:25)	5 (1:10)	2 (1:10) e 7 (1:25)	$2,4 \pm 0,8$ (1:10)

* Cepa G

** Cepa CL Brener

5.2. Teste para descarte da infecção por *T. cruzi* nos doadores

Antes de iniciar os testes de infecção de DCs provenientes de diferentes doadores, a PCR para exclusão de infecção prévia pelo parasito foi realizada. Após extração do DNA dos leucócitos dos doadores, a reação foi feita para amplificação do alvo *tcz*, exclusivo de *T. cruzi*. O padrão esperado para essa PCR é a amplificação de um produto com 188 pb com possível formação de catâmeros dado que o alvo da PCR é uma região repetitiva. Como esperado e mostrado na Figura 12, os doadores voluntários não apresentam amplificação, o DNA genômico da cepa CL Brener apresenta o produto na altura esperada e outras amplificações inespecíficas que

podem ter sido geradas pela alta concentração de DNA na reação. No entanto, esse resultado mostra que os doadores selecionados não estão infectados pelo protozoário.

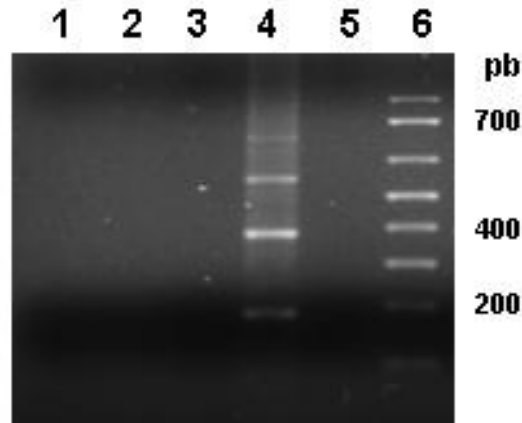


Figura 12. Produtos de PCR visualizados em gel de agarose 1,5%. 1: DNA do doador A, 2: doador B, 3: doador C, 4: DNA genômico *T. cruzi*, 5: DNA de doador não infectado, 6: Marcador molecular

5.3. Diferenciação e obtenção de células dendríticas

Após padronização para obtenção da forma TM, o próximo passo foi diferenciar as DCs provenientes dos mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de 3 doadores voluntários. Todos os resultados foram padronizados e obtidos para cada doador, no entanto, para evitar o excesso de figuras, somente uma imagem foi escolhida para representar alguns resultados.

5.3.1. Verificação de mononucleares de sangue periférico

Após coleta de sangue dos doadores, uma alíquota dos PBMCs obtidos por gradiente de ficoll foi separada para determinar a porcentagem de monócitos presente na amostra inicial. A Figura 13 apresenta a citometria de fluxo representativa dos experimentos realizados para validar a obtenção dos PBMCs. Esta figura apresenta três populações que estão separadas segundo tamanho e granulosidade e o *gate* violeta (Mon) indica a localização da população monocitária na amostra. Nas marcações feitas neste ponto, os PBMCs apresentaram entre 8 -

10% de monócitos CD14+, porcentagem similar aos parâmetros internacionais que tem como valor de referência 2 - 9%.

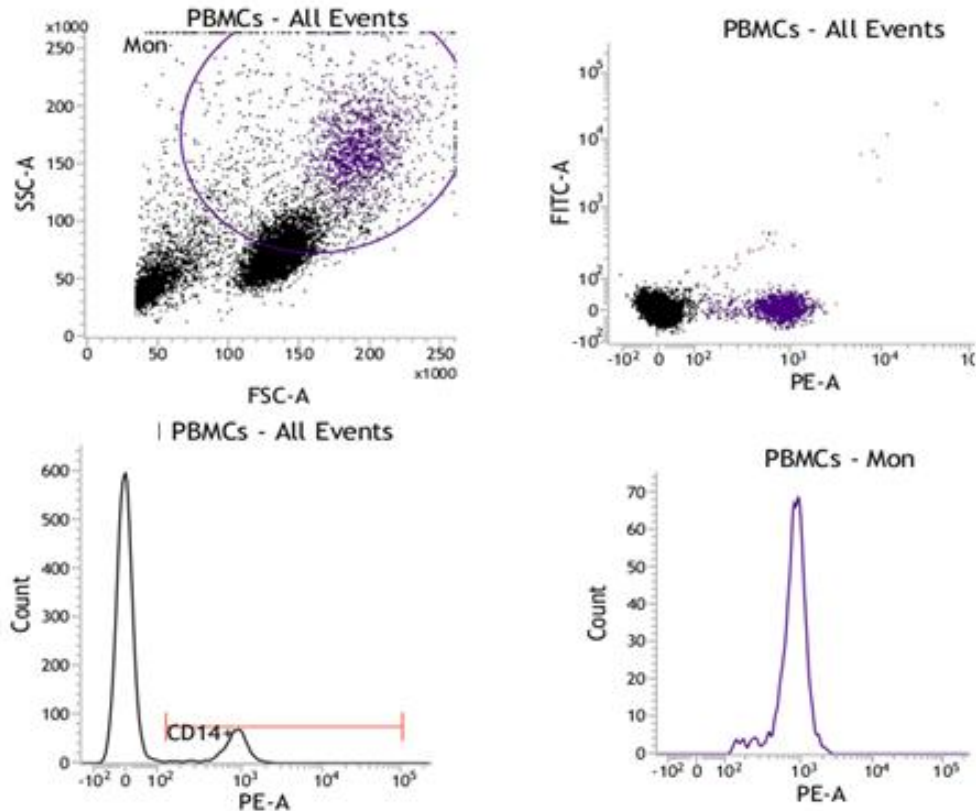


Figura 13. Citometria de fluxo representativa dos PBMCs totais. Gate violeta (Mon): localização aproximada dos monócitos. Em vermelho: células CD14 (+).

5.3.2. Enriquecimento da amostra com monócitos

Após determinação da porcentagem de monócitos, passamos para a etapa de separação destas células, esta etapa precede a diferenciação das DCs, e implica o enriquecimento da amostra mediante separação magnética para células CD14+. Para confirmação desta separação, alíquotas de 10⁵ células tanto da fração positiva (FP) (Figura 14) quanto negativa (FN) (Figura 15) foram submetidas, novamente, à citometria de fluxo para validar a separação obtida pelo método. Como representado nas figuras, os monócitos estão, de fato, concentrados na FP e, ainda, foi possível

obter em torno de 80% de monócitos durante os experimentos, o que indica que o protocolo de separação e purificação pode ser validado.

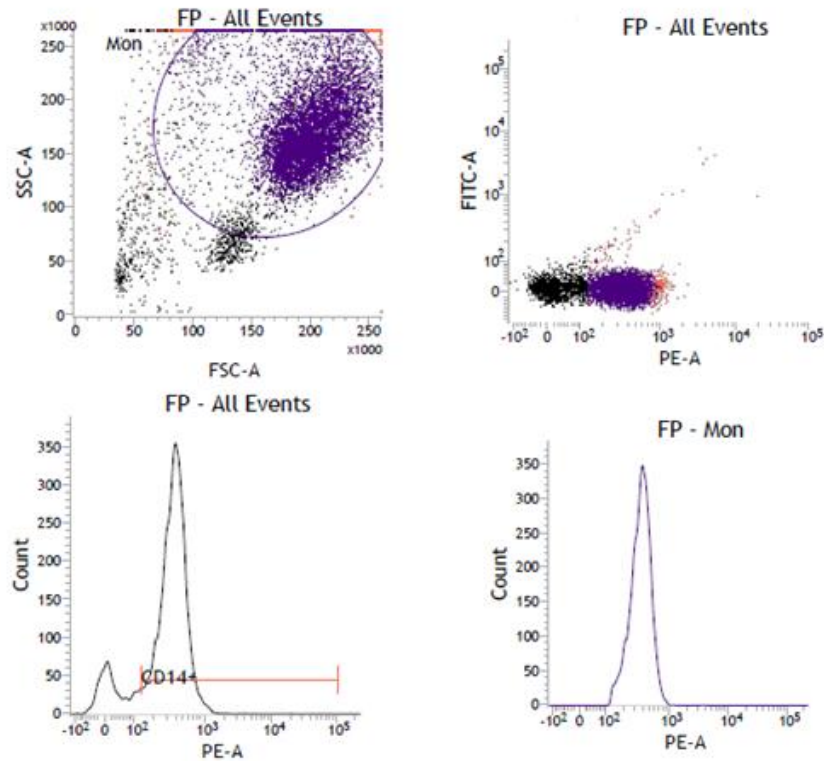


Figura 14. Citometria de fluxo representativa da fração positiva após passagem na coluna de separação magnética para células CD14+. Gate violeta (Mon): localização aproximada dos monócitos. Em vermelho: células CD14 (+).

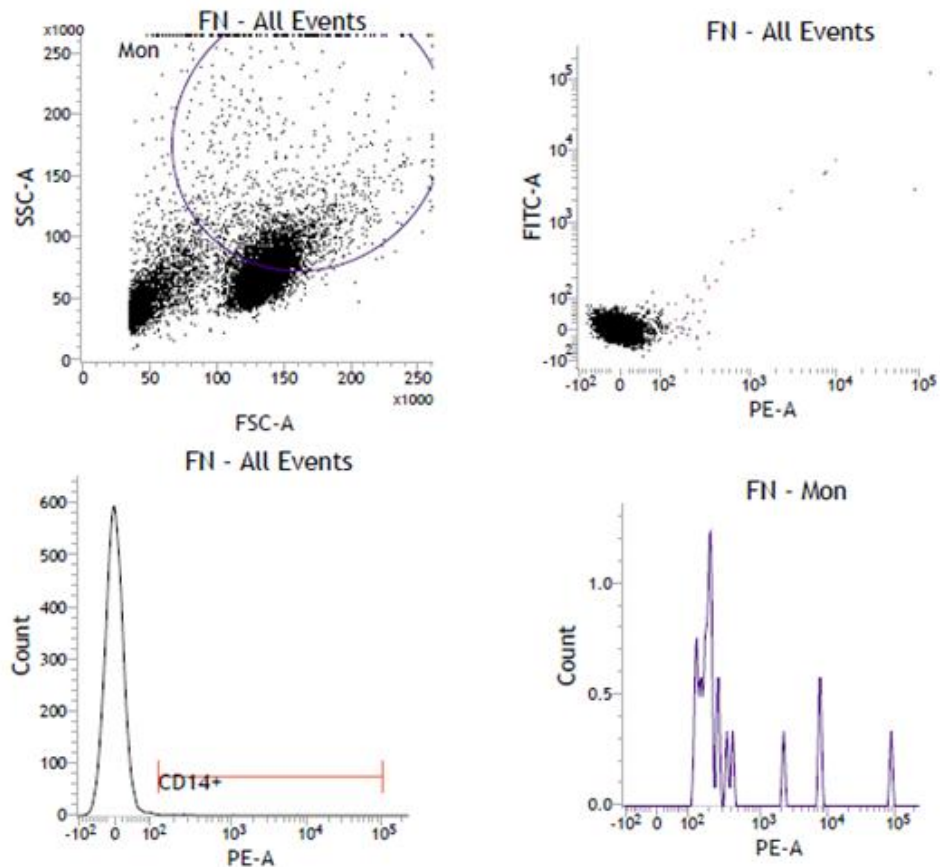


Figura 15. Citometria de fluxo representativa da fração negativa após passagem na coluna de separação magnética para células CD14+. Gate violeta (Mon): localização aproximada dos monócitos. Em vermelho: células CD14 (+).

5.3.3 Diferenciação de células dendríticas

Os monócitos provenientes da FP da etapa de enriquecimento foram cultivados em meio RPMI 1640 por 7 dias para a diferenciação em DCs induzida por IL-4 e GM-CSF. Durante a diferenciação as células eram monitoradas diariamente por microscopia de luz e, após os sete dias de indução, elas apresentaram morfologia menos circular e presença de alguns dendritos (Figura 16).

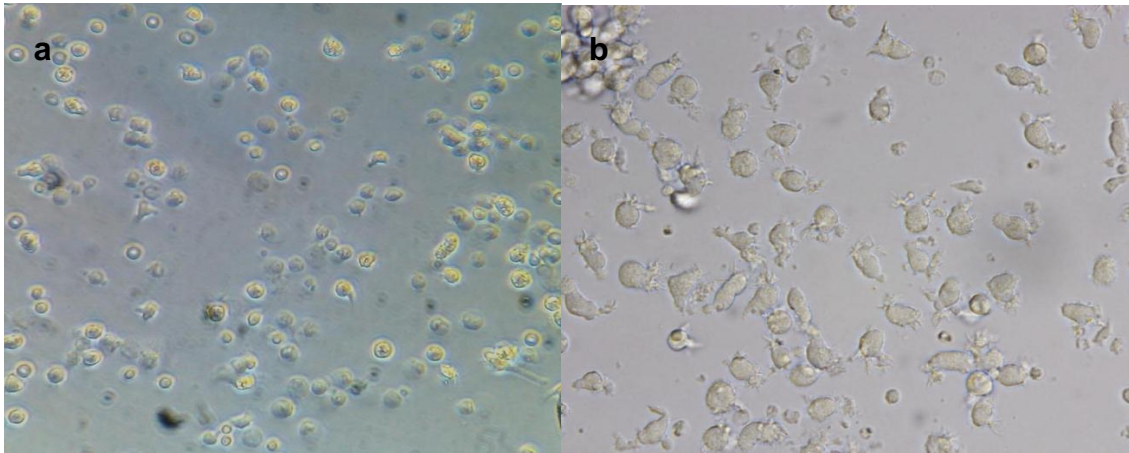


Figura 16. Microscopia de luz para observação simples da morfologia das células durante a diferenciação em cultura após a) 24 h, b) sete dias. Objetiva de 40X.

Para avaliar a correta diferenciação dos monócitos em DCs, 10^5 células foram marcadas para HLA-DR e CD1a e submetidas novamente à citometria de fluxo. Como pode ser observado na Figura 17, no mínimo, 70% das células provenientes dos monócitos expressavam o complexo HLA na superfície. A Figura 18 representa as marcações para CD1a, onde 60%, pelo menos, da população submetida à análise apresentava esta molécula de superfície.

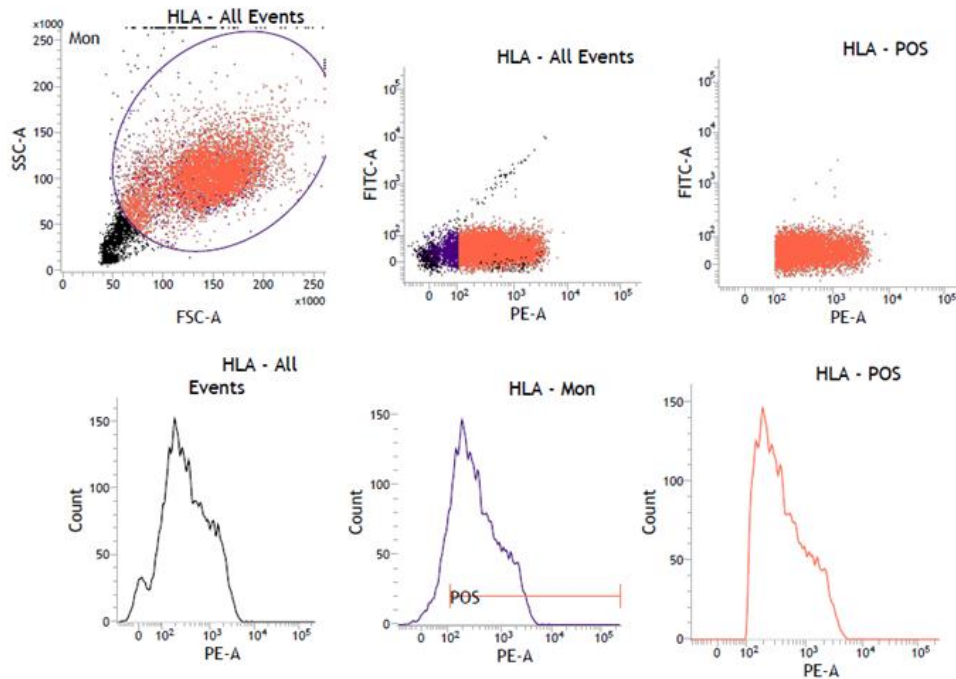


Figura 17. Citometria de fluxo representativa da diferenciação de monócitos para DCs com marcação para HLA após 7 dias em meio RPMI com citocinas apropriadas. Gate violeta: localização aproximada dos monócitos, em vermelho: células HLA (+).

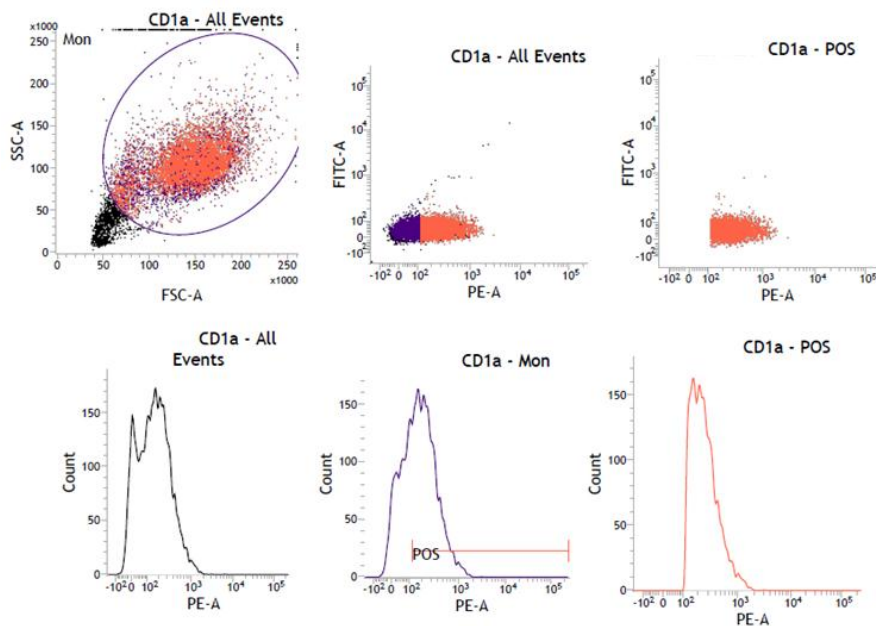


Figura 18. Citometria de fluxo representativa da diferenciação de monócitos para DCs com marcação para CD1a após 7 dias em meio RPMI com citocinas apropriadas. Gate violeta: localização aproximada dos monócitos, em vermelho: células CD1a (+).

5.4. Coleta das células dendríticas diferenciadas e infecção pelo *T. cruzi*

Após a confirmação da diferenciação, as DCs foram colocadas em contato com formas TMs por até 24 h e, posteriormente, coletadas para extração do RNA para o transcriptoma, citometria de fluxo, determinação de taxa de infecção e ativação ou ensaios de fluorescência.

A citometria de fluxo, com marcações para HLA-DR e CD1a, foi novamente realizada, mas agora com o intuito de verificar se houve a interação entre as DCs e o parasito. A Tabela 4 resume os resultados, após 12 h de infecção, tanto para HLA-DR como CD1a para cada doador (CTR – controle; INF – infectada). Analisando os dados, podemos observar que a expressão da molécula HLA-DR não apresentou diferença entre as células controle e infectadas do mesmo doador. No entanto, a molécula CD1a mostrou uma expressão variável entre os doadores, mas também diferenças não significativas entre as condições intra doador.

Tabela 4. Porcentagem de DCs infectadas ou controle que expressando HLA-DR e CD1a nos diferentes doadores

Amostra	% HLA (+)	%CD1a(+)
A_CTR	97,36	17,66
A_INF	97,90	13,14
B_CTR	97,58	82,08
B_INF	90,94	77,40
C_CTR	70,73	53,11
C_INF	64,86	20,94

Embora a expressão de HLA-DR e CD1a apresentem a tendência a diminuir após 12 horas de infecção, não houve diferença significativa na porcentagem de células expressando HLA-DR ou CD1a entre as condições CTR e INF, ou seja, sob as condições testadas, o método não parece ser sensível suficiente para avaliar a interação DCs-parasito (Figura 19).

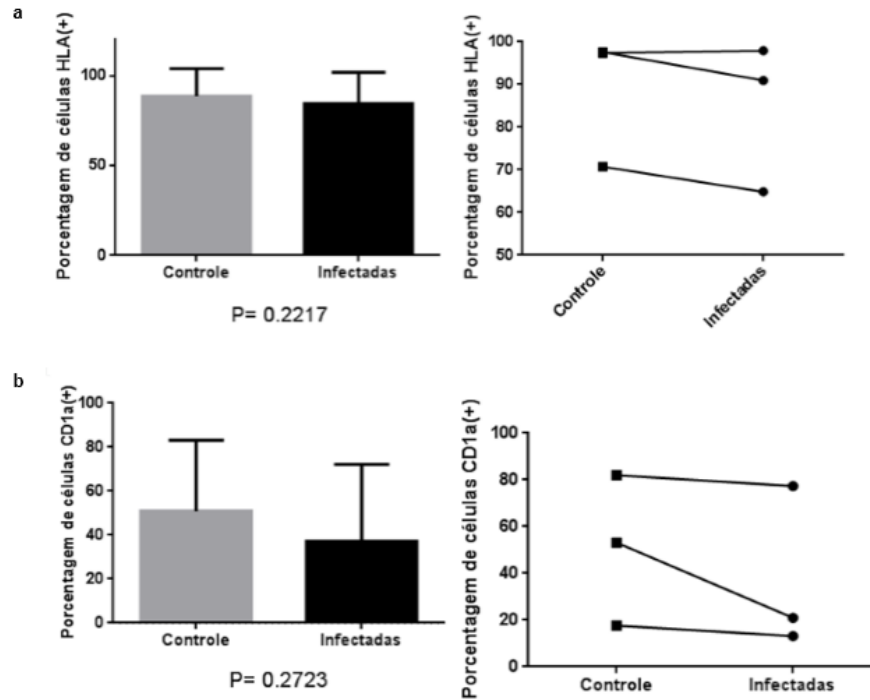


Figura 19. Percentagem de marcadores de superfície após 12h de infecção com *T. cruzi*, Cepa CL Brener. a). Marcação para HLA-DR, b). Marcação para CD1a. Análise de significância com Teste t, n=3

5.5. Taxa de infecção

O próximo passo foi a determinação das taxas de infecção das DCs após 12 horas de contato com os TMs, da quantidade de DCs ativadas e, também, da quantidade de amastigotas por célula. A Figura 20 mostra uma micrografia representativa das DCs controle e infectadas. A Tabela 5 apresenta os resultados da infecção obtidos para cada doador.

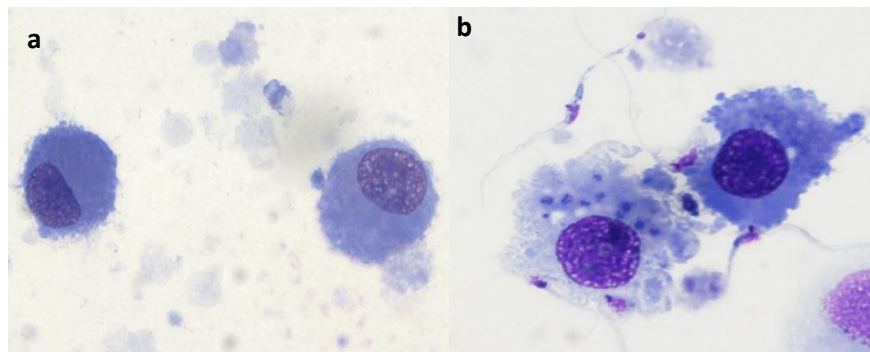


Figura 20. Fotografias representativas das DCs a). Controle não-infectadas b). Infectadas após 12 horas de infecção, MOI 1:10, com tripomastigotas metacíclicos da cepa CL Brener.

Tabela 5. Dados da infecção de DCs pelo *T. cruzi* nas 4 réplicas biológicas realizadas.

Amostra	Amastigotas/DC	%Infectadas	%Ativadas
A1_CTR	0	0	44,97
A1_INF	2,1	22,53	79,12
A2_CTR	0	0	57,46
A2_INF	1,9	38,19	89,09
A3_CTR	0	0	30,88
A3_INF	3,5	55,55	94,44
A4_CTR	0	0	51,20
A4_INF	3,0	58,33	88,33
B1_CTR	0	0	45,83
B1_INF	3,5	27,71	45,78
B2_CTR	0	0	53,33
B2_INF	2,5	53,06	91,84
B3_CTR	0	0	46,43
B3_INF	3,3	66,22	91,30
B4_CTR	0	0	48,70
B4_INF	1,3	54,67	84,00
C1_CTR	0	0	25,55
C1_INF	2,7	23	75,00
C2_CTR	0	0	59,37
C2_INF	2,7	18,92	72,07
C3_CTR	0	0	57,14
C3_INF	1,5	20,48	83,13
C4_CTR	0	0	39,02
C4_INF	1,3	31,58	77,63

A taxa média de infecção das DCs foi 39,2% ($\pm 17,3\%$) e o número médio de amastigotas por células foi 2,4 ($\pm 0,8$). Ao separar e observar os resultados por doador, vemos que o doador C obteve a menor taxa de infecção com média de 23,5% ($\pm 5,6\%$), enquanto que os doadores A e B apresentaram 43,6% ($\pm 16,7\%$) e 50,4% ($\pm 16,2\%$) de média, respectivamente (Figura 21). Não houve diferença significativa entre os doadores ao se comparar o número de amastigotas por célula: o A apresentou 2,6 ($\pm 0,8$) amastigotas/DC infectada, o B, 2,6 ($\pm 1,0$) e o C, 2,1 ($\pm 0,8$) (Figura 21).

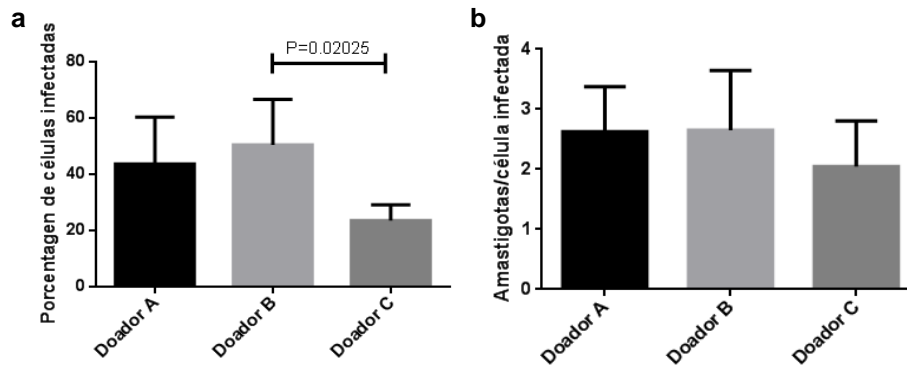


Figura 21. a). Taxa de infecção das DCs por doador. Pelo menos 100 células foram contadas em campos aleatórios para determinar a taxa de infecção das DCs, b). Número de amastigotas por DC infectada de cada doador (análise de significância com Teste t, n=4)

Em média, 46,7% ($\pm 10,5\%$) das DCs controles foram ativadas após 12 horas de infecção, a porcentagem de ativação para as infectadas foi 81,0% ($\pm 13,2\%$). A comparação intra doador (DC controle–DC infectada) revela que as DCs infectadas de todos os doadores apresentaram maior ativação do que as controle. Por último, não houve diferença significativa na ativação das DCs entre doadores (Figura 22). Esses resultados permitem inferir que a interação parasito-DCs foi responsável pela ativação das DCs, garantindo uma diferença entre células controle e infectadas que pode representar uma expressão gênica diferencial no transcriptoma.

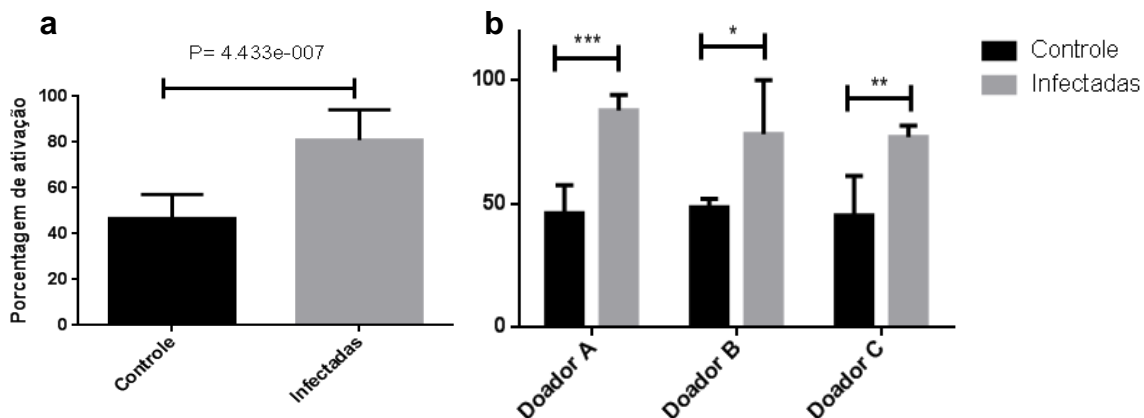


Figura 22. a). Porcentagem global de ativação das DCs controle e infectadas (análise de significância com Teste t, n=12); b). Porcentagem de ativação por doador (teste t, n=4, * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$).



5.6. Imunofluorescência das DCs ativadas após infecção por *T. cruzi*

Devido a dificuldade da diferenciação entre amastigotas intracelulares e TMs ainda não internalizados pela microscopia de luz, ensaios de imunofluorescência com um protocolo que permitisse essa identificação foram desenvolvidos. Adicionalmente, o nível de ativação das DCs foi determinado com maior exatidão mediante quantificação da fluorescência emitida pelas células ativadas, usando LPS como controle positivo da ativação. No entanto, em algumas imagens, dependendo deste nível de ativação, a faloidina apresentou fluorescência no verde, dificultando a identificação dos parasitos intracelulares. A Figura 23 apresenta imagens representativas dos ensaios em diferentes tempos de infecção.

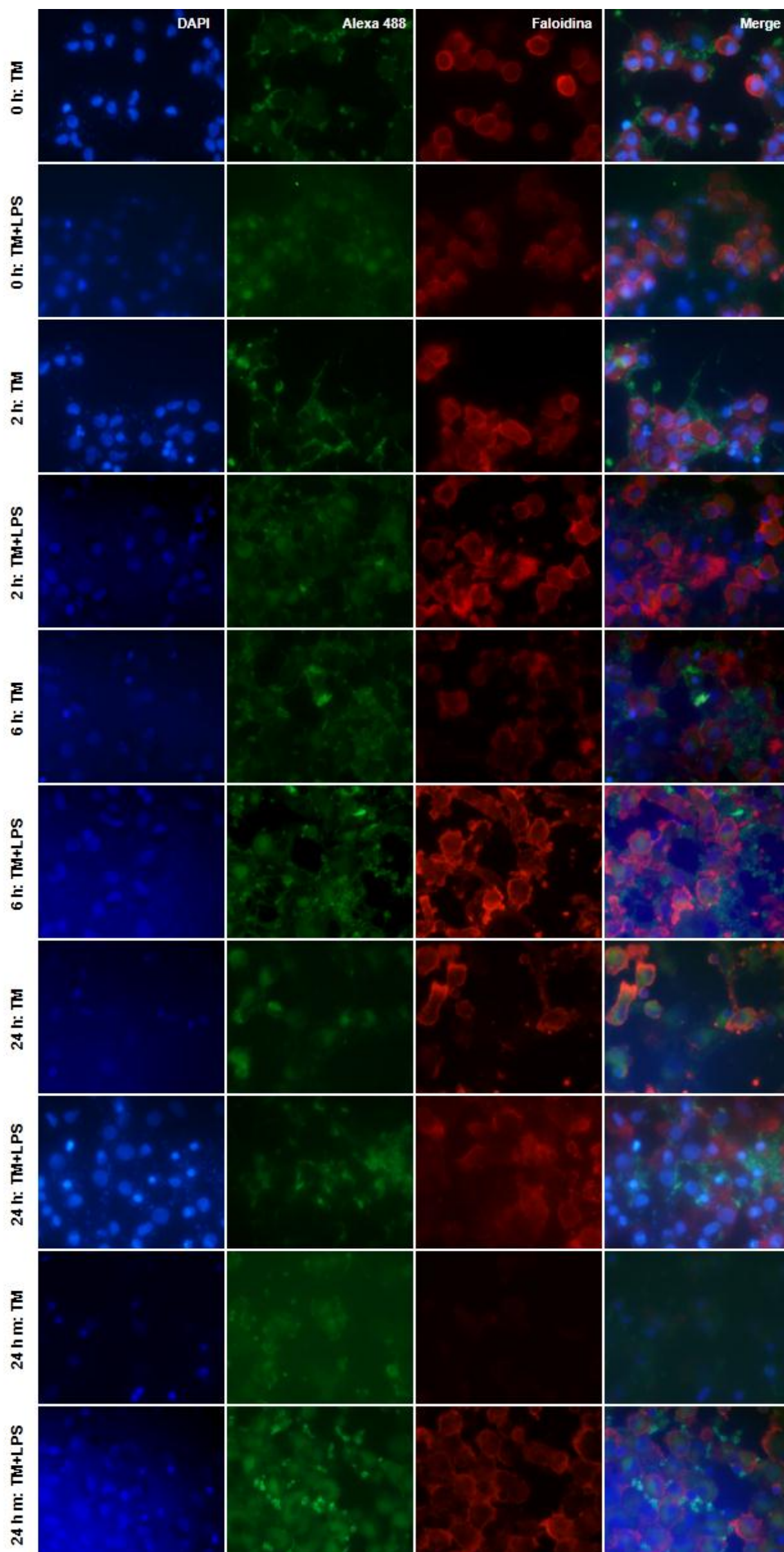


Figura 23. Micrografias representativas dos ensaios de imunofluorescência em diferentes tempos de infecção na presença/ausência de LPS. Primeira coluna: DAPI (ácidos nucleicos), segunda coluna: Alexa Fluor 488 (parasito extracelular), terceira coluna: faloidina (filamentos de actina), quarta coluna: *Merge*. TMs: tripomastigotas metacíclicos, m: TM inativados com luz UV, LPS: molécula de lipopolissacarídeo.

Ao medir a fluorescência média por célula dendrítica nos diferentes tempos (Figura 24) foi observado que a maioria teve uma diferença significativa com respeito às células controle, mostrando então uma maior ativação das células que interagiram com o parasito do que aquelas que foram incubadas com meio ou com meio contendo LPS. Na Figura 24, os asteriscos em cima da barra representam diferença significativa quando comparada com o controle. O tempo de 24 h com de incubação com *T. cruzi* e LPS (CLB24h+LPS) apresentou diferença significativa quando comparado com o controle. No entanto, os parasitos previamente inativados por UV (CLBm24h e CLBm24h+LPS) não mostraram diferença na ativação quando comparados com o controle. As linhas horizontais com asteriscos representam diferenças significativas entre DC+parasito e DC+parasito+LPS. Aqui é interessante observar que a presença de LPs favoreceu a ativação das DCs a partir de 6 h de infecção.

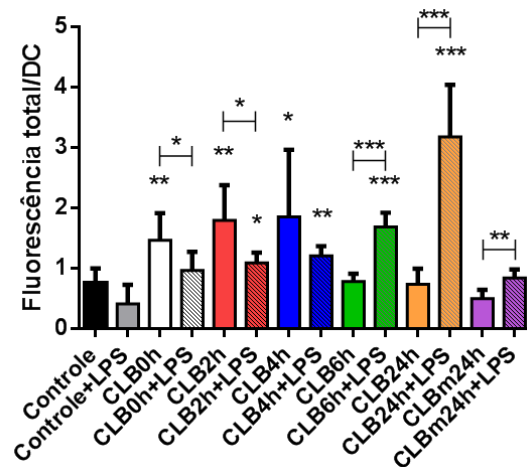


Figura 24. Medida da fluorescência total da faloidina por célula dendrítica (DC) quando incubadas com formas tripomastigotas metacíclicas, indicando o nível de ativação. CLB: cepa CL Brener, m: formas MT inativadas com luz UV, 0, 2, 4, 6 e 24 h: tempos de incubação, +LPS: na presença de LPS. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (Test t, $n = 5$).

Por outra parte, a Figura 25 apresenta os diferentes níveis de ativação das DCs de acordo com os tempos de incubação com as formas metacíclicas da cepa CL Brener, sem ter em conta a presença de LPS. Neste caso, é possível observar

que os tempos de 0 a 4h apresentaram uma ativação maior do que nas incubações sucessivas.

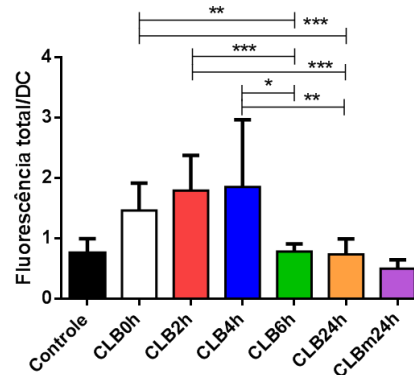


Figura 25. Medida da fluorescência total da foloidina por célula dendrítica (DC) quando incubadas com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa CL Brener. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (Test t, $n=5$).

Os níveis de ativação das células dendríticas quando incubadas com o parasito + LPS estão representados na Figura 26. O ponto CLB24h+LPS apresentou diferença significativa quando comparado com todos os outros tempos. Neste caso, pode ser visto que os níveis de ativação parecem incrementar com o tempo e os parasitos inativados não possuem capacidade de ativar as DCs.

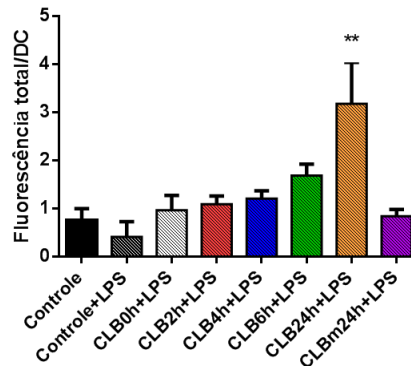


Figura 26. Medida da fluorescência total da faloidina nas células dendríticas (DC) quando incubadas com LPS e as formas tripomastigotas metacíclicas da cepa CL Brener. ** $p < 0,01$ na comparação do tempo de 24 h com os demais (Test t, $n=5$).

O próximo passo foi determinar a taxa de infecção das DCs pelas formas TMs nos diferentes tempos de incubação. Ao analisar a Figura 27 pode-se observar

diferenças entre tempos de incubação na presença/ausência de LPS, mas a sua presença desencadeou nenhum padrão de infecção. Cabe ressaltar que os parasitos inativados não são internalizados na mesma medida que os parasitos vivos (CLB24h e CLBm24h), talvez pela falta de capacidade dos parasitos inativados em induzir a fagocitose.

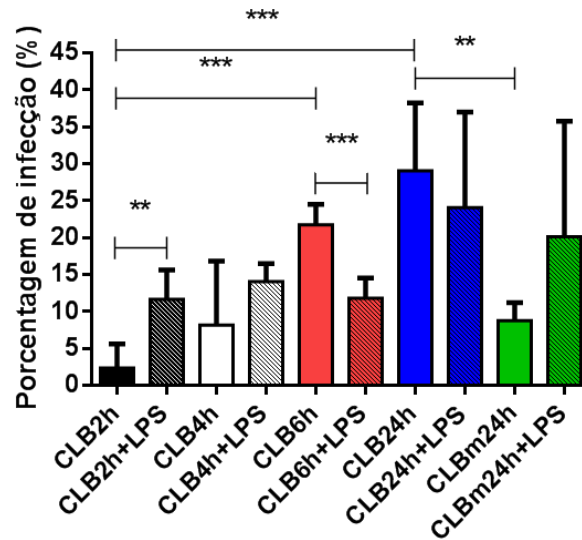


Figura 27. Taxa de infecção das DCs pela cepa CL Brener na presença ou não de LPS. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (Test t, $n=5$).

No que diz respeito ao número de amastigotas/DC infectada, uma média relativamente estável de 1,4 amastigotas por célula infectada foi obtida a partir das análises das imagens de fluorescência (Figura 28). Curiosamente, a presença do LPS não influenciou na internalização do parasito, talvez por que o processo não é uma simples fagocitose por parte da DC e depende também da atividade do parasito. Por outro lado, como visto nas análises anteriores, os parasitos inativados apresentaram uma internalização menor o que reforça a hipótese da participação ativa dos TMs da cepa CL Brener na indução de fagocitose.

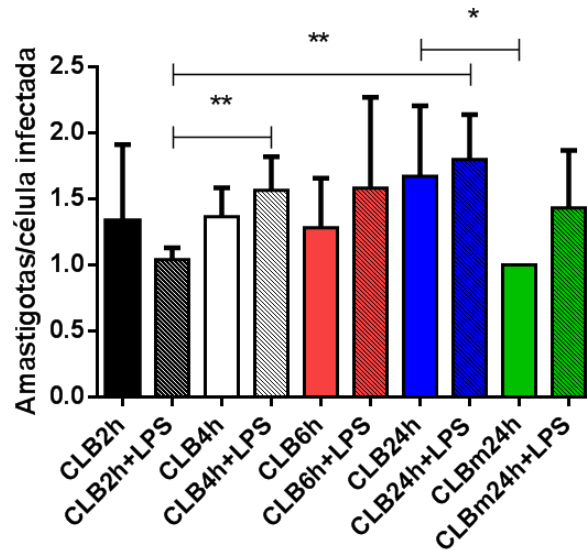


Figura 28. Número de amastigotas por célula infectada nos diferentes tempos de incubação na presença ou não de LPS. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (Test t, $n=5$).

5.7. Extração e controle de qualidade do RNA total das DCs extraído após infecção com *Trypanosoma cruzi*

O RNA das DCs infectadas com TMs da cepa CL Brener (MOI 1:10) durante 12 h e das células controle foi extraído usando o protocolo recomendado para o TriZol. Para uma verificação rápida do material, as amostras foram visualizadas em gel de agarose 1% RNase free e quantificadas mediante nanodrop. No entanto, tendo em conta a dificuldade de preparação das amostras e a magnitude do projeto, era necessário garantir a qualidade do RNA que seria usado para o sequenciamento. Desta forma, as amostras também foram testadas no Bioanalyzer que tem a vantagem de quantificar e determinar integridade mediante o cálculo do RIN. A Figura 29 apresenta o resultado do Bioanalyzer, onde é possível observar a integridade do RNA representada pela presença das bandas das subunidades ribossomais eucarióticas.

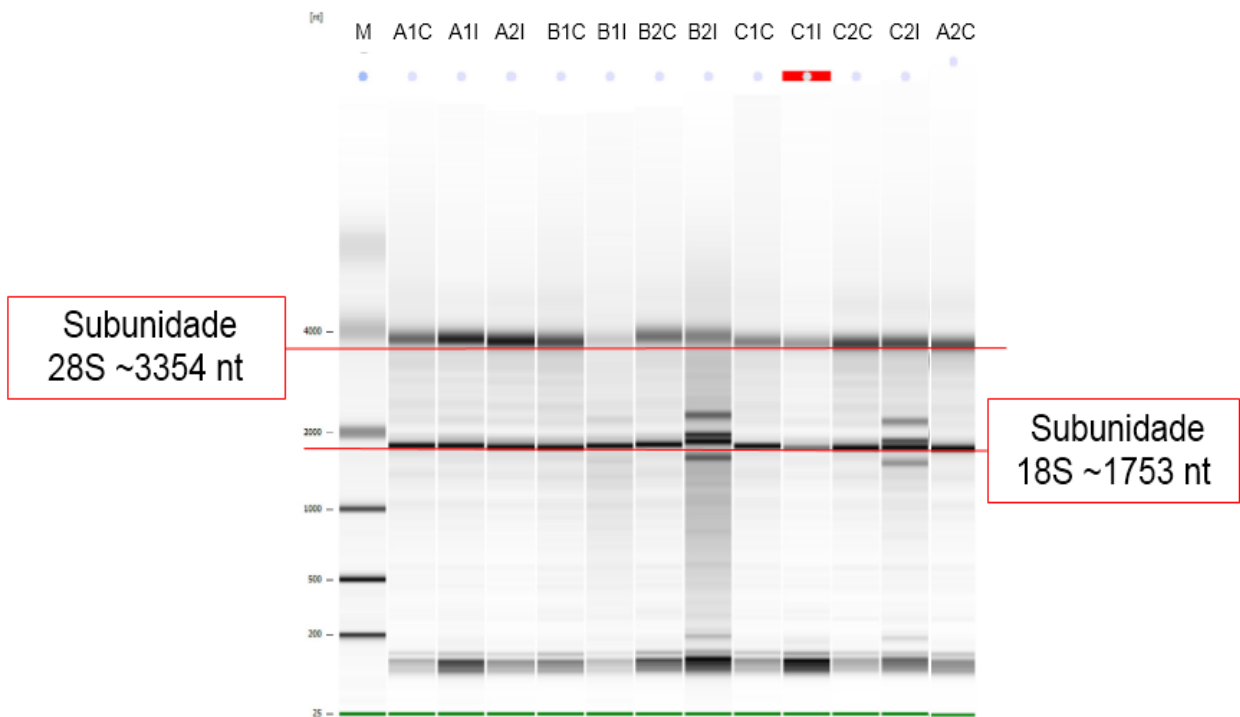


Figura 29. Análise por Bioanalyzer da integridade do RNA extraído de DCs após infecção com o parasito. As amostras representadas são dos doadores A, B e C (C: controle, I: infectadas).

A Tabela 6 apresenta os resultados da quantificação do RNA total após extração de cada amostra além do número RIN, dado obtido no Bioanalyzer. Embora o RIN das amostras B1INF, B2INF e C1INF não seja o ideal, no gel virtual da Figura 29 pode-se observar as bandas referentes à subunidade 28S (3354 nucleotídeos) e à 18S (1753 nucleotídeos). As bandas adicionais são referentes ao RNA do parasito, extraído juntamente com o das DCs infectadas, o que pode interferir no cálculo do RIN feito pelo programa.

Tabela 6. Quantificação e qualidade do RNA total extraído das DCs após infecção com o parasito.

Amostra	Concentração (ng/μl)	260/280	Volume total (μl)	Quantidade total (ng)	RIN
A1CTR	180,6	1,70	27	4.876,2	7,9
A1INF	156,0	1,70	27	4.212,0	8,6
A2CTR	490,7	1,75	27	13.248,9	8,4
A2INF	133,9	1,71	27	3.615,3	8,9
B1CTR	96,7	1,73	27	2.610,9	7,7
B1INF	124,7	1,63	27	3.366,9	6,1
B2CTR	30,7	1,85	37	1.135,9	7,8
B2INF	81,0	1,83	27	2.187,0	4,8
C1CTR	195,9	1,69	27	5.289,3	7,9
C1INF	88,1	1,80	37	3.259,7	NA
C2CTR	119,6	1,72	27	3.229,2	8,5
C2INF	107,8	1,75	27	2.910,6	7,2

5.8. Transcriptoma preliminar das DCs após infecção com *T. cruzi*

A partir deste ponto, os resultados apresentados foram obtidos pelo sequenciamento, montagem dos reads e análise de expressão diferencial feitos pela empresa Novogene. Como controle de qualidade da preparação das bibliotecas, as amostras fragmentadas e fusionadas aos adaptadores requeridos foram analisadas no LabChip GX (PerkinElmer) que proporciona um gel virtual para identificação do tamanho destes fragmentos ($400 \pm 20\text{bp}$ = inserto de 250pb + adaptadores) e suas concentrações. A Figura 30 mostra que a distribuição dos fragmentos obtidos encontra-se no comprimento ideal.

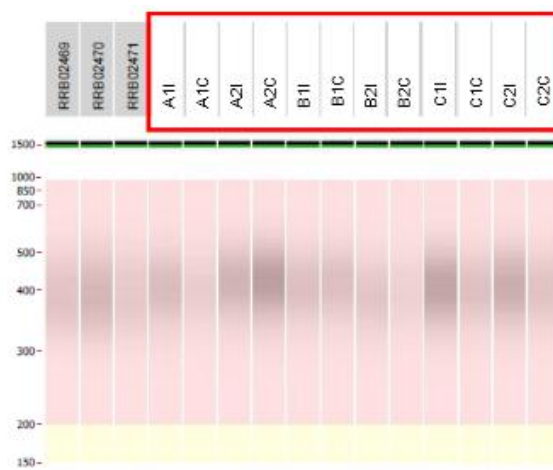


Figura 30. Distribuição dos fragmentos de cDNAs obtidos a partir das bibliotecas.

Além disso, para assegurar a eficiência do processo, o LabChip GX proporciona as concentrações de cada fragmento específico dentro da biblioteca. A Figura 31 mostra que os fragmentos de 310 a 530 pb apresentam concentrações compatíveis com as padronizadas pela empresa para continuação do sequenciamento. É possível observar que as bibliotecas provenientes de amostras infectadas (linhas descontínuas) apresentam concentração maior de fragmentos na região esperada, mas a biblioteca A2C é uma exceção a essa observação, provavelmente devido a sua alta concentração de RNA desde o início do processo (ver Tabela 6).

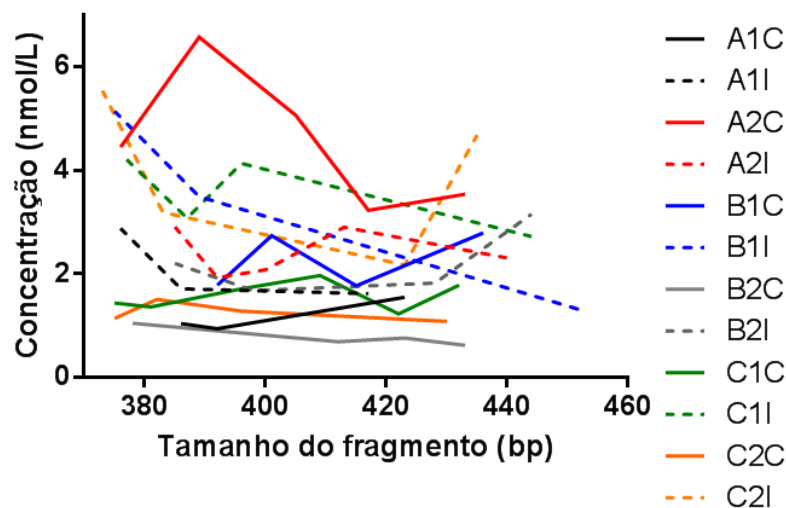


Figura 31. Quantificação da concentração dos fragmentos de cDNA obtidos na produção de bibliotecas

Após a checagem da qualidade do material, as bibliotecas foram submetidas ao sequenciamento na plataforma Illumina HiSeq 2500. A Tabela 7 apresenta o resumo dos resultados de cada biblioteca sequenciada: número de reads obtidos por amostra, o número de reads depois da depuração, qualidade das sequências e porcentagem de GC. A média dos reads limpos obtidos por amostra foi 22.900.000. Os dados da coluna Q20 e Q30 representam a qualidade dos reads por meio da porcentagem correta de nucleotídeos que foram adicionados durante a PCR com intervalo de confiança de 99 e 99,9%, respectivamente.



Tabela 7. Resumo do resultado dos sequenciamentos usando a plataforma Illumina HiSeq 2500.

Sample name	Raw reads	Clean reads	Clean bases	Error rate(%)	Q20(%)	Q30(%)	GC content(%)
A1C	15748354	14970500	2.25G	0.01	97.45	94.47	49.67
A2C	26072128	25433690	3.82G	0.01	97.80	95.03	50.87
A1I	18276194	17409180	2.61G	0.01	97.63	94.70	51.14
A2I	26417544	25741070	3.86G	0.01	97.62	94.77	50.73
B1C	28998888	28161532	4.22G	0.01	97.67	94.81	52.72
B2C	22836642	22004494	3.3G	0.01	97.49	94.54	53.86
B1I	24237576	23540744	3.53G	0.01	97.40	94.45	51.02
B2I	26951896	26101944	3.92G	0.01	96.82	93.53	49.30
C1C	23140974	22475196	3.37G	0.01	96.96	93.43	49.94
C2C	22259296	21626970	3.24G	0.01	97.62	94.76	51.67
C1I	22202262	21661094	3.25G	0.01	97.90	95.23	50.77
C2I	26307908	25544920	3.83G	0.01	96.94	93.71	49.31

A Tabela 8 contém os resultados do mapeamento feito contra o genoma de referência humano após montagem dos reads. Aqui é possível observar que as amostras B2I e C2I apresentaram baixa quantidade de reads para as sequencias do genoma humano (35,8 e 39,6%, respetivamente). Estas são as amostras que apresentaram alta quantidade de RNA do parasito quando submetidas ao Bioanalyzer, por este motivo podemos supor que este resultado era esperado.

Tabela 8. Resultado do mapeamento dos reads obtidos usando o genoma humano de referência.

Sample_name	Total reads	Total mapped	Multiple mapped	Uniquely mapped	Reads map to '+'	Reads map to '-'	Non-splice reads	Splice reads
-------------	-------------	--------------	-----------------	-----------------	------------------	------------------	------------------	--------------



A1C	14970500	12524613 (83.66%)	161732 (1.08%)	12362881 (82.58%)	6192934 (41.37%)	6169947 (41.21%)	9160495 (61.19%)	3202386 (21.39%)
A2C	25433690	21587543 (84.88%)	277572 (1.09%)	21309971 (83.79%)	10667237 (41.94%)	10642734 (41.85%)	13629236 (53.59%)	7680735 (30.2%)
A1I	17409180	13324075 (76.53%)	180652 (1.04%)	13143423 (75.5%)	6580462 (37.8%)	6562961 (37.7%)	8901207 (51.13%)	4242216 (24.37%)
A2I	25741070	20567850 (79.9%)	253750 (0.99%)	20314100 (78.92%)	10173225 (39.52%)	10140875 (39.4%)	13716564 (53.29%)	6597536 (25.63%)
B1C	28161532	23757122 (84.36%)	286343 (1.02%)	23470779 (83.34%)	11740195 (41.69%)	11730584 (41.65%)	15106372 (53.64%)	8364407 (29.7%)
B2C	22004494	18190481 (82.67%)	263095 (1.2%)	17927386 (81.47%)	8970531 (40.77%)	8956855 (40.7%)	10985345 (49.92%)	6942041 (31.55%)
B1I	23540744	16035934 (68.12%)	199462 (0.85%)	15836472 (67.27%)	7922935 (33.66%)	7913537 (33.62%)	10892574 (46.27%)	4943898 (21%)
B2I	26101944	9352332 (35.83%)	112621 (0.43%)	9239711 (35.4%)	4626909 (17.73%)	4612802 (17.67%)	6483603 (24.84%)	2756108 (10.56%)
C1C	22475196	18618548 (82.84%)	218074 (0.97%)	18400474 (81.87%)	9219940 (41.02%)	9180534 (40.85%)	13003538 (57.86%)	5396936 (24.01%)
C2C	21626970	18259675 (84.43%)	245165 (1.13%)	18014510 (83.3%)	9020822 (41.71%)	8993688 (41.59%)	12007869 (55.52%)	6006641 (27.77%)
C1I	21661094	16762849 (77.39%)	185161 (0.85%)	16577688 (76.53%)	8295928 (38.3%)	8281760 (38.23%)	9657508 (44.58%)	6920180 (31.95%)
C2I	25544920	10126599 (39.64%)	111769 (0.44%)	10014830 (39.2%)	5015664 (19.63%)	4999166 (19.57%)	6937729 (27.16%)	3077101 (12.05%)

Ainda baseado nos resultados apresentados na Tabela 8, vê-se que a maioria dos reads foi mapeada unicamente em um lugar do genoma de referência e, aproximadamente, 1% dos reads, em múltiplos lugares. Este resultado indica que houve um bom processo de montagem já que os parâmetros utilizados permitiram um alinhamento inequívoco. Além disso, todas as amostras apresentaram distribuição de aproximadamente 50% dos reads lidos na fita positiva e outros 50% na fita negativa. Pode-se observar que a maioria dos reads não apresentava *splicings* alternativo; no entanto, houve condições em que essa porcentagem alcançou até 30%.

As condições do estudo permitiram que o mesmo sequenciamento proporcionasse informações da modulação genômica funcional do parasito quando

este infecta a DC. O mapeamento foi obtido usando o genoma de referência de *T. cruzi* cepa CL Brener e o resumo dos resultados encontra-se na Tabela 9.

Como a finalidade principal do trabalho era a obtenção do transcriptoma das DCs, a quantidade de material fornecida para realização do transcriptoma dizia respeito ao RNA destas células e, por isso, poucos reads limpos foram mapeados no genoma de referência de *T. cruzi*; com exceção das amostras B2I e C2I que desde o início do processo apresentam alta quantidade de RNA do parasito. Curiosamente, algumas das amostras do controle, ou seja, aquelas sem RNA do parasito, apresentaram pequenas porcentagens de reads que parearam no genoma do *T. cruzi*. Esses pareamentos podem ter ocorrido possivelmente devido a sequências parecidas nos dois genomas, aos parâmetros selecionados para a montagem dos reads ou a erros durante o sequenciamento. No entanto, vale lembrar que ainda estamos em uma etapa preliminar das análises dos dados obtidos e que os motivos mencionados são suposições que poderão ser respondidas com o término da pesquisa em trabalhos posteriores. Mesmo com pouco material, ainda é possível observar uma distribuição homogênea das leituras dos reads tanto para a fita positiva quanto a negativa do cDNA do parasito. O número de *splicings* alternativos identificados foi baixo, mas isso pode ser devido a forma peculiar do *T. cruzi* em controlar a maquinaria de transcrição e edição do RNA.

Tabela 9. Resultado do mapeamento dos reads obtidos usando o genoma de referência do *T. cruzi*.

Sample name	Total reads	Total mapped	Multiple mapped	Uniquely mapped	Reads map to '+'	Reads map to '-'	Non-splice reads	Splice reads
A1C	14970500	494 (0%)	360 (0%)	134 (0%)	97 (0%)	37 (0%)	134 (0%)	0 (0%)
A2C	25433690	9484 (0.04%)	1857 (0.01%)	7627 (0.03%)	3837 (0.02%)	3790 (0.01%)	7627 (0.03%)	0 (0%)
A1I	17409180	1439413 (8.27%)	259458 (1.49%)	1179955 (6.78%)	589535 (3.39%)	590420 (3.39%)	1179096 (6.77%)	859 (0%)
A2I	25741070	1043391 (4.05%)	182985 (0.71%)	860406 (3.34%)	429707 (1.67%)	430699 (1.67%)	859745 (3.34%)	661 (0%)



B1C	28161532	20615 (0.07%)	4096 (0.01%)	16519 (0.06%)	8304 (0.03%)	8215 (0.03%)	16517 (0.06%)	2 (0%)
B2C	22004494	8156 (0.04%)	1717 (0.01%)	6439 (0.03%)	3246 (0.01%)	3193 (0.01%)	6438 (0.03%)	1 (0%)
B1I	23540744	3315458 (14.08%)	594880 (2.53%)	2720578 (11.56%)	1359605 (5.78%)	1360973 (5.78%)	2717637 (11.54%)	2941 (0.01%)
B2I	26101944	10789472 (41.34%)	1979114 (7.58%)	8810358 (33.75%)	4401178 (16.86%)	4409180 (16.89%)	8792890 (33.69%)	17468 (0.07%)
C1C	22475196	15903 (0.07%)	3144 (0.01%)	12759 (0.06%)	6426 (0.03%)	6333 (0.03%)	12757 (0.06%)	2 (0%)
C2C	21626970	3333 (0.02%)	768 (0%)	2565 (0.01%)	1291 (0.01%)	1274 (0.01%)	2564 (0.01%)	1 (0%)
C1I	21661094	1858801 (8.58%)	353043 (1.63%)	1505758 (6.95%)	752541 (3.47%)	753217 (3.48%)	1504270 (6.94%)	1488 (0.01%)
C2I	25544920	9957829 (38.98%)	1838939 (7.2%)	8118890 (31.78%)	4056398 (15.88%)	4062492 (15.9%)	8100775 (31.71%)	18115 (0.07%)

Voltando ao transcriptoma referente às DCs, as Figura 32, Figura 33 e Figura 34 apresentam a distribuição dos reads mapeados dentro do genoma dos doadores A, B e C, respectivamente. Estas figuras mostram a cobertura obtida dentro dos primeiros 14 cromossomos e o cromossomo X, algumas regiões dos cromossomos não apresentam representatividade porque, provavelmente, são regiões satélite ou centrômeros, sem expressão. Estas figuras confirmam que a cobertura do transcriptoma é suficiente para que se obtenha informações relevantes sobre a modulação causada pelo parasito durante as horas iniciais da infecção de DCs.

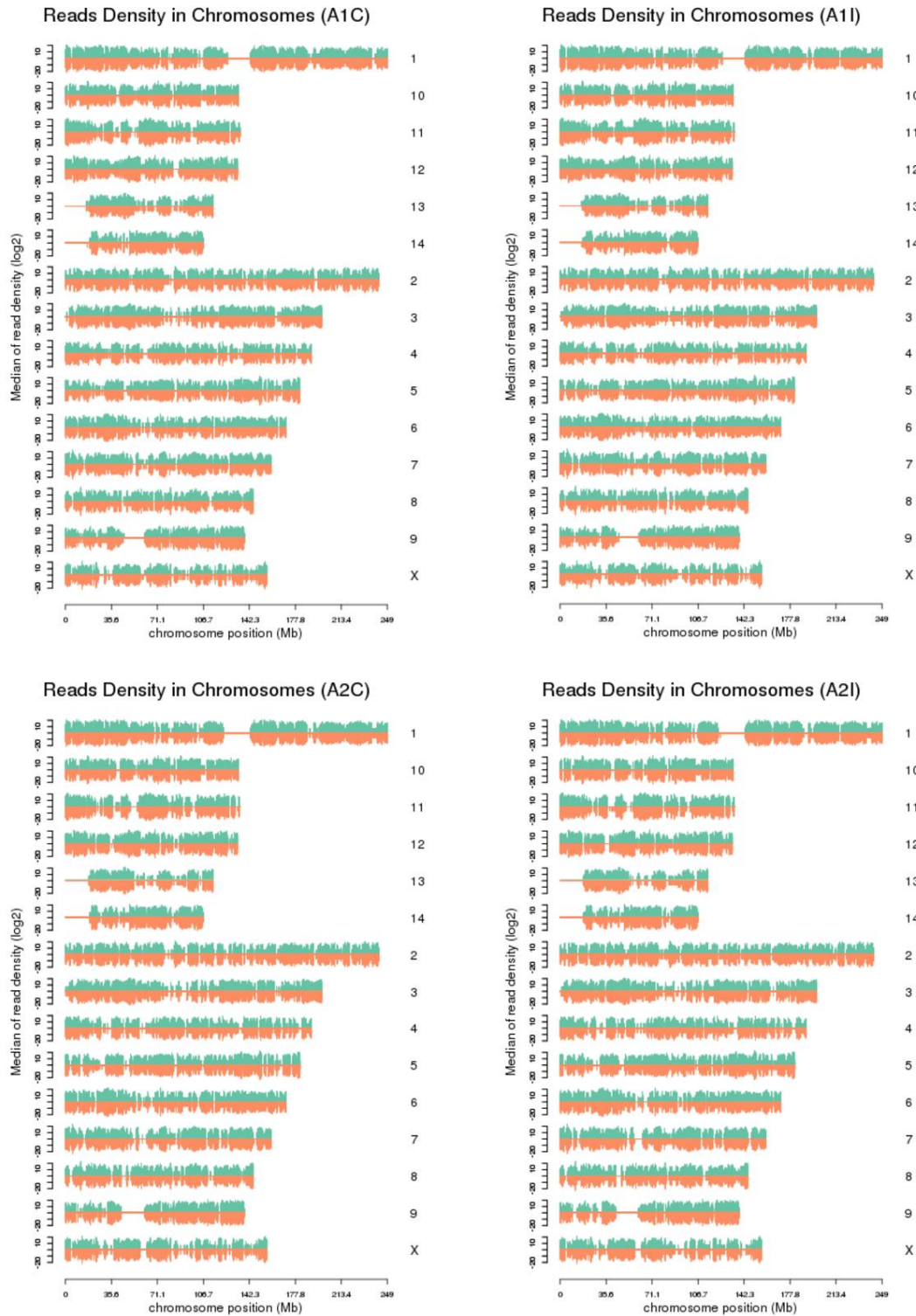


Figura 32. Distribuição dos reads obtidos a partir do doador A nos cromossomas humanos. Esquerda: células controle, direita: células infectadas. No eixo X: posição no cromossoma em Mb, no eixo Y: média da densidade dos reads. Em verde: densidade dos reads mapeados na fita positiva, em laranja: densidade dos reads mapeados na fita negativa.

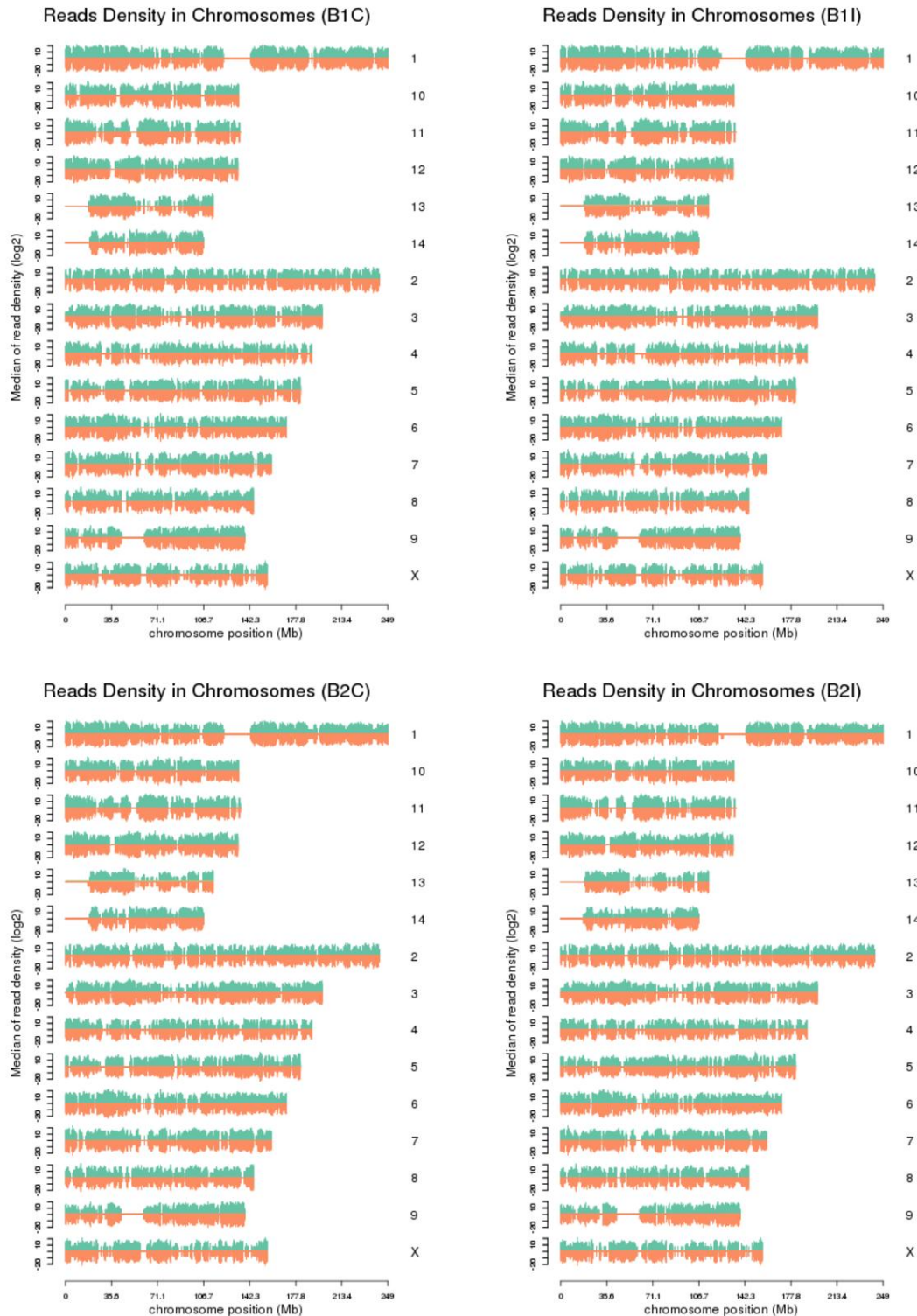


Figura 33. Distribuição dos reads obtidos a partir do doador B nos cromossomas humanos. Esquerda: células controle, direita: células infectadas. No eixo X: posição no cromossoma em Mb, no eixo Y: média da densidade dos reads. Em verde: densidade dos reads mapeados na fita positiva, em laranja: densidade dos reads mapeados na fita negativa.

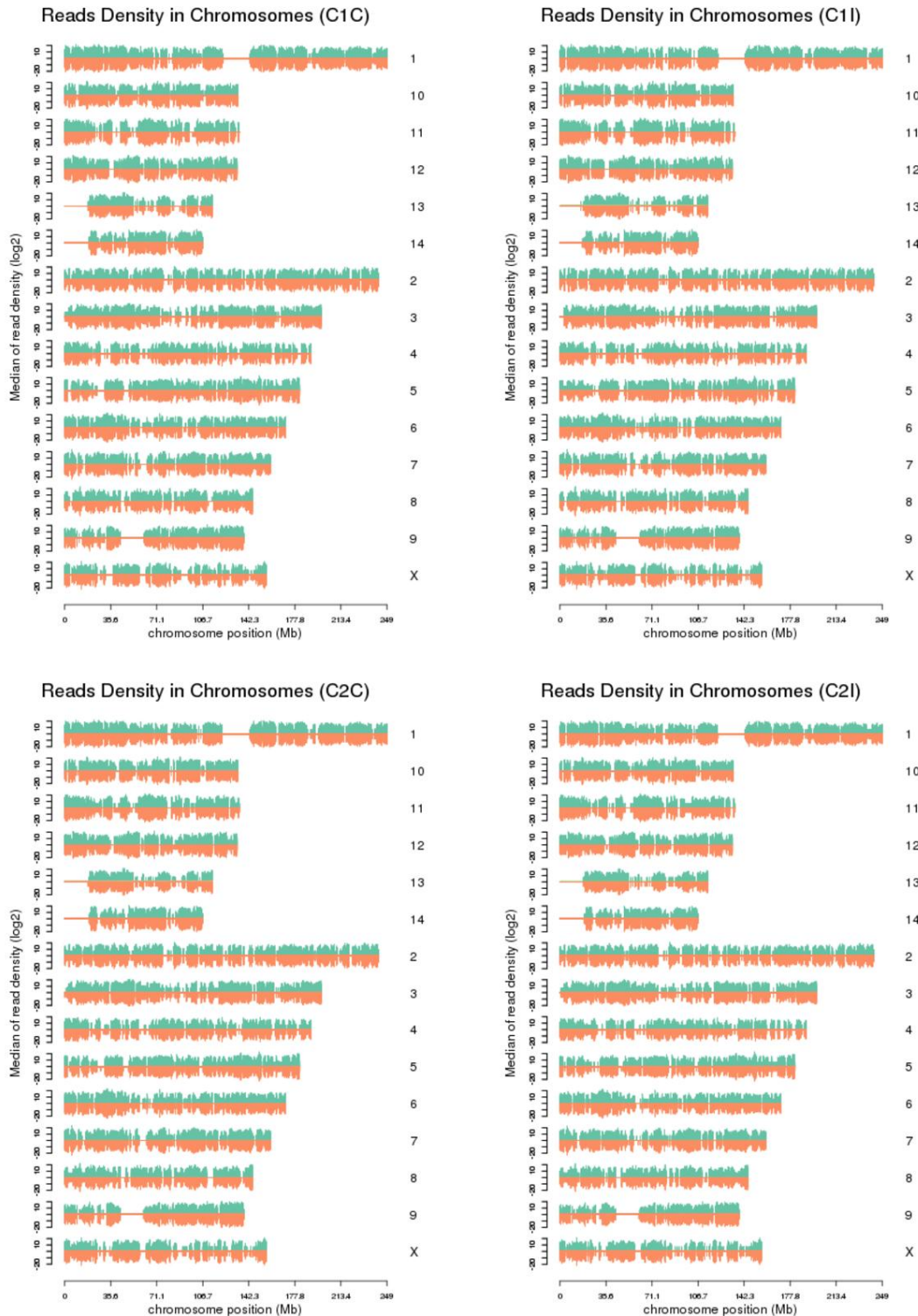


Figura 34. Distribuição dos reads obtidos a partir do doador C nos cromossomas humanos. Esquerda: células controle, direita: células infectadas. No eixo X: posição no cromossoma em Mb, no eixo Y: média da densidade dos reads. Em verde: densidade dos reads mapeados na fita positiva, em laranja: densidade dos reads mapeados na fita negativa.

O cálculo do coeficiente de correlação de Pearson permite verificar a qualidade das duplicatas biológicas, tal cálculo foi feito levando em consideração os níveis de expressão dos genes em cada amostra. A correlação está apresentada de duas formas: entre todas as amostras (Figura 35) e entre as duplicatas das células controle e das infectadas para cada doador (

Figura 36). É possível observar que coeficiente de correlação é maior que 0,94 para todas as comparações, este resultado mostra que as duplicatas tem suficiente qualidade para conclusões bem fundamentadas já que o ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) recomenda o valor de 0,92 para condições experimentais ideais.

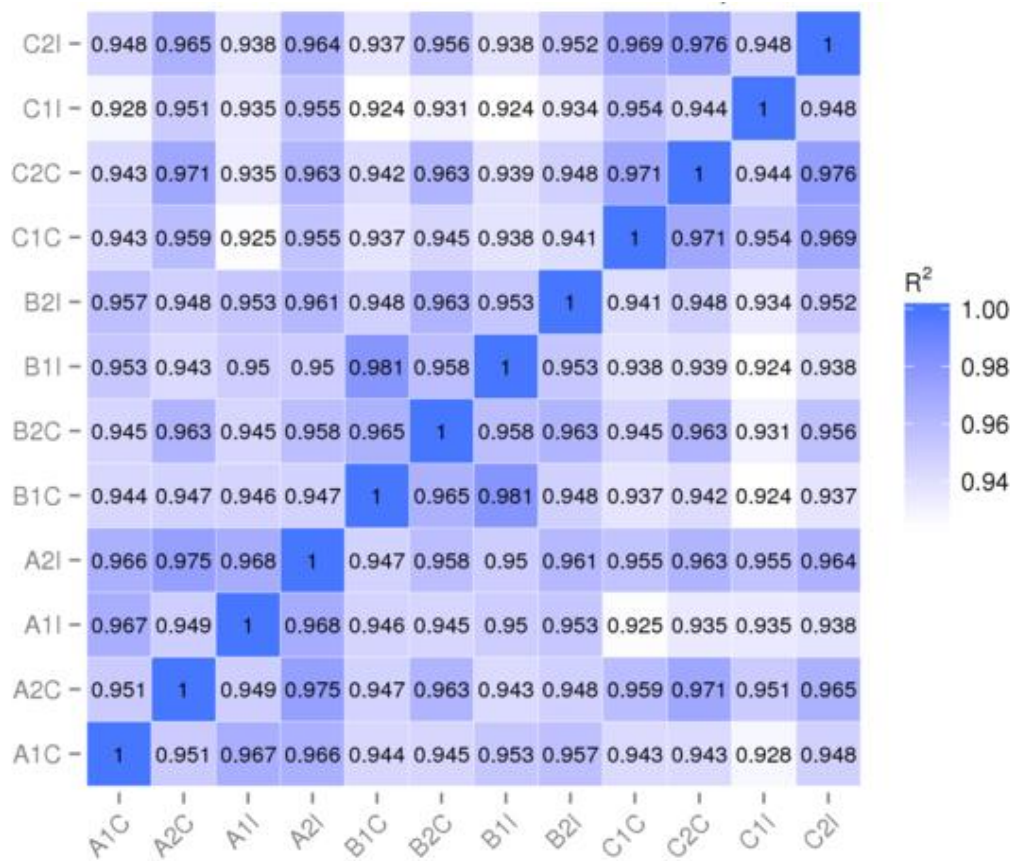


Figura 35. Matriz de correlação entre todas as amostras usando o coeficiente de correlação de Pearson.

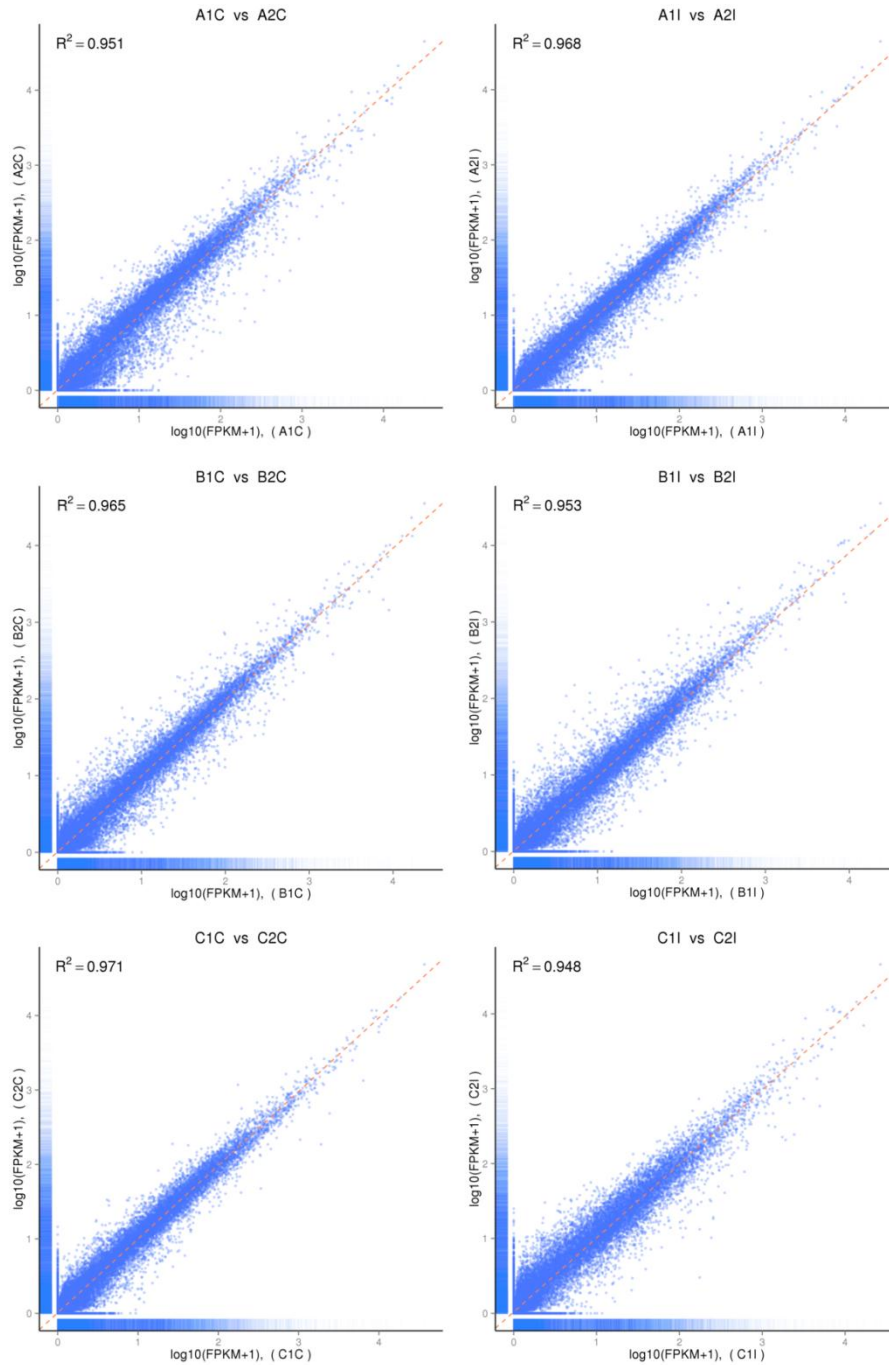


Figura 36. Correlação entre as duplicatas biológicas de cada doador baseado no nível de expressão dos genes humanos nas amostras (FPKM). Superior: doador A, células controle e infectadas; centro: doador B, células controle e infectadas; inferior: doador C, células controle e infectadas.

Para o estudo dos genes diferencialmente expressos, a normalização foi realizada usando o FPKM (número de fragmentos por Kb de sequência de transcritos por milhão de pares de bases mapeadas). As contagens de reads mapeados de um gene ou exon é proporcional ao nível de expressão do gene, dependente do comprimento do mesmo e do alcance do sequenciamento, razão pela qual a normalização se faz necessária para termos de comparação (TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009). A Tabela 10 apresenta o número de genes mapeados dentro genoma humano com as porcentagens de genes que são expressos no nível especificado. Para compreensão da Tabela 10 vale a pena reforçar que o intervalo de FPKM entre 0 - 1 representa a expressão ou não de determinado gene, por exemplo, genes que apresentam FPKM muito próximo de 0 serão considerados como não expressos, e, por outro lado, se o valor for 1 a expressão do gene será considerada baixa. O mesmo aumento dos valores demonstram incrementos nos níveis de expressão. Nessa tabela, é possível observar que mais que 78% dos genes em cada amostra apresentou FPKM entre 0 e 1, e só 3% dos genes apresentaram níveis de expressão maiores que 60.

Tabela 10. Número de genes humanos com diferentes níveis de expressão nas 12 amostras.

FPKM Interval	0~1	1~3	3~15	15~60	>60
A1C	47559(78.38%)	3055(5.04%)	4635(7.64%)	3395(5.60%)	2031(3.35%)
A2C	47923(78.98%)	2804(4.62%)	4225(6.96%)	3585(5.91%)	2138(3.52%)
A1I	47576(78.41%)	3154(5.20%)	4567(7.53%)	3317(5.47%)	2061(3.40%)
A2I	47779(78.75%)	3028(4.99%)	4373(7.21%)	3433(5.66%)	2062(3.40%)
B1C	48212(79.46%)	2819(4.65%)	4332(7.14%)	3246(5.35%)	2066(3.41%)
B2C	47985(79.09%)	2905(4.79%)	4394(7.24%)	3285(5.41%)	2106(3.47%)
B1I	47811(78.80%)	3066(5.05%)	4488(7.40%)	3268(5.39%)	2042(3.37%)
B2I	47852(78.87%)	2903(4.78%)	4664(7.69%)	3231(5.33%)	2025(3.34%)
C1C	48096(79.27%)	2946(4.86%)	4307(7.10%)	3295(5.43%)	2031(3.35%)
C2C	47892(78.93%)	2934(4.84%)	4394(7.24%)	3369(5.55%)	2086(3.44%)
C1I	48969(80.71%)	2494(4.11%)	3990(6.58%)	3244(5.35%)	1978(3.26%)
C2I	47872(78.90%)	2928(4.83%)	4431(7.30%)	3399(5.60%)	2045(3.37%)

No que diz respeito à expressão diferencial, alguns resultados preliminares já foram parcialmente analisados (Figura 37 e Figura 38). Comparando os níveis de expressão dos genes mapeados nas células infectadas e controle do doador A, foram achados 502 genes mais expressos e 681 menos expressos (Figura 37, esquerda). No caso do doador B, foram achados 422 genes mais expressos e 716 menos expressos (Figura 37, centro), enquanto que o doador C apresentou 2163 genes mais expressos e 1755 genes menos expressos (Figura 37, direita). A partir dos dados anteriores, uma análise de agrupamento foi feita (Figura 38), onde as amostras foram agrupadas por doador, isto quer dizer que o padrão de expressão diferencial entre células controle e infectadas do mesmo doador é mais parecido do que quando comparado ao padrão dos outros doadores. Curiosamente, o doador C foi agrupado fora do *cluster* formado pelos doadores A e B. Nenhum padrão aparente de expressão entre doadores e condições foi observado.

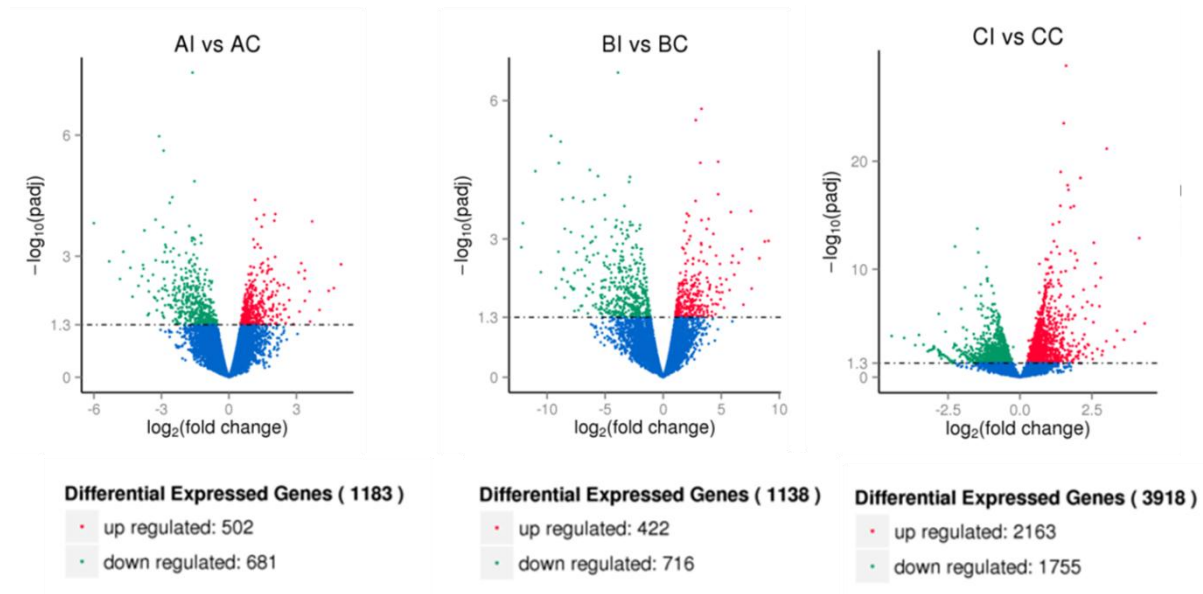


Figura 37. Vulcano plot para os genes humanos diferencialmente expressos nas amostras. No eixo X se apresenta o número de vezes que o genes foi diferencialmente expresso; no eixo Y, a significância das diferenças. Azul: genes sem diferença significativa na expressão; vermelho: genes com aumento de expressão; verde: genes com redução de expressão. Esquerda: doador A, centro: doador B, direita: doador C. C: controle, I: infectado.

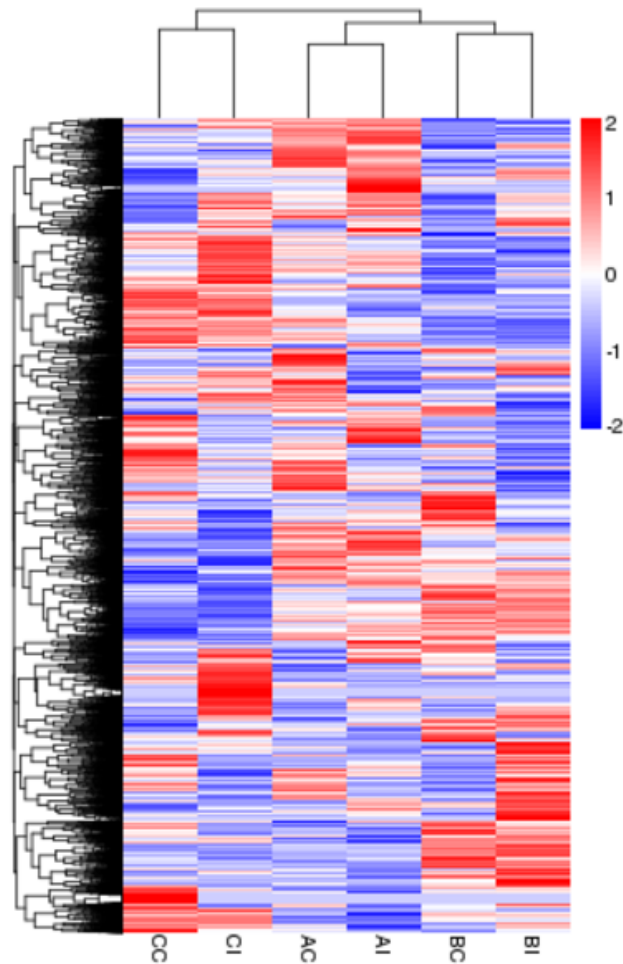


Figura 38. Análise de agrupamento dos genes humanos diferencialmente expressos nas amostras controle e infectadas dos três doadores. Vermelho: genes com aumento de expressão, em azul: genes com redução de expressão.

5.9. Revisão bibliográfica da interação DCs-*T. cruzi* em forma de manuscrito

Para o melhor entendimento do sistema DCs-*T. cruzi*, uma revisão de literatura extensiva foi desenvolvida, tendo em conta detalhes como tecido a partir do qual as DCs eram obtidas, marcadores de superfície testados, cepa avaliada, tempo de infecção, etc. Estes dados proporcionam pontos de referência e análise para o presente estudo e poderão ser usados durante a discussão dos resultados obtidos a partir do transcriptoma. Adicionalmente, nosso grupo decidiu aproveitar a revisão feita para ser publicada, pois representava um tema importante cuja recopilção e discussão serviria de guia para próximos estudos. Nesta revisão, um

ponto fraco nos estudos do sistema foi identificado e discutido: a falta de determinação das subpopulações usadas para cada experimento, pois este dado poderia ajudar a explicar com maior facilidade os resultados variáveis de cada um desses estudos, assim como à identificação de novos alvos de tratamento. O artigo (adjunto no apêndice 10.1) foi aceito para publicação na revista *Frontiers in Microbiology*.

6. DISCUSSÃO

As DCs, ponte entre as respostas inata e adaptativa e com seu potencial de modulação e polarização da imunidade, são células de suma importância durante a infecção pelo protozoário *T. cruzi* podendo ativar ou regular as respostas imunológicas para manter o equilíbrio entre a eliminação do parasito e o dano tecidual (STEINMAN, 2007). Dentro deste contexto imunológico, o objetivo deste estudo, por meio da simulação das condições naturais da infecção pelo parasito, foi obtenção do transcriptoma das DCs durante as primeiras horas de interação DCs-*T. cruzi*. Com este fim, as formas TMs de duas cepas de *T. cruzi* foram incubadas durante 12 h com DCs CD1a⁺ derivadas de monócito humano para a obtenção do RNA total das células em interação e sequenciamento do mesmo.

Na natureza, as formas TMs são depositadas, durante o repasto, na pele do vertebrado juntamente com as fezes do triatomíneo infectado, podendo alcançar as células do hospedeiro por meio de feridas, contato com mucosas ou, ainda, por consumo de alimentos contaminados (BERN, 2015; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Para a sua obtenção *in vitro*, usa-se os meios TAU e TAU3AAG, pois os mesmos recriam as condições do intestino posterior do barbeiro, local natural da diferenciação dos TMs a partir de formas epimastigotas. O meio TAU favorece a adesão dos epimastigotas à garrafa de cultura, simulando a adesão dos parasitos à camada superficial da cutícula intestinal, enquanto que o meio TAU3AAG contém os aminoácidos essenciais para a metaciclogênese (BAYER-SANTOS et al., 2013; BOKER; SCHAUB, 1984; CONTRERAS et al., 1985). No entanto, a incubação nesses meios de cultura não é garantia de alto rendimento, pois as porcentagens

de TMs obtidas foram de aproximadamente 25%. A cromatografia de troca iônica usando DEAE-celulose é comumente utilizada para separação desta forma específica do protozoário (BAYER-SANTOS et al., 2013; TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986; YOSHIDA, 1983), mas a lise com SFB ativo, metodologia aplicada neste trabalho, é também uma forma efetiva de separar os TMs das formas epimastigotas. Isso é possível porque os TMs são resistentes ao sistema complemento, característica que não é compartilhada pelas formas epimastigotas (CANAVACI et al., 2010; FERREIRA et al., 2004). No presente trabalho foi padronizado um novo protocolo de obtenção de formas TMs da cepa CL Brener, no qual a cultura de epimastigota na fase estacionária, e não na *lag*, foram usadas para o início da diferenciação. Esta modificação pode ser um dos fatores que proporcionou maior quantidade de TM e, juntamente, com a lise por SFB podem ser a explicação do incremento obtido na eficiência da metodologia.

Durante a padronização para simulação das condições naturais da infecção pelo parasito, a velocidade de crescimento, o rendimento do processo de metaciclogênese e a eficiência nas infecções das cepas G e CL Brener foram comparadas para a seleção final de qual seria a escolhida para trabalho.

Os testes realizados demonstraram baixa infectividade e pouco rendimento por parte da cepa G, precisando de mais tempo para crescimento das formas epimastigotas e para incubação no meio TAU3AAG (Tabela 2 e Tabela 3). Os TMs desta cepa apresentam baixa infectividade *in vivo*, no entanto, já foi demonstrado, *in vitro*, que as formas amastigotas possuem grande capacidade de infecção, tanto em fagócitos profissionais como em células não fagocitárias (FERNANDES et al., 2013). A baixa capacidade de infecção constatada nesta cepa se deve a sua susceptibilidade à proteção conferida pelo IFN- γ já que camundongos deficientes na produção de IFN- γ apresentavam alta parasitemia e baixo índice de sobrevivência quando inoculados com a cepa G. No entanto, os deficientes para linfócitos T CD8, T CD4 e TNF- α foram resistentes à infecção com esta cepa, reforçando o papel do IFN- γ nesta proteção (RODRIGUES et al., 2012). Outra possível justificativa para baixa infectividade da cepa é a alta expressão, em TM, das moléculas de superfície gp90, conhecido regulador negativo de infecção e

gp35/50, molécula que induz baixo fluxo de Ca^{2+} que dificulta a internalização do parasito (RUIZ et al., 1998). Além disso, a gp90 da cepa G é resistente a degradação pela mucina gástrica, o que também dificultaria a infecção via oral (COVARRUBIAS et al., 2007).

A cepa CL Brener, por outro lado, é infectiva em camundongos, tem capacidade de se estabelecer em humanos e possui tropismo para células cardíacas e musculares (ZINGALES et al., 1997). A cepa CL Brener é, ademais, uma cepa de referência e boa representante da diversidade genotípica e fenotípica exibida pela espécie devido a sua origem heterozigótica, compartilhando características de vários DTUs (BRISSE et al., 1998; ZINGALES et al., 2012). Por essas propriedades, a cepa CL Brener tem sido selecionada para vários estudos de infecção, incluindo alguns envolvendo DCs. Em 2011, Caetano e colaboradores usaram esta cepa para infecções em camundongos com a intenção de estudar o papel do reconhecimento do parasito pelos TLRs 3, 7 e 9. Neste estudo, camundongos deficientes para a proteína UNC93B1, que transporta estes TLRs desde o retículo endoplasmático até o endolisossomo, foram mais susceptíveis à infecção e suas DCs não apresentaram boa produção de IL-12p40 (CAETANO et al., 2011). O genoma completo, depurado e anotado da cepa CL Brener encontra-se disponível, contendo aproximadamente 22570 genes codificadores de proteínas preditos, o que facilita a montagem final das sequências para o transcriptoma proposto neste trabalho. No entanto, 50% do genoma da cepa consiste em sequências repetitivas e genes das famílias das moléculas de superfície. Estas regiões repetitivas são um desafio durante a montagem e anotação de sequências (EL-SAYED et al., 2005). Graças a este genoma, foram desenvolvidos estudos sobre o reconhecimento do *T. cruzi* pela célula hospedeira com fortes bases bioinformáticas. Um screening sobre o genoma da cepa CL Brener revelou regiões com potencial de serem reconhecidas por TLR9 dentro do fagolisossoma (BARTHOLOMEU et al., 2008). Este receptor é responsável pelo reconhecimento de ácidos nucleicos de vírus, bactérias e protozoários após certa degradação destes organismos por fagocitose (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). O motivo CpG (as regiões potencias) foi testado então em células HEK transfectadas com TLR9, mostrando

interação com o receptor e estimulando a produção de proteínas pró-inflamatórias (BARTHOLOMEU et al., 2008). Nos testes desenvolvidos durante a padronização da infecção, a cepa CL Brener mostrou-se tão infectiva quanto à cepa G, mas a maior quantidade de formas TMs obtidas em menor tempo foi a razão pela qual a cepa CL Brener foi a escolhida para realizar o transcriptoma (Tabela 2 e Tabela 3).

As DCs derivadas de monócito são precursoras da subpopulação de DCs inflamatórias, células capazes de responder com eficácia a infecções já que estimulam linfócitos T CD4⁺ virgens, apresentam antígenos aos linfócitos T CD8⁺ por apresentação cruzada, estimulam respostas Th17 e produzem IL-1, -12, -6, e -23 e TNF- α , todas citocinas pró-inflamatórias. Esta subpopulação humana expressa os marcadores de superfície CD1c, CD1a, CD206, Fc ϵ R1 e SIRPa (COLLIN; MCGOVERN; HANIFFA, 2013). É sabido que DCs CD1a⁻ derivadas de monócito não produzem IL-12 e favorecem respostas do tipo Th2 (CHANG; WRIGHT; PUNNONEN, 2000) que não é o ideal para o estudo, pois a simulação de uma infecção natural fazia parte do objetivo, e, classicamente, um padrão de inflamação e resposta Th1 é visto no começo da infecção (MACHADO et al., 2013). Por isso a presença deste marcador é importante e foi verificada durante a padronização dos experimentos. A molécula de superfície CD1a está presente também em células de Langerhans e DCs de tecidos mucosos (SEGURA, 2016), ou seja, as células escolhidas para este estudo compartilhariam, em certa medida, um fenótipo similar com estas populações. Células de Langerhans encontram-se associadas a tecidos epiteliais estratificados como a pele, e possuem capacidade de se diferenciar para migrar até os linfonodos (DUBSKY et al., 2005). Este tipo celular, junto com as células associadas a tecidos mucosos, seriam provavelmente as primeiras DCs em ter contato com o *T. cruzi* como já demonstrado para o protozoário *Leishmania* (LOCKSLEY et al., 1988), mas a dificuldade de se obter estas subpopulações nas quantidades necessárias para um estudo como o desenvolvido no presente trabalho, torna as DCs CD1a⁺ derivadas de monócito uma escolha pertinente.

A definição clara da subpopulação das DCs usadas em cada trabalho é de suma importância, dado que estes subgrupos celulares exibem características morfológicas e funcionais diferentes e produção diferenciada de citocinas, fatores

que poderiam desencadear reações variáveis no sistema imunológico (SEGURA, 2016). Porém, uma revisão atual da literatura no assunto revelou esta deficiência nos estudos desenvolvidos para a interação DC-*T. cruzi*, onde a grande maioria deles foi realizada no modelo murino e sem as especificações da(s) subpopulação(ões) usadas. Igualmente, os sete estudos desenvolvidos no modelo humano não apresentam os detalhes necessários para a determinação do subgrupo de DCs estudado, com exceção do trabalho do grupo de Brodskyn em 2002, que usou a mesma subpopulação da presente dissertação (BRODSKYN et al., 2002; GIL-JARAMILLO et al., 2016). É curioso ver essa falência na interação DCs-*T. cruzi* dado que outros sistemas têm começado a dar a importância devida ao papel exercido por cada subpopulação durante uma infecção. Na interação DCs-*Leishmania*, por exemplo, foi reportada uma forte interação entre células de Langerhans e *L. amazonensis* que bloqueia os fatores desencadeantes de uma resposta próinflamatória, enquanto que *L. braziliensis* apresenta interação preferencial com DCs dérmicas que favorecem o desenvolvimento de uma resposta Th1 eficiente (CARVALHO et al., 2016).

A separação magnética usando colunas com microesferas associadas a anticorpos é prática comum para a obtenção de determinada população celular já que permite a obtenção de 80 a 90% das células desejadas (BRODSKYN et al., 2002; CHANG; WRIGHT; PUNNONEN, 2000; OUAISSI et al., 2002; PONCINI et al., 2015). As colunas utilizadas no presente trabalho podem ser carregadas com, no máximo, 2×10^8 PBMCs (MILTENYI BIOTEC INC., [s.d.]) permitindo uma recuperação de monócitos de aproximadamente 10% das células iniciais totais. Com essa capacidade máxima, a quantidade de células CD14⁺ obtidas era limitante e ultrapassar esta saturação implicava em entupimentos da coluna, o que obrigou o uso de várias delas simultaneamente. Isto, somado à perda de células por adesão à placa ou por morte, dificultou significativamente a obtenção da quantidade final de material para a extração de RNA e para o sequenciamento e montagem do transcriptoma.

Com o intuito de confirmar mudanças em padrões de expressão gênica das DCs após interagirem com o *T. cruzi*, a expressão das moléculas HLA-DR e CD1a

foi quantificada por citometria de fluxo tanto nas células controle como infectadas após 12 h de interação (mesmo tempo usado para o transcriptoma). A primeira é necessária para a apresentação de antígenos e sua expressão parece ser modulada por diferentes cepas do parasito após interação com diferentes populações de DCs (ALBA SOTO et al., 2003, 2010; BRODSKYN et al., 2002; PLANELLES et al., 2003; VAN OVERTVELT et al., 1999). Contudo, neste trabalho, a expressão deste complexo não mostrou diferença significativa entre as condições, mas uma tendência à sua diminuição pode ser observada nas células infectadas (Figura 19). A variação da expressão da molécula HLA-DR entre os doadores pode ser o motivo pelo qual não se obteve resultados conclusivos, um maior número de réplicas biológicas poderia solucionar esta dificuldade. Por outro lado, a expressão da CD1a, molécula exclusiva de DCs, foi estudada para observar a estabilidade do fenótipo obtido após a diferenciação. Não houve diferença significativa entre as condições estudadas, mas observando cada um dos experimentos separadamente, a quantificação desta molécula apresenta uma tendência ainda mais marcante à diminuição. Cabe anotar que as moléculas tipo CD1 são usadas pelas DCs como uma via alternativa de apresentação de antígenos lipídicos ou glicolipídicos de origem endógena ou exógena (LIPSCOMB; MASTEN, 2002) e uma redução na sua expressão representaria uma provável modulação por parte do parasito.

Outro parâmetro observado para corroborar a interação entre o parasito e sua célula hospedeira foi o nível de ativação/maturação das DCs postas em contato com o *T. cruzi*. O processo de maturação das DCs implica a diferenciação desde células especializadas na captura de antígenos até células especializadas em apresentação de antígenos e estimulação dos linfócitos T. DCs maduras apresentam uma morfologia característica, com extensões citoplasmáticas e estruturas (lisossomas, endossomas e grânulos) relacionadas com a internalização e processamento de antígenos em maior quantidade (O'NEILL; ADAMS; BHARDWAJ, 2004). Por análise em microscópio óptico, foi possível observar que as DCs, após 12 horas de incubação com o parasito, apresentavam mudanças morfológicas comparáveis à de células ativadas, mais um indício da modulação da expressão gênica provocada pelo *T. cruzi* (Figura 20 e Figura 22)

As taxas de infecção e o número de amastigotas/DC infectada determinados neste trabalho serão de grande utilidade no momento da interpretação dos dados provenientes do transcriptoma, nos quais, possivelmente, serão observadas as diferenças de expressão nos genes da DC envolvidos com a fagocitose e/ou nos genes do parasito que induzem a sua própria fagocitose. A taxa de infecção média obtida nos doze ensaios foi de ~39% com variações consideráveis entre os doadores (Figura 21). A primeira vista, estes valores podem parecer baixos para a finalidade do trabalho que é a comparação entre DCs infectadas e não infectadas, mas, levando em conta o MOI 1:10 estabelecido, o curto tempo de interação e a capacidade das DCs de lisar os parasitos e processar seus antígenos para a apresentação, a quantidade de amastigotas intracelulares detectados está dentro do esperado. Estudos já realizados em DCs derivadas de monócitos humanos apresentaram taxas de infecção variáveis, por exemplo, a taxa de infecção de tripomastigotas derivados de cultura após incubação durante 24 h com DCs foi entre 40 e 80% para o MOI 1:10, 45 e 90% para o MOI 1:20 e 70% para o MOI 1:30 (VAN OVERTVELT et al., 1999, 2002). Adicionalmente, Rodríguez e colaboradores também acharam uma baixa taxa de infecção em DCs humanas, propondo que DCs madura perdem capacidade de fagocitose para se especializar na apresentação de antígenos (RODRIGUEZ; CARLIER; TRUYENS, 2012b). O aumento da relação inicial DCs:TMs para realizar as infecções foi descartado porque os epimastigotas remanescentes do processo de diferenciação podem prejudicar a interação das formas TMs com as DCs, resultando em uma taxa ainda mais baixa de infecção (Tabela 3).

No caso da taxa de infecção individual, as DCs originadas dos monócitos do doador C parecem ser mais resistentes à infecção pelo protozoário, resultado que poderá ser mais bem compreendido após análise completa do transcriptoma da interação.

A média de 2,4 amastigotas/DC infectada obtida após os doze ensaios de infecção aparentam estar de acordo com a literatura. Van Overvelt e colaboradores em 1999, usando DCs derivadas de monócitos, tripomastigotas derivados de cultura da cepa Tehuantepec e MOI 1:10, obtiveram 4 - 10 amastigotas/DC infectada após

24 h de infecção (VAN OVERTVELT et al., 1999). O presente trabalho utilizou 12 h como tempo para permitir a interação entre as células e utilizou também outra cepa deste parasito, justificativas pertinentes para as diferenças encontradas entre os resultados.

Ainda sobre o mesmo tema, ensaios de imunofluorescência foram realizados para calcular as taxas de infecção e os amastigotas/DC. Com esta técnica, a taxa média de infecção foi ~29,0% e cada DC apresentou ~1,7 amastigotas intracelulares após 24 h de infecção. A diminuição em ambos os parâmetros pode ter duas explicações que não são mutuamente excludentes. Tecnicamente, o protocolo de imunofluorescência possibilita diferenciar claramente os parasitos internalizados dos que estão fora da célula, o que já não pode ser feito com exatidão na microscopia de luz. Por tanto, é possível que menos parasitos extracelulares sejam quantificados de forma equivocada por ensaios de imunofluorescência. Por outra parte, as DCs podem ter degradado parasitos durante as 12 h adicionais de incubação, o que também explicaria a redução da taxa de infecção.

Outra vantagem dos ensaios de imunofluorescência consiste na possibilidade da quantificação de DCs ativadas; desta forma eliminam-se as subjetividades que podem se apresentar na avaliação por microscopia de luz. Com este fim, o programa ImageJ foi usado para calcular a média de fluorescência/DC. Este cálculo foi feito dividindo a fluorescência total emitida para marcação para faloidina pelo número de núcleos de células humanas presentes na imagem, relação que permitiu representar o nível de remodelamento das DCs nas primeiras horas de infecção. Outros estudos tem adotado a mesma técnica de quantificação para analisar eventos com alteração no citoesqueleto (SPRACKLEN et al., 2014).

Nos testes de fluorescência desenvolvidos, as DCs incubadas com as formas TMs, na ausência de LPS, apresentaram maior ativação nos tempos 0, 2 e 4 h quando comparadas com as células controle, para os outros tempos não houve diferenças significativas. É possível que os mecanismos de imunoregulação do *T. cruzi* apresentem um tempo de latência antes de serem ativados, o que levaria ao atraso na maturação das DCs que será sobrepujado mais tardiamente (6 h pós-infecção segundo os resultados obtidos). Este retardo na ativação dos mecanismos

de imunomodulação e evasão pode ter relação com a expressão policistrônica dos genes do parasito. Curiosamente, os tripanossomatídeos exibem mecanismos de expressão gênica únicos, como a transcrição policistrônica, o trans-splicing, a síntese de mRNA por meio da RNA polimerase I e a edição do RNA sintetizado, sem evidência de regulação para o início da transcrição (EKANAYAKE et al., 2011; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010). Por tanto, o processo de modulação na expressão dos genes dos parasitos envolvidos na evasão do sistema imune poderia demorar um pouco mais que a ativação inicial das DCs, tendo como resultado uma ativação normal das DCs nas primeiras etapas da interação e supressão em um tempo maior após 4 h de interação.

Por outra parte, a incubação das DCs, na presença de LPS, não apresentou nenhum padrão congruente de ativação para as primeiras 4 h, mas provocou o nível de ativação das células a partir das 6 h. Comumente, células de mamífero são previamente incubadas por no mínimo 4 h com o LPS para desencadear a ativação (SHEIKH et al., 2014; THOMPSON et al., 2010), mas o tempo de incubação prévia adotado para este estudo foi de 30 min. Isto poderia explicar porque nos tempos de 6 e 24 h houve maior ativação das DCs. De maneira interessante, alguns estudos mostraram a inibição da maturação das DCs mediada pelas cepas Tehuantepec, G e Y revertendo o efeito do LPS (BRODSKYN et al., 2002; VAN OVERTVELT et al., 2002), mas isto não foi visto durante os ensaios de imunofluorescência, talvez seja por conta da cepa utilizada ou diferença de metodologia entre os testes, pois o grau de maturação das DCs dos exemplos provenientes da literatura foi medido por citometria de fluxo para marcadores de superfície próprios da DC madura.

Um resultado muito interessante obtido durante os ensaios de imunofluorescência foi visto no tempo de incubação de 24 h. Ali, a interação das DCs com as formas TMs, na presença de LPS, apresentou uma ativação significativamente maior comparando com as células controle ($p < 0,0001$), porém a incubação na presença de LPS com as formas TMs previamente inativadas não teve diferença significativa com respeito ao seu controle. Estes resultados indicam uma provável indução à fagocitose por parte do parasito, pois as formas inativadas não induzem remodelamento de actina nas DCs na mesma proporção que as

formas TMs íntegras. Este tipo de indução ativa de fagocitose pelo patógeno já foi visto em formas amastigotas da cepa G na infecção de células não fagocitárias. Porém, fagócitos profissionais, como os macrófagos, internalizaram amastigotas vivos ou inativados na mesma proporção (FERNANDES et al., 2013). Por outro lado, já é sabido que as formas TMs são indutoras da sua própria fagocitose por fagócitos profissionais, principalmente pela atividade da molécula gp82 que induz fluxo de cálcio, promovendo a internalização do parasito. (BARRIAS; DE CARVALHO; DE SOUZA, 2013; DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; ROMANO et al., 2012). Esta molécula poderia continuar intacta após inativação do parasito mediante exposição a luz UV, tendo ainda capacidade de interação com seu receptor na célula hospedeira, mas a passagem do sinal, após a interação, não aconteceu dado o estado do parasito. Isto poderia explicar a interrupção da ativação de DCs observadas nas formas inativadas. Por tanto, a hipótese de uma indução ativa para a própria fagocitose do *T. cruzi* é consistente e os dados obtidos mediante o transcriptoma poderão identificar novas moléculas envolvidas em esta característica do parasito.

É importante ressaltar que não houve diferença significativa na ativação das DCs, na ausência de LPS, durante 24 h quando incubadas com as formas TMs vivas ou inativadas, isso pode indicar a necessidade de uma célula ativada para a internalização das formas, talvez a expressão diferencial de receptores ou outras moléculas intracelulares seja requerida para a fagocitose “pedida” pelo parasito. Além disso, observando as taxas de infecção obtidas nestas últimas duas condições (sem LPS/24h), o parasito inativado apresentou uma porcentagem de infecção menor em células com nível de ativação menor. Este resultado reforça a ideia anterior sobre o papel da ativação das DCs durante a indução da internalização por parte das formas TMs do *T. cruzi*.

A garantia do sucesso de um transcriptoma está diretamente relacionada à qualidade do material enviado para o sequenciamento e, por este motivo, múltiplos controles desta qualidade foram realizados em diferentes pontos do trabalho. O número de RIN recomendado para o sequenciamento pela plataforma Illumina é de mínimo 8 e a quantidade de material inicial deve ser de 0,1 a 4 µg de RNA total



(ILLUMINA, 2013). As amostras B2I, B1I e C2I apresentaram número de RIN menor do que o recomendado, mas foram essas as amostras que também apresentaram bandas características do RNA do parasito no gel gerado pelo Bioanalyzer, provavelmente essas bandas interferiram no cálculo do RIN, dificultando a correta identificação das bandas correspondentes às subunidades ribossomais humanas. Neste caso, o baixo número de RIN representou a alta quantidade de RNA proveniente do parasito em relação ao da célula humana. Posteriormente, o controle de qualidade das bibliotecas das doze amostras mostrou a ligação correta dos adaptadores para o sequenciamento, o tamanho adequado do fragmento e a concentração obtida de cada um deles.

Após reanálise e comprovação da qualidade do material pela empresa contratada, o sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina HiSeq 2500, usando duas lanes para a obtenção de reads de 150 pb na configuração *paired-end* com resultado final de aproximadamente 22.900.000 reads limpos/amostra. Em 2015, Kaakoush e colaboradores realizaram o transcriptoma de uma linhagem de macrófagos humanos infectados por *Campylobacter concisus* com cerca de 29.723.079 *paired-end* reads/amostra. De maneira interessante, este trabalho identificou outros tipos de RNA além do mRNA que parecem ter papel na resposta imune do hospedeiro humano (KAAKOUSH et al., 2015). Outro transcriptoma recentemente publicado foi o do *T. cruzi* durante a infecção em fibroblastos humanos (LI et al., 2016). Este trabalho foi desenvolvido usando tripomastigotas derivados de cultura da cepa Y para o estudo dos tempos 6, 12, 24, 48 e 72 h de infecção. Três réplicas biológicas de fibroblastos de linhagem foram sequenciadas com a plataforma Illumina HiSeq 1000, obtendo 2,7 bilhões de *paired-end* reads de 101 pb de comprimento no total (77 milhões de reads/amostra). Apesar da grande diferença no número de reads quando se compara este último trabalho e o aqui apresentado vale destacar que este último propôs a montagem de um transcriptoma a partir da simulação da infecção natural, usando TMs e DCs, células que não se dividem em cultura e não são provenientes de linhagem. No entanto, o número de reads por amostra obtido pode ser uma desvantagem na hora de identificar genes de baixa expressão.

Cabe ressaltar que a análise de correlação das duplicatas demonstrou a boa qualidade das réplicas biológicas realizadas o que permite chegar à conclusões contundentes baseadas na montagem do transcriptoma diferencial. Réplicas biológicas são realizadas para verificar que o evento visto durante um experimento não é simplesmente aleatório e será obtido sempre que as mesmas condições forem aplicadas, permitindo a determinação de significância entre genes diferencialmente expressos e capturando a variabilidade biológica do sistema. Por tanto, a correlação ótima ($R^2 \sim 1$) entre réplicas biológicas se traduz em resultados confiáveis e representativos (BLAINEY; KRZYWINSKI; ALTMAN, 2014; SCHURCH et al., 2016).

Por último, quando culminado em trabalhos posteriores, este transcriptoma diferencial representará o primeiro estudo da genômica funcional de DCs humanas durante a infecção pelo *T. cruzi*, recriando as condições do início de uma infecção natural, assim como o primeiro em estudar a expressão gênica do parasito ao infectar células do sistema imune humano. Tudo isso engrandece os resultados atuais e futuros e, tudo indica que bons achados poderão ser obtidos a partir dos dados finais, incluindo novos alvos para o tratamento da doença.

7. CONCLUSÃO

Ainda há muito a ser investigado antes do completo entendimento do papel da DC na indução da imunidade contra o *T. cruzi*. Além disso, o conhecimento atual sobre essa interação se baseia principalmente na regulação, diferenciação e função das linhagens de DCs de camundongos. No caso de humanos, a dificuldade em isolar os subgrupos de DCs provenientes dos diferentes tecidos do organismo ainda necessita ser transposta para, só então, a compreensão, em nível molecular, do papel dessas células na infecção pelo protozoário seja aprofundada, o que talvez possa aumentar as chances de desenvolver vacinas para a prevenção ou



tratamento da doença de Chagas. Por tanto, o presente trabalho poderá ajudar na ampliação do conhecimento atual dentro do modelo humano.

O presente estudo demonstrou qualidade satisfatória no que diz respeito aos resultados preliminares do transcriptoma e sua continuação é promissora para a identificação de novos genes de interesse. Além disso, este é o primeiro estudo da genômica funcional de DCs humanas durante a infecção pelo *T. cruzi*, recriando as condições do início de uma infecção natural, assim como o primeiro em estudar a expressão gênica do parasito ao infectar células do sistema imune humano.

8. PERSPECTIVAS

Dentro do tema **Modulação da genômica funcional de células dendríticas por *T. cruzi***, a perspectiva em curto prazo é:

- Montagem do transcriptoma de todos os doadores na condição infectado/não infectado;
- Análise de expressão diferencial entre as amostras.

De posse destes resultados, as perspectivas em médio/longo prazo são:

- Selecionar genes de interesse na relação parasito-hospedeiro e na regulação da resposta imune inata, incluindo aqueles potencialmente associados à apresentação profissional de antígenos aos linfócitos T;
- Caracterizar a expressão diferencial desses genes em DC e/ou parasitos pela técnica de PCR em tempo real;
- Clonar e produzir as proteínas recombinantes correspondentes (particularmente para novos genes), adquirir ou produzir anticorpos específicos;
- Empregar estes anticorpos específicos para estudar a expressão (fenotipagem) das correspondentes proteínas durante a interação DC-parasito.

9. REFERÊNCIAS

ADAMS, J. U. Transcriptome: Connecting the Genome to Gene Function. **Nature Education**, v. 1, n. 1, 2008.

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. **Infection and immunity**, v. 71, n. 3, p. 1194–9, 2003.

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. 7407–7413, 2010.

ALVAREZ, J. M. et al. Chagas Disease: Still Many Unsolved Issues. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p. 912965, 2014.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Opinion: The Trypanosoma cruzi–host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 819–823, 2005.

ANGHEBEN, A. et al. Chagas disease in Italy : breaking an epidemiological silence. **Eurosurveillance**, v. 16, n. 37, p. 1, 2011.

ANTAS, P. R. Z. et al. Early, intermediate, and late acute stages in Chagas' disease: A study combining anti-galactose IgG, specific serodiagnosis, and polymerase chain reaction analysis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p. 308–314, 1999.

ARGIBAY, P. F. et al. Trypanosoma cruzi surface mucin TcMuc-e2 expressed on higher eukaryotic cells induces human T cell anergy, which is reversible. **Glycobiology**, v. 12, n. 1, p. 25–32, 2002.

BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of Trypanosoma cruzi. **Cell structure and function**, v. 20, n. 4, p. 275–284, 1995.



- BARRIAS, E. S.; DE CARVALHO, T. M. U.; DE SOUZA, W. Trypanosoma cruzi: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. **Frontiers in immunology**, v. 4, n. August, p. 186, 2013.
- BARTHOLOMEU, D. C. et al. Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with Trypanosoma cruzi. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 2, p. 1333–1344, 2008.
- BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2013.
- BASTOS, C. J. C. et al. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in Northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, 2010.
- BAYER-SANTOS, E. et al. Expression and cellular trafficking of GP82 and GP90 glycoproteins during Trypanosoma cruzi metacyclogenesis. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 127, 2013.
- BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **The New England journal of medicine**, v. 364, p. 2527–2534, 2011.
- BERN, C. Chagas' Disease. **The New England journal of medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.
- BLAINEY, P.; KRZYWINSKI, M.; ALTMAN, N. Replication: Quality is often more important than quantity. **Nature methods**, v. 11, n. 9, p. 879–880, 2014.
- BOGLIOLO, A. R.; LAURIA-PIRES, L.; GIBSON, W. C. Polymorphisms in Trypanosoma cruzi: evidence of genetic recombination. **Acta tropica**, v. 61, p. 31–40, 1996.
- BOKER, C. A.; SCHAUB, G. A. Scanning electron microscopic studies of Trypanosoma cruzi in the rectum of its vector Triatoma infestans. **Z.Parasitenkd.**, v. 70, n. 4, p. 459–469, 1984.
- BONALDO, M. C. et al. Cell-substrate adhesion during Trypanosoma cruzi differentiation. **Journal of Cell Biology**, v. 106, n. 4, p. 1349–1358, 1988.
- BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune pathogenesis of chagas heart disease: Looking back, looking ahead. **American Journal of Pathology**, v. 185, n. 6, p. 1537–1547, 2015.



BOUSSIOTIS, V. A. et al. The role of B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down-regulation of the immune response. **Immunological Reviews**, v. 153, p. 5–26, 1996.

BRISSE, S. et al. A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 92, n. 2, p. 253–263, 1998.

BRODSKYN, C. et al. Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* Interfere with Macrophages and Dendritic Cell Responses. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3736–3743, 2002.

BUSCAGLIA, C. A et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 229–236, 2006.

CAETANO, B. C. et al. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for Toll-Like Receptor 7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v. 187, n. 4, p. 1903–1911, 2011.

CAMARGO, M. M. et al. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. **American Associations of Immunologists**, n. December 2015, p. 6131–6139, 1997.

CANAVACI, A. M. C. et al. In vitro and in vivo high-throughput assays for the testing of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 7, p. e740, 2010.

CAROD-ARTAL, F. J.; VARGAS, A. P.; FALCAO, T. Stroke in asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-infected patients. **Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)**, v. 31, n. 1, p. 24–28, 2011.

CARRASCO, H. J. et al. Geographical distribution of *trypanosoma cruzi* genotypes in venezuela. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. e1707, 2012.

CARVALHO, A. K. et al. Differential Recruitment of Dendritic Cells Subsets to Lymph Nodes Correlates with a Protective or Permissive T-Cell Response during *Leishmania* (*Viannia*) *Braziliensis* or *Leishmania* (*Leishmania*) *Amazonensis* Infection. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1–12, 2016.



- 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** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1909.
- CHANG, C. C.; WRIGHT, A.; PUNNONEN, J. Monocyte-derived CD1a⁺ and CD1a⁻ dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation. **Journal of immunology**, v. 165, n. 7, p. 3584–3591, 2000.
- CHAPMAN, M. D. et al. Trypanosoma cruzi from paraguayan Chaco: Isoenzyme profiles of strains isolate at Makthlawaiya. **J. Protozool**, v. 31, n. 3, p. 482–486, 1984.
- CLOONAN, N.; GRIMMOND, S. M. Transcriptome content and dynamics at single-nucleotide resolution. **Genome Biology**, v. 9, n. 9, p. 234, 2008.
- COLLIN, M.; MCGOVERN, N.; HANIFFA, M. Human dendritic cell subsets. **Immunology**, v. 140, n. 1, p. 22–30, 2013.
- CONTRERAS, V. T. et al. In vitro differentiation of Trypanosoma cruzi under chemically defined conditions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, n. 3, p. 315–327, 1985.
- CORINTI, S. et al. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 7, p. 4312–8, 2001.
- COURA, J. R. et al. **Control of Chagas disease** World Health Organization - **Technical Report Series**. [s.l.: s.n.].
- COURA, J. R.; ALBAJAR-VIÑAS, P. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 14–21, 2010.
- COVARRUBIAS, C. et al. Interaction with host factors exacerbates Trypanosoma cruzi cell invasion capacity upon oral infection. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 14, p. 1609–1616, 2007.
- CUNHA-NETO, E. et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant Trypanosoma cruzi antigen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**, v. 92, n. 8, p. 3541–3545, 1995.
- CURA, C. I. et al. Trypanosoma cruzi I genotypes in different geographic regions



and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced leader genes. **Int J Parasitol.**, v. 40, n. 14, p. 1599–1607, 2011.

DA COSTA, T. A. et al. Immunomodulation by *Trypanosoma cruzi*: Toward Understanding the Association of Dendritic Cells with Infecting Tc1 and Tc11 Populations. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

DA SILVA, V. L. C.; LUNA, E. J. DE A. Prevalência de infecção pelo *T. cruzi* em doadores de sangue nos hemocentros coordenadores do Brasil em 2007. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 22, n. 1, p. 103–110, 2013.

DE LANA, M.; MARQUES, E.; MACHADO, D. M. **Biology of Trypanosoma cruzi and Biological Diversity**. First Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2010.

DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitology research**, v. 88, n. 12, p. 1013–1025, 2002.

DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. May, p. 89–100, 2009.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1–18, 2010.

DE SOUZA, W.; ULISSES DE CARVALHO, T. M. Active penetration of *Trypanosoma cruzi* into host cells: Historical considerations and current concepts. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. JAN, p. 2–4, 2013.

DEANE, M. P.; LENZI, H. L.; JANSEN, A. **Trypanosoma cruzi: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis***. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1984.

DELAPORTE, F. Romana's Sign. **Journal of the History of Biology**, v. 30, n. 3, p. 357–366, 1997.

DEMANGEL, C.; BERTOLINO, P.; BRITTON, W. J. Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 4, p. 994–1002, 2002.

DEN HAAN, J. M. M.; ARENS, R.; VAN ZELM, M. C. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells.

Immunology letters, v. 162, n. 2 Pt B, p. 103–12, 2014.

DUBSKY, P. et al. Human dendritic cell subsets for vaccination. **Journal of Clinical Immunology**, v. 25, n. 6, p. 551–572, 2005.

DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 208–218, 2009.

DUTRA, W. O. et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunol.**, v. 36, n. 8, p. 377–387, 2015.

EBSTEIN, F. et al. Maturation of human dendritic cells is accompanied by functional remodelling of the ubiquitin-proteasome system. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 5, p. 1205–1215, 2009.

EKANAYAKE, D. K. et al. Epigenetic regulation of transcription and virulence in *Trypanosoma cruzi* by O-linked thymine glucosylation of DNA. **Molecular and cellular biology**, v. 31, n. 8, p. 1690–1700, 2011.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, p. 409–415, 2005.

ERDMANN, H. et al. Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 1600–1611, 2009.

FERNANDES, M. C. et al. Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 977–991, 2013.

FERREIRA, V. et al. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 5, p. 3042–3050, 2004.

FRAGATA-FILHO, A. A. et al. Evaluation of Parasiticide Treatment with Benznidazol in the Electrocardiographic, Clinical, and Serological Evolution of Chagas Disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004508, 2016.

FRANZÉN, O. et al. Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* i Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. 1–9, 2011.



- GARBER, M. et al. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. **Nature methods**, v. 8, n. 6, p. 469–477, 2011.
- GIL-JARAMILLO, N. et al. In Press: Dendritic cells: a double-edged sword in immune responses during Chagas Disease. **Frontiers in Microbiology**, 2016.
- GRAVINA, H. D. et al. Differential Use of TLR2 and TLR9 in the Regulation of Immune Responses during the Infection with *Trypanosoma cruzi*. v. 8, n. 5, 2013.
- GUIMARO, M. C. et al. Inhibition of Autoimmune Chagas-Like Heart Disease by Bone Marrow Transplantation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 2014.
- HABERLAND, A. et al. Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC**, v. 51, n. 2, p. 271–94, 2013.
- HALL, B. F.; FURTADO, G. C.; JOINER, K. A. Characterization of host cell-derived membrane proteins of the vacuole surrounding different intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* in J774 cells. Evidence for phagocyte receptor sorting during the early stages of parasite entry. **J Immunol**, v. 147, n. 12, p. 4313–4321, 1991.
- HANIFFA, M. et al. Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. **The Journal of experimental medicine**, v. 206, n. 2, p. 371–385, 2009.
- HANIFFA, M. et al. Human Tissues Contain CD141^{hi} Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103⁺ Nonlymphoid Dendritic Cells. **Immunity**, v. 37, n. 1, p. 60–73, 2012.
- HIRATA, N. et al. Selective synergy in anti-inflammatory cytokine production upon cooperated signaling via TLR4 and TLR2 in murine conventional dendritic cells. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 10, p. 2734–2742, 2008.
- HOFF, R. et al. *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease. **N Engl J Med**, p. 604–606, 1978.
- ILLUMINA. **TruSeq® Stranded mRNA Sample Preparation Guide** San Diego, 2013. Disponível em: <www.illumina.com>
- JANEWAY, C. A. et al. **Immunobiology: The immune system in health and disease**. 4th. ed. [s.l.] Garland, 2001.



- KAAKOUSH, N. O. et al. Transcriptomic and Proteomic Analyses Reveal Key Innate Immune Signatures in the Host Response to the Gastrointestinal Pathogen *Campylobacter concisus*. **Infection and immunity**, v. 83, n. 2, p. 832–45, 2015.
- KIERSZENBAUM, F.; MORETTI, E.; SZTEIN, M. B. Molecular basis of *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression. Altered expression by activated human lymphocytes of molecules which regulate antigen recognition and progression through the cell cycle. **Biol Res**, v. 26, n. 1, p. 197–207, 1993.
- KIPNIS, T. L.; CALICH, V. L.; DA, S. W. D. Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. **Parasitology**, v. 78, n. 1, p. 89–98, 1979.
- KIRCHER, M.; KELSO, J. High-throughput DNA sequencing - Concepts and limitations. **BioEssays**, v. 32, n. 6, p. 524–536, 2010.
- LEWIS, K. L.; REIZIS, B. Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 8, p. a007401, 2012.
- LI, Y. et al. Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005511, 2016.
- LIPSCOMB, M. F.; MASTEN, B. J. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 97–130, 2002.
- LOCKSLEY, R. M. et al. Cutaneous host defense in leishmaniasis: Interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 2, p. 336–342, 1988.
- 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. 753–770, 2013.
- MANCHOLA, N. C. et al. Biochemical Characterization of Branched Chain Amino Acids Uptake in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 0, p. 1–10, 2015.
- MANNE-GOEHLER, J.; REICH, M.; WIRTZ, V. Access to Care for Chagas Disease in the United States. **Am J Trop Med Hyg**, 2015.
- MARTÍNEZ-CALVILLO, S. et al. Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.



- MCGOVERN, N.; CHAN, J. K. Y.; GINHOUX, F. Dendritic cells in humans--from fetus to adult. **International immunology**, v. 27, n. 2, p. 65–72, 2015.
- MELÉ, M. et al. The human transcriptome across tissues and individuals. **Science**, v. 348, n. 6235, p. 660–665, 2015.
- MILES, M.; FELICIANGLI, M.; DE ARIAS, A. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. **BMJ**, p. 1444–1448, 2003.
- MILTENYI BIOTEC INC. **Monocyte Isolation Kit II human**. Disponível em: <www.miltenyibiotec.com>. Acesso em: 20 jun. 2016.
- MINISTÉRIO DE SAÚDE. Boletim Epidemiológico. **Secretaria de Vigilância em saúde**, v. 46, n. 21, p. 1–9, 2015.
- MONTEIRO, A. C. et al. Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 9, p. 6325–6335, 2006.
- MORTARA, R. A. et al. Host Cell Actin Remodeling in Response to *Trypanosoma cruzi*: Trypomastigote Versus Amastigote Entry. In: BURLEIGH, B. A.; SOLDATI-FAVRE, D. (Eds.). . **Molecular Mechanisms of Parasite Invasion**. Mainz: Landes Bioscience, 2008. p. 101–109.
- MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 1477–1482, 1989.
- MUÑOZ-SARAVIA, S. G. et al. Chronic Chagas' heart disease: A disease on its way to becoming a worldwide health problem: Epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Failure Reviews**, v. 17, p. 45–64, 2012.
- NEEFJES, J. et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 12, p. 823–836, 2011.
- NOGUEIRA, N.; COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **J Exp Med**, v. 143, n. 6, p. 1402–1420, 1976.
- O'NEILL, D. W.; ADAMS, S.; BHARDWAJ, N. Manipulating dendritic cell biology for



the active immunotherapy of cancer. **Blood Journal**, v. 104, n. 8, p. 2235–2246, 2004.

OCANA-MAYORGA, S. et al. Sex, subdivision, and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Southern Ecuador. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. 1–8, 2010.

OUAISSI, A. et al. *Trypanosoma cruzi*-Induced Host Immune System Dysfunction: A Rationale for Parasite Immunosuppressive Factor(s) Encoding Gene Targeting. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 11–17, 2001.

OUAISSI, A. et al. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-Released Protein Induces Human Dendritic Cell Maturation, Signals Via Toll-Like Receptor 2, and Confers Protection Against Lethal Infection. **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 6366–6374, 2002.

PADILLA, A. M.; BUSTAMANTE, J. M.; TARLETON, R. L. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Current opinion in immunology**, v. 21, n. 4, p. 385–90, 2009.

PINAZO, M.-J. et al. Diagnosis, management and treatment of Chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. **Gastroenterología y Hepatología.**, v. 33, n. 3, p. 191–200, 2010.

PLANELLES, L. et al. Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. **Clinical and experimental immunology**, v. 131, n. 1, p. 41–7, 2003.

PONCINI, C. V. et al. *Trypanosoma cruzi* Induces Regulatory Dendritic Cells In Vitro. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 6, p. 2633–2641, 2008.

PONCINI, C. V. et al. Central role of extracellular signal-regulated kinase and Toll-like receptor 4 in IL-10 production in regulatory dendritic cells induced by *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 11-12, p. 1981–1988, 2010.

PONCINI, C. V. et al. *Trypanosoma cruzi* Infection Imparts a Regulatory Program in Dendritic Cells and T Cells via Galectin-1–Dependent Mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 195, p. 3311–3324, 2015.

RAMÍREZ, J. D. et al. Chagas Cardiomyopathy Manifestations and *Trypanosoma cruzi* Genotypes Circulating in Chronic Chagasic Patients. **PLoS Neglected**



Tropical Diseases, v. 4, n. 11, p. e899, 2010.

RAMIREZ, M. I. et al. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion.

Infection and Immunity, v. 61, n. 9, p. 3636–3641, 1993.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RIBEIRO, M. et al. Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model.

Experimental Parasitology, v. 162, 2016.

RITTIG, M. G. et al. Coiling phagocytosis of trypanosomatids and fungal cells.

Infection and Immunity, v. 66, n. 9, p. 4331–4339, 1998.

RITTIG, M. G.; BURMESTER, G.; KRAUSE, A. Coiling phagocytosis: when the zipper jams, the cup is deformed. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 384–388, 1998.

RODRIGUES, A. A. et al. IFN-gamma plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 4, p. e1598, 2012.

RODRIGUEZ, P.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Activation of cord blood myeloid dendritic cells by *Trypanosoma cruzi* and parasite-specific antibodies, proliferation of CD8 + T cells, and production of IFN-gamma. **Med Microbiol Immunol**, v. 201, p. 157–169, 2012a.

RODRIGUEZ, P.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C. *Trypanosoma cruzi* activates cord blood myeloid dendritic cells independently of cell infection. **Med Microbiol Immunol**, v. 201, n. 3, p. 287–296, 2012b.

ROMANO, P. S. et al. Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. **IUBMB Life**, v. 64, n. 5, p. 387–396, 2012.

RUIZ, R. C. et al. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. **The Biochemical journal**, v. 330, p. 505–511, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning - Sambrook & Russel**. [s.l.: s.n.]. v. 18

SANTANA, R. et al. *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. **Parasites & Vectors**, 2014.

- SCHLIENGER, K. et al. Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, v. 96, n. 10, p. 3490–3498, 2000.
- SCHMITZ, V. et al. C5a and bradykinin receptor cross-talk regulates innate and adaptive immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 7, p. 3613–23, 2014.
- SCHURCH, N. J. et al. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? **RNA**, v. 22, p. 839–851, 2016.
- SEGURA, E. Review of Mouse and Human Dendritic Cell Subsets. In: SEGURA, E.; ONAI, N. (Eds.). . **Dendritic Cell Protocols**. New York: Springer Science+Business Media, 2016. v. 1423p. 3–15.
- SHEIKH, F. et al. An essential role for IFN- β in the induction of IFN-stimulated gene expression by LPS in macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 96, n. 4, p. 591–600, 2014.
- SPRACKLEN, A. J. et al. Prostaglandins temporally regulate cytoplasmic actin bundle formation during *Drosophila* oogenesis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, 2014.
- STEINMAN, R. M. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. **Nature medicine**, v. 13, n. 10, p. 1155–9, 2007.
- SULTAN, M. et al. A Global View of Gene Activity and Alternative Splicing by Deep Sequencing of the Human Transcriptome. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 956–960, 2008.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. **Pattern Recognition Receptors and Inflammation Cell**, 2010.
- TEIXEIRA, A. et al. Experimental Chagas' disease in isogenic III/J rabbits. I. Physiopathology of arrhythmia and sudden death in Chagas' disease patients. **AMB: revista da Associação Médica Brasileira**, v. 29, n. 5-6, p. 77–83, 1983.
- TEIXEIRA, A. et al. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 592–630, 2011.
- TEIXEIRA, M. M. G.; YOSHIDA, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies.



Molecular and Biochemical Parasitology, v. 18, n. 3, p. 271–282, 1986.

THOMPSON, P. A et al. ABCA1 promotes the efflux of bacterial LPS from macrophages and accelerates recovery from LPS-induced tolerance. **Journal of lipid research**, v. 51, n. 9, p. 2672–2685, 2010.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 1, p. 85–104, 1998.

TRAPNELL, C.; PACTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105–1111, 2009.

TZELEPIS, F.; PERSECHINI, P. M.; RODRIGUES, M. M. Modulation of CD4(+) T cell-dependent specific cytotoxic CD8(+) T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. **PloS one**, v. 2, n. 4, p. e393, 2007.

VAN OVERTVELT, L. et al. Trypanosoma cruzi infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. **Infection and immunity**, v. 67, n. 8, p. 4033–4040, 1999.

VAN OVERTVELT, L. et al. Trypanosoma cruzi down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8 + T lymphocytes. **International Immunology**, v. 14, n. 10, p. 1135–1144, 2002.

VIOTTI, R. et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 7, n. 2, p. 157–163, 2009.

VRAY, B. et al. Up-regulation of galectin-3 and its ligands by Trypanosoma cruzi infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. **Glycobiology**, v. 14, n. 7, p. 647–657, 2004.

VYAS, J. M.; VAN DER VEEN, A. G.; PLOEGH, H. L. The known unknowns of antigen processing and presentation. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 8, p. 607–18, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Organization: Chagas disease**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>.

YOSHIDA, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi.



Infection and immunity, v. 40, n. 2, p. 836–9, 1983.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*.

Anais Da Academia Brasileira De Ciencias, v. 78, n. 1, p. 87–111, 2006.

ZINGALES, B. et al. *Trypanosoma cruzi* Genome Project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 68, p. 159–173, 1997.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.



10. APÊNDICE

10.1. Manuscrito aceito

Dendritic cells: a double-edged sword in immune responses during Chagas Disease

Natalia Gil-Jaramillo¹, Flávia Nader Motta^{1, 2}, Cecília B. F. Favali³, Izabela M. D. Bastos¹, Jaime M. Santana^{1,*}

¹Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

²Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

³Laboratório de Biologia do Gene, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

* Correspondence:

Dr. Jaime Martins de Santana

jsantana@unb.br

Keywords: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; dendritic cell; immunoregulation; evasion strategy

Running title: DC-*T. cruzi* interaction in Chagas disease

Number of words: 6058, Number of figures: 2, Number of tables: 1

Abstract

Dendritic cells (DCs) are the most important member of the antigen presenting cells (APC) group due to their ability to recognize antigen at the infection site and their high specialized antigen internalization capacity. These cells have central role in connecting the innate and adaptive immune responses against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. These first line defense cells modulate host immune response depending on type, maturation level, cytokine milieu and DC receptor involved in the interactions with *T. cruzi*, influencing the development of the disease clinic forms. Here, we present a review of DCs–*T. cruzi* interactions both in human and murine models, pointing out the parasite ability to manipulate DCs activity for the purpose of evading innate immune response and assuring its own survival and persistence.

Introduction

More than a century has passed since Carlos Chagas discovered the pathogen *Trypanosoma cruzi* and the natural way of its transmission to humans and animals, and elucidated the corresponding human disease it causes (Kropf and Sá, 2009). Chagas disease is also

transmitted through blood transfusions or organ transplants, vertically from mother to child through the placenta, and through contaminated food (Andrade et al., 2014). This neglected disease affects predominantly deprived people and induces social and economic impacts by decreasing patient's productivity and earning capacity (Hotez et al., 2007).

With 28,000 new cases per year and 8,000 newborns infected during gestation, Chagas disease affects about 8 million people, beyond 65 million live in areas of exposure and are at risk of contracting the disease (World Health Organization, 2015). Despite the efforts to reduce Chagas disease and the number of infections over the last two decades, it is still endemic in Latin America (Rassi et al., 2010; Strasen et al., 2013) and, as result of global migration, the number of people infected with *T. cruzi* is increasing in North America, Europe, Japan and Oceania (non-endemic areas) (Schmunis, 2007). Since Chagas disease crosses boundaries and spreads, it becomes not only a burden for the endemic countries but a worldwide health concern (Andrade et al., 2014).

Treatment of Chagas disease is one of the greatest therapeutic challenges in tropical medicine since the only drugs approved for human treatment - Nifurtimox and Benznidazole - date from the early 1970s and have carcinogenic properties conferred to nitrofurans and nitroimidazole, their active chemical groups, respectively (Bern, 2011; Wilkinson et al., 2011). Nevertheless, both medicines share similar features: necessity of prolonged administration, effectiveness related to the acute phase and different susceptibility among *T. cruzi* strains (Bermudez et al., 2015). Additionally, Nifurtimox prescription has been abolished in Brazil, Argentina, Uruguay, Chile and United States due to its toxic effects over central nervous system, genotoxicity and reduced efficacy (Wilkinson et al., 2011).

The natural disease progression consists of an acute phase that can be followed by an asymptomatic indeterminate phase, which represents most of the cases and, one-third of infected population progress to the chronic phase that may lead to death (Machado et al., 2013). Early clinical manifestations include headache, fever and cough, which are nonspecific signs; consequently most of infected individuals are neither notified nor treated. Symptomatic chronic stage of the disease usually occurs from 10 to 25 years after infection and typical manifestations are mild to severe cardiomyopathy and/or dilated digestive tract (megaesophagus and megacolon) (Steverding, 2014). The mechanisms responsible for patient progression from the indeterminate to the symptomatic chronic phase are not completely understood, although the immunological events initiated during the acute phase undoubtedly drive the organism towards the development of a protective or deleterious immune response (Andrade et al., 2014).

It is unanimity that during the acute phase, dendritic cells (DC), along with macrophages and natural killer (NK) cells, guarantee the host first line of defense against the parasite (Watanabe Costa et al., 2016). Guide by this context, our purpose is to present a review about DC–*T. cruzi* interaction pointing out the parasite ability to evade innate immune response to assure its own survival and persistence.

Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi is an obligate intracellular protozoan of the Kinetoplastea Class, characterized by the presence of one flagellum and a single mitochondrion comprising the kinetoplast, a specialized DNA-containing structure. The Order Trypanosomatida comprises other parasites responsible for severe diseases in humans and other species, for instance *Leishmania* spp. (leishmaniasis), *Trypanosoma brucei* (African trypanosomiasis), *Phytomonas* spp. (plant diseases), and *Crithidia* spp. (arthropods diseases) (Stevens, 2008), that show adaptability towards their hosts with numerous sophisticated immune evasion strategies (D'Avila-Levy et al., 2015).

T. cruzi strains present diversity in morphology, infection capacity, cell surface predominant antigens and other biological and biochemical features (de Lana et al., 2010). In 2009, the Second Satellite Meeting held in Buzios, Brazil suggested six Discrete Typing Units (DTUs) for classifying the several *T. cruzi* strains, named TcI to TcVI (Zingales et al., 2009). A DTU is a population set that is more genetically related among themselves than to any other population, showing common genetic, immunological and molecular markers (Tibayrenc, 1998). These DTUs subsets have different distribution among the American continent due to parasite adaptations to different vectors and reservoirs (Zingales et al., 2012), and, although, some characteristics are shared within the same DTU, differences in many aspects can be found among strains. *T. cruzi* Colombian and G strains, belonging to TcI group, are a clear example of this intra-DTU diversity. Colombian strain, isolated from humans, is highly infective (Ramírez et al., 2010), but no human infections were reported from G strain, which was isolated from anal gland secretions of an opossum (Deane et al., 1984). *T. cruzi* G strain has gp35/50 as predominant surface glycoprotein that appears to be related to its poor internalization by humans cells (Yoshida, 2006).

T. cruzi life cycle alternates between reduviid bug vectors and mammal hosts. Domestic and wild animals like opossum, bats, armadillo and monkey may also act as reservoir host (Coura et al., 2002). The parasite presents different forms during its life cycle – epimastigotes remains in the insect gut; non-dividing and infective metacyclic trypomastigotes (MT) find in the insect feces and/or urine; bloodstream trypomastigotes that can circulate in the mammalian blood and, finally, the intracellular, proliferative and rounded amastigote form. A triatomine insect picks up the parasite trypomastigote forms by feeding on the blood of an infected mammal (Teixeira et al., 2009) and, once inside the vector, those forms differentiate into epimastigotes and multiply in midgut (Manchola et al., 2015). After migration to the bug's hindgut, epimastigotes attach to the waxy gut cuticle by their flagella and differentiate into infectious MT, which will be deposited along with feces/urine on the skin of the victim (Muñoz-Saravia et al., 2012). The parasite penetrates the new host through lesions caused by its bite or a variety of mucosal membranes. MTs invade host cells entering a parasitophorous vacuole (Romano et al., 2012), which fuses to lysosomes. Once free in the cytoplasm, the parasite differentiates into amastigotes that undergo binary fission multiplication and transform back to trypomastigotes, which are released upon rupture of the host cell membrane and infect neighboring cells or enter the bloodstream (Stecconi-Silva et al., 2003; Tonelli et al., 2004). Bloodstream trypomastigotes may begin another infection cycle when they are taken in the blood feeding of the vector (Bern, 2015). Humans and animals can be infected orally through the ingestion of food and drink contaminated by crushed infected insect vectors or their feces (Bastos et al., 2010; Nóbrega et al., 2009).

Immune evasion strategies developed by *T. cruzi* are essential to the establishment of a long-life infection. Complement inactivation, escape from phagolysosome, antibodies with no *T. cruzi* specificity and delayed immune response are some examples of those strategies (Reviewed by Cardoso et al., 2016; Nardy et al., 2015). Another mechanism involved in parasite persistence is the manipulation of dendritic cell functions, which impairs an adequate host immune defense.

Dendritic cells (DCs)

DCs are bone-marrow-derived cells that belong to the antigen presenting cells (APC) group, being considered the most important member due to their high capacity to recognize and internalize antigens at the infection site (Collin et al., 2013; Haniffa et al., 2009). They link innate and adaptive immune responses by capturing, processing and expressing antigens in the cell surface membrane (Planelles et al., 2003; Steinman, 2007). Immature DCs have a wide range of innate receptors that enables the recognition of pathogens via pattern recognition receptors (PRRs), which activate DCs through signaling pathways eliciting their maturation (Pearce and Everts, 2015). Toll-like receptors (TLRs), abundant in APC, are one of the best-characterized PRRs and efficiently detect pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that are located on the cell surface or in the lumen of endosomes. The presence of TLRs on the cell surface or in the lumen of endosomes enables efficient pathogen recognition and the development of an adequate innate immune response; i.e. TLR2, located in DCs plasma membrane, senses various components of pathogens and its stimulation induces the production of various proinflammatory cytokines. TLR9, located in DCs endolysosome, is involved in virus, bacteria, protozoa nucleic acid recognition and its activation also leads to the production of proinflammatory cytokines (Takeuchi and Akira, 2010). After antigen recognition, DCs can travel along the body from peripheral tissues to lymphoid organs/tissues where they present the processed antigens through their major histocompatibility complexes (MHC) to T cells (Lipscomb and Masten, 2002). Maturation process comprises differentiation from antigen-capturing specialized cells to presenting and stimulating specialized cells. Mature DCs can be identified by morphological aspects like cytoplasmic extensions and abundant intracellular structures (lysosomes, endosomes, granules, etc.) related to antigen processing and by modulation of molecular markers such as up-regulation of CD83, of co-stimulatory molecules like CD80 (or B7-1) and CD86 (or B7-2) and MHC (O'Neill et al., 2004).

DCs present antigens to lymphocytes CD8+ and CD4+ T by MHC class I and MHC class II, respectively (Blum et al., 2013). For MHC class I molecules, these antigens originate from intracellular sources; for MHC class II, from exogenous sources. Some DCs have an atypical ability, called cross-presentation that allows to load peptides from exogenous antigens onto MHC class I molecules (Neefjes et al., 2011; Segura and Amigorena, 2015; Vyas et al., 2008). MHC class I molecules are expressed by all nucleated cells and their antigen presentation pathway consists in a series of reactions: (1) intracellular proteins are degraded by the proteasome; (2) the peptides are delivered to the endoplasmic reticulum by the transporter associated with antigen processing complex; (3) antigens are loaded onto MHC class I molecules; (4) peptide–MHC class I complexes are transported via the Golgi to cell surface for presentation to CD8+ T cells (Neefjes et al., 2011; Vyas et al., 2008). Recently it

was demonstrated that infection of HeLa cells with *T. cruzi* Y strain promotes a down-regulation of the immunoproteasome subunits biosynthesis as well as the MHC class I molecule expression, which could be considered a mechanism of parasite persistence inside the cell (Camargo et al., 2014). Unlike MHC class I expression, MHC class II are mainly expressed by APCs such as DCs, macrophages and B cells (Neefjes et al., 2011; Vyas et al., 2008). Extracellular antigens are taken up by APCs and placed into the phagosome. This compartment fuses with lysosomes to form phagolysosomes, where MHC class II molecules interact with the antigens. Peptide-loaded MHC class II molecules are then transported to the cell surface where they engage antigen-specific CD4+ T cells (Neefjes et al., 2011; Vyas et al., 2008). Curiously, MHC II molecules are in constant recycle and degradation process in immature DCs, but mature DCs exhibits a stable and prolonged antigen presentation (den Haan et al., 2014). It is worth mentioning that DCs antigen presentation is not enough for T lymphocytes activation and proliferation. Co-stimulatory molecules expression and cytokine production are also required and they are efficiently provided by mature DCs (den Haan et al., 2014). Following activation via TLRs, DCs may produce acute innate cytokines involved in local and systemic responses such as IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 and TNF- α (Holdsworth and Can, 2015; Verhasselt et al., 1997), however DCs, under specific conditions, are also able to produce IL-10 and TGF- β for directing a regulatory response (Table 1).

Different DC subsets and maturation levels can produce distinct kinds of cytokines or co-stimulatory molecules that can lead either to an inflammatory or a regulatory response. Among DC subsets, myeloid (mDC or classical DC), plasmacytoid (pDC), Langerhans cells (LCs) and derived from monocytes (monocyte DC) are some well-known examples. In murines, mDCs are composed of two main groups: resident and migratory, which are further divided into two subsets: Batf3-dependent and IRF4-dependent DCs (Reviewed by Segura, 2016). mDC Batf3-dependent/migratory expresses CD11c, Clec9A, XCR1, CD103 and CD207; the resident one expresses CD11c, Clec9A, XCR1 and CD8. On the other hand, mDC IRF4-dependent/resident expresses CD11c, CD11b, CD172a; the same markers are found in the migratory subsets along with CD206. The major markers for pDC are CD11c, Ly6c, B220 and SiglecH. For monocyte DC, they are CD11c, CD11b, CD64, Fc ϵ RI, CD206, CD14, CD172a and Ly6c (Reviewed by Segura, 2016). Finally, LCs is a special DC population present in epidermis and other stratified squamous epithelia, such as oral and genital mucous membranes and bronchus. Despite of being associated with these tissues, LCs may differentiate into migratory cells for antigen presentation; their principal markers are CD11c, CD207, EpCAM and E-cadherin. Human mDCs classical markers are CD11c+, Dectin 1 (CLEC 7A) and Dectin 2 (CLEC6A). Regarding pDCs, CD303 (CLEC4C), CD304 (neuropilin) and CD123 (IL-3R) are human usual markers. Monocyte DCs may express CD14, CD209 (DC-SIGN), CD16 and CD1c (Reviewed by Collin et al., 2013). Lewis and Reizis have proposed the existence of two more kinds of DCs within these subsets: “receptors”, cells more specialized in capturing antigens and producing cytokines and “presenters”, cells that benefit from these cytokines and travel to lymph nodes for presenting the antigens. It represents another level of specialization among DCs, stating their diversity and their capacity to guide polarity, magnitude and specificity of immune responses (Lewis and Reizis, 2012).

Some studies have demonstrated that acute and chronic phases of Chagas disease require different polarizations of immune response: Th1 profile is protective in an acute state and

regulatory responses are important in preventing the chronic phase (Andrade et al., 2014; Dutra et al., 2015). For this reason, DCs are a key group of cells in Chagas disease: they could modulate response depending on type, maturation level, cytokine milieu and DC receptor involved, having a fundamental role in the development of the disease clinic forms including the undetermined stage.

Dendritic cell-*T. cruzi* interaction: murine models

Studies on acute Chagas disease in humans are limited due to lack of unique symptoms that characterize this disease state. Nonetheless, extending our knowledge about the acute phase is important because immunological events that take place in this stage have a great influence on the possible development of the chronic phase (Andrade et al., 2014). In this context, experimental murine infection may mimic the human disease, giving us a similar view on what happens at the beginning of *T. cruzi* infection.

Unlikely the habitual DCs response during an infection, the expression of important surface molecules like MHC, CD80 or CD86 can be reduced when DCs recognize *T. cruzi* antigens in a strain dependent manner, limiting DC maturation and antigen presenting capacity. During acute phase, splenic DCs infected by *T. cruzi* Tehuantepec strain shows low expression of CD86 molecules and are not able to migrate toward lymphoid organs/tissues (Chaussabel et al., 2003). *T. cruzi* high virulent RA strain (TcVI) induces bone-marrow DCs downregulation of cytokine production and of endocytic capacity added to a suppression of MHC class II, compared to non-infected cells (Poncini et al., 2008). These data are in concordance with the regulation studied by Alba Soto and coworkers, where they also detected a diminished MHC II expression in infected splenic DCs by the same *T. cruzi* strain. Additionally, they showed that the DC manipulated behavior induced by RA strain is not repeated for non-virulent K98 *T. cruzi* strain (TcI) (Figure 1) (Alba Soto et al., 2003). Another comparative infection study, using mDCs, was performed using TcI (AQ1.7 and MUTUM) and TcII strains (1849 and 2369). The results demonstrated that both *T. cruzi* DTUs may modulate DCs to different extents and this modulation varied more between strains than between DTUs themselves. In general, both DTUs induced the production and expression of anti-inflammatory molecules, such as IL-10, production and PD-L1 and TLR2 expression. Regarding TLR2 expression, it seems that *T. cruzi* has molecules that bind this receptor promoting the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-10. Oppositely, proinflammatory molecules did not present a pattern, varying depending on the strain. Finally, they also demonstrated that DC expression of differentiation and activation molecules was not polarized, which suggests that each strain of *T. cruzi* has possibly evolved specific evasion strategies (da Costa et al., 2014). Interestingly, when two mice lineages were infected by high virulent *T. cruzi* Y strain (TcII), the susceptible one showed splenic DCs with reduced capacity of antigen presentation and lower expression of CD40 and CD86 molecules compared with resistant lineages (Planelles et al., 2003). It is well known that the deficiency of co-stimulatory signals during cross-presentation may reduce T cell stimulation or lead to an anergic state (Boussiotis et al., 1996). Thus, it seems that impaired function by DC maybe helps parasite to evade the host immune system.

Cytokine production is another important aspect during DCs–*T. cruzi* interaction, particularly the production of IL-12, considered a protective molecule during the acute infection once it drives a polarized Th1 adaptive response that enables the host to adequately control parasite growth through IFN- γ (Andrade et al., 2014). In concordance, DCs from *T. cruzi*-resistant mouse lineages overexpressed IL-12 and TNF- α while the susceptible lineages produced the Th2 cytokine IL-4 (Planelles et al., 2003). IL-4 is known to mediate host susceptibility to *T. cruzi* but is also required for preventing immune hyperactivity and organ immunopathology (Abrahamsohn and Coffman, 1996; Laucella et al., 1996). Terrazas and coworkers demonstrated the protective role of IL-12 through *T. cruzi* Queretaro (TcI) strain infection of MIF (macrophage migration inhibitory factor)-deficient mice (Terrazas et al., 2011). MIF is a pleiotropic cytokine produced by multiple different cell types, including DCs, that modulates the expression of several proinflammatory molecules (Cooke et al., 2009). It seems that it favors DC maturation through IL-12 secretion and activation of p38 MAPK protein, a kinase already known to be involved in DC maturation. On the other hand, MIF-deficient mice showed lower levels of IL-12 production and immature bone-marrow DCs, leading to a susceptibility of *T. cruzi* Queretaro (TcI) strain infection (Terrazas et al., 2011). The regulatory IL-10 cytokine is also associated with host susceptibility during acute stage of Chagas disease by limiting DCs induction of antimicrobial effector mechanism such as suppressing DC trafficking to draining lymph nodes (Alba Soto et al., 2010; Corinti et al., 2001; Demangel et al., 2002). A single intravenous injection of IL-10-deficient DCs that were pulsed with parasite antigens conferred an effective control against a lethal challenge with *T. cruzi* RA strain in mice. IL-10 deficient DCs were high Th1 cytokines producers and inducers of antigen-specific T lymphocytes after immunization (Alba Soto et al., 2010). On the other hand, Poncini and coworkers have showed that interaction of DCs with *T. cruzi* trypomastigotes was not able to activate the DCs, and these cells became TGF- β and IL-10 producers and were not efficient as lymphocyte stimulators, being classified as regulatory DCs (Poncini et al., 2010). Furthermore, mature DCs have the capacity to induce natural killer (NK) cells activation and proliferation. NK cells play a significant role in innate immune response and surveillance as a result of their cytokine production and cytolysis of infected cells. Moreover, NK cells secrete IFN- γ , TNF- α and GM-CSF, which promote DC maturation and activation of T-cell (Gerosa et al., 2002; Piccioli et al., 2002). Batalla and coworkers used RA and K98 *T. cruzi* strains to demonstrate the role of NK cells in regulating the maturation level of DCs. During both infections, NK cell was functionally activated and produced IFN- γ but also IL-10; NK cells from mice infected with *T. cruzi* RA strain (high virulence) exhibit reduced ability to lyse and fail to induce maturation of bone marrow-derived immature DCs. This unbalanced DC population could difficult T cell stimulation for an adequate response. Finally, that IL-10 production observed by NK cells after infection with *T. cruzi* RA strain might lead to parasite persistence but can also limit the induction of a vigorous tissue-damaging T-cell response (Batalla et al., 2013). Cytokine production may also be modulated by parasite initial inocula. Three different inocula of *T. cruzi* Colombian strain were used to infect mice, resulting in differential expression of IFN- γ , IL-17, TNF- α , IL-4 and IL-23 by immune cells in heart infiltrates. Curiously, the medium inoculum showed the less favorable host response, which may indicate the existence of an ideal initial inoculum to help parasite evade host immune response (Borges et al., 2012).

It also has been shown the important role of TLRs in *T. cruzi* recognition by first line of defense cells, including DCs. In 2004, Campos and coworkers demonstrated that *T. cruzi*

employs a myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-, a key adaptor for most TLRs, dependent pathway to elicit cytokine production by the host cells. Intraperitoneal macrophages lacking MyD88 produced less IFN- γ , IL-12, TNF- α and reactive nitrogen intermediates, they also presented higher parasitemia and mortality (Campos et al., 2004). The role of TLRs in the establishment of critical effector mechanisms mediated by CD8+ T cells during *T. cruzi* infection was also investigated (Oliveira et al., 2010). The analysis of induction of IFN- γ and cytotoxic activity in vivo in TLR2-, TLR4-, TLR9- or MyD88-deficient mice during infection showed that neither the absence of TLR2, TLR4 or TLR9 individually, nor the ablation of all MyD88-mediated pathways affect the development of cytotoxic and IFN- γ -producing CD8+ T cells. Nonetheless, TLR4 deficient macrophages presented a reduced production of TNF- α and nitric oxide (NO), pointing to an important role of the TLR4 pathway and NO production to the innate immune response against *T. cruzi* infection (Oliveira et al., 2010). With regard specifically to DCs, infection with *T. cruzi* parasites promotes recruitment of TLR9 to the DC endolysosome compartment, promoting their interaction during initial phagocytosis. Stimulatory motifs containing CpG islands of *T. cruzi* CL Brener, particularly those formed by genes coding for mucin like proteins, also led TLR9 into lysosomes of bone-marrow DCs and the induction of IL-12 as well as IFN- γ synthesis (Bartholomeu et al., 2008). Such potent proinflammatory activity and, consequently, control of parasite replication could lead to host resistance to infection or avoiding host lethality and maintenance of parasite life cycle long-term parasite persistence. The second hypothesis suggests another adaptation of *T. cruzi* to the host cell-mediated immunity (Bartholomeu et al., 2008). Gravina and co-workers stated that DC population constitutes the main source of IL-12/IL-23p40 production in a TLR9-dependent manner in *T. cruzi* Y strain infection. Moreover, when DCs were unable to produce IL-12/IL-23p40, macrophages recovered their capacity to respond to TLR9 agonist, which may represent a compensatory response. Therefore, modulation of TLR9 is important to control the inflammatory response in the different cell populations but TLR9 acts fundamentally on DC inflammatory activity in *T. cruzi* infection (Gravina et al., 2013). Synergy among TLRs in parasite infected DC has also been studied. When MyD88/TRIF (Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- β) deficient mice (i.e., with no functional activation of TLRs) were infected with *T. cruzi* Tulahuen strain (TcVI), parasite clearance was impaired mainly by absence of IFN- β production (Koga et al., 2006). In the same work, it was proposed that proinflammatory cytokine production is a MyD88-dependent induction and the expression of IFN- β is a TRIF-dependent. In any case, both TLR adaptors contribute to innate immune responses against *T. cruzi* infection (Koga et al., 2006). UNC93B1, a protein that interacts with TLR3, TLR7 and TLR9, seems to play an essential role in host protection against *T. cruzi* infection (Caetano et al., 2011). UNC93B1 mice deficient were more susceptible to *T. cruzi* infection and produced lower concentration of IL-12p40 and IFN- γ . Such susceptibility was also achieved during TLR3/TLR7/TLR9-deficient mice *T. cruzi* infection, showing that nucleic acid-sensing TLRs are critical determinants of host resistance to primary infection with *T. cruzi* (Caetano et al., 2011).

Other receptors also have been proposed to play an important role during the acute phase of Chagas disease. G-protein-coupled bradykinin (BK) B2 receptors (B2R)-deficient mice were more susceptible to *T. cruzi* Dm28c strain (TcI) infection than WT animals (Monteiro et al., 2007). B2Rs recognize *T. cruzi* released kinins, mediators related to bradykinin that activate immature DCs (Monteiro et al., 2006). Splenic DCs without B2R receptor do not produce

IL-12, appointing a critical role for the kinin signaling pathway in the development of type-1 effector T cells (Monteiro et al., 2007). In a recent study, the same group demonstrated that blockage of B2R along with C5a receptor resulted in splenic DCs unable to produce IL-12p40/70 and IFN- γ (Schmitz et al., 2014). C5a is an anaphylatoxin derived from proteolysis of C5 complex of complement system, whose biological function is to activate cells from myeloid lineage (Klos et al., 2009). Yet, they showed that, as for kinins, C5a molecules seems to be produced through *T. cruzi* cruzipain activity during infection and can promote DC activation and a Th1 protective response (Schmitz et al., 2014). Galectins, a lectin receptor, can also act as pathogen recognition receptors and as modulators of innate and adaptive response (Vasta, 2009). It has been shown that those receptors are widely expressed in B cell, macrophages and DCs during *T. cruzi* infection (Vray et al., 2004; Zúñiga et al., 2001a, 2001b). Concerning DCs, Galectin-1 seems to be a negative immune regulator that limits the host protective response by driving tolerogenic circuits in DCs. Those tolerogenic DCs induce regulatory T cells activation, which would favor parasite persistence in host tissues or limit collateral tissue damage through suppression of inflammatory responses (Poncini et al., 2015). Galectin-3 (Gal-3) and its specific ligands were over-expressed in splenic DCs after infection by *T. cruzi* Tehuantepec strain, which lead to DC increased adhesiveness and reduced migration (Vray et al., 2004). Therefore, *T. cruzi* modulates Gal-3 and its ligands functionality to improve infection, another immunomodulatory property of *T. cruzi* (Vray et al., 2004). Another lectin-like receptor expressed by immune system cells, Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E), has also been implicated in *T. cruzi* infection. It is well known that transference of sialic acid by *T. cruzi* trans-sialidase (TS) from host cell to parasite surface mucin-like molecules confers resistance to human complement, contributing to infection (Tomlinson et al., 1994). In this context, pathogenic *T. cruzi* Tulahuen strain (high TS activity) interacted more to Siglec-E than non-pathogenic *T. cruzi* Tehuantepec strain (reduced TS activity). This interaction led to an inhibitory effect on DCs modulation, suppressing the production of cytokine IL-12 and subsequent T-cell activation. In contrast, *T. cruzi* Tehuantepec strain could not install an important parasitemia (Erdmann et al., 2009). Together, those findings suggest that *T. cruzi* (or parasite products) may lead to immunosuppression through its interaction with DC lectin receptors (Terrazas et al., 2010). Slamf1 (self-ligand adhesion molecule - CD150) is a co-stimulatory molecule present in myeloid lineage and required at the interface of antigen presenting cells and T cells (van Driel et al., 2016). In vitro and in vivo experiments revealed that Slamf1-deficient myeloid cells showed altered production of cytokines and reduced parasite replication. For instance, much lower IFN- γ production was detected in the heart of Slamf1 deficient mice than in the heart of WT mice. Additionally, Slamf1 deficient mice presented reduced cardiac damage despite of the comparable number of infiltrating DCs, macrophages, CD4 and CD8 T lymphocytes to that of WT animals. Therefore, *T. cruzi* requires Slamf1 to replicate in DCs and its absence leads to less production of myeloid cell specific factors by DCs, which are key compounds to host immune response and infection outcomes (Calderón et al., 2012).

Currently, there is an enormous amount of data that states a direct association between mouse DC functional specializations (antigen presentation or pathogen sensing) and their subsets. However, after our meticulous review of literature in the field, it is not unrealistic to conclude that the role of DC subsets in innate immune response against *T. cruzi* needs to be more properly addressed by researches since most cited works emphasize only one surface phenotype as if all DCs are equally functional. The same statement is valid for *T. cruzi* strains,

a missing pattern respect to DCs subsets and their level of activation and to *T. cruzi* strains, which hampers an association concerning published data. Table 1 summarizes the limited actual data in the murine DC- *T. cruzi* system.

Human dendritic cell – *T. cruzi* interaction: in vitro studies

The first experiment that confirmed the ability of *T. cruzi* to infect and reproduce inside a human DC was performed in 1999 (Van Overtvelt et al., 1999), a biological process that had already been known for Leishmania (Moll et al., 1995). The authors also demonstrated that DCs, derived from monocytes and infected with *T. cruzi* Tehuantepec strain, significantly reduced HLA-DR and CD40 expression. In addition, these infected DCs were neither IL-12 nor TNF- α producers (Van Overtvelt et al., 1999). In a different study, using the same *T. cruzi* strain, Van Overtvelt and co-workers showed that *T. cruzi* soluble factor(s) released by the parasite itself into the DC culture medium inhibits LPS induced MHC class I up-regulation on the surface of human DC. Such inhibition may decrease the protective effect of specific CD8+ T since infected DCs had a weaker capacity of cross-presentation. This reduction of DC function may influence the in vivo host's ability to competently combat *T. cruzi* infection (Van Overtvelt et al., 2002). It is well known that a small family of type 1 glycoinositolphospholipids (GIPLs) is abundant in *T. cruzi* cell surface and, therefore, such molecules seem to have immunoregulatory activities (Brodskyn et al., 2002; Medeiros et al., 2007). GIPLs isolated from *T. cruzi* G (TcI) and Y (TcII) strains were incubated along with LPS to stimulate DCs derived from monocytes. The results showed that *T. cruzi* GIPL antigens direct the down-regulation of both proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-12 and anti-inflammatory, such IL-10, in DCs. The parasite GIPL also inhibited the expression of co-stimulatory molecules HLA-DR, CD83, CD86, CD80 and CD40 on DC surface. Similar results were achieved when the ceramide portion of GIPL molecule alone was used to stimulate DC, suggesting that fragments from the parasite glycoproteins could represent an evasion strategy of *T. cruzi*. Altogether, GIPL seems to contribute to parasite protection from the innate responses, allowing the beginning of infection and also acts in an inhibitory way on DC maturation, postponing an adequate immune response against *T. cruzi* (Brodskyn et al., 2002). Otherwise, a parasite released protein belonging to thiol-disulfide oxidoreductase family (Tc52) binds to and induces human and murine DC maturation by TLR2 activation. DCs derived from monocytes treated with Tc52 showed higher expression of CD83, CD86, CD54 and HLA-DR and an elevated production of IL-8, MCP-1, MIP-1 α . These in vitro data suggest that Tc52 may provide local recruitment and activation of leukocyte and then DC migration to the lymph node, where they can trigger B and T cell immune responses (Ouaissi et al., 2002).

Yet, *T. cruzi* Tulahuen strain parasites enhance expression of CD40 and CD80 on cord blood mDCs in a higher level compared to mDCs from adult donors. CD8+ T cells proliferation was also stimulated by those cord blood mDCs. In early life, immune responses are considered of partial effectiveness, owing to the relative immaturity of the human immune system therefore it is possible that maternally transmitted IgGs might contribute to overcome some deficiency of fetal/neonatal DCs and to protect the fetus/newborn against pathogens that have already come into contact with the mother (Rodriguez et al., 2012a). Another study, performed by the same group, showed that *T. cruzi* can induce maturation of this DC type

without infecting them. Rodriguez and coworkers found that blood cord and adult mDCs that had contact with parasite but were not yet infected also expressed high levels of CD80 and CD83. In addition, they demonstrated that either infected mDCs or *T. cruzi* lysates co-incubated mDCs have a similar expression pattern of their surface molecules. The authors also showed that infection rate in mDCs is lower than in monocytes and granulocytes, maybe due to their enhanced capacity of phagocytosis when compared to mature DCs (Rodriguez et al., 2012b). Consistent with the results shown in murine model, modulation of DCs function varies according to *T. cruzi* strain. In a comparative study, Magalhães and colleagues demonstrated that *T. cruzi* Col cl1.7 (TcI) but not Y (TcII) strain induces higher CD80 and CD86 expression, while *T. cruzi* Y strain induces up-regulation of IL-10, TNF- α and granzyme A production. Also, CD8+ T lymphocytes activated by Col cl1.7 strain produced higher level of IL-17. Then, TcI strain were capable of a higher monocyte activation, while the profile induced by TcII was more inflammatory (Magalhães et al., 2015). Figure 2 summarizes DC receptors referred to in this review.

The present knowledge about the interaction between human DCs and *T. cruzi* is restricted to in vitro models where expression of some cytokines and surface molecules were analyzed, but the specific functions of human DC subsets are only beginning to be unraveled. Contradictory studies have been published concerning DC–*T. cruzi* interactions, both in human and mouse models. However it seems that *T. cruzi* virulent strains probably take advantage of susceptible DCs to overcome host immune response and successfully install the infection. Remarkably, those modulated DCs will conduct a weak adaptive response with low expression of MHC class I and II molecules and proinflammatory cytokines, which are fundamental for controlling parasite survival (Alba Soto et al., 2010; da Costa et al., 2014; Poncini et al., 2008, 2010).

Future: needs and expectations

DCs are crucial decision-making cells of the immunological system as they direct tolerance, anergy and initiation/regulation of the adaptive immune responses (Banchereau and Steinman, 1998). For these reasons, DC has been proposed as targets for immunotherapy in diseases related to autoimmunity and exacerbated immune responses, such as autoimmune encephalomyelitis (Menges et al., 2002), thyroiditis (Verginis et al., 2005) and arthritis (Jaen et al., 2009) or to improve unsatisfactory immune responses towards tumor or pathogens (Dubsky et al., 2005). Targeting these cells with recombinant antibodies conjugated to autoantigens or pathogen antigens could direct a less exacerbated response against certain disease (Lutz, 2012).

ASP-2, an amastigote protein from *T. cruzi* Y strain, was conjugated with α DEC205 antibody, DEC205 is a C-type lectin endocytic receptor expressed in some DC populations and is widely used for targeting DCs. Recombinant ASP-2/DEC205 antibody was injected in mice, resulting in higher IFN- γ production by splenocytes and high proliferation of antigen-specific CD4+ T cells (Rampazo et al., 2015). Thus, targeted regulatory DCs could be used as an immunotherapy strategy during disease undetermined form to prevent evolution to the chronic phase. Nevertheless, host receptor and parasite antigen should be carefully elected because they could influence maturation signals received by DCs for orchestration of

the immune response (Cohn and Delamarre, 2014). Furthermore, trypomastigote lysate - pulsed IL-10-deficient DC conferred protection against *T. cruzi* infection to recipient mice by secreting increased amounts of IFN- γ , enhancing antigen-specific production and inducing endogenous DC activation. This DC-based vaccination against *T. cruzi* also demonstrated that IL-10 produced by sensitizing DC has a key role in inhibiting the protection response (Alba Soto et al., 2010). DC-based vaccine has also been successfully tested in Leishmania. Freshly isolated pDC from mice pulsed with Leishmania antigen and reinjected into host resulted in a protective effect, presenting mixed Th1/Th2 response with secretion of IFN- γ , IL-4 and IL-10 (Remer et al., 2007).

Unfortunately, DC immunizations have an elevated cost, which turns up this approach less attractive added to relative efficiency of the current treatment for Chagas disease during acute phase (Cohn and Delamarre, 2014; Rassi et al., 2010). Nonetheless, this neglected disease remains with no vaccines or antiparasitic drugs proven efficient in chronically infected adults, when most patients are diagnosed. Thus, future DCs immunization researches could be directed towards treatment for the undetermined stage targeting tolerogenic DCs.

Conclusion

Although efforts have been devoted to deciphering DCs–*T. cruzi* interaction, there is still much to be investigated before the complete understanding of DC role in the induction of immunity against *T. cruzi*. Moreover, our knowledge about that interaction is mostly based on the regulation, differentiation and function of the DC lineage from mouse. A challenge that needs to be overcome is the difficulty in isolating subsets of DCs from human tissue; only then we might be able to improve the understanding of human DCs in a molecular level and perhaps develop vaccines for the prevention or treatment of Chagas disease. Our review reiterates that *T. cruzi* capacity to modulate host DCs is an indispensable strategy to escape from innate immune response with the purpose of its own survival. Nevertheless, DCs present an efficient machinery to capture, process, and present antigens to T cells and to activate B cells therefore their immunotherapeutic potential may not be disregarded.

Author contributions

NG-J: Participated in design and manuscript writing. FM: Participated in design and manuscript writing. CF: Participated in design and manuscript writing. IB: Participated in design, coordination and manuscript writing. JS: Participated in design, coordination and manuscript writing.

Funding

This study was funded by CNPq-Pronex-DF, FAPDF (Grant number: 193.001.076/2015 and 193.000.822/2015), and MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRO-CENTRO-OESTE. NG-J received a scholarship from CAPES.



Acknowledgment

We thank Julian E. Palacio Hernández for image editions.

References

Abrahamsohn, I. a, and Coffman, R. L. (1996). Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp. Parasitol.* 84, 231–44. doi:10.1006/expr.1996.0109.

Alba Soto, C. D., Mirkin, G. a, Solana, M. E., and González Cappa, S. M. (2003). 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.* 71, 1194–9. doi:10.1128/IAI.71.3.1194.

Alba Soto, C. D., Solana, M. E., Poncini, C. V., Pino-Martinez, A. M., Tekiel, V., and González-Cappa, S. M. (2010). Dendritic cells devoid of IL-10 induce protective immunity against the protozoan parasite Trypanosoma cruzi. *Vaccine* 28, 7407–7413. doi:10.1016/j.vaccine.2010.08.105.

Andrade, D. V., Gollob, K. J., and Dutra, W. O. (2014). Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3010. doi:10.1371/journal.pntd.0003010.

Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252. doi:10.1038/32588.

Bartholomeu, D. C., Ropert, C., Melo, M. B., Parroche, P., Junqueira, C. F., Teixeira, S. M. R., et al. (2008). Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with Trypanosoma cruzi. *J. Immunol.* 181, 1333–1344. doi:10.4049/jimmunol.181.2.1333.

Bastos, C. J. C., Aras, R., Mota, G., Reis, F., Dias, J. P., de Jesus, R. S., et al. (2010). Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in Northeastern Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4. doi:10.1371/journal.pntd.0000711.

Batalla, E. I., Pino Martínez, A. M., Poncini, C. V., Duffy, T., Schijman, A. G., González Cappa, S. M., et al. (2013). Impairment in natural killer cells editing of immature dendritic cells by infection with a virulent Trypanosoma cruzi population. *J. Innate Immun.* 5, 494–504. doi:10.1159/000350242.

Bermudez, J., Davies, C., Simonazzi, A., Real, J. P., and Palma, S. (2015). Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop.* 156, 1–16. doi:10.1016/j.actatropica.2015.12.017.



- Bern, C. (2011). Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N. Engl. J. Med.* 364, 2527–2534. doi:10.1056/NEJMct1014204.
- Bern, C. (2015). Chagas' Disease. *N. Engl. J. Med.* 373, 456–466. doi:10.1056/NEJMra1410150.
- Blum, J. S., Wearsch, P. A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of Antigen Processing. *Annu Rev Immunol* 31. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095910.
- Borges, D. C., Araújo, N. M., Cardoso, C. R., and Lazo Chica, J. E. (2012). Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology* 138, 145–156. doi:10.1111/imm.12022.
- Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Gribben, J., and Nadler, L. (1996). The role of B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down-regulation of the immune response. *Immunol. Rev.* 153, 5–26. doi:10.1111/j.1600-065X.1996.tb00918.x.
- Brodskyn, C., Patricio, J., Oliveira, R., Lobo, L., Arnholdt, A., Mendonça-previato, L., et al. (2002). Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* Interfere with Macrophages and Dendritic Cell Responses. *Infect. Immun.* 70, 3736–3743. doi:10.1128/IAI.70.7.3736–3743.2002.
- Caetano, B. C., Carmo, B. B., Melo, M. B., Cerny, A., dos Santos, S. L., Bartholomeu, D. C., et al. (2011). Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for Toll-Like Receptor 7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 187, 1903–1911. doi:10.4049/jimmunol.1003911.
- Calderón, J., Maganto-Garcia, E., Punzón, C., Carrión, J., Terhorst, C., and Fresno, M. (2012). The receptor Slamf1 on the surface of myeloid lineage cells controls susceptibility to infection by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 8. doi:10.1371/journal.ppat.1002799.
- Camargo, R., Faria, L. O., Kloss, A., Favali, C. B. F., Kuckelkorn, U., Kloetzel, P. M., et al. (2014). *Trypanosoma cruzi* infection down-modulates the immunoproteasome biosynthesis and the MHC class I cell surface expression in HeLa cells. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0095977.
- Campos, M. A., Closel, M., Valente, E. P., Cardoso, J. E., Akira, S., Alvarez-leite, J. I., et al. (2004). Impaired Production of Proinflammatory Cytokines and Host Resistance to Acute Infection with *Trypanosoma cruzi* in Mice Lacking Functional Myeloid Differentiation Factor 88. *J. Immunol.* 172, 1711–1718. doi:10.4049/jimmunol.172.3.1711.
- Cardoso, M. S., Reis-cunha, J. L., Bartholomeu, D. C., Fernandez, M. M., and Bartholomeu, D. C. (2016). Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Front. Immunol.* 6, 1–15. doi:10.3389/fimmu.2015.00659.
- Chaussabel, D., Pajak, B., Vercruyse, V., Bisseyé, C., Garzé, V., Habib, M., et al. (2003). Alteration of Migration and Maturation of Dendritic Cells and T-Cell Depletion in the Course of Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *Lab. Investig.* 83, 1373–1382. doi:10.1097/01.LAB.0000087587.93781.6F.



- Cohn, L., and Delamarre, L. (2014). Dendritic cell-targeted vaccines. *Front. Immunol.* 5, 1–11. doi:10.3389/fimmu.2014.00255.
- Collin, M., MCGovern, N., and Haniffa, M. (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology* 140, 22–30. doi:10.1111/imm.12117.
- Cooke, G., Armstrong, M. E., and Donnelly, S. C. (2009). Macrophage migration inhibitory factor (MIF), enzymatic activity and the inflammatory response. *Biofactors* 35, 165–168. doi:10.1002/biof.27.
- Corinti, S., Albanesi, C., la Sala, A., Pastore, S., and Girolomoni, G. (2001). Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J. Immunol.* 166, 4312–8. doi:10.4049/jimmunol.166.7.4312.
- da Costa, T. A., Silva, M. V., Mendes, M. T., Carvalho-Costa, T. M., Batista, L. R., Lages-Silva, E., et al. (2014). Immunomodulation by *Trypanosoma cruzi*: Toward Understanding the Association of Dendritic Cells with Infecting TcI and TcII Populations. *J. Immunol. Res.* 2014, 1–12. doi:10.1155/2014/962047.
- Coura, J. R., Dias, J. C. P., Frasc, A. C. C., Guhl, F., Lazzari, J. O., Lorca, M., et al. (2002). Control of Chagas disease. doi:10.1016/S0065-308X(05)61004-4.
- D'Avila-Levy, C. M., Boucinha, C., Kostygov, A., Santos, H. L. C., Morelli, K. A., Grybchuk-Ieremenko, A., et al. (2015). Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 956–965. doi:10.1590/0074-02760150253.
- Deane, M. P., Lenzi, H. L., and Jansen, a. (1984). *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79, 513–515. doi:10.1590/S0074-02761984000400021.
- Demangel, C., Bertolino, P., and Britton, W. J. (2002). Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. *Eur. J. Immunol.* 32, 994–1002. doi:10.1002/1521-4141(200204)32:4<994::AID-IMMU994>3.0.CO;2-6.
- van Driel, B. J., Liao, G., Engel, P., and Terhorst, C. (2016). Responses to Microbial Challenges by SLAMF Receptors. *Front. Immunol.* 7, 1–14. doi:10.3389/fimmu.2016.00004.
- Dubsky, P., Ueno, H., Piqueras, B., Connolly, J., Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2005). Human dendritic cell subsets for vaccination. *J. Clin. Immunol.* 25, 551–572. doi:10.1007/s10875-005-8216-7.
- Dutra, W. O., Menezes, C. A. S., Magalhães, L. M. D., and Gollob, K. J. (2015). Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.* 36, 377–387. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate.



Erdmann, H., Steeg, C., Koch-nolte, F., Fleischer, B., and Jacobs, T. (2009). Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). *Cell. Microbiol.* 11, 1600–1611. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01350.x.

Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195, 327–333. doi:10.1084/jem.20010938.

Gravina, H. D., Antonelli, L., Gazzinelli, R. T., and Ropert, C. (2013). Differential Use of TLR2 and TLR9 in the Regulation of Immune Responses during the Infection with *Trypanosoma cruzi*. 8. doi:10.1371/journal.pone.0063100.

den Haan, J. M. M., Arens, R., and van Zelm, M. C. (2014). The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol. Lett.* 162, 103–12. doi:10.1016/j.imlet.2014.10.011.

Haniffa, M., Ginhoux, F., Wang, X.-N., Bigley, V., Abel, M., Dimmick, I., et al. (2009). Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J. Exp. Med.* 206, 371–385. doi:10.1084/jem.20081633.

Holdsworth, S. R., and Can, P. Y. (2015). Cytokines: Names and numbers you should care about. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 2243–2254. doi:10.2215/CJN.07590714.

Hotez, P. J., Molyneux, D. H., Fenwick, A., Kumaresan, J., Sachs, S. E., Sachs, J. D., et al. (2007). Control of neglected tropical diseases. *N. Engl. J. Med.* 357, 1018–1027. doi:10.1056/NEJMra064142.

Jaen, O., Rullé, S., Bessis, N., Zago, A., Boissier, M. C., and Falgarone, G. (2009). Dendritic cells modulated by innate immunity improve collagen-induced arthritis and induce regulatory T cells in vivo. *Immunology* 126, 35–44. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02875.x.

Klos, A., Tenner, A. J., Johswich, K. O., Ager, R. R., Reis, E. S., and Köhl, J. (2009). The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol. Immunol.* 46, 2753–2766. doi:10.1016/j.molimm.2009.04.027.

Koga, R., Hamano, S., Kuwata, H., Atarashi, K., Ogawa, M., Hisaeda, H., et al. (2006). TLR-Dependent Induction of IFN- β Mediates Host Defense against *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 177, 7059–7066. doi:10.4049/jimmunol.177.10.7059.

Kropf, S. P., and Sá, M. R. (2009). The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. *Hist. Cienc. Saude. Manguinhos.* 16 Suppl 1, 13–34. doi:10.1590/S0104-59702009000500002.

de Lana, M., Marques, E., and Machado, D. M. (2010). *Biology of Trypanosoma cruzi and Biological Diversity*. First Edit. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-384876-5.00014-9.

Laucella, S. A., Rottenberg, M. E., and de Titto, E. H. (1996). Role of cytokines in resistance and pathology in *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Argent Microbiol* 28, 99–109.



- Lewis, K. L., and Reizis, B. (2012). Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a007401. doi:10.1101/cshperspect.a007401.
- Lipscomb, M. F., and Masten, B. J. (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 82, 97–130. doi:10.1152/physrev.00023.2001.
- Lutz, M. B. (2012). Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction. *Front. Immunol.* 3, 1–9. doi:10.3389/fimmu.2012.00123.
- Machado, F. S., Dutra, W. O., Esper, L., Gollob, K., Teixeira, M., Factor, S. M., et al. (2013). Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol.* 34, 753–770. doi:10.1007/s00281-012-0351-7.Current.
- Magalhães, L. M. D., Viana, A., Chiari, E., Galvão, L. M. C., Gollob, K. J., and Dutra, W. O. (2015). Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003816. doi:10.1371/journal.pntd.0003816.
- Manchola, N. C., Rapado, L. N., Barison, M. J., and Silber, A. M. (2015). Biochemical Characterization of Branched Chain Amino Acids Uptake in *Trypanosoma cruzi*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 0, 1–10. doi:10.1111/jeu.12278.
- Medeiros, M. M., Peixoto, J. R., Oliveira, A.-C., Cardilo-Reis, L., Koatz, V. L. G., Van Kaer, L., et al. (2007). Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Leukoc. Biol.* 82, 488–496. doi:10.1189/jlb.0706478.
- Menges, M., Rößner, S., Voigtländer, C., Schindler, H., Kukutsch, N. A., Bogdan, C., et al. (2002). Repetitive Injections of Dendritic Cells Matured with Tumor Necrosis Factor alpha Induce Antigen-specific Protection of Mice from Autoimmunity. *J Exp Med* 195, 15–21. Available at: <http://www.jem.org/cgi/content/full/195/1/15>.
- Moll, H., Flohé, S., and Röllinghoff, M. (1995). Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *Eur. J. Immunol.* 25, 693–699. doi:10.1002/eji.1830250310.
- Monteiro, A. C., Schmitz, V., Morrot, A., de Arruda, L. B., Nagajyothi, F., Granato, A., et al. (2007). Bradykinin B2 Receptors of Dendritic Cells, Acting as Sensors of Kinins Proteolytically Released by *Trypanosoma cruzi*, Are Critical for the Development of Protective Type-1 Responses. *PLOS Pathog.* 3, 1730–1744. doi:10.1371/journal.ppat.0030185.
- Monteiro, A. C., Schmitz, V., Svensjo, E., Gazzinelli, R. T., Almeida, I. C., Todorov, A., et al. (2006). Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 177, 6325–6335. doi:10.1172/jci17796325 [pii].
- Muñoz-Saravia, S. G., Haberland, A., Wallukat, G., and Schimke, I. (2012). Chronic Chagas' heart disease: A disease on its way to becoming a worldwide health problem: *Epidemiology*,



etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Fail. Rev.* 17, 45–64. doi:10.1007/s10741-010-9211-5.

Nardy, A. F., Freire-de-Lima, C. G., and Morrot, A. (2015). Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol. Res.* 2015. doi:10.1155/2015/178947.

Neefjes, J., Jongasma, M. L., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11, 823–836. doi:10.1038/nri3084.

Nóbrega, A. A., Garcia, M. H., Tatto, E., Obara, M. T., Costa, E., Sobel, J., et al. (2009). Oral transmission of chagas disease by consumption of Açaí palm fruit, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 653–655. doi:10.3201/eid1504.081450.

O'Neill, D. W., Adams, S., and Bhardwaj, N. (2004). Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood J.* 104, 2235–2246. doi:10.1182/blood-2003-12-4392.Supported.

Oliveira, A., Alencar, B. C. De, Tzelepis, F., Klezewsky, W., Raquel, N., Neves, F. S., et al. (2010). Impaired Innate Immunity in Tlr4^{2/2} Mice but Preserved CD8 + T Cell Responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4^{-/-}, Tlr2^{-/-}, Tlr9^{-/-} or Myd88-Deficient Mice. *J. Immunol.* 180, 1000870. doi:10.1371/journal.ppat.1000870.

Ouaissi, A., Guilvard, E., Delneste, Y., Caron, G., Magistrelli, G., Herbault, N., et al. (2002). The *Trypanosoma cruzi* Tc52-Released Protein Induces Human Dendritic Cell Maturation, Signals Via Toll-Like Receptor 2, and Confers Protection Against Lethal Infection. *J. Immunol.* 168, 6366–6374. doi:10.4049/jimmunol.168.12.6366.

Van Overtvelt, L., Andrieu, M., Verhasselt, V., Connan, F., Choppin, J., Vercruyse, V., et al. (2002). *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8 + T lymphocytes. *Int. Immunol.* 14, 1135–1144. doi:1135-1144 doi:10.1093/intimm/14.11.1135.

Van Overtvelt, L., Vanderheyde, N., Verhasselt, V., Ismaili, J., De Vos, L., Goldman, M., et al. (1999). *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect. Immun.* 67, 4033–4040. Available at: papers3://publication/uuid/E7EDB0A6-58C2-4C69-A9D3-923DD6E42196.

Pearce, E. J., and Everts, B. (2015). Dendritic cell metabolism. *Nat Rev Immunol* 15, 18–29. doi:10.1038/nri3771.

Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., and Valiante, N. M. (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J. Exp. Med.* 195, 335–341. doi:10.1084/jem.20010934.

Planelles, L., Thomas, M. C., Marañón, C., Morell, M., and López, M. C. (2003). Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. *Clin. Exp. Immunol.* 131, 41–7. doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02022.x.



- Poncini, C. V., Ilarregui, J. M., Batalla, E. I., Engels, S., Cerliani, J. P., Cucher, M. A., et al. (2015). Trypanosoma cruzi Infection Imparts a Regulatory Program in Dendritic Cells and T Cells via Galectin-1-Dependent Mechanisms. *J. Immunol.* 195, 3311–3324. doi:10.4049/jimmunol.1403019.
- Poncini, C. V., Giménez, G., Pontillo, C. A., Alba-Soto, C. D., de Isola, E. L. D., Piazzón, I., et al. (2010). Central role of extracellular signal-regulated kinase and Toll-like receptor 4 in IL-10 production in regulatory dendritic cells induced by Trypanosoma cruzi. *Mol. Immunol.* 47, 1981–1988. doi:10.1016/j.molimm.2010.04.016.
- Poncini, C. V., Soto, C. D. A., Batalla, E., Solana, M. E., and Gonzalez Cappa, S. M. (2008). Trypanosoma cruzi Induces Regulatory Dendritic Cells In Vitro. *Infect. Immun.* 76, 2633–2641. doi:10.1128/IAI.01298-07.
- Ramírez, J. D., Guhl, F., Rendón, L. M., Rosas, F., Marin-Neto, J. A., and Morillo, C. A. (2010). Chagas Cardiomyopathy Manifestations and Trypanosoma cruzi Genotypes Circulating in Chronic Chagasic Patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e899. doi:10.1371/journal.pntd.0000899.
- Rampazo, E. V., Amorim, K. N. S., and Yamamoto, M. M. (2015). Antigen Targeting to Dendritic Cells Allows the Identification of a CD4 T-Cell Epitope within an Immunodominant Trypanosoma cruzi Antigen. 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0117778.
- Rassi, A., Rassi, A., and Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet* 375, 1388–1402. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
- Remer, K. A., Apetrei, C., Schwarz, T., Linden, C., and Moll, H. (2007). Vaccination with plasmacytoid dendritic cells induces protection against infection with Leishmania major in mice. *Eur. J. Immunol.* 37, 2463–2473. doi:10.1002/eji.200636780.
- Rodriguez, P., Carlier, Y., and Truyens, C. (2012a). Activation of cord blood myeloid dendritic cells by Trypanosoma cruzi and parasite-specific antibodies, proliferation of CD8 + T cells, and production of IFN-gamma. *Med Microbiol Immunol* 201, 157–169. doi:10.1007/s00430-011-0217-y.
- Rodriguez, P., Carlier, Y., and Truyens, C. (2012b). Trypanosoma cruzi activates cord blood myeloid dendritic cells independently of cell infection. *Med Microbiol Immunol* 201, 287–296. doi:10.1007/s00430-012-0230-9.
- Romano, P. S., Cueto, J. A., Casassa, A. F., Vanrell, M. C., Gottlieb, R. A., and Colombo, M. I. (2012). Molecular and cellular mechanisms involved in the Trypanosoma cruzi/host cell interplay. *IUBMB Life* 64, 387–396. doi:10.1002/iub.1019.
- Schmitz, V., Almeida, L. N., Svensjö, E., Monteiro, A. C., Köhl, J., and Scharfstein, J. (2014). C5a and bradykinin receptor cross-talk regulates innate and adaptive immunity in Trypanosoma cruzi infection. *J. Immunol.* 193, 3613–23. doi:10.4049/jimmunol.1302417.
- Schmunis, G. A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 75–85. doi:10.1590/S0074-02762007005000093.



Segura, E. (2016). “Review of Mouse and Human Dendritic Cell Subsets,” in *Dendritic Cell Protocols*, eds. E. Segura and N. Onai (New York: Springer Science+Business Media), 3–15. doi:10.1007/978-1-4939-3606-9_1.

Segura, E., and Amigorena, S. (2015). *Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells*. 1st ed. Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.ai.2015.03.002.

Stecconi-Silva, R. B., Andreoli, W. K., and Mortara, R. A. (2003). Parameters Affecting Cellular Invasion and Escape from the Parasitophorous Vacuole by Different Infective Forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 953–958. doi:10.1590/S0074-02762003000700016.

Steinman, R. M. (2007). Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat. Med.* 13, 1155–9. doi:10.1038/nm1643.

Stevens, J. R. (2008). Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite* 15, 226–232. doi:10.1051/parasite/2008153226.

Steverding, D. (2014). The history of Chagas disease. *Parasit. Vectors* 7, 1–8. doi:10.1186/1756-3305-7-317.

Strasen, J., Williams, T., Ertl, G., Zoller, T., Stich, A., and Ritter, O. (2013). Epidemiology of chagas disease in Europe: Many calculations, little knowledge. *Clin. Res. Cardiol.* 103, 1–10. doi:10.1007/s00392-013-0613-y.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022.

Teixeira, A., Vinaud, M., and Castro, A. M. (2009). *Emerging Chagas Disease*. Brasília: Bentham.

Terrazas, C. A., Huitron, E., Vazquez, A., Juarez, I., Camacho, G. M., Calleja, E. A., et al. (2011). MIF synergizes with *Trypanosoma cruzi* antigens to promote efficient dendritic cell maturation and IL-12 production via p38 MAPK. *Int. J. Biol. Sci.* 7, 1298–1310.

Terrazas, C. A., Terrazas, L. I., and Gómez-García, L. (2010). Modulation of Dendritic Cell Responses by Parasites: A Common Strategy to Survive. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010. doi:10.1155/2010/357106.

Tibayrenc, M. (1998). Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.* 28, 85–104. doi:10.1016/S0020-7519(97)00180-X.

Tomlinson, S., Pontes de Carvalho, L. C., Vandekerckhove, F., and Nussenzweig, V. (1994). Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. *J. Immunol.* 153, 3141–3147.

Tonelli, R. R., Silber, A. M., Almeida-de-Faria, M., Hirata, I. Y., Colli, W., and Alves, J. M. (2004). L-Proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Microbiol.* 6, 733–741. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00397.x.



Vasta, G. R. (2009). Roles of galectins in infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 424–38. doi:10.1038/nrmicro2146.

Verginis, P., Li, H. S., and Carayanniotis, G. (2005). Tolerogenic semimature dendritic cells suppress experimental autoimmune thyroiditis by activation of thyroglobulin-specific CD4⁺CD25⁺ T cells. *J. Immunol.* 174, 7433–7439. doi:10.4049/jimmunol.174.11.7433.

Verhasselt, V., Buelens, C., Willems, F., De Groote, D., Haeffner-Cavaillon, N., and Goldman, M. (1997). 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.* 158, 2919–2925. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=9058830&retmode=ref&cmd=prlinks\papers2://publication/uuid/B6F04091-8A8B-47E9-9304-EEFBEF935095>.

Vray, B., Camby, I., Vercruyse, V., Mijatovic, T., Bovin, N. V., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. (2004). Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. *Glycobiology* 14, 647–657. doi:10.1093/glycob/cwh068.

Vyas, J. M., Van der Veen, A. G., and Ploegh, H. L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 607–18. doi:10.1038/nri2368.

Watanabe Costa, R., da Silveira, J. F., and Bahia, D. (2016). Interactions between *Trypanosoma cruzi* Secreted Proteins and Host Cell Signaling Pathways. *Front. Microbiol.* 7, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2016.00388.

Wilkinson, S. R., Bot, C., Kelly, J. M., and Hall, B. S. (2011). Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 2072–2084. doi:10.2174/156802611796575894.

World Health Organization (2015). World Health Organization: Chagas disease. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.

Yoshida, N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78, 87–111.

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. S., Campbell, D. a., Chiari, E., Fernandes, O., et al. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 1051–1054. doi:10.1590/S0074-02762009000700021.

Zingales, B., Miles, M. a., Campbell, D. a., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., et al. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* 12, 240–253. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.009.

Zúñiga, E., Gruppi, A., Hirabayashi, J., Kasai, K. I., and Rabinovich, G. A. (2001a). Regulated expression and effect of galectin-1 on *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages:

Modulation of microbicidal activity and survival. *Infect. Immun.* 69, 6804–6812. doi:10.1128/IAI.69.11.6804-6812.2001.

Zúñiga, E., Rabinovich, G. a, Iglesias, M. M., and Gruppi, A. (2001b). Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 70, 73–79.

Figure legends

Figure 1. Possible scenarios after DC-*Trypanosoma cruzi* interaction. DCs may mature, up-regulating MHC molecule expression and proinflammatory cytokine production, which may stimulate antigen-specific T lymphocyte activation and proliferation to control parasitemia (magenta); or DCs may be manipulated and the resultant low MHC expression together with high regulatory cytokine production may lead to a weak T cell activation, helping parasite establishment (blue). DC deviant behavior pathway could represent a potent immune evasion strategy of virulent *T. cruzi* strains to successfully set host infection. On the other hand, less virulent *T. cruzi* strains lack DC modulation capacity, which enables host immune response and parasite control.

Figure 2. DC receptor–*T. cruzi* antigen interactions may induce host resistance or susceptibility to parasite by activating different DCs signaling pathways. DCs maturation, cytokine production and migration capacity could be up or down-regulated depending on the signaling pathways triggered during the initial contact between DCs and the parasite. H: DC receptors already known to interact with parasite in human model. M: DC receptors already known to interact with parasite in murine model. ?: May act as a maturation inducer or as regulatory cytokines activator.

Table 1. Study conditions in murine models

DC source	Markers	<i>T. cruzi</i> strain	Study conditions	Disease phase	Result	Reference
Spleen	CD11c	Tehuantepec	Tehuantepec <i>in vivo</i> infection	Acute	↓CD86; ↓ migration capacity	Chaussabel et al., 2003
Bone-marrow	CD11b; CD11c	RA	RA <i>in vitro</i> infection	Acute	↓Cytokine production; ↓endocytic capacity	Poncini et al., 2008
Spleen	CD11c	RA	RA <i>in vivo</i> infection	Acute	↓Cytokine production; ↓MHC II expression	Alba Soto et al., 2003
Spleen	CD11c	K98	K98 <i>in vivo</i> infection	Acute	↑Co-stimulatory molecules expression; ↑MHC II expression	Alba Soto et al., 2003
Bone-marrow	CD11b; CD11c	AQ1.7, MUTUM (TcI); 1849, 2369 (TcII)	<i>in vitro</i> infections	Acute	↑Anti-inflammatory cytokine production; ↑ TLR2 expression	da Costa et al., 2014
Spleen	CD11c	Y	<i>in vivo</i> infection using	Acute	↓Co-stimulatory molecules expression; ↓MHC II expression	Planelles et al., 2003



Bone-marrow	CD11c	Queretaro	different mouse lineages <i>in vivo</i> infection using MIF-deficient mice	Acute	IL-12 role in protection	Terrazas et al., 2011
Bone-marrow	CD11b; CD11c	RA	IL-10-deficient DCs were injected along RA strain in mice	From acute to chronic	↓Cytokine production; ↓MHC II expression	Alba Soto et al., 2010
Bone-marrow	CD11b; CD11c	RA	<i>in vitro</i> infections	Acute	↑Anti-inflammatory cytokine production; ↓T cell induction	Poncini et al., 2010
Bone-marrow DCs and NK cells	CD11c	RA	Study of NK cells and DCs interaction in mice	Acute	Unbalanced DC population	Batalla et al., 2013
Spleen	CD11b; CD11c	Colombian	300, 3000 and 30000 initial inocula in mice	From acute to chronic	Less favorable host response in medium inocula	Borges et al., 2012
Bone-marrow		CL Brener	<i>in vitro</i> assay using CpG islands	Acute	Recognition by TLR9; ↑IL-12 and IFN- γ production	Bartholomeu et al., 2008
Spleen	CD11c	Y	<i>in vivo</i> infection studying TLR9 expression	Acute	↑Recognition by TLR9; ↑inflammatory cytokine production	Gravina et al., 2013
Bone-marrow		Tulahuen	<i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> infection using MyD88/TRIF-deficient mice	Acute	No IFN- β production and no parasite clearance	Koga et al., 2006
Spleen	CD11c	CL Brener	<i>in vivo</i> infection using UNC93B1 deficient mice	Acute	No correct TLR activation; ↓IL-12p40 and IFN- γ	Caetano et al., 2012
Spleen	CD11c	Dm28c	<i>in vitro</i> infections using B2R-deficient DCs	Acute	No IL-12 production	Monteiro et al., 2007
Spleen	CD11c	Dm28c	<i>in vitro</i> infections using C5a antagonist	Acute	No IL-12p40/70 and IFN- γ production	Schmitz et al., 2014
Spleen	CD11c	RA	<i>in vitro</i> infections using Gal-1-deficient DCs	Acute	Regulatory T Cell induction	Poncini et al., 2015
Spleen	CD11c	Tehuantepec	<i>in vivo</i> infections studying Gal-3 expression	Acute	↑Gal-3 expression; ↓Migration capacity	Vray et al., 2004
Bone-marrow	CD11c	Tulahuen	<i>in vitro</i> infections blocking Siglec-E	Acute	↓Inflammatory cytokine production; ↓T cell induction	Erdmann et al., 2009
Bone-marrow	CD11c	Tehuantepec	<i>in vitro</i> infections blocking Siglec-E	Acute	Parasite clearance	Erdmann et al., 2009



Spleen	CD11b; CD11c	Y	<i>in vitro</i> infectionn using Slamf1- deficient splenic DCs	From acute to chronic	↓IFN- γ production; no intracellular <i>T. cruzi</i> replication	Calderón et al., 2012
--------	-----------------	---	--	-----------------------------	--	-----------------------

Figure 1

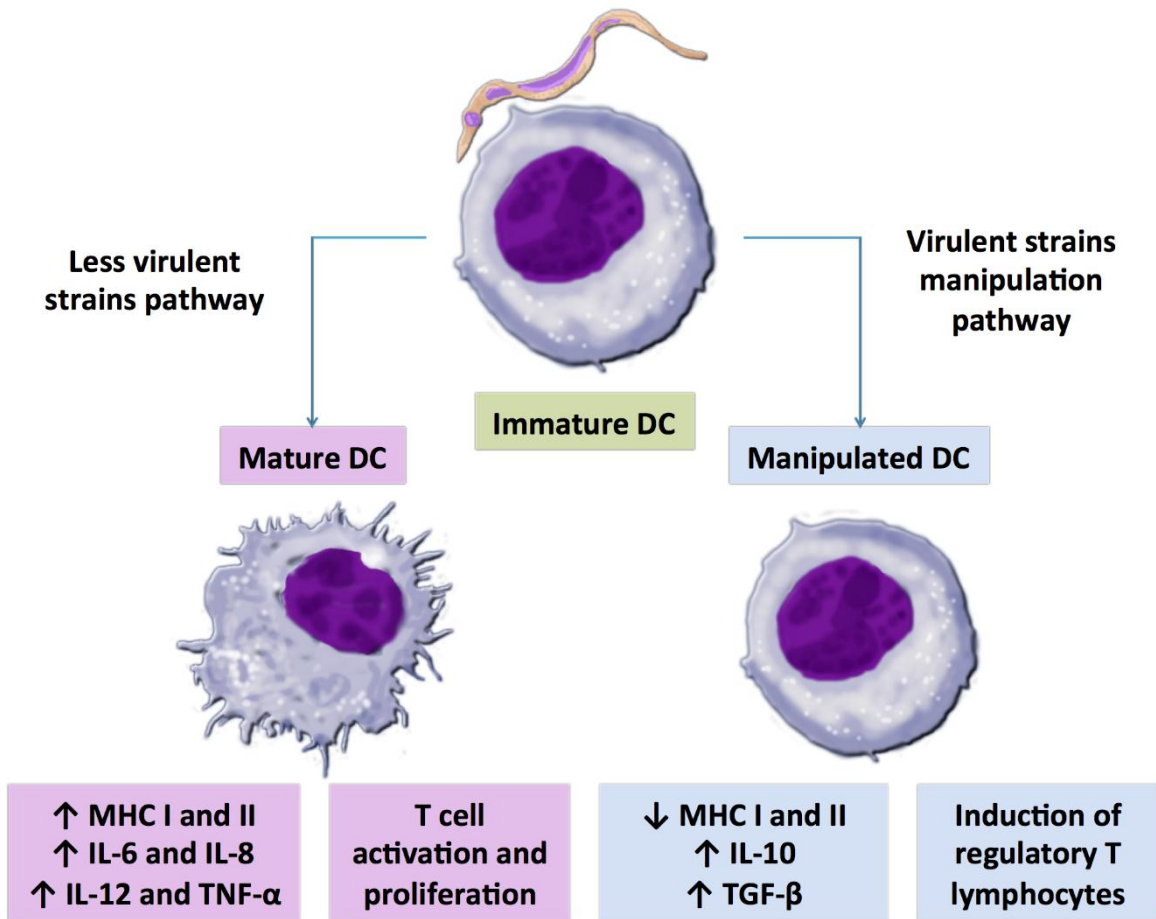


Figure 2

