



**Universidade de Brasília**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM CÉLULAS  
DENDRÍTICAS HUMANAS NA FASE INICIAL DA INTERAÇÃO COM  
*Trypanosoma cruzi***

**NATALIA GIL JARAMILLO**

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

Co-orientadora: **Profa. Dr. Izabela Marques Dourado Bastos**

Brasília - DF, 2021.



# Universidade de Brasília

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM CÉLULAS  
DENDRÍTICAS HUMANAS NA FASE INICIAL DA INTERAÇÃO COM  
*Trypanosoma cruzi***

**NATALIA GIL JARAMILLO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina-UnB como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora.

Orientador: **Prof. Dr. Jaime Martins de Santana**  
Coorientadora: **Profa. Dr. Izabela Marques Dourado Bastos**

Brasília - DF, 2021.



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

*Apoio financeiro:*

Curso de doutorado realizado com bolsa do CNPq (processo no. 142285/2016-1) e da Capes (no. 88887.497886/2020-00).

Doutorado sanduíche realizado com bolsa Capes-PrInt (no. 88887.364005/2019-00).

Projeto PRONEX “Interface entre biotecnologia, genômica funcional e garimpagem molecular de drogas para tratamento de leishmaniose e doença de Chagas” financiado por CNPq (INCTMCTI/CNPq/FAPs 16/2014), FAPDF (nos. 0193.001803/2017 e 0193.001485/2017) e Capes (923/18 CAPES-COFECUB).



**Dedico este trabalho aos povos brasileiro e colombiano,  
países irmãos na luta para sair da ignorância.  
Para eles, ciência, educação e liberdade!**



## AGRADECIMENTOS

Eu agradeço...

Aos meus orientadores Dr. Jaime Santana e Dra. Izabela Bastos, pela oportunidade, guia e exemplo. Seu papel foi indispensável para este trabalho, não só por conta do desenho do projeto, financiamento da pesquisa e competência profissional, se não também pelo apoio acadêmico.

Aos meus professores de ciência e de vida, e especialmente, à Flávia, quem me ajudou infinitamente não só no âmbito acadêmico, mas também no meu processo de amadurecimento pessoal desde o mestrado. Agradeço muito sua amizade, obrigada por escutar meus problemas. Também as professoras Cecília, Carla e Tainá, e ao professor Marcelo pelos conhecimentos e conselhos.

Aos meus orientadores nos Estados Unidos: Dr. Fayyaz Sutterwala, Dra. Suzanne Cassel, e Dr. David Engman, a quem agradeço ter me acolhido na sua família e no seu laboratório.

Aos membros da banca: Dr. Enrique Argañaraz, Dra. Carolina Poncini, Dra. Gloria Cadavid Restrepo e Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca, o tempo, conhecimento e experiência investidos para embelezar e melhorar este trabalho.

Às agências financiadoras: FAPDF, CAPES, CNPq e CAPES PrINT, o investimento na minha educação e na geração de ciência para o povo brasileiro.

A todos meus amigos e colegas do Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro, especialmente a Milene, Camila, Clênia, Yanna e Kaio, os conselhos, apoio e companhia que me foram dados. Amo vocês meus amigos da ciência; peço a Deus que nossa amizade seja sempre tão grande como o tamanho atual da minha saúde. Não posso esquecer a Raquel e Amanda, com quem trabalhei ombro a ombro no início do mestrado e doutorado, respectivamente; nem o Gabriel, cuja ajuda e alegria facilitaram vários experimentos.



À minha mãe, pelo seu amor e seu apoio que sempre me deram forças para continuar a minha jornada e costurou meus pedaços quando fui destruída e reconstruída no processo. Este trabalho não teria nem começado sem você. Obrigada por ser meu exemplo e minha inspiração.

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

Aos meus amigos de Medellín: Sebastián, Jorge e Sara, 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 fora do mundo acadêmico, especialmente a Nestor e Noemia, que com alegria aliviaram o peso de certos dias complicados. Amo o fato de poder falar sobre qualquer coisa com vocês, e lembro com carinho do tanto de conselhos e frases de apoio que recebi dos dois.

Aos amigos incríveis que fiz nos Estados Unidos: Helen, Miguel, Alex, Ben, Luz, Jorge, Luciana, Hernán, e especialmente ao Santiago, cuja amizade me ajudou a perceber novos pontos de vista e me deu força em tempos difíceis. Aparece um sorriso no meu rosto quando penso no tanto que a sua diversidade me enriquece.



## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xvi
LISTA DE TABELAS .....	xviii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT .....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	3
1.2. Resposta imune do hospedeiro mamífero.....	6
1.3. As DCs na doença de Chagas .....	10
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Etapas .....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	17
4.1. Metaciclogênese dos parasitos .....	17
4.2. Células dendríticas (DCs) .....	17
4.3. Interação DCs- <i>T. cruzi</i> .....	19
4.4. Extração de RNA .....	20
4.5. Transcritoma diferencial da interação DCs- <i>T. cruzi</i> .....	20
4.6. Validação do transcritoma diferencial via RT-qPCR .....	21
4.7. Dosagem de citocinas .....	23
4.8. Citometria de fluxo das células humanas.....	23
4.9. Extração de proteína a partir das amostras em Trizol.....	23
4.10. Obtenção e validação de DCs murinas de medula óssea (BM-DCs).....	24
4.11. Interação das BM-DCs com o <i>T. cruzi</i> .....	25



4.12. Treinamento das BM-DCs usando ácido polinossínico-ácido policitídílico (Poli I:C) .....	25
5. RESULTADOS .....	27
5.1. Características dos doadores.....	27
5.2. Interação DCs- <i>T. cruzi</i> durante 12 h .....	28
5.3. Transcritoma diferencial global da interação DCs humanas com as formas TMs do <i>T. cruzi</i> durante 12 h .....	29
5.4. Validação do transcritoma global via RT-qPCR .....	41
5.5. Validação do transcritoma via dosagem de citocinas.....	41
5.6. Preparação das amostras para o proteoma da interação DCs- <i>T. cruzi</i> .....	44
5.7. Obtenção de DCs murinas (BM-DCs) .....	46
5.8. Treinamento das BM-DCs usando Poli I:C.....	47
5.9. Manuscrito “The first contact of human dendritic cells with <i>Trypanosoma cruzi</i> reveals response to virus as an unexplored central pathway” .....	49
6. DISCUSSÃO.....	50
7. CONCLUSÃO .....	70
8. PERSPECTIVAS .....	71
9. REFERÊNCIAS .....	72
10. ANEXOS .....	96





## LISTA DE ABREVIATURAS

AIM2: Ausente em melanoma 2

APC: Alofocianina

ASC: Proteína associada à apoptose semelhante à speck contendo CARD

B2M: Beta-2 microglobulina

BCG: Bacillus Calmette-Guérin

BM-DCs: Células dendríticas derivadas de medula óssea

BSA: Albumina de soro bovino

BV421: Do inglês Brilliant Violet 421

CARD16: Proteína 16 que contém o domínio de recrutamento de caspase

CARS: Cisteinil-tRNA sintetase

CASP1: Caspase 1

CASP4: Caspase 4

CCL2: Ligante de quimiocina 2

CCL5: Ligante de quimiocina 5

CD: Grupamento de diferenciação

cDNA: DNA complementar

CFSE: Carboxifluoresceína succinimidil éster

Con A: Concanavalina A

CPM: Contagens por milhão

CTLA-4: Antígeno 4 do linfócito T citotóxico

CTR: Controle

CXCL8: Interleucina 8

CXCL9: Ligante 9 da quimiocina com motivo C-X-C

CXCL10: Ligante 10 da quimiocina com motivo C-X-C

Cy5.5: Cianina5,5

Cy7: Cianina7

DCs: Células dendríticas

DEGs: Genes diferencialmente expressos

DDX58: gene induzível pelo ácido retinóico I



DDX60: DEXD / H-Box Helicase 60

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTU: Do inglês *Discrete typing units*

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

eF450: eFluor 450

F4/80: Módulo semelhante ao EGF, contendo hormônio semelhante à mucina, semelhante ao receptor 1

FACS: Separação de células ativada por fluorescência

FAS: Proteína Associada ao Domínio de Morte

FasL: ligante Fas

Fc: Fração constante dos anticorpos

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GBP1: Proteína 1 de ligação a guanilato

GBP2: Proteína 2 de ligação a guanilato

GBP3: Proteína 3 de ligação a guanilato

GBP4: Proteína 4 de ligação a guanilato

GBP5: Proteína 5 de ligação a guanilato

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

GO: Do inglês *Gene Ontology database*

gp82: Glicoproteína de superfície 82 do *T. cruzi*

gp90: Glicoproteína de superfície 90 do *T. cruzi*

GPI: Glicosilinositol fosfato

GTP: Trifosfato de guanosina

H3K4me3: Trimetilação na lisina 4 das histonas H3

HLA: Antígeno leucocitário humano

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico

HERC5: Domínio HECT e RLD que contêm E3 *Ubiquitin Protein Ligase 5*

HPRT: Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

IFI16: Proteína induzível por interferon gama

IFI44: Proteína Induzida por Interferon 44



IFI44L: Proteína Induzida por Interferon 44 semelhante  
IFIH1: Proteína associada à diferenciação de melanoma 5  
IFIT1: Proteína induzida por interferon com repetições de tetratricopeptídeo 1  
IFIT2: Proteína induzida por interferon com repetições de tetratricopeptídeo 2  
IFIT3: Proteína induzida por interferon com repetições de tetratricopeptídeo 3  
IFN: Interferon  
IFN- $\alpha$ : Interferon alfa  
IFN- $\beta$ : Interferon beta  
IFN- $\gamma$ : Interferon gama  
IFNL1: Interferon Lambda 1  
IFR9: Fator regulador de interferon 9  
IgG: Imunoglobulina G  
IgM: Imunoglobulina M  
IKBKE: Inibidor da subunidade Epsilon do fator nuclear Kappa B  
IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 beta  
IL-2: Interleucina 2  
IL-4: Interleucina 4  
IL-6: Interleucina 6  
IL-8: Interleucina 8  
IL-10: Interleucina 10  
IL-12: Interleucina 12  
IL-12p70: Interleucina 12 na sua forma ativa como heterodímero das subunidades p40 e p35  
INF: Infectado  
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível  
IRF7: fator regulador do interferon 7  
ISG15: Gene 15 estimulado por interferon  
JNK: c-Jun N-terminal kinase  
KEEG: Do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*  
LAMP2: Proteína 2 da membrana associada ao lisossomo  
LPS: molécula de lipopolissacarídeo



MACS: Classificação celular ativada magneticamente  
MFN1: Mitofusina-1  
MHC I/ II: Complexo principal de histocompatibilidade de classe I/ II  
MoDCs: Células dendríticas derivadas de monócito  
MOI: Multiplicidade de infecção  
mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro  
MX1: Proteína de ligação a GTP induzida por interferon  
MyD88: Proteína de resposta primária da diferenciação mielóide 88  
NAMPT: Visfatina  
NF- $\kappa$ B: Fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B  
NK: Células Natural Killer  
NLRC: Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos, rico em repetições de leucina e contendo um domínio CARD  
NLRP: Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos, rico em repetições de leucina e contendo um domínio Pirina  
NLRs: Do inglês *NOD like receptors*  
NOD: Proteína contendo domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos  
OAS1: 2'-5'-oligoadenilato sintetase 1  
OAS3: 2'-5'-oligoadenilato sintetase 3  
OASL: Proteína do tipo 2'-5'-oligoadenilato sintetase  
PAMPs: Padrões moleculares associados ao patógeno  
pb: pares de bases  
PBS: Tampão fosfatosalina  
PCA: Análise de componentes principais  
PCR: Reação em cadeia da polimerase  
PD-L1: Ligante de morte celular programada 1  
PE: Ficoeritrina  
PerCP: Peridina-clorofila-proteína  
PLCB2: 1-fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato fosfodiesterase beta-2  
PNX1: Pannexin 1  
Poli I:C: Ácido polinossínico-ácido policitidílico



PPI: interação proteína-proteína  
RBCK1: Proteína 1 contendo dedo de zinco do tipo RanBP e C3HC4  
RIG-I: gene induzível pelo ácido retinóico I  
RIPK2: Receptor que Interage com Serina / Treonina Quinase 2  
RNA: Ácido ribonucléico  
RNA-Seq: Do inglês, *RNA-sequencing*  
RPMI: Do inglês *Roswell Park Memorial Institute*  
RT-qPCR: PCR quantitativa em tempo real  
RSAD2: Viperina  
SAPA: Do inglês *Shed acute phase antigen*  
SD: Desvio padrão  
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio  
SFB: Soro Fetal bovino  
STAT1: Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1  
STAT2: Transdutor de sinal e ativador da transcrição 2  
STRING: Do inglês *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*  
TAK1: Quinase 1 ativada pelo fator de transformação do crescimento beta  
TAU: Do inglês *Traitomine artificial urine medium*  
TAU3AAG: TAU com glicose, prolina, glutamato, aspartato  
Tc: *Trypanosoma cruzi*  
Tc52: Tiol-transferase Tc52  
tCTR: DCs controle treinadas  
TGF- $\beta$ : Fator de crescimento transformante beta  
Th1: T auxiliador tipo 1  
Th2: T auxiliador tipo 2  
Th17: T auxiliador tipo 17  
tINF: DCs infectadas treinadas  
TLR: Receptores tipo Toll  
TM: Tripomastigota metacíclico  
TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa  
TNFSF18: Membro 18 da superfamília do ligande do fator de necrose tumoral



TRAIL: Do inglês *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

Treg: Linfócitos T reguladores

TRIM25: Proteína 25 contendo motivo tripartido

USP18: Peptidase 18 específica da ubiquitina

WNT5B: Membro 5B da família Wnt



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....	4
Figura 2. Polarização da resposta imune durante a doença de Chagas .....	9
Figura 3. Reconhecimento do <i>T. cruzi</i> pelas DCs .....	12
Figura 4. Interação DCs- <i>T. cruzi</i> . DCs humanas foram infectadas com formas tripomastigotas metacíclicas do <i>T. cruzi</i> .....	28
Figura 5. PCA dos perfis de expressão das DCs humanas incluindo todas as amostras.....	30
Figura 6. Perfil de expressão gênica das DCs humanas durante a interação com as formas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> .....	30
Figura 7. <i>Heatmap</i> dos genes diferencialmente expressos dentro do termo de resposta de defesa contra vírus (GO:0051607) do <i>Gene Ontology</i> .....	32
Figura 8. <i>Heatmap</i> dos genes diferencialmente expressos dentro do termo de regulação da secreção da citocina IL-1 $\beta$ (GO:0050706) do <i>Gene Ontology</i> .....	33
Figura 9. Resumo da análise de enriquecimento de GO dos genes diferencialmente expressos.....	34
Figura 10. Enriquecimento da via de sinalização por receptores do tipo NOD (hsa04621) segundo KEGG .....	36
Figura 11. Enriquecimento da via da infecção do vírus do papiloma humano (hsa05165) segundo KEGG.....	37
Figura 12. Gráfico de correlação entre os níveis de expressão dos primeiros 50 genes diferencialmente expressos .....	38
Figura 13. A interação proteína-proteína ressalta os genes da resposta do vírus como <i>hubs</i> da rede.....	40
Figura 14. Validação via RT-qPCR do transcritoma da interação DCs- <i>T. cruzi</i> . ...	41
Figura 15. Dosagem de citocinas para validação do transcritoma em nível de proteína. ....	44
Figura 16. Integridade das amostras de proteína.....	45
Figura 17. Caracterização das BM-DCs.....	46



Figura 18. Marcadores de maturação nas BM-DCs treinadas durante 8 h com Poli I:C..... 47

Figura 19. Marcadores de maturação nas BM-DCs treinadas durante 24 h com Poli I:C..... 47

Figura 20. Marcadores de maturação nas BM-DCs treinadas ou não por 8 h com Poli I:C após 12 h de infecção..... 48

Figura 21. Marcadores de maturação após treinamento ou não por 24 h com Poli I:C e 12 h de infecção. .... 49





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores dos genes humanos usados para validação do transcritoma. .....	22
Tabela 2. Iniciadores da Qiagen para a validação do transcritoma.....	22
Tabela 3. Caracterização dos doadores.....	27
Tabela 4. Mapeamento das <i>reads</i> dentro do genoma humano.....	29
Tabela 5. Expressão diferencial dos transcritos das citocinas, segundo o transcritoma. NA: não aplica. ....	42
Tabela 6. Dosagem de citocinas. ....	42
Tabela 7. Quantificação de proteínas das amostras para proteoma da interação DCs- <i>T. cruzi</i> . ....	45

## RESUMO

As células dendríticas (DCs), como as mais potentes células apresentadoras de antígenos, são importantes na ligação entre imunidade inata e adaptativa. Dependendo de muitos fatores, estas células podem modular respostas, influenciando no desenvolvimento de doenças complexas como a doença de Chagas. Assim, o entendimento da interação inicial entre o sistema imune e o *Trypanosoma cruzi* pode revelar novos alvos estratégicos de estudo e tratamento para esta doença. Nesse contexto, o presente trabalho simula o contato inicial parasito-DC em uma infecção natural com o objetivo de estudar a modulação gênica funcional das DCs nessas condições. O transcritoma de DCs humanas após 12 h de interação *in vitro* com o parasito foi analisado e validado aqui. Uma grande variação foi encontrada entre doadores e entre amostras infectadas e controle, onde 468 genes mostraram expressão diferencial, incluindo genes de proteassoma, ubiquitinação, ISGilação e relacionados com resposta imune. Entre as vias de interesse que foram diferencialmente moduladas estão a via de resposta a vírus e a via dos NLRs, pouco estudadas dentro do contexto da interação DCs-*T. cruzi*. Os genes USP18, CXCL9, TNFSF18, WNT5B, PLCB2, OASL, MX1 e GPB4 e as citocinas IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-8 e TNF foram selecionadas para a validação do transcritoma, conseguindo corroborar as análises feitas. Finalmente, experimentos preliminares com DCs de camundongo foram feitos estimulando a via de resposta viral e avaliando a resposta nas células murinas. Este é o primeiro transcritoma de uma célula imune em contato com o *T. cruzi*; ea visão detalhada da resposta de uma célula apresentadora de antígenos ante o parasito será de ajuda para o entendimento da evolução diferencial dos indivíduos infectados da doença de Chagas, demonstrando, ademais, que uma via amplamente estudada é de fundamental importância desse primeiro contato.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, inflamassoma, tripomastigotas metacíclicos, transcritoma, infecção viral, células dendríticas.



## ABSTRACT

Dendritic cells (DCs), as the most potent antigen-presenting cells, are a key in linking innate and adaptive immunity. Depending on many factors, these cells can modulate responses, influencing the development of complex diseases such as Chagas disease. Understanding the initial interaction between the immune system and *Trypanosoma cruzi* may reveal new strategic study and treatment targets for this disease. In this context, the present study simulates the initial parasite-DC contact in natural infection to study the functional gene modulation of DCs under these conditions. The transcriptome of human DCs after 12 h of *in vitro* interaction with the parasite was analyzed and validated here. A considerable variation was found among donors and between infected and control samples. Four hundred sixty-eight genes showed differential expression, including proteasome, ISGylation, and ubiquitination genes and genes related to immune response. Among the interesting pathways that have been differentially enriched, the virus response pathway and the signaling pathway by NOD-like receptors were found, which are little studied within the context of the DCs-*T. cruzi* interaction. USP18, CXCL9, TNFSF18, WNT5B, PLCB2, OASL, MX1, GPB4 genes and IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-8, and TNF cytokines were selected for transcriptome validation, managing to corroborate the analyzes made. Finally, preliminary experiments with mouse DCs were done by stimulating the viral response pathway and evaluating the response in murine cells. The first transcriptome of an immune cell in contact with *T. cruzi* and its detailed view of an antigen-presenting cell's response to the parasite will help to understand the differential evolution of infected individuals with Chagas disease. Furthermore, this transcriptome demonstrates that a widely studied pathway is of fundamental importance for this first contact.

### Keywords:

Chagas disease, inflammasome, metacyclic trypomastigotes, transcriptome, virus infection, dendritic cells.

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é uma doença parasitária endêmica que afeta aproximadamente sete milhões de pessoas na América Latina, com estimativa de mais de 65 milhões em risco de contrair a doença (PAHO, 2017; WHO, 2020). A doença tornou-se um problema de saúde global, principalmente por causa da migração de indivíduos infectados. Por exemplo, existem mais de 120.000 casos agora registrados na Europa, mais de 300.000 nos EUA, e relatórios oficiais estimam mais 10.000 casos no Japão, Austrália e Canadá (SCHMUNIS; YADON, 2010; IMAI et al., 2015; WHO, 2018).

Esta é uma doença transmitida através de insetos vetores da subfamília Triatominae (CHAGAS, 1909). Sua transmissão oral é de crescente importância epidemiológica, com surtos frequentes de casos agudos e, às vezes, letais. Nestes episódios, o *T. cruzi* é adquirido por meio de alimentos ou bebidas contaminados com insetos ou fezes/urina de insetos (YOSHIDA, 2009; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). Em países não endêmicos, a transmissão ocorre principalmente por meio de transfusão de sangue, transplante de órgãos ou transmissão vertical de mãe para filho (SCHMUNIS, 2007).

A doença de Chagas usualmente manifesta-se em fase aguda e crônica. A fase aguda, é normalmente assintomática ou com sintomas leves, que incluem febre, inflamação no local da infecção, inflamação dos linfonodos e, em alguns casos, hepatomegalia. Já na fase crônica 30% a 40% dos indivíduos infectados evoluem para as formas clínicas conhecidas de pacientes chagásicos: cardiomiopatia, megacólon ou megaesôfago (MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Ademais, aproximadamente 2% dos indivíduos que não conseguem controlar a alta parasitemia característica da fase aguda morrem por miocardite aguda ou meningoencefalite, sendo estes, principalmente, crianças, indivíduos imunossuprimidos e aqueles infectados mediante a ingestão de alimentos contaminados onde a carga parasitária é alta (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012; MACHADO et al., 2013; DE ALBUQUERQUE et al., 2018).



Os problemas cardíacos são os mais frequentes e graves entre as formas clínicas apresentadas durante a fase crônica. Estes representam 14% a 45% dos pacientes sintomáticos, que entre sinais iniciais podem mostrar bloqueios e anormalidades nas paredes do coração, como focos de inflamação, áreas de fibrose, dilatação ventricular, e áreas acinéticas ou discinéticas, entre outras; enquanto que na fase tardia poderão ser vistos bradicardia, bloqueios atrioventriculares e intraventriculares de alto-nível, taquicardia ventricular sustentada, aneurisma, embolia e cardiomiopatia dilatada progressiva com insuficiência cardíaca congestiva (RASSI; RASSI; RASSI, 2001). Por outro lado, as manifestações gastrointestinais são menos comuns. Estas representam 10% a 21% dos casos e acontecem com maior frequência no cone sul de América do Sul (Argentina, Chile, Uruguai e o sul do Brasil). Pacientes com megaesôfago apresentam risco aumentado de apresentar câncer de esôfago, enquanto que o desenvolvimento de megacólon está relacionado com a obstrução do trânsito intestinal pelo endurecimento das fezes, torção do intestino e isquemia intestinal (DE OLIVEIRA et al., 1998).

O resultado da infecção depende da combinação de muitos processos complexos, com uma previsão precisa sobre a progressão para a fase crônica permanecendo um desafio. Os eventos imunológicos na fase aguda influenciam o desenvolvimento de uma resposta protetora ou patogênica em estágios posteriores da doença de Chagas. Isto porque o reconhecimento do parasito, a apresentação de antígenos para ativação da resposta adaptativa e a eliminação da maior parte da carga parasitaria acontece nessa fase. Disto dependerá se poucos parasitos conseguem evadir a resposta imune e o desenvolvimento de células de memória específicas contra *T. cruzi* (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014). Da mesma forma, a diversidade genética do parasita e o tropismo de tecidos, o inóculo e a rota de transmissão, juntamente com o histórico genético do hospedeiro, a idade e as condições nutricionais, podem modular os mecanismos imunológicos e de patogênese (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; BONNEY; ENGMAN, 2015)

Atualmente, o único fármaco disponível na maior parte da América Latina para o tratamento da doença de Chagas é o benzonidazol ao que se lhe tem

atribuído mecanismos de ação inespecíficos para a eliminação do parasito (RIBEIRO et al., 2020). No entanto, estudos randomizados recentes demonstraram que o benzonidazol somente reduz a carga parasitária, mas não conduz a nenhuma melhoria clínica nos pacientes com cardiomiopatia chagásica estabelecida. Adicionalmente, os efeitos secundários são tão frequentes e sérios que a maioria dos pacientes não consegue finalizar o tratamento (MORILLO et al., 2015; RASSI; MARIN-NETO; RASSI, 2017). Considerando que os dois medicamentos atualmente em uso (Benzonidazol e Nifurtimox) tem mais de 40 anos, com eficácia limitada (principalmente na fase aguda) e com relatos crescentes de resistência do parasita, causando efeitos adversos graves, incluindo dano hepático (WILKINSON et al., 2011; MORILLO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2020), o desenvolvimento de tratamentos inovadores para a doença é urgente. Além disso, nenhuma vacina avançou ainda para o estágio de ensaio clínico (RIOS et al., 2019).

### 1.1. *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico desta doença e apresenta uma única mitocôndria com uma região específica contendo grande quantidade de DNA em forma de minicírculos e maxicírculos chamada cinetoplasto, particularidade da família Trypanosomatidae (CAVALIER-SMITH, 2002; DE LANA; MARQUES; MACHADO, 2010; CAVALCANTI; DE SOUZA, 2018). Este tripanossomatídeo apresenta diferentes estágios de desenvolvimento ao longo de um ciclo de vida complexo que se dá entre um hospedeiro invertebrado (vetor) e um hospedeiro mamífero (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Insetos da subfamília Triatominae podem ser infectados mediante a ingestão de sangue contaminado. Este sangue contém as formas tripomastigotas, infectivas mas não proliferativas, que se diferenciam em epimastigotas no intestino médio do inseto vetor. Os epimastigotas são formas proliferativas não infectivas que não sobrevivem ao sistema complemento no sangue de mamíferos. Estas formas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (TMs) no intestino posterior dos triatomíneos onde o meio é restrito em nutrientes. Os TMs são expelidos nas fezes do inseto após um novo repasto, facilitando sua entrada por meio de feridas ou contato com tecidos

mucosos no hospedeiro mamífero. Estas formas infectivas e não proliferativas têm a capacidade de infectar qualquer célula mamífera nucleada. Durante a infecção da célula hospedeira, os parasitos secretam fatores que destroem o vacúolo parasitóforo e uma vez no citoplasma, diferenciam-se em amastigotas, formas pouco infectivas e proliferativas, as quais se dividem por fissão binária com um tempo de duplicação de aproximadamente 14 h, dependendo da cepa. Após sucessivas divisões, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que podem infectar novas células ou serem ingeridos por outro inseto vetor para recomençar o ciclo (Figura 1) (DE LANA; MARQUES; MACHADO, 2010; BERN, 2015; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

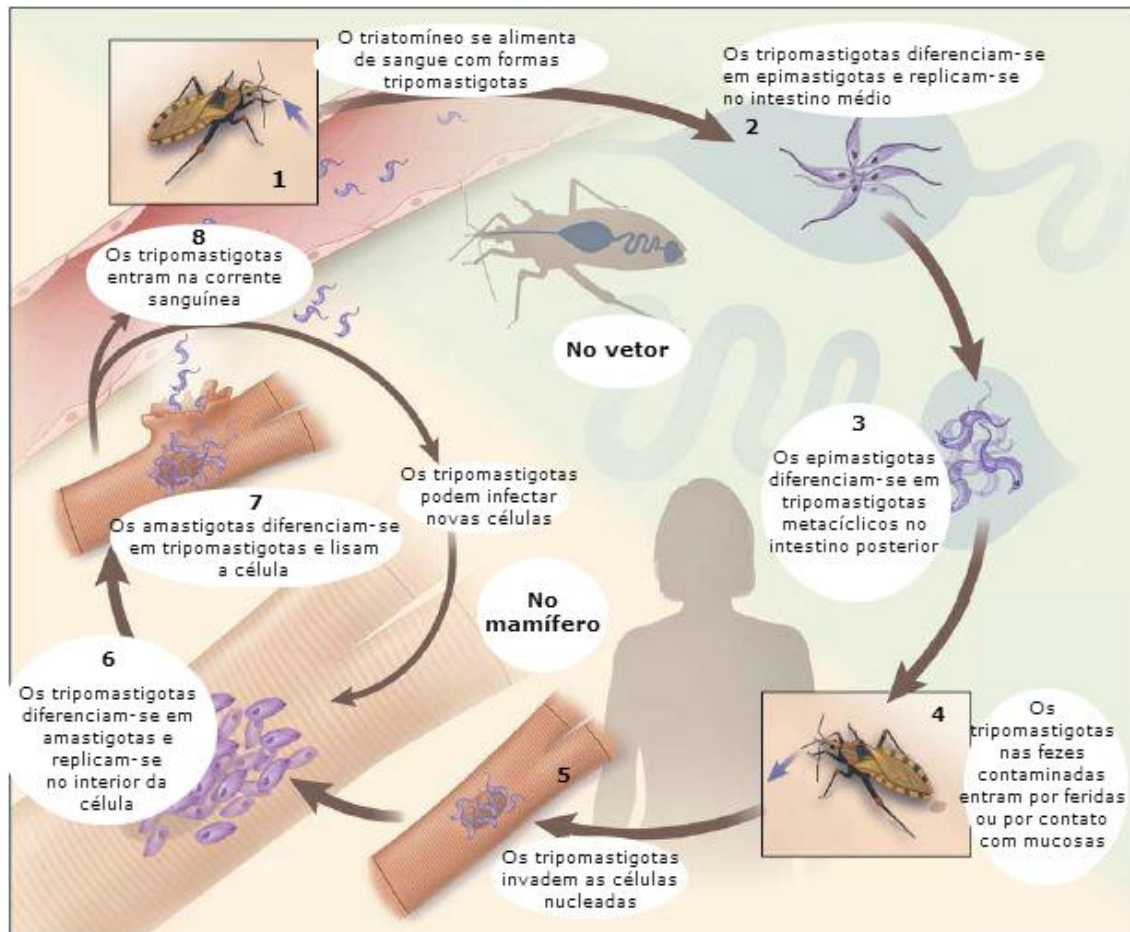


Figura 1. Ciclo de vida do *T. cruzi*. Modificada de (BERN, 2015).

Especificamente, os TMs apresentam uma expressão proteica e uma morfologia única que estabelece a interação com o hospedeiro de uma forma

totalmente diferente quando comparada com amastigotas e tripomastigotas sanguíneos (TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986; YOSHIDA, 2006; BAYER-SANTOS et al., 2013). Estas são as principais formas com as que o hospedeiro mamífero tem interação no início da infecção, e as que apresentam de maneira exclusiva as glicoproteínas de membrana gp82 e gp90, membros da família trans-sialidases que medeiam a invasão do parasito na célula hospedeira (ATWOOD III et al., 2005; BAYER-SANTOS et al., 2013). A molécula gp82 é reconhecida no hospedeiro mediante a proteína LAMP2 e induz um incremento temporal da concentração de  $Ca^{2+}$  na célula hospedeira, favorecendo o recrutamento de lisossomos no lugar da entrada (DORTA et al., 1995; RODRIGUES et al., 2019). Esta molécula também medeia a interação dos TMs com a mucina gástrica e facilita sua penetração nas células epiteliais das mucosas, fazendo os TMs a forma mais eficiente durante a infecção oral (NEIRA et al., 2003; YOSHIDA, 2006). Por outro lado, a molécula gp90 tem um efeito antifagocítico, removendo resíduos de glicose necessários para a internalização, assim como a não mobilização de  $Ca^{2+}$  após sua ligação com a célula hospedeira. Esta molécula é digerida facilmente pela pepsina gástrica, favorecendo a infecção do parasito por via oral (COVARRUBIAS et al., 2007; DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010).

Caracterizado por seu grande polimorfismo, o *T. cruzi* tem sido classificado segundo marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos em diferentes DTUs (em inglês *Discrete Typing Units*: TcI a TcVI e TcBat), que se distribuem diferencialmente ao redor do continente americano e apresentam diferentes tropismos teciduais (MELO; BRENER, 1978; ZINGALES et al., 2012). Análises de clones derivados de cepas selvagens confirmaram uma variabilidade genética de até 48% entre as cepas de *T. cruzi* (LEWIS et al., 2009). Isto somado à possível recombinação natural entre elas demonstram a grande diversidade genética do parasito, dificultando sua classificação (ZINGALES, 2018). Por exemplo, no cone sul da América do sul TcII, TcV e TcVII são predominantes, os três podendo desenvolver cardiomiopatias ou síndrome dos megas; enquanto que da linha do Equador ao norte, o TcI é o mais encontrado nos indivíduos infectados e a cardiomiopatia é mais comum (ZINGALES et al., 2012; ZINGALES, 2018).



Adicionalmente, diferenças nas estruturas da membrana nas cepas do parasito influem no reconhecimento pelo hospedeiro, podendo ativar receptores de forma diferencial, desencadeando respostas diferentes (CARREIRA et al., 1996; DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; GIL-JARAMILLO et al., 2016). Portanto, o fator linhagem não pode ser esquecido e será fundamental para o entendimento da evolução diferencial da doença de Chagas.

A linhagem CL Brener do *T. cruzi*, usada no presente trabalho, foi obtida a partir da clonagem da cepa CL, que por sua vez foi obtida de *Triatoma infestans* no Rio Grande do Sul, Brasil (BRENER; CHIARI, 1963). Este clone pertencente à DTU TcVI é um híbrido das DTUs TcII e TcIII, e é o mesmo clone usado como organismo de referência no projeto Genoma de *T. cruzi* (STURM et al., 2003; EL-SAYED et al., 2005). A DTU TcVI se caracteriza pela sua presença no cone sul de América do Sul, ciclos principalmente domésticos e vetor ou hospedeiro silvestre desconhecido, podendo apresentar tanto cardiomiopatia quanto síndrome dos megas nos indivíduos infectados (ZINGALES et al., 2012). As características da cepa para sua escolha como referência para a montagem do genoma incluem ter sido isolada de um vetor na natureza, susceptibilidade ao tratamento quimioterápico, tropismo por células musculares e sintomas claros durante a fase aguda (ZINGALES et al., 1997).

## **1.2. Resposta imune do hospedeiro mamífero**

Durante a fase aguda, células NK, macrófagos, DCs e linfócitos T e B, assim como a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 são de grande importância para o controle e eliminação do parasito (MACHADO et al., 2013). Entre as moléculas reconhecidas pelas células da imunidade inata, sabe-se que externamente as GPI-mucinas, na membrana do *T. cruzi*, ativam o TLR2/6 e os glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) ativam o TLR4. Intracelularmente os motivos de CpG no DNA estimulam o TLR9, o RNA do parasito pode ativar o TLR7, e algumas proteínas do parasito podem ativar o inflamassoma (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010; CARDOSO et al., 2016). As células NK, após reconhecerem moléculas de superfície do parasito, são as primeiras produtoras IFN- $\gamma$ , necessário

para a ativação de macrófagos e DCs, que irão proporcionar um ambiente pró-inflamatório requerido para a ativação da imunidade adquirida (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014). Adicionalmente, a função citotóxica das células NK tem um papel importante na eliminação inicial do parasito e em modelo murino foi visto que a depleção destas células resulta em susceptibilidade e impossibilidade de controle da infecção (CARDILLO et al., 1996; UNE; ANDERSSON; ÖRN, 2003).

Monócitos, DCs e macrófagos são fundamentais para o estabelecimento do meio pró-inflamatório que dirigirá a ativação e polarização linfocitária necessária para o eficiente controle do parasito. Estes são os principais produtores da citocina IL-12 que estimulará a polarização tipo 1 nos linfócitos T auxiliares no início da infecção. Múltiplos estudos em camundongos que não expressam esse gene mostraram aumento na parasitemia e mortalidade (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018). Outra importante função destas células fagocíticas é a de eliminar o parasito por meio do estresse oxidativo produzido no vacúolo parasitóforo. No entanto, o *T. cruzi* conta com uma rede metabólica antioxidante que permite sua sobrevivência e escape (CARDOSO et al., 2016). Portanto, somente uma célula fagocítica especializada, ativada pela imunidade adquirida, será eficiente para a eliminação do parasito (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018). Com relação aos neutrófilos, também células fagocíticas, observa-se que são fortemente ativadas após interagir com o parasito, produzindo TNF e IL-12, mas que sofrem apoptose associada à expressão do receptor do TNF e de FasL, o que poderia ser um mecanismo redutor da resposta imune do hospedeiro mamífero (MAGALHÃES et al., 2017).

Os linfócitos T e B são necessários para a completa ativação do sistema imune; sua retroalimentação para as células efectoras mediante a produção de IFN- $\gamma$ , sua ação citotóxica e a produção de anticorpos é fundamental para a eliminação do parasito nos tecidos. Mas durante a infecção pelo *T. cruzi* sua ativação parece retardada por mecanismos de evasão do parasito (OUAISSI et al., 2001; BASSO, 2013). Na fase aguda linfócitos T auxiliares são ativados, mas a aparição de linfócitos T citotóxicos específicos para antígenos de *T. cruzi* acontece somente no final desta fase. Algumas moléculas do parasito, como SAPA (*Shed acute phase antigen*), desencadeiam uma inibição da proliferação dos linfócitos T, enquanto que

as glicoproteínas de membrana podem inibir a expressão dos receptores da citocina de proliferação IL-2. Ademais, *T. cruzi* tem mostrado capacidade de incrementar a expressão de Fas em células T CD8 específicas para antígenos do parasito assim como a morte celular das células B (OUAISSI et al., 2001; TZELEPIS et al., 2006; ALVAREZ et al., 2014; CARDOSO et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2020). Também é conhecido que a ativação retardada das células apresentadoras de antígenos pode ser mais uma explicação para o desenvolvimento demorado da resposta adaptativa (BOUSSIOTIS et al., 1996; PLANELLES et al., 2003; BATALLA et al., 2013; PONCINI et al., 2015; GIL-JARAMILLO et al., 2016). Testes *in vivo* usando DCs contendo peptídeos de *T. cruzi* mostraram a indução de células T CD4 Foxp3 regulatórias que suprimem a ativação dos linfócitos T CD8 via CTLA-4 e TGF- $\beta$  (ERSCHING et al., 2016).

Alta produção de anticorpos do tipo IgM e IgG contra o protozoário é observada durante o final da fase aguda, assim como ativação policlonal e alta proliferação de linfócitos B (ANTAS et al., 1999; BASSO, 2013). A subclasse IgG é a principal envolvida na eliminação do parasito em nível local e sistêmico por meio de mecanismos como fixação do sistema complemento, aglutinação e citotoxicidade (BASSO, 2013; ALVAREZ et al., 2014). No entanto, esta ativação policlonal e a alta produção de anticorpos pode ser uma das causas do fenômeno autoimune mediado por anticorpos autorreativos (DE BONA et al., 2018). Isto se encontra respaldado por hibridomas obtidos a partir de camundongos infectados por *T. cruzi*, que mostraram uma baixa ligação ao parasito, mas alto reconhecimento de estruturas naturais do hospedeiro, como actina, tubulina, miosina, queratina, entre outras (MINOPRIO et al., 1989).

Alguns estudos têm demonstrado que as fases aguda e crônica da doença de Chagas requerem uma polarização diferente. Um perfil T auxiliar do tipo I na fase aguda garante a eliminação do parasito através do estresse nitroxidativo ativado em células efectoras retroalimentadas com as citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que são produzidas pelos linfócitos Th1; enquanto que uma resposta regulatória que controle a inflamação exacerbada, sem imunossuprimir a resposta celular até um nível de permitir um incremento na parasitemia, previne as formas clínicas da

fase crônica (Figura 2) (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; DUTRA et al., 2015; CARDOSO et al., 2016).

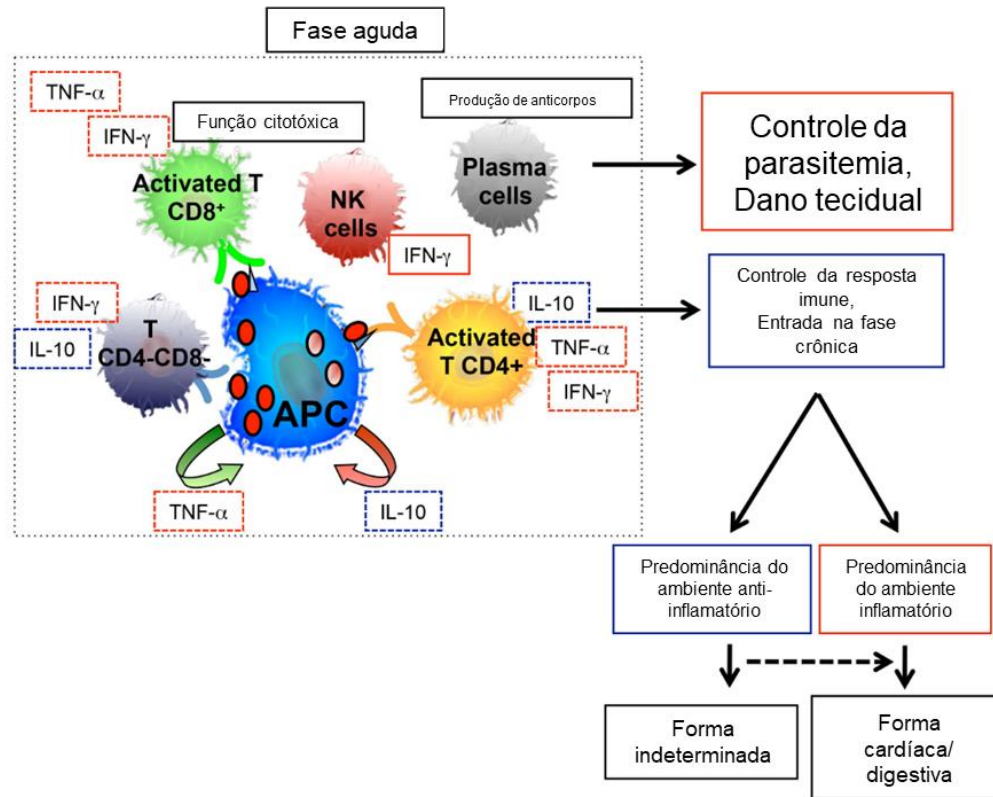


Figura 2. Polarização da resposta imune durante a doença de Chagas. Moléculas pró-inflamatórias (vermelho) são fundamentais para o controle da parasitemia na fase aguda, mas as moléculas anti-inflamatórias (azul) protegem contra os danos teciduais causadores da doença. Modificada de (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014).

Assim, as hipóteses da autoimunidade e do dano tecidual causado por respostas inflamatórias descontroladas foram as principais explicações para a aparição diferencial das formas clínicas em certos indivíduos infectados. Além do estudo de Minoprio e colaboradores em 1989, outros trabalhos demonstraram interação citotóxica de linfócitos específicos para antígenos do *T. cruzi* em células cardíacas não infectadas, e um ataque imunológico específico para células cardíacas e neurônios. Igualmente, o fato de não achar ninhos de amastigota em corações chagásicos fortaleceu esta hipótese (TEIXEIRA et al., 2011). Adicionalmente, a liberação pela ruptura de tecidos após a saída dos tripomastigotas de antígenos próprios normalmente não expostos, assim como de

mediadores de inflamação, pode acarretar na produção de anticorpos autorreativos resultando em autoimunidade (BONNEY; ENGMAN, 2015; DE BONA et al., 2018). No entanto, nos últimos anos, têm-se gerado evidências de que a presença do parasito é necessária para o estabelecimento da doença; novas tecnologias facilitaram a localização de antígenos nos corações dos pacientes com cardiomiopatia chagásica, mas não naqueles na fase indeterminada, a obtenção e amplificação de DNA do protozoário em tecidos de pacientes com os síndromes dos megas, e inclusive a visualização do parasito nos tecidos de camundongos cronicamente infectados (HYLAND et al., 2008; ALVAREZ et al., 2014; LEWIS et al., 2015, 2018).

### **1.3. As DCs na doença de Chagas**

Um dos momentos no qual sabe-se que ocorre a manipulação da resposta imune pelo parasito é na ligação entre a resposta imune inata e a adaptativa, onde células apresentadoras de antígenos como as DCs exercem sua função (VAN OVERTVELT et al., 1999; BRODSKYN et al., 2002; OUAISSI et al., 2002; VAN OVERTVELT et al., 2002; ALBA SOTO et al., 2003; PLANELLES et al., 2003; PONCINI et al., 2008; DA COSTA et al., 2014; GIL-JARAMILLO et al., 2016; BARBOSA et al., 2019). Estas células apresentadoras de antígenos são consideradas as mais especializadas, pois reconhecem e internalizam antígenos no lugar da infecção, amadurecendo e migrando desde os tecidos periféricos até os linfonodos para apresentá-los (BANCHEREAU et al., 2000). Existem diferentes subtipos residentes de DCs, algumas associadas à pele e mucosas, como as células de Langerhans, que são as primeiras células potenciais a serem estimuladas pela entrada do parasito no hospedeiro junto com outros subgrupos que chegarão no lugar da infecção nas próximas horas (KELLY; HWANG; KUBES, 2007; LUTZ et al., 2017). Portanto, como primeira linha de combate, a capacidade das DCs de ativar linfócitos T virgens será um ponto chave no controle da infecção no início da fase aguda (COLLIN; MCGOVERN; HANIFFA, 2013).

Para ativar linfócitos T virgens, as DCs precisam acionar 3 sinais principais: apresentação de antígenos por meio do complexo MHC I e II, expressão de

moléculas coestimulatórias e produção de citocinas (DEN HAAN; ARENS; VAN ZELM, 2014). No que diz respeito ao primeiro sinal, múltiplos estudos têm demonstrado que o *T. cruzi* tem a capacidade de reduzir a expressão do MHC-II mediante um mecanismo ainda desconhecido. Isto foi visto em diferentes subtipos de DCs obtidas a partir de camundongos de diferentes linhagens, e usando diversas cepas do parasito (ALBA SOTO et al., 2003; PONCINI et al., 2008; BARBOSA et al., 2019). Em um estudo usando DCs derivadas de monócito (MoDCs), Poncini e colaboradores monitoraram a maturação, migração e eficiência na apresentação de antígenos destas células após uma infecção intradérmica em camundongos. Neste caso, todos os subtipos de DCs obtidos apresentaram uma menor expressão do MHC-II, com exceção das iDCs (DCs não migratórias) e das DCs CD8 $\alpha^+$  ou DCs clássicas (PONCINI; GONZÁLEZ-CAPPA, 2017). De maneira interessante, foi visto que a saliva dos triatomíneos pode manipular a resposta das DCs ao parasito, e consistentemente, todas as espécies testadas desencadearam uma redução no MHC-II (MENDES et al., 2016). O panorama é o mesmo em humanos onde MoDCs de doadores mostraram expressão menor do complexo apresentador de antígeno classe I ou II após interagirem com o *T. cruzi* ou seus fatores liberados no meio (VAN OVERTVELT et al., 1999, 2002; BRODSKYN et al., 2002). Somente um dos estudos demonstrou maior expressão do MHC-II após o reconhecimento da proteína Tc52 do parasito pelo TLR2 (OUAISSI et al., 2002). Portanto, parece que a resposta e ativação das DCs depende em parte de como é reconhecido o parasito. A Figura 3 resume o encontrado até agora em relação ao reconhecimento do *T. cruzi* pelas DCs, onde em rosa são apresentadas as interações que significariam resistência do hospedeiro, e em azul as que desencadeariam susceptibilidade (GIL-JARAMILLO et al., 2016).

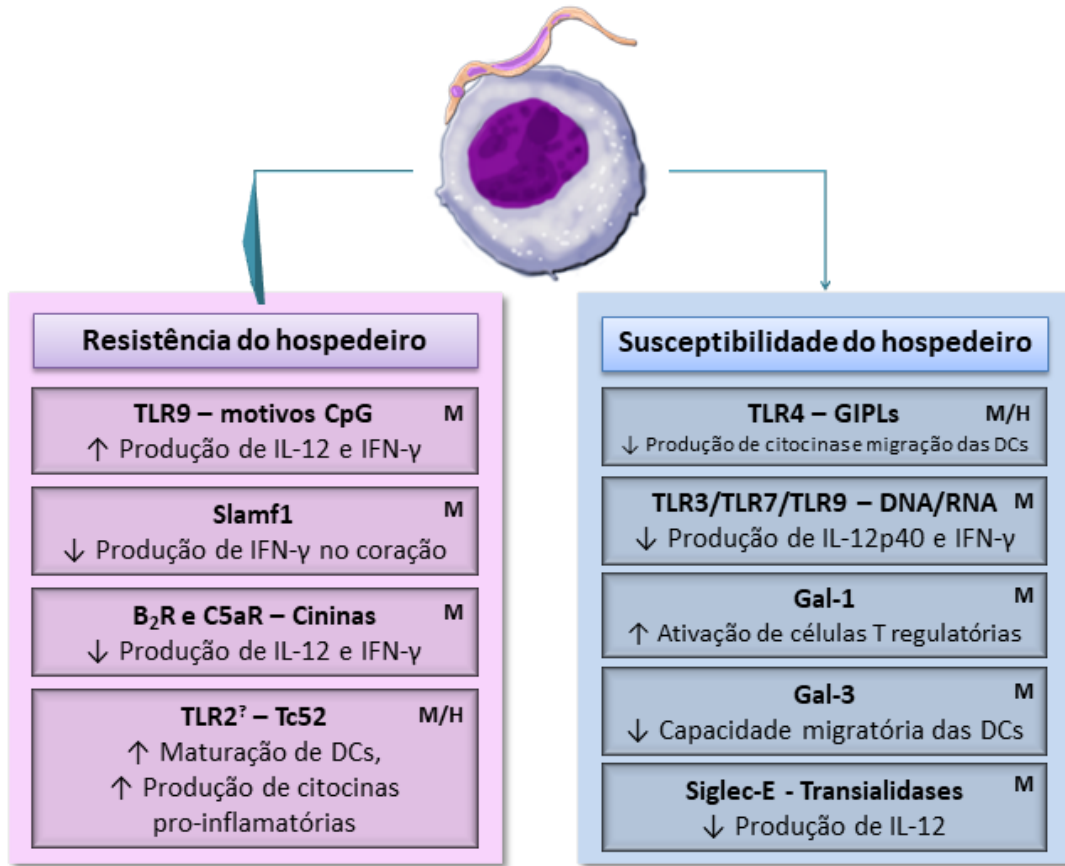


Figura 3. Reconhecimento do *T. cruzi* pelas DCs. O reconhecimento de diferentes antígenos do *T. cruzi* por diferentes receptores nas DCs desencadeia diferentes resultados. Resistência e susceptibilidade do hospedeiro são mostradas em rosa e azul, respectivamente. M: obtido em modelo murino; H: obtido em modelo humano. Modificada de (GIL-JARAMILLO et al., 2016).

Referente ao segundo sinal, os estudos em camundongos e distintas linhagens do *T. cruzi* demonstraram a diminuição das moléculas coestimulatórias CD80, CD86, CD83 e CD40, assim como o aumento da expressão da molécula inibitória PD-L1 (PLANELLES et al., 2003; DA COSTA et al., 2014; BARBOSA et al., 2019). Em humanos, dois trabalhos obtiveram resultados similares aos do modelo murino (VAN OVERTVELT et al., 1999; BRODSKYN et al., 2002), mas alguns apresentaram resultados contraditórios. Ouaisi e colaboradores obtiveram uma maior expressão de CD86 e CD83 nas DCs após interagirem com a molécula Tc52 do *T. cruzi* (OUAISSI et al., 2002). Outro estudo demonstrou que as células não infectadas, mas que tinham interagido com o parasito, expressavam mais CD80 e CD83 (RODRIGUEZ; CARLIER; TRUYENS, 2012). E finalmente, Magalhães e

colaboradores obtiveram maior expressão de CD80 e CD86 em DCs infectadas com a cepa Col cl1.7, mas não com a cepa Y (MAGALHÃES et al., 2015). É possível que dependendo da cepa e dos marcadores mais expressos em cada, do doador, do subtipo de DCs e dos receptores expressos no momento da infecção, a resposta será diferente, e no geral, cepas mais virulentas inibem a expressão das moléculas coestimulatórias (GIL-JARAMILLO et al., 2016).

Por último, no terceiro sinal de ativação, tanto o modelo humano quanto o murino evidenciaram o aumento induzido pelo *T. cruzi* da produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10, TGF- $\beta$  e IL-4 e a inibição o diminuição de IL-12 e TNF- $\alpha$  (VAN OVERTVELT et al., 1999; BRODSKYN et al., 2002; PLANELLES et al., 2003; PONCINI et al., 2010; DA COSTA et al., 2014; BARBOSA et al., 2019). Por outro lado, Magalhães e colaboradores demonstraram que esta expressão depende da cepa, pois as duas cepas testadas (Y e Col cl1.7) conseguiram estimular maior produção de TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12 nas DCs humanas infectadas, e IL-10 nas DCs “espectadoras” (não infectadas mas que interagiram com o parasito). No entanto a produção de IL-10 foi significativamente maior nas DCs infectadas com a cepa Col cl1.7 (MAGALHÃES et al., 2015). Há outros estudos que tem em conta diferentes condições além da infecção. Em 2010, Alba Soto e seu grupo estudaram o efeito da IL-10 nas DCs durante a infecção, concluindo que DCs que não expressam IL-10 e que foram estimuladas com antígenos do parasito produzem maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias e são mais eficientes na apresentação de antígenos aos linfócitos T (ALBA SOTO et al., 2010). Um ano depois, Terrazas e colaboradores observaram que a citocina IL-12 é protetiva durante a infecção, pois ao interferir na sua via de produção os camundongos infectados morreram rapidamente, exibindo DCs imaturas (TERRAZAS et al., 2011). Em 2012, foi visto que diferentes inóculos do parasito podem também influenciar na resposta do hospedeiro. Borges e colaboradores observaram uma expressão diferencial de citocinas que dependia da quantidade de parasitos inoculados no camundongo, sendo que o inóculo intermediário mostrou um pior cenário para o hospedeiro, o que se poderia interpretar como que existe um inóculo ideal para o sucesso da infecção (BORGES et al., 2012). Em 2015, Nogueira e colegas observaram que as vesículas



extracelulares liberadas por diferentes cepas do parasito estimulavam de maneira diferencial a produção de citocinas nas DCs e outras células (NOGUEIRA et al., 2015). O efeito da saliva do inseto vetor também foi testado neste aspecto, mostrando em todas as espécies testadas a redução da expressão de IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-6 e o aumento da produção de IL-10, com exceção de *R. prolixus* que aumentou IL-6 (MENDES et al., 2016).

As DCs são fundamentais na ativação dos linfócitos T, mas também na indução de anergia e no controle de reações contra antígenos próprios (PONCINI et al., 2008; LEWIS; REIZIS, 2012). Como foi exposto anteriormente, durante a fase aguda da doença de Chagas, as DCs têm a dupla capacidade de gerar sinais inibitórios, regulatórios ou de ativação dependendo de como elas interagem com o *T. cruzi*. Essa capacidade de ativar ou induzir tolerância faz das DCs um ponto de interesse no estudo da interação *T. cruzi*-hospedeiro mamífero. No entanto, pouco tem sido estudado sobre essa interação e, além disso, os estudos existentes limitam-se quase exclusivamente ao modelo murino, dificultando o entendimento dos primeiros acontecimentos da doença no humano (GIL-JARAMILLO et al., 2016). Por essa razão, um estudo mais abrangente da interação DCs-*T. cruzi* no hospedeiro humano se faz necessário com a intenção de entender: o mecanismo de entrada e escape do parasito, as proteínas envolvidas nos processos dentro e fora do fagolisossoma, como acontece a imunomodulação das células apresentadoras de antígenos, os genes ativados ou reprimidos durante a interação, entre outros aspectos. Neste trabalho, o transcritoma diferencial da interação DCs humanas-*T. cruzi* após 12 h de interação usando 3 doadores (GIL-JARAMILLO, 2016) será analisado e validado, propondo um novo enfoque de estudo para a doença ao descobrir que vias bem caracterizadas estão presentes durante a infecção inicial do parasito.

## 2. JUSTIFICATIVA

As DCs, como ponte entre a resposta inata e a resposta adaptativa, são importantes na modulação da imunidade e no desenvolvimento diferencial da doença de Chagas nos indivíduos infectados. O conhecimento atual sobre os processos que ocorrem no início da interação dessas células com o *T. cruzi* limita-se quase exclusivamente à medição de citocinas ou de expressão de marcadores de superfície no modelo humano, e os múltiplos trabalhos no modelo murino não são necessariamente extrapoláveis para o hospedeiro humano. O transcritoma do contato inicial, assim como a sua validação e análise, faz-se necessário para aprimorar o conhecimento do mecanismo de entrada e escape do parasito, as proteínas envolvidas nos processos dentro e fora do fagolisossoma, como acontece a imunomodulação das células apresentadoras de antígenos, os genes ativados ou reprimidos durante a interação, entre outros aspectos iniciais, particularmente no modelo humano. Além disso, uma metodologia abrangente como o transcritoma poderia proporcionar novos alvos para o tratamento da doença, incluindo genes ou vias completas, e ajudar no entendimento da evolução diferencial da doença nos pacientes e nos mecanismos de resistência e tolerância ao parasito, dada a duplicidade do papel desenvolvido pelas DCs na fase aguda da doença. Adicionalmente, não existe transcritoma das células do sistema imune humano durante sua infecção/interação com o *T. cruzi*, e portanto, o fator hospedeiro não foi avaliado ainda mediante esta metodologia. Tal avaliação poderia resultar em novos estudos visando conhecer melhor a interface *T. cruzi*-hospedeiro humano e assim aumentar o conhecimento da patogênese da Doença de Chagas.

### 3. OBJETIVOS

- O objetivo deste trabalho é estudar a resposta, via expressão gênica diferencial, de DCs humanas em estágio inicial de contato com formas metacíclicas de *T. cruzi* por meio de análise de transcritoma e expressão de citocinas.

#### 3.1. Etapas

- Extração de monócitos de sangue periférico de 6 doadores e suas diferenciações em DCs *in vitro*.
- Obtenção de TMS a partir de formas epimastigotas de *T. cruzi*.
- Ensaio *in vitro* de interação TMs-DCs
- Obtenção e análise detalhada de transcriptomas das DCs após incubação com TMs.
- Validação dos transcritomas por RTqPCR.
- Quantificação de citocinas nos sobrenadantes de cultura das células em estudo.
- Extração de proteínas a partir das amostras das interações
- Estimulação de DCs murinas com poli I:C para o estudo do efeito na infecção pelo *T. cruzi*

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Metaciclologênese dos parasitos

Epimastigotas da cepa CL Brener foram mantidos a 28 °C em meio LIT suplementado com 5% v/v de SFB e 100 µg/mL de gentamicina até alcançarem a fase estacionária quando foram centrifugados a 4.000 × g e a temperatura ambiente por 10 min para eliminar o meio. Foram, então, ressuspensos em meio TAU (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,035% NaHCO<sub>3</sub>) e incubados durante 2 h a 28 °C em garrafas de cultura em posição horizontal. Após incubação, o meio TAU foi descartado e foi adicionado o meio TAU3AAG (meio TAU acrescido de 10 mM L-prolina, 50 mM L-glutamato de sódio, 2 mM L-aspartato de sódio, 10 mM glicose), deixando os parasitos na mesma temperatura e com a garrafa na mesma posição para favorecer a diferenciação em TMs (CONTRERAS et al., 1985). Seis dias depois, o sobrenadante das garrafas foi coletado e centrifugado a 4.000 × g a temperatura ambiente por 10 min e o *pellet* foi ressuscitado em soro humano não inativado (do mesmo doador) e incubado durante 20 h a 37 °C (CANAVACI et al., 2010). Os parasitos viáveis foram centrifugados a 400 × g por 10 min a 25 °C em tubos Falcon de 50 mL e, novamente, incubados por 2 h a 37 °C para a separação dos parasitos viáveis por meio da sua motilidade. O sobrenadante obtido do soro foi lavado sucessivamente com PBS para eliminar detritos presentes na amostra. Em seguida, os parasitos foram ressuspensos em RPMI 1640 contendo L-glutamina (Gibco) com 100 µg/mL de gentamicina para contagem em câmara de Neubauer e preparação de lâmina corada com Instant prov stain (NewProv), para cálculo da taxa de metaciclologênese mediante contagem de 300 parasitos em pelo menos 3 campos diferentes no microscópio óptico. Os TMs foram identificados segundo morfologia e posição do cinetoplasto.

### 4.2. Células dendríticas (DCs)

As células dendríticas analisadas no presente trabalho foram obtidas a partir de 5 doadores sem vícios na faixa etária de 25 a 33 anos (CAAE:

54822616.7.0000.5558, Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília), 3 dos quais participaram do transcritoma desenvolvido (doadores A, B e C). Dados de vacinação e infecções virais foram coletados para cada um dos doadores, assim como nível de atividade física IPAQ (ALTO: aquele que cumpriu as recomendações de: a) VIGOROSA:  $\geq 5$  dias/sem e  $\geq 30$  min por sessão; b) VIGOROSA:  $\geq 3$  dias/sem e  $\geq 20$  min por sessão + MODERADA e/ou CAMINHADA:  $\geq 5$  dias/sem e  $\geq 30$  min por sessão. MODERADO: aquele que cumpriu as recomendações de: a) VIGOROSA:  $\geq 3$  dias/sem e  $\geq 20$  min por sessão; ou b) MODERADA ou CAMINHADA:  $\geq 5$  dias/sem e  $\geq 30$  min por sessão; ou c) Qualquer atividade somada:  $\geq 5$  dias/sem e  $\geq 150$  min/sem (caminhada + moderada + vigorosa. BAIXO: aquele que realiza atividade física, porém insuficiente para ser classificado como ativo pois não cumpre as recomendações quanto à frequência ou duração (<https://sites.google.com/site/theipaq/scoring-protocol>) (Tabela 3). Cada réplica biológica dentro do mesmo doador foi feita mediante a obtenção de monócitos de sangue periférico em tempos diferentes. Aproximadamente 90 mL de sangue foram extraídos cada vez e diluídos 1:1 em PBS a temperatura ambiente. Posteriormente, a solução sangue:PBS foi distribuída em tubos Falcon de 50 mL, sendo adicionada cuidadosamente sobre 12 mL de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) a temperatura ambiente em cada tubo. O gradiente foi centrifugado a 25 °C, 400 × g, por 30 min sem freio, para conservar a camada leucocitária resultante entre a fase do soro e a do Ficoll. Esta camada foi recuperada e lavada 3 vezes com PBS gelado, centrifugando a 500 × g, 4 °C, por 10 min. Os mononucleares do sangue periférico foram, então, ressuspensos em 5 mL de PBS gelado para contagem em câmara de Neubauer usando azul de tripan 0,4% w/v (Sigma). As células foram centrifugadas novamente sob as mesmas condições das lavagens anteriores e ressuspensas em 80 µL de tampão MACS (PBS pH 7,2 contendo 0,5% de BSA e 2 mM de EDTA) e 10 µL de microesferas magnéticas com anticorpos para CD14 humano (Miltenyi Biotec), por cada  $10^7$  células. A separação magnética foi realizada seguindo o protocolo do Kit CD14 MicroBeads Human (Miltenyi Biotec). As células CD14<sup>+</sup> foram plaqueadas em uma concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL em placas de 24 poços contendo meio RPMI 1640 com L-glutamina

(Gibco), 2 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 150 µg/mL de gentamicina, 10% SFB inativado, 0,16 µg/mL de IL-4 humana recombinante (PeproTech) e 0,05 µg/mL de GM-CSF humana recombinante (PeproTech) (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). A cada 3 dias, 150 µL de meio eram retirados de cada poço e 200 µL de meio novo com citocinas eram adicionados. Após 7 dias de diferenciação, as DCs foram recuperadas da placa, centrifugadas a 500 × g, 4 °C por 15 min e contadas para os ensaios de interação. Para verificar a diferenciação, uma alíquota de 5 × 10<sup>4</sup> células foram marcadas com anticorpos contra CD1a, HLA-DR, CD11c, CD209, CD80 e CD86 (Ver figuras suplementares do Anexo 5).

#### **4.3. Interação DCs-*T. cruzi***

A partir das DCs obtidas na diferenciação, 5 × 10<sup>5</sup> células/mL foram plaqueadas no meio RPMI sem citocinas em placas de 24 poços. A metade dos poços foi posta em contato com os TMs obtidos, na proporção de 10 parasitos por cada DC durante 12 h a 37 °C e CO<sub>2</sub> 5%, enquanto as células controle foram cultivadas nas mesmas condições sem contato com o parasito. Após o tempo de interação, as células foram recuperadas da placa, centrifugadas a 500 × g, 4 °C por 15 min e guardadas em 1 mL de TRIzol (ThermoFisher) a -80 °C, tirando uma alíquota de pelo menos 5 × 10<sup>4</sup> células, por condição, para preparação de uma lâmina corada com Instant prov stain (NewProv), para determinar taxa de infecção, número de amastigotas/célula infectada e porcentagem de ativação. Devido a que as DCs recém diferenciadas apresentaram uma expressão relativamente alta do marcadores de ativação típicos (ver Anexo 5), a mudança morfológica foi uma ferramenta útil e amplamente aceita para avaliar a maturação das DCs (BANCHEREAU et al., 2000; KIAMA et al., 2001; PEREIRA et al., 2005). Os critérios morfológicos para a determinação da ativação das DCs foram: tamanho, presença/ausência de prolongações citoplasmáticas, e formato esférico ou não. O sobrenadante obtido da interação foi armazenado a -80 °C para dosagem posterior das citocinas secretadas.

#### 4.4. Extração de RNA

As amostras armazenadas a -80 °C em TRIzol (ThermoFisher) foram descongeladas a temperatura ambiente. Adicionaram-se 200 µL de clofórmio, vórtex por 15 s, incubando a temperatura ambiente por 3 min, e centrifugando a 12.000 × g, por 15 min, a 4 °C. A fase aquosa foi separada, 1 volume de isopropanol foi adicionado para posterior incubação a -80 °C por 1 h e centrifugação a 12.000 × g, por 15 min, a 4 °C. O isopropanol foi descartado e 1 mL de etanol 75% foi adicionado cuidadosamente, sem desfazer o *pellet*. As amostras foram centrifugadas a 12.000 × g por 10 min a 4 °C para descartar o etanol, deixando secar o *pellet* e ressuspendendo este em 20 µL de água RNase *free*. Finalmente, alíquotas para quantificação e visualização em gel de Agarose ou análise por Bioanalyzer foram separadas e o RNA foi armazenado a -80 °C.

#### 4.5. Transcritoma diferencial da interação DCs-*T. cruzi*

Usando a plataforma Illumina HiSeq 2500, paired-end, foram sequenciadas 12 amostras: células controle e infectadas dos doadores A, B e C em duplicata. O sequenciamento foi realizado pela empresa Novogen (<http://www.novogen.com>) usando NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB, USA) para a preparação das bibliotecas de cDNA. As *reads* de 150 pb obtidas foram analisadas para controle de qualidade usando o programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), eliminando aquelas com número de PHRED < 20. As *reads* resultantes foram então alinhadas simultaneamente no genoma humano (Ensembl GRCh38.87) e do *T. cruzi* (EnsemblProtists ASM20906v1) usando HISAT2 v2.0.6 (KIM; LANGMEAD; SALZBERG, 2015), para garantir o pareamento adequado das *reads* no seu respectivo genoma. Os arquivos desses alinhamentos foram ordenados e classificados usando Samtools v0.1.18 (LI et al., 2009), para então fazer a contagem de *reads* usando os arquivos das anotações do genoma humano contidas em Ensembl para o genoma GRCh38.87, junto com o *software* HTSeq-count v0.6.0 (-m intersection-nonempty) (ANDERS; PYL; HUBER, 2014). Uma análise de componentes principais (PCA) foi feita usando R (R CORE TEAM, 2019) para

avaliar o padrão das amostras, testando várias combinações e finalmente excluindo aquelas que diferiam das demais, garantindo assim um número maior de genes diferencialmente expressos. A análise de expressão diferencial foi feita utilizando o pacote DESeq de R/Bioconductor (LOVE; ANDERS; HUBER, 2014), comparando as condições amostra controle e infectada ( $padj \leq 0,05$ ). Os enriquecimentos de Gene Ontology (GO) e KEGG pathway foram obtidos usando os pacotes de Bioconductor GStat (BEISSBARTH; SPEED, 2004) e Pathview (LUO; BROUWER, 2013), respectivamente. Os heatmaps mostrando o *Fold change* da média de contagens por milhão (CPM) e os resumos dos termos GO enriquecidos foram obtidos usando o pacote gplots em R (<https://CRAN.R-project.org/package=gplots>). Os gráficos de correlação entre os níveis de expressão dos genes foram obtidos usando os pacotes Hmisc (<https://cran.r-project.org/web/packages/Hmisc/>), corrplot (<https://cran.r-project.org/package=corrplot>) e igraph (<https://cran.r-project.org/package=igraph>) de R. Os dados de interação proteína-proteína foram obtidos do STRING (<https://string-db.org/>) (SZKLARCZYK et al., 2017), usando o programa Cytoscape (SHANNON et al., 2003) para criar as redes com as coordenadas de saída do STRING.

#### 4.6. Validação do transcrito diferencial via RT-qPCR

Para validar as análises obtidas do transcrito, alguns dos genes diferencialmente expressos foram escolhidos para realização de RT-qPCR. Os critérios de seleção dos genes incluíram: valor de  $padj \leq 0,01$ ,  $|\text{Log}_2\text{FoldChange}| \geq 1$  para a análise global dos dados, presença nos termos de GO relacionados ao sistema imune, expressão relatada nos tecidos de interesse segundo o BioGPS (WU et al., 2009) e número de transcritos descritos  $\leq 2$ . Os iniciadores foram desenhados usando o *software* primer-BLAST (YE et al., 2012) anelando em diferentes exons e tendo em conta todas as características sugeridas pelo fornecedor do kit GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega) para garantir eficiência de amplificação  $\geq 90\%$  (Tabela 1) ou então foram usados iniciadores validados fornecidos por Qiagen (Tabela 2). Após verificação da eficiência de cada par de iniciadores, as RT-qPCRs foram feitas seguindo o protocolo do fabricante,



modificando unicamente o volume de reação de 50  $\mu$ L para 25  $\mu$ L e usando o StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystem) para a amplificação e coleta dos dados. O programa ExpressionSuite Software V1.1 (ThermoFisher) foi usado para a análise dos dados, tendo dois genes endógenos (B2M e HPRT) usados para a normalização do nível de expressão dos demais genes. A normalidade dos dados foi verificada usando D'Agostino & Pearson and Shapiro-Wilk. O teste t não pareado foi usado para comparação entre amostras controle e infectadas.

**Tabela 1. Iniciadores dos genes humanos usados para validação do transcritoma.**

Primer	Sequência	Amplicon (pb)	Eficiência (%)
HPRT-F1	TATGGCGACCCGAGCCCT	313	91.4
HPRT-R2	GCTCTTCAGTCTGATAAAATCTAC		
B2M-F	GTCTTTCAGCAAGGACTGGTC	173	90.1
B2M-R	CAAATGCGGCATCTTCAAACC		
IL12B-F	TGGATGCCGTTCAACAAGCTCA	199	97.7
IL12B-R	TGGACCTGAACGCAGAATGTCA		
TNFSF18-F	GAGATCATCCTGGAAGCTGTGG	196	105.4
TNFSF18-R	CCAGTCAGACACCTTATTCACG		
CXCL9-F	GTGGTGTCTTTTCTCTTGGG	240	90.2
CXCL9-R	CCTTCACATCTGCTGAATCTGG		
USP18-F	ATCCGGAATGCTGTGGATGG	225	94.1
USP18-R	AGACTCCGTAGATCCAGGAACG		

**Tabela 2. Iniciadores da Qiagen para a validação do transcritoma**

Primer	Sequência do amplicon	Tamanho do amplicon (pb)
MX1	GATCCGCCTCCACTTCCAGATGGAACAGATTGTCTACTGCCAGGACCAG GTATACAGGGGTGCATTGCAGAAGGTCAGAGAGAAGGAGCTGGAAGAA GAAAAGAAGAAGAAATCCTGGGATTTTGGGGCTTTCCAGTCCAGCTCGG CAACAGACTCTTCCATGGAGGAGATCTTTCAGCACCTG	184
GBP4	GACAAGATTTCTCAGCCCGTGGTGGTGGCCATTGTAGGGCTATACC GCACAGGAAAATCCTATCTCATGAATCGTCT	80
OASL	CAGTGGAGCAGAGGGGTTACCCAGATTTCAACCTCATCGTGAACCCTTAT	183



	GAGCCCATAAGGAAGGTAAAGAGAAAATCCGGAGGACCAGGGGCTAC	
	TCTGGCCTGCAGCGTCTGTCTTCCAGGTTCTTGGCAGTGAGAGGCAGCT	
	TCTCAGCAGCAGGTGCTCCTTAGCCAAATATGGGA	
<b>PLCB2</b>	CCCCCTCCATCTCTAGATAAGTGTCATATATTTGTTGAGGGCAAAGACT	94
	ATGGACTGGAAGGCAGAAAGTGGGATCCTGGCCCCACTCTGCCT	
	CGGAGGGCATGGATGGCTGTGAGCTCATGTGCTGCGGGCGTGGCTACAA	
<b>WNT5B</b>	CCAGTTCAAGAGCGTGCAGGTGGAGCGCTGCCACTGCAAGTTCCACTGG	144
	TGCTGCTTCGTCAGGTGTAAGAAGTGCACGGAGATCGTGGACCAGT	

#### 4.7. Dosagem de citocinas

O sobrenadante dos 3 doadores do transcriptoma foi analisado por duplicata usando o kit CBA Human inflammatory cytokines (BD), que permite dosar IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6, IL-12p70 e TNF (n = 18). As análises foram feitas seguindo os protocolos do fabricante. Os dados foram normalizados para fins de comparação e analisados mediante Wilcoxon test pois não apresentaram distribuição normal.

#### 4.8. Citometria de fluxo das células humanas

Para verificar a completa diferenciação das DCs, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD1a conjugado a FITC, CD11c-APC, CD80-PE, CD86-PE, CD209-PE, HLA-DR-APC. A marcação foi feita após lavagem das células com PBS e bloqueio com 100  $\mu$ L de tampão FACS (PBS, BSA 1%, azida sódica 0,001%) durante 30 min a 4°C. O tampão foi então descartado por centrifugação e as células foram incubadas em câmara escura por 30 min a 4°C com 20  $\mu$ L do anticorpo diluído 1:20 em FACS. Finalmente, as células foram lavadas com 100  $\mu$ L de FACS e ressuspendidas em 400  $\mu$ L do mesmo tampão para sua leitura no citômetro de fluxo FACSVerse (BD Bioscience) e análise no programa FACSuite (BD Bioscience) ou FlowJo VX. O mesmo procedimento foi aplicado nos linfócitos para o ensaio de proliferação, usando anticorpos anti-CD4 conjugado a PerCP-Cy5.5 e CD8 conjugado a PE.

#### 4.9. Extração de proteína a partir das amostras em Trizol

Durante a extração de RNA, a fase aquosa foi separada, e a interfase, assim como a fase orgânica foram conservadas a -80°C para posterior obtenção de

proteínas. A esta porção de amostra, adicionaram-se 300  $\mu$ L de etanol 100%, misturando por inversão e incubando a temperatura ambiente por 2 a 3 min. Então as amostras foram centrifugadas a 200  $\times$  g, 4°C, 5 min para precipitar o DNA. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo e 1 mL de isopropanol foi adicionado, incubando por 10 min a temperatura ambiente e centrifugando a 12.500  $\times$  g, 4°C, 10 min para eliminar o sobrenadante. O *pellet* obtido foi lavado 3 vezes em 1,5 mL de cloridrato de guanidina 0,3 M em etanol 95%, incubando por 20 min na solução em cada lavagem e centrifugando a 7.500  $\times$  g, 4°C, 5 min. Uma lavagem final foi feita com 1,5 mL de etanol 100% por 20 min, descartando o sobrenadante após centrifugação a 7.500  $\times$  g, 5 min a 4°C (Protocolo de TRIzol, ThermoFisher). O *pellet* foi secado ao ar, e ressuspenso em 50  $\mu$ L de ureia 8M contendo coquetel de inibidores de protease cOmplete™, Mini, sem EDTA (Roche) 1X. Foram feitas alíquotas para quantificação (Qubit Protein Assay Kit, Invitrogen) e verificação em SDS-PAGE 12% corado com prata, e as amostras foram armazenadas a -80°C.

#### **4.10. Obtenção e validação de DCs murinas de medula óssea (BM-DCs)**

Com o intuito de realizar alguns testes no modelo murino, a expressão das DCs murinas após interação com o parasito foi testada. Para isso, células de medula óssea de camundongos BALB/c foram obtidas a partir de fêmures de fêmeas entre 8 e 12 semanas (IACUC007053 de Cedars-Sinai Medical center, Estados Unidos). As fêmeas foram eutanasiadas em câmara de CO<sub>2</sub> com posterior deslocação cervical. Na câmara de fluxo laminar, os fêmures intactos foram obtidos mediante dissecação usando tesouras, pinças e bisturis esterilizados em álcool 70%. Usando uma agulha de 25 G, o interior do fêmur foi lavado com 10 mL de meio RPMI completo (RPMI 1640 suplementado com SFB10%, EDTA 2 mM, L-glutamina 2 mM, HEPES 30 mM, 2-ME 50  $\mu$ M, penicilina/estreptomicina 1%). O conteúdo foi filtrado em cell strainer de 70  $\mu$ m e lavado no filtro para o aproveitamento da maior quantidade possível de células. A suspensão obtida foi lavada duas vezes mediante centrifugação a 350  $\times$  g, 5 min, 4°C em meio completo. Finalmente, as células foram ajustadas a uma concentração de 2  $\times$  10<sup>5</sup> células/mL de meio completo contendo 20 ng/mL de GM-CSF murino e 20 ng/mL de IL-4 murino, e plaqueadas em placas

de 6 poços de superfície de ultrabaixa adesão. A cada 3 dias, centrifugaram-se as células e metade do sobrenadante foi descartado, adicionando-se meio novo com citocinas. Depois de 7 dias de diferenciação,  $5 \times 10^5$  células foram marcadas para avaliação da diferenciação e o restante foi utilizado para o ensaio de interação com *T. cruzi*. Para a marcação, as células foram lavadas em FACS e bloqueadas usando 1  $\mu$ L de TruStain fcX™ CD16/32 clone 93 isotipo: rato (BioLegend) em 100  $\mu$ L de FACS por 5 min a 4°C. Seguidamente, 1  $\mu$ L de cada anticorpo foi adicionado às amostras, incluindo: MHC-II conjugado a eF450, CD45-Alexa Fluor 700, CD11c-BV421, F4/80-PE-Dazzel594, CD11b-PE-Cy7, CD80-FITC, CD86-PerCP-Cy5.5, CD40-APC e CD209-PE. Após 30 min de incubação a 4°C, adicionaram-se 2 mL de FACS para a lavagem das amostras por centrifugação a 350  $\times$  g, 5 min, 4°C, ressuspendendo-se as células em 100  $\mu$ L de tampão. As BM-DCs foram analisadas no citômetro Sony SA3800.

#### **4.11. Interação das BM-DCs com o *T. cruzi***

As BM-DCs devidamente diferenciadas foram lavadas 2 vezes mediante centrifugação a 400  $\times$  g, 10 min, 4°C, em PBS para remover as citocinas do meio de diferenciação. As células foram ajustadas a uma concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL e cultivadas em placas de 24 poços. Para a interação, foram adicionados nas células infectadas 10 TMs/BM-DCs da cepa Tulahuen expressando luciferase e fluorescência neon. Os TMs foram obtidos usando o mesmo protocolo utilizado para a cepa CL Brener. Após 12 h de interação, os sobrenadantes foram colhidos, e as DCs foram lavadas e usadas para obtenção de RNA, citometria de fluxo para marcadores de maturação ou ensaios de proliferação de linfócitos T.

#### **4.12. Treinamento das BM-DCs usando ácido polinossínico-ácido policitidílico (Poli I:C)**

A fim de ativar vias de resposta a vírus, tentou-se simular uma infecção viral mediante estimulação com Poli I:C, cuja estrutura é similar ao RNA de dupla fita e interage com o TLR3. Após a sua completa diferenciação, as BM-DCs foram estimuladas com 10  $\mu$ g/mL de Poli I:C diluído em RPMI completo durante 8 h ou 24



h. As células foram lavadas 3 vezes em PBS, cultivadas em RPMI completo por 4 h e então mantidas em contato com o parasito seguindo o protocolo mencionado anteriormente. Após 12 h de interação, os sobrenadantes foram colhidos, algumas células foram usadas para citometria de fluxo, e o restante foi armazenado em TRIzol para posterior extração de RNA.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Características dos doadores

O histórico imunológico dos doadores pode refletir na forma em que suas células respondem ao parasito. Portanto, a Tabela 3 apresenta os dados de imunizações e de algumas doenças infecciosas comuns assim como idade e nível de atividade física. Brevemente, o doador C apresentou maior número de imunizações contra vírus ( $n = 28$ ,  $\bar{X} = 19$ ), os doadores A e B tiveram o maior número de imunizações bacterianas (17 cada, sendo 15 a média), e o doador D foi o menos imunizado, com 10 antígenos virais e 12 bacterianos.

Tabela 3. Caracterização dos doadores.

	Doador A	Doador B	Doador C	Doador D	Doador E	Doador F
<b>Idade</b>	30	30	25	33	27	25
<b>Sexo</b>	Feminino	Feminino	Feminino	Masculino	Masculino	Masculino
<b>Atividade física</b>	Moderado	Moderado	Alto	Baixo	Baixo	Moderado
<b>Antígeno</b>						
Sarampo	2	5	6	1	3	2
Tétano	6	8	5	4	4	5
Pólio	4	4	4	4	5	12
Difteria	6	4	4	3	4	5
Pertussis	4	4	4	4	4	4
Tuberculose	1	1	1	1	1	1
Hepatite B	3	3	3	1	1	3
Caxumba	1	3	4	1	1	0
Rubéola	1	4	4	1	1	1
Febre amarela	2	1	1	1	1	3
H1N1	0	2	1	0	0	0
Influenza	0	0	1	0	0	3
Raiva	0	0	3	0	0	0
Hepatite A	0	0	0	0	1	0
Catapora	0	1	1		1	1
<b>Total</b>	30	40	42	21	27	40

## 5.2. Interação DCs-*T. cruzi* durante 12 h

A partir das lâminas coradas após 12 h de interação, a taxa de infecção e o número de amastigotas por célula infectada foram determinadas (Figura 4A). Foi obtida uma média global de 31,5% de infecção, assim como uma média de 37,2% para o doador A, 35,6% para o B e 21,7% para o C, este apresentando uma diferença significativa com os demais ( $p < 0,05$ ) (Figura 4B). A análise morfológica das DCs mostrou uma maior ativação naquelas que estiveram em contato com o parasito (Figura 4C). De forma interessante, o número de amastigotas por célula infectada não apresentou diferença significativa entre os doadores, com uma média de 2,2 amastigotas/DC infectada (Figura 4D).

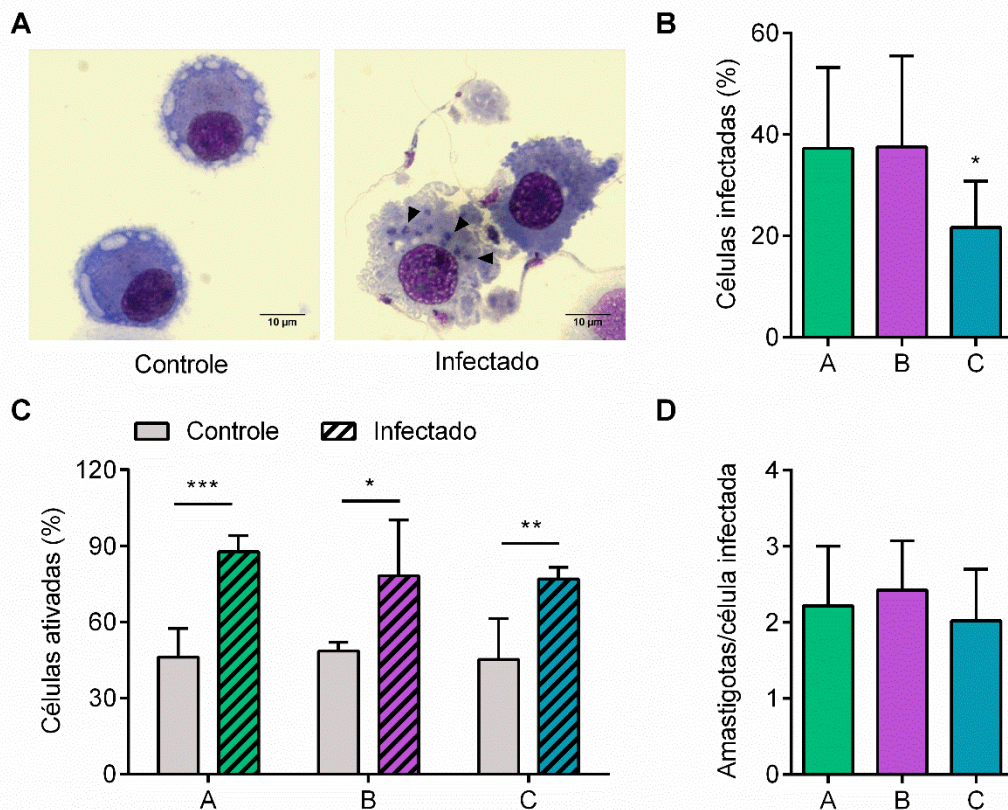


Figura 4. Interação DCs-*T. cruzi*. DCs humanas foram infectadas com formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*. Após 12 h de incubação, DCs controle e infectadas foram coradas (A) para determinação de porcentagem de infecção (B), porcentagem de ativação (C) e número de amastigotas por célula infectada (D). Os dados são apresentados como média  $\pm$  SD; contagem feita em duplo cego, n=8. A distribuição normal foi verificada usando Shapiro-Wilk, e o teste Turkey foi usando para as comparações múltiplas e teste t não pareado para as comparações simples. Significância estatística é

mostrada como \* para  $p < 0,05$ , \*\* para  $p < 0,01$  e \*\*\* para  $p < 0,001$ . Uma DC é considerada ativada quando apresenta prolongações citoplasmáticas, formato não esférico e maior tamanho.

### 5.3. Transcritoma diferencial global da interação DCs humanas com as formas TMs do *T. cruzi* durante 12 h

O transcritoma desenvolvido foi analisado a partir dos dados brutos, incluindo uma abordagem global, que reúne os dados dos três doadores. Assim, após a filtragem uma média de 23.620.805 *reads* por amostra foi obtida, com um mapeamento dentro do genoma humano de pelo menos 84,2% para cada amostra (Tabela 4).

**Tabela 4. Mapeamento das *reads* dentro do genoma humano para cada doador (A, B e C) nas condições controle (C) e infectado (I)**

Amostra	n. <i>Reads</i> totais	n. <i>Reads</i> mapeadas	Mapeamento (%)
A1C	15.748.354	14.101.548	89,54
A2C	26.072.128	23.676.301	90,81
B1C	28.998.888	26.205.537	90,37
B2C	22.836.642	20.180.834	88,37
C1C	23.140.974	20.799.134	89,88
C2C	22.259.296	20.134.192	90,45
A1I	18.276.194	16.480.332	90,17
A2I	26.417.544	23.794.275	90,07
B1I	24.237.576	21.474.805	88,6
B2I	26.951.896	22.691.972	84,19
C1I	22.202.262	20.278.731	91,34
C2I	26.307.908	22.441.175	85,3

Usando as *reads* mapeadas e anotadas, foi obtido um PCA para a visualização do padrão de expressão resultante de cada amostra, mas o padrão de separação obtido usando os dados de todas as amostras não era definido, como visto na Figura 5. Ao excluir os dados das amostras A1C, B1I, e C2I da análise, obteve-se um padrão de separação segundo a condição (controle ou infectado) das amostras (Figura 6A), podendo incrementar então o número de genes diferencialmente expressos. A partir da abordagem global do transcritoma, foram obtidos 468 genes diferencialmente expressos (Anexo 1). Destes, 439 foram mais



expressos na condição infectada, enquanto 29 genes tiveram a expressão diminuída (Figura 6B).

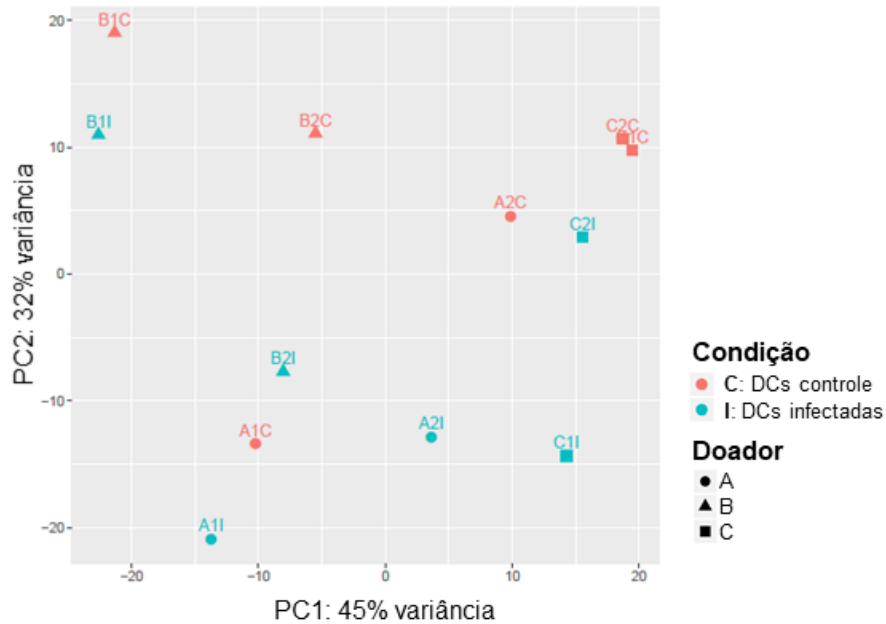


Figura 5. PCA dos perfis de expressão das DCs humanas incluindo todas as amostras. Controle (C – vermelho) e infectadas (I – azul) dos doadores A (●), B (▲) e C (■).

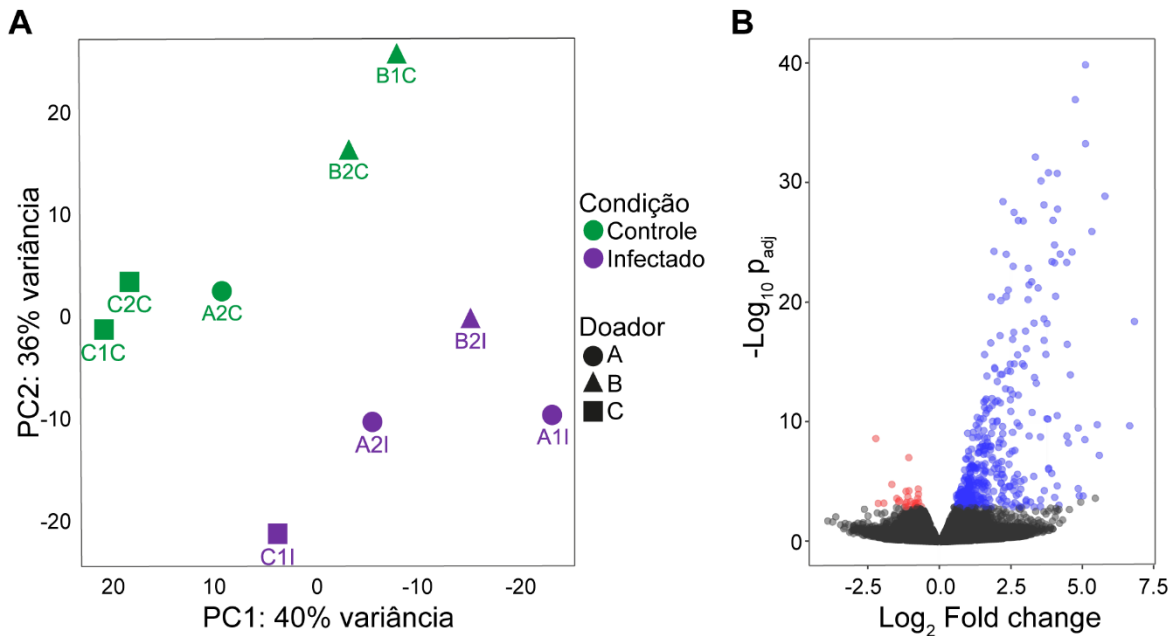


Figura 6. Perfil de expressão gênica das DCs humanas durante a interação com as formas metacíclicas de *T. cruzi*. Para avaliar a relação entre os grupos controle (verde) e infectado (roxo), o PCA foi obtido. Os doadores A, B e C são representados com os símbolos ●, ▲ e ■, respectivamente (A). Volcano plot do perfil de expressão diferencial dos genes com  $p_{adj} < 0,05$ ; azul: genes regulados positivamente, vermelho: genes regulados negativamente (B). As análises foram realizadas após descarte dos outliers.

A partir dos genes diferencialmente expressos, foi feita a análise de enriquecimento dos termos de *Gene Ontology* (GO), identificando 520 termos representados significativamente, dos quais 2 termos foram sub-representados: desenvolvimento de órgãos sensoriais (GO:0007423) e processo biossintético de tetrapirrol (GO:0033014) (Anexo 2). Alguns termos de interesse foram selecionados para criar gráficos de *heatmap*, permitindo a visualização do *Fold change* da média das CPM para cada gene em determinada via dentro de cada condição. A Figura 7 mostra os CPM de cada gene diferencialmente expresso no transcrito dentro do termo “resposta de defesa contra vírus” (GO:0051607) do GO. Nessa figura é possível observar como a condição infectada apresenta maior expressão nos genes da via, pois nenhum gene foi regulado negativamente (todos em azul). Além disso, é possível calcular matrizes de distância a partir do CPM calculado para cada gene, criando um dendrograma que representa a proximidade do nível de expressão de cada um deles como visto na mesma figura. Isto permite relacionar o nível de expressão com a biologia do gene, pois se genes biologicamente relacionados (participação na mesma via, interação proteína-proteína, localização no cromossoma) encontram-se agrupados no gráfico, significa que seu nível de expressão foi similar e que, portanto, existe uma regulação não aleatória dessa relação biológica. Por exemplo, na Figura 7 os genes CXCL10, IFIT1, IFNL1, DDX58, OAS3, HERC5, IFIH1, DDX60, TRIM25, GBP3 e STAT1 encontram-se fortemente agrupados e, ao mesmo tempo, eles apresentam algum tipo de associação biológica segundo STRING (Anexo 3). Estes genes se mostraram relacionados especificamente com ligação a RNA tanto de fitas simples como de fita dupla, com uma taxa de falsa detecção de  $5 \times 10^{-4}$  e  $4 \times 10^{-6}$ , respectivamente. O Doador C apresentou uma expressão por cima de média em 78% dos genes regulados dentro desta via, com exceção dos genes APOBEC3B, IFIT3, UNC93B1, C19orf66, IL27, PML, IRF7, ISG20 e STAT2. Por outro lado, estes últimos 7 genes foram expressos acima da média no doador A que teve 21% dos genes com expressão maior à média do transcrito. De forma interessante, os genes que codificam para as proteínas sensoras dos inflamassomas (AIM2 e IFI16) foram expressos acima da média em B e C, e RIG-I em C.

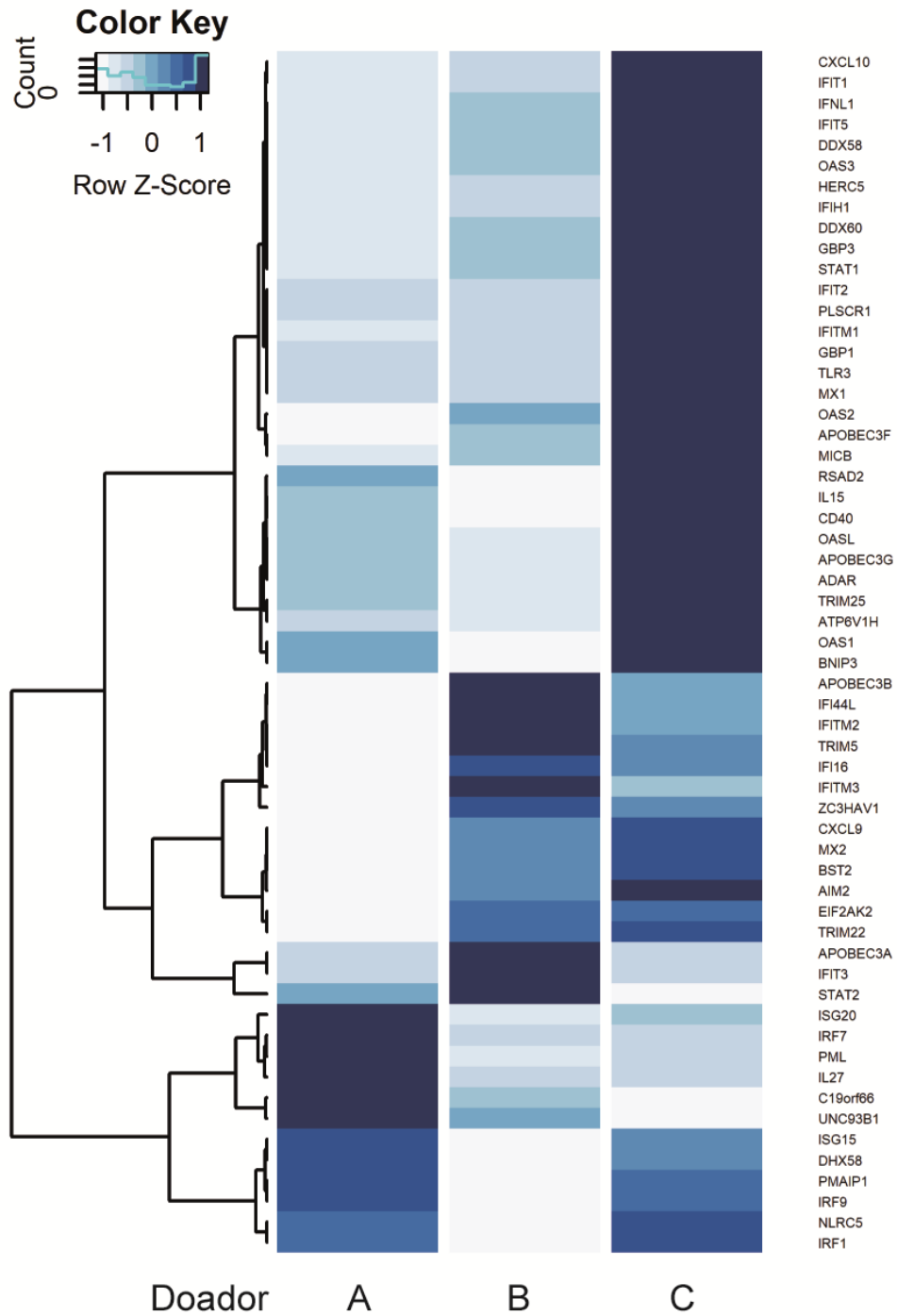


Figura 7. *Heatmap* dos genes diferencialmente expressos dentro do termo de resposta de defesa contra vírus (GO:0051607) do *Gene Ontology*. É apresentado o *Fold change* das médias das contagens por milhão de *reads* por cada gene para cada doador (A, B, C), normalizando com z-score para facilitar a interpretação.

A Figura 8 apresenta o *Fold change* da média de CPM dos genes dentro do termo “regulação da secreção da citocina IL-1 $\beta$ ” (GO:0050706) do GO. Novamente, é possível perceber uma expressão mais alta nas amostras infectadas em 26% dos genes dentro desta via nos 3 doadores, o que é um indicativo de que este processo foi regulado consistentemente por uma razão biológica e que o resultado da expressão de cada gene não é simplesmente fortuito. No entanto, observando o dendrograma, esta figura tem genes menos correlacionados matematicamente que o anterior (ver comprimento das ramas). Neste caso, o doador A apresentou uma expressão acima da média em 54% dos genes regulados da via, o doador B 29% dos genes e o C 60%.

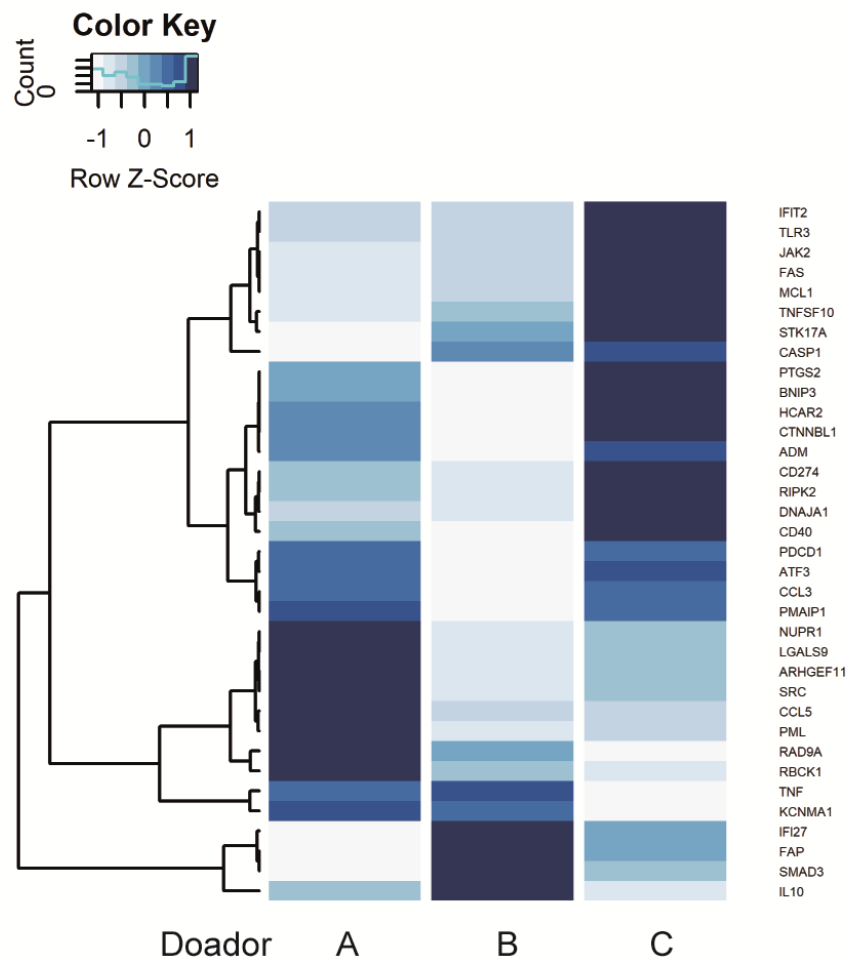
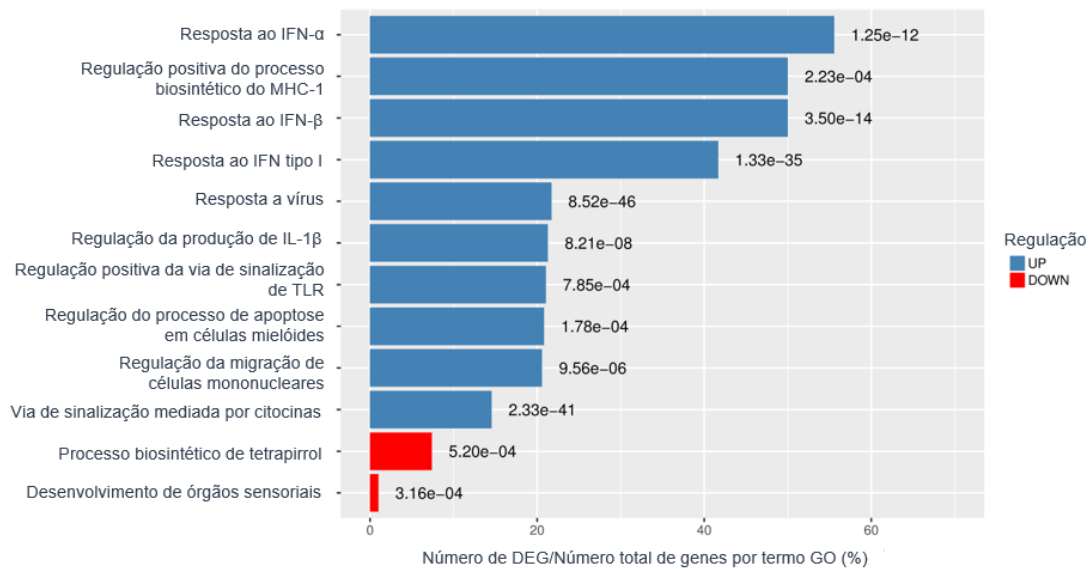


Figura 8. *Heatmap* dos genes diferencialmente expressos dentro do termo de regulação da secreção da citocina IL-1 $\beta$  (GO:0050706) do *Gene Ontology*. É apresentado o *Fold change* das médias das contagens por milhão de *reads* por cada gene para cada doador (A, B, C), normalizando com z-score para facilitar a interpretação.

Foi feito então um resumo dos termos GO que apresentaram enriquecimento, onde foram tidos em conta aqueles processos que tiveram maior relevância no âmbito imunológico, maior porcentagem de enriquecimento, e menor valor de  $p$  (Figura 9). Nesta figura, observam-se termos de resposta ao IFN- $\alpha$ , ao IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e resposta a vírus, todos eles relacionados e fortemente enriquecidos, com valores de  $p_{adj} < 1,25 \times 10^{-12}$ , fazendo deles um alvo interessante para um estudo mais aprofundado.



**Figura 9. Resumo da análise de enriquecimento de GO dos genes diferencialmente expressos. Em azul: processos regulados positivamente, em vermelho: processos regulados negativamente. O valor de  $p_{adj}$  é mostrado na frente da barra para verificação da significância do enriquecimento.**

Para comprovar que os genes diferencialmente expressos pertencem às vias significativamente reguladas durante a infecção com as formas TMs do *T. cruzi*, foi feita uma análise de enriquecimento de vias contidas em KEGG, tendo como resultado 32 vias enriquecidas com  $p \leq 0,006$  (Anexo 4). A Figura 10 da via de sinalização por receptores do tipo NOD foi obtida a partir dessa análise de enriquecimento, sendo esta a via com maior número de genes diferencialmente expressos (31/233) e menor valor de  $p$  ( $5,8 \times 10^{-16}$ ). Esta foi uma das razões para a escolha dos genes PLCB2, GBP4 e OASL para validação do transcrito, juntamente com a sua posição no rank dos genes diferencialmente expressos (Anexo 1). Outra via interessante que foi regulada durante a infecção é a de infecção



do vírus papiloma humano (Figura 11), apresentando 19/233 genes diferencialmente expressos e um valor de  $p = 0,006$ . Igualmente, os genes MX1 e WNT5B foram selecionados a partir desta via para validação do transcritoma.

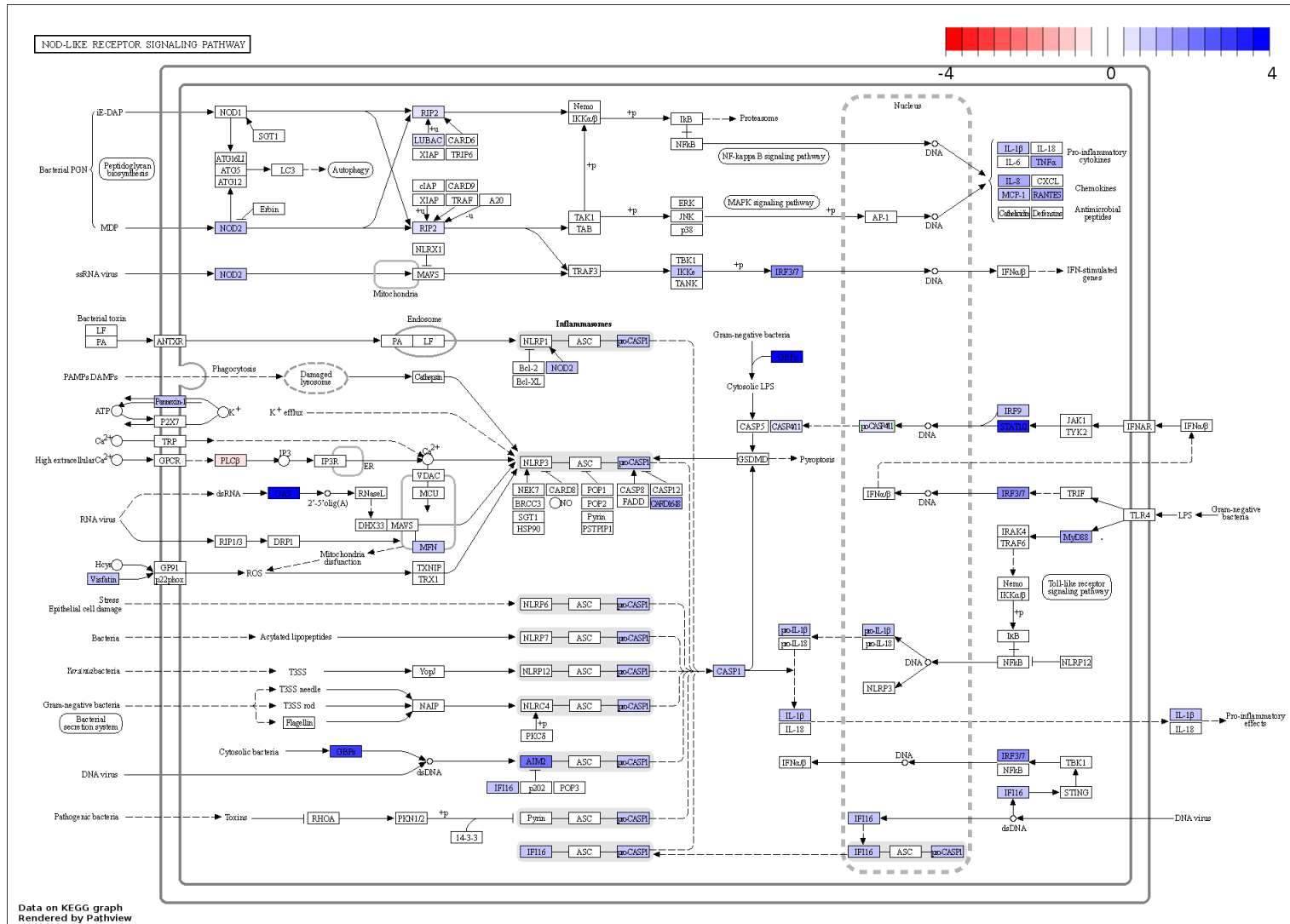


Figura 10. Enriquecimento da via de sinalização por receptores do tipo NOD (hsa04621) segundo KEGG. Os genes são mostrados em uma escala de azul a vermelho segundo o Log<sub>2</sub> Fold change apresentado por estes.

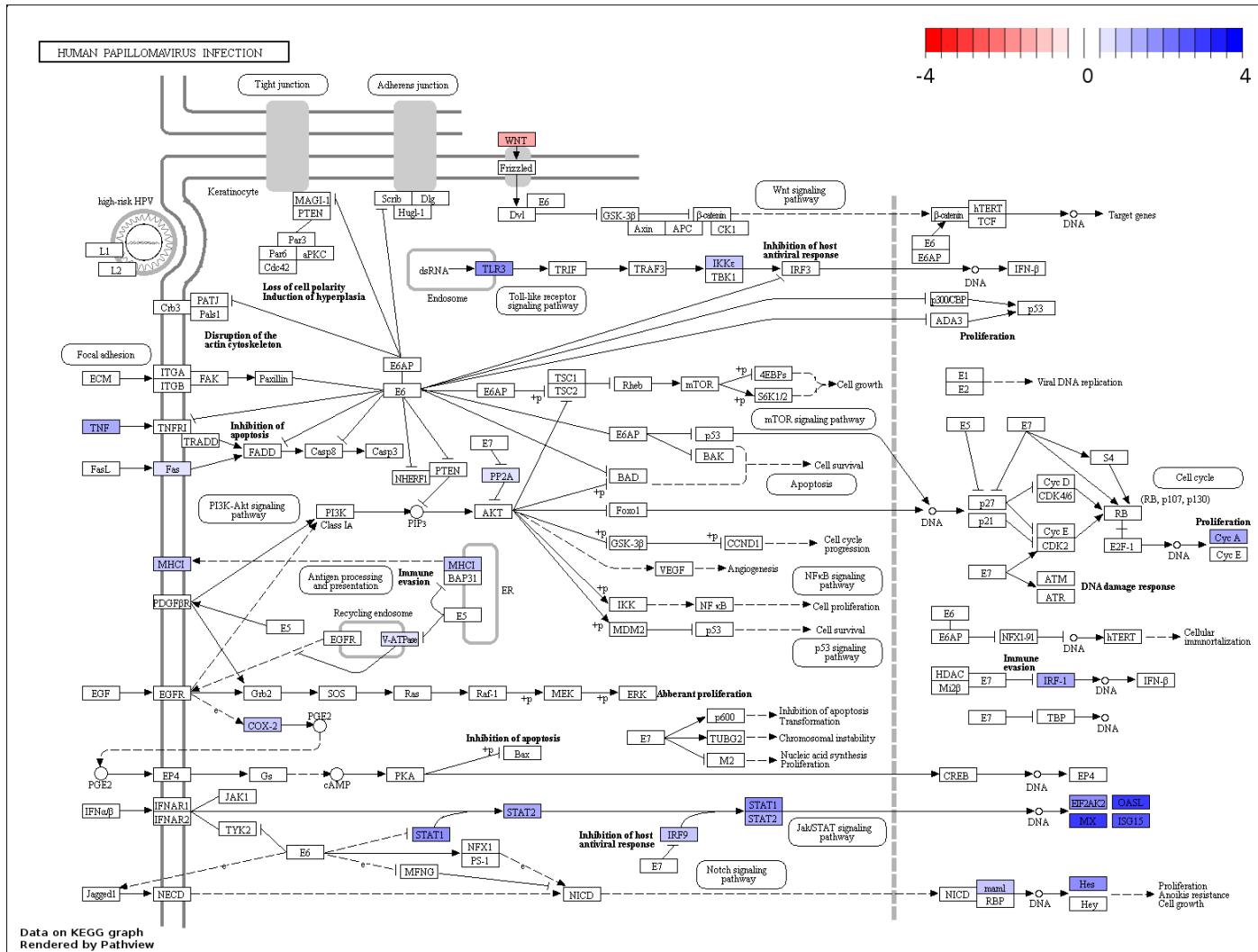


Figura 11. Enriquecimento da via da infecção do vírus do papiloma humano (hsa05165) segundo KEGG. Os genes são mostrados em uma escala de azul a vermelho segundo o  $\text{Log}_2$  Fold change apresentado por estes.



Por outro lado, a partir do transcrito foi feita uma análise de correlação dos primeiros 50 genes diferencialmente expressos, onde estes eram correlacionados segundo seu nível de expressão, obtendo um gráfico de correlação (Figura 12). Entre os primeiros 50 genes, todos eles apresentaram correlação matemática positiva com outros genes.

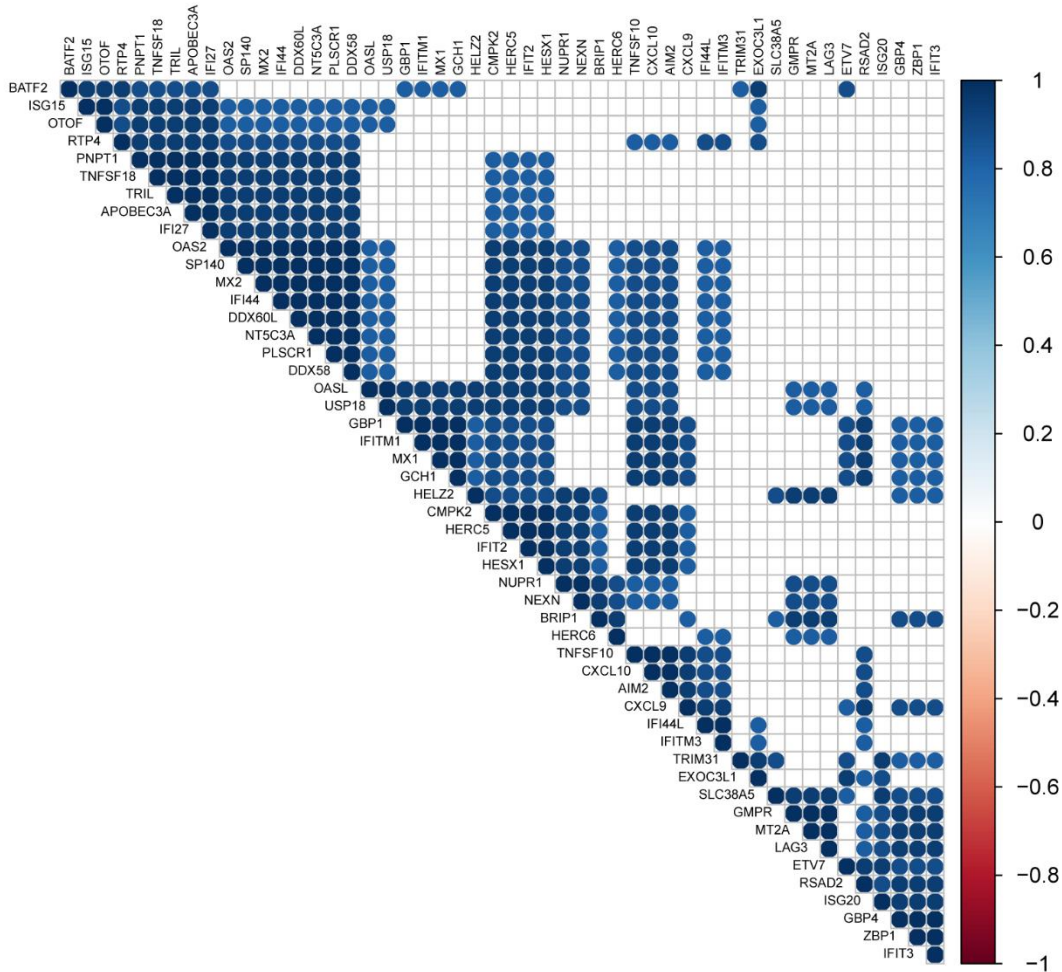


Figura 12. Gráfico de correlação entre os níveis de expressão dos primeiros 50 genes diferencialmente expressos. A escala mostrada entre vermelho e azul representa o número de correlação negativa ou positiva entre os genes.

A fim de determinar o significado biológico no controle da magnitude da expressão diferencial de cada gene, uma rede de interação proteína-proteína (PPI) dos DEGs foi gerada usando o banco de dados STRING. Após a exclusão de genes e proteínas não anotados sem interação relacionada, as 126 proteínas participantes da

rede apresentaram sete padrões funcionais consistentes (Figura 13). Notadamente, quatro deles estão intimamente relacionados à resposta a vírus: resposta a vírus (magenta), processamento do antígeno MHC-I e apresentação por meio de proteassoma de ubiquitina (amarelo), via de sinalização do receptor semelhante a NOD (violeta) e metalotioneínas (laranja). Além disso, três funções típicas de DCs foram reguladas para cima e destacadas na rede PPI: produção de espécies reativas de oxigênio (ciano), recrutamento de linfócitos (verde menta) e coestimulação (rosa pálido). Em relação à resposta relacionada a vírus, foi observada uma correlação direta entre o *Fold change* e a probabilidade de PPI (representada pelo diâmetro do nó e o comprimento da aresta, respectivamente). Vale ressaltar que os 10 principais hubs de rede: ISG15, IFIT3, MX1, RSAD2, STAT1, IFIH1, OASL, IFIT1, IFI44L e IFI44 pertencem ao termo GO "resposta ao vírus", reforçando que o *T. cruzi* pode ativar uma resposta relacionada a vírus em DCs. Esse padrão indica que a expressão diferencial obtida por meio da análise do transcritoma não é aleatória e suporta um significado biológico para as vias desencadeadas. Dentro da rede PPI, da via de resposta do vírus foi conectada à sinalização dos receptores tipo NOD, recrutamento de linfócitos e processamento e apresentação de antígenos via MHC-I através de GBP1, CXCL10 e USP18, respectivamente. Além disso, o CCL4 liga o agrupamento de recrutamento de linfócitos às proteínas relacionadas à coestimulação. Finalmente, as metalotioneínas orientam-se em um único grupo que apresenta uma forte probabilidade de PPI.

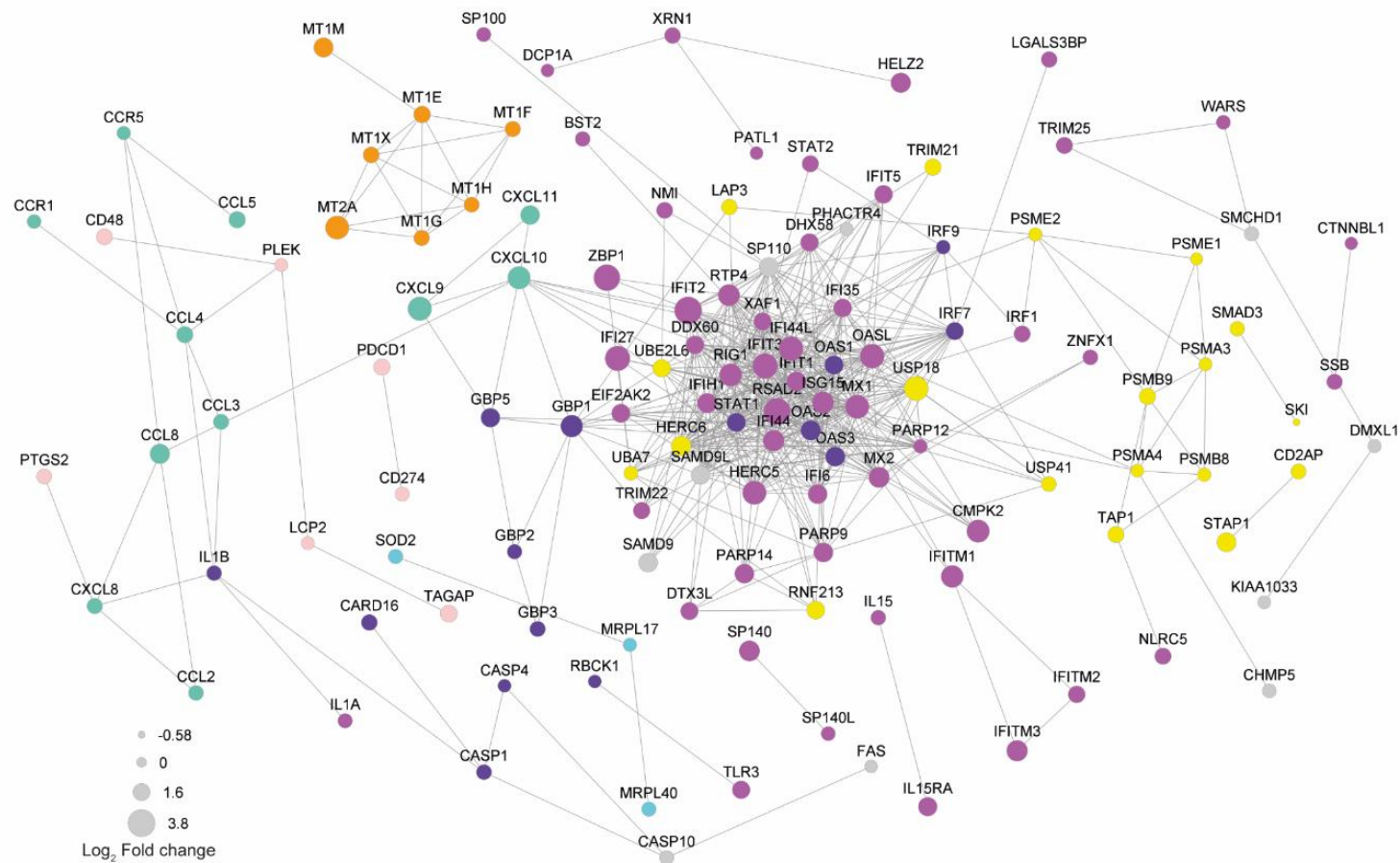


Figura 13. A interação proteína-proteína resalta os genes da resposta do vírus como *hubs* da rede. Os DEGs foram usados como entrada para análise de interação proteína-proteína (PPI) no banco de dados STRING. Magenta: resposta do vírus (GO: 0009615); amarelo: processamento e apresentação de antígeno exógeno (GO: 0002479) incluindo proteossoma (hsa03050) e ubiquitinação / deubiquitinação (GO: 0016567 / GO: 0016579); violeta: via de sinalização de receptores tipo a NOD (hsa04621); verde menta: via de sinalização de quimiocina (hsa04602); rosa pálido: coestimulação de linfócitos; laranja: metalotioneínas relacionadas à resposta do vírus; ciano: proteínas relacionadas a espécies reativas de oxigênio. Um escore de confiança de 0,6 foi definido como ponto de corte permitindo dados de coexpressão, coocorrência e experimentais como evidências. Os comprimentos das arestas representam a pontuação de evidência STRING: pontuações mais altas refletem comprimentos mais curtos. O diâmetro dos nós representa o  $\text{Log}_2$  Fold change no transcrito.

#### 5.4. Validação do transcritoma global via RT-qPCR

Para a validação dos dados do transcritoma foram escolhidos 7 genes usando os parâmetros descritos nos materiais e métodos: TNFSF18, CXCL9, USP18, GBP4, PLCB2, OASL e WNT5B. A Figura 14A mostra o resultado da RT-qPCR obtida a partir de três réplicas biológicas de cada doador que participou no transcritoma. O  $\text{Log}_2$  *Fold change* de USP18 e CXCL9 é aproximadamente 3, enquanto o de TNFSF18 foi menor, como visto no transcritoma (Figura 14C). Para verificar que o padrão de expressão se conserva em uma amostra maior, 3 novos doadores foram incluídos na análise. Mediante comparação entre a Figura 14B e C é possível ver que inclusive em amostras maiores, os genes testados foram regulados como esperado, e inclusive os valores de *p* se refletem na quantificação feita com RT-qPCR, pois genes mais significativos no transcritoma são também os mais significativos na validação feita no método independente. Desta forma, os dados da RT-qPCR confirmam os observados no transcritoma.

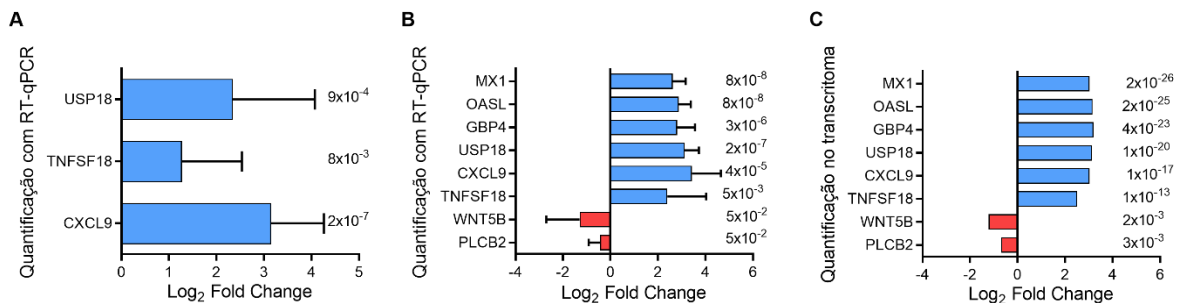


Figura 14. Validação via RT-qPCR do transcritoma da interação DCs-*T. cruzi*. Os genes CXCL9, TNFSF18 e USP18 foram testados e normalizados respeito à expressão de B2M por triplicata nos doadores A, B e C ( $n=9$ ; média do  $\text{Log}_2$  *Fold change*  $\pm$  SD) (A), e por réplica única de mais três doadores ( $n = 6$ ; média do  $\text{Log}_2$  *Fold change*  $\pm$  SD) nos mesmos genes junto com MX1, OASL, GBP4, WNT5B e PLCB2 (B). O  $\text{Log}_2$  *Fold change* dos genes no transcritoma é apresentado em C. Os valores de *p* são mostrados na frente das barras. Normalidade verificada mediante D’Agostino & Pearson, o teste t não pareado foi usado para as comparações contra as amostras controle.

#### 5.5. Validação do transcritoma via dosagem de citocinas

Para validação em nível de proteína do transcritoma, tentou-se uma abordagem a partir da quantificação de citocinas secretadas no meio durante a interação. No transcritoma, as citocinas IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-10 e TNF apresentaram uma

expressão levemente aumentada nas amostras infectadas (~2 vezes maior), enquanto que IL-6, IL-12 e IL-4 não mostraram diferença significativa (Tabela 5).

**Tabela 5. Expressão diferencial dos transcritos das citocinas, segundo o transcritoma. NA: não aplica.**

Citocina	Log <sub>2</sub> <i>Fold change</i>	p <sub>adj</sub>
IL-6	NA	NA
IL-12	NA	NA
TNF	1,28	1,2848 × 10 <sup>-5</sup>
IL-8	1,24	0,0006
IL-10	0,99	0,0089
IL-1B	1,14	0,0103

Com esse intuito, as mesmas citocinas foram dosadas em 25 µL do sobrenadante da interação DCs-*T. cruzi*, obtendo os resultados listados na Tabela 6. No entanto, grande parte dos resultados não foi usada na análise (0 pg/µL na tabela) por ter ficado abaixo do limite de detecção dos kits (1,9 pg/µL para IL-12p70; 2,5 pg/µL para IL-6; 3,3 pg/µL para IL-10; 3,7 pg/µL para TNF; 3,6 pg/µL para IL-8; e 7,2 pg/µL para IL-1β). Enquanto a citocina IL-12p70, todos seus valores foram inferiores ao limite de detecção.

**Tabela 6. Dosagem de citocinas em 25 µL do sobrenadante obtido após 12 h de interação nas diferentes réplicas dos doadores A, B e C. Dados normalizados para igual quantidade de células no meio.**

Amostra	TNF (pg/µL)	IL-10 (pg/µL)	IL-6 (pg/µL)	IL-1β (pg/µL)	IL-8 (pg/µL)
A1 CTR	0,56	0	0,41	0	194,80
A1 INF	1,25	0	1,02	0	358,35
A2 CTR	0	0	0	0	92,08
A2 INF	14,27	0	0	0	234,45
A3 CTR	0,54	0	1,15	0	685,66
A3 INF	9,64	0,40	3,23	0	1397,17
A4 CTR	0,61	0	7,53	0	141,42
A4 INF	50,62	22,46	855,93	107,35	3232,13
B1 CTR	0	0	0	0	10,42
B1 INF	0	0	0,30	0	82,70
B2 CTR	0	0	0	0	77,87
B2 INF	0	0	0,88	0	137,12
B3 CTR	0	0	0	0	32,29



<b>B3 INF</b>	0	0	1,92	0	226,57
<b>B4 CTR</b>	0,37	0	0	0	70,46
<b>B4 INF</b>	48,10	0	6,16	0,58	1023,81
<b>B5 CTR</b>	0,53	0	0,44	0	168,13
<b>B5 INF</b>	0,47	0	0,26	0	53,12
<b>B6 CTR</b>	0,62	0	0,48	0	265,39
<b>B6 INF</b>	3,54	0	0,95	0	488,03
<b>B7 CTR</b>	0,67	0	0,27	0	60,00
<b>B7 INF</b>	0,65	0	0,58	0	59,55
<b>C1 CTR</b>	0	0	0	0	10,37
<b>C1 INF</b>	0	0	0	0	14,49
<b>C2 CTR</b>	0,95	0	1,36	0	176,13
<b>C2 INF</b>	0,88	0	1,00	0	166,82
<b>C3 CTR</b>	0,37	0	1,51	0	625,03
<b>C3 INF</b>	35,57	0,29	24,08	1,08	1779,29
<b>C4 CTR</b>	1,04	0	1,40	0	68,78
<b>C4 INF</b>	3,80	0	2,49	0	275,89
<b>D1 CTR</b>	0,76	0	0,45	0	364,90
<b>D1 INF</b>	4,61	0	0,94	0	483,84
<b>E1 CTR</b>	0,70	0	0,28	0	204,63
<b>E1 INF</b>	3,68	0	1,18	0	380,20
<b>F1 CTR</b>	1,80	0	59,52	0	1357,31
<b>F1 INF</b>	3,68	2,68	73,68	1,04	2858,55

A partir dos dados normalizados e não excluídos da Tabela 6, a Figura 15 foi obtida, observa-se que não teve diferença significativa nas concentrações de IL-10 e IL-1 $\beta$  no meio, embora no transcritoma estes genes foram significativamente mais expressos nas amostras infectadas. Contudo, entre os genes que codificam para citocinas, estes foram os que apresentaram o valor de  $p$  mais alto, pelo o que é razoável concluir que técnicas menos sensíveis não detectam a diferença de expressão. Por outro lado, TNF e IL-8 mostraram secreções diferencialmente significativas, como esperado segundo o transcritoma (Figura 15B e D). Como previsto, IL-6 não apresentou diferença significativa.

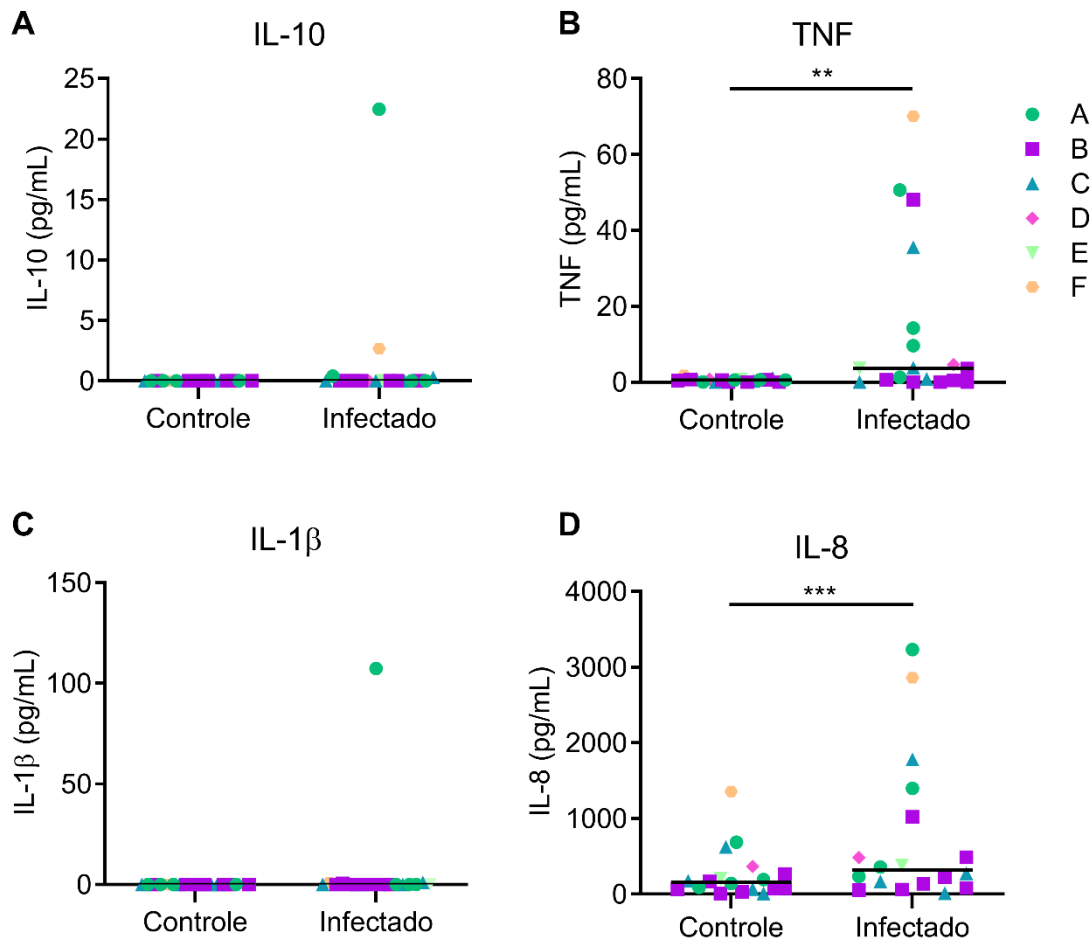


Figura 15. Dosagem de citocinas para validação do transcrito em nível de proteína. Após 12 h de interação, o sobrenadante dos grupos controle e infectado foi coletado para cada doador (doador A: círculo verde; doador B: quadrado roxo; doador C: triângulo azul; doador D: losango rosa; doador E: triângulo invertido verde claro; doador F: hexágono laranja) e testado para IL-10 (A), TNF (B), IL-1β (C), e IL-8 (D) usando o kit CBA de citocinas humanas inflamatórias (BD). As linhas horizontais nos gráficos mostram a mediana das quantificações (pg/μL) e cada ponto representa uma réplica (n= 19). Os dados não apresentaram distribuição normal segundo Shapiro-Wilk e as diferenças significativas foram testadas usando o teste Mann Whitney. \*\*:  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0.001$ .

### 5.6. Preparação das amostras para o proteoma da interação DCs-*T. cruzi*

A Tabela 7 contém as quantificações dos extratos de proteína obtidos das DCs após 12 h de interação com o parasito. A quantidade mínima sugerida de 11 μg de proteínas foi atingida em todas as amostras.

Tabela 7. Quantificação de proteínas das amostras para proteoma da interação DCs-*T. cruzi*. As amostras foram nomeadas segundo o doador (B, C e D) e condição (controle: C, infectado: I).

Amostra	Quantidade total (µg)	Volume total (µL)
B_C	22	44
B_I	22,5	44
C_C	31,4	45
C_I	11,4	41
D_C	11	40
D_I	12	40,5

Posteriormente a integridade de todas as amostras foi confirmada mediante visualização em SDS-PAGE, confirmando que a quantificação e a limpeza das amostras foram homogêneas, como visto na Figura 16 para os doadores B e C. Portanto, as amostras são aptas para a realização futura de um proteoma, que será realizado após sobrelevar impedimentos técnicos e circunstanciais (pandemia).

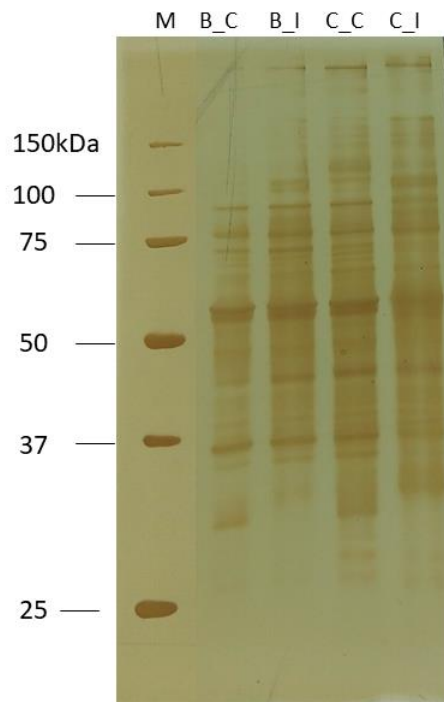


Figura 16. Integridade das amostras de proteína. SDS-PAGE 12% das amostras dos doadores B e C. 2.5 µg de proteína de cada amostra foram visualizados no gel mediante coloração por prata. Ordem dos poços: Marcador de peso molecular (M), doador B controle (B\_C), doador B infectado (B\_I), doador C controle (C\_C), doador C infectado (C\_I).



### 5.7. Obtenção de DCs murinas (BM-DCs)

Para testar a via de resposta a vírus no modelo murino, foi necessária a obtenção de células dendríticas diferenciadas de medula óssea. Após 7 dias de diferenciação, as BM-DCs obtidas mostravam uma só população (Figura 17A), eram negativas para o marcador de macrófagos F4/80 (Figura 17C), expressavam os marcadores de DCs murinas CD11b e CD11c (Figura 17C e D), e apresentaram diferentes porcentagens de expressão positiva da molécula MHC-II. Uma viabilidade maior a 95% foi verificada em cada experimento (Figura 17B). Portanto, pode-se afirmar que foi possível obter uma diferenciação completa das BM-DCs.

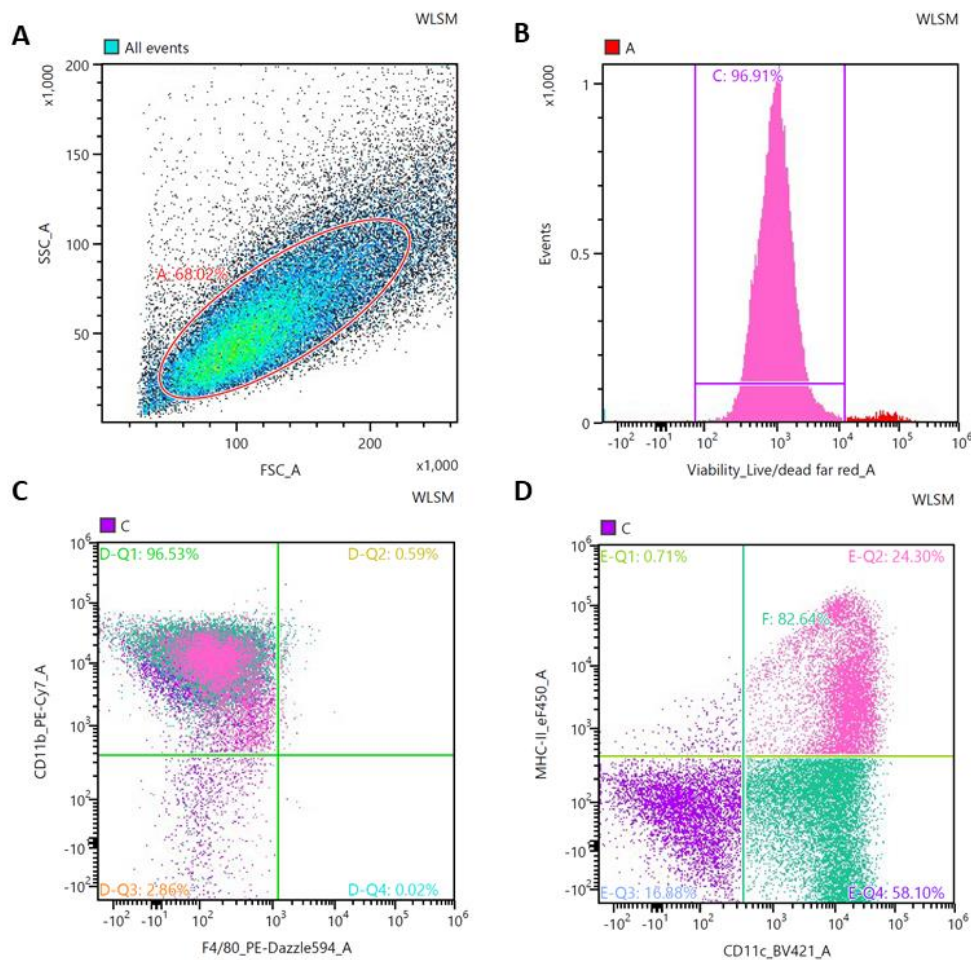


Figura 17. Caracterização das BM-DCs. Após 7 dias de diferenciação as DCs obtidas a partir de células de medula óssea foram caracterizadas mediante citometria de fluxo usando anticorpos contra marcadores típicos de DCs (CD11b, CD11c e MHC-II) e macrófagos (F4/80). Os painéis mostram resultados representativos da população total (A), viabilidade das células (B) e expressão dos marcadores (C e E) de todos os experimentos feitos.

### 5.8. Treinamento das BM-DCs usando Poli I:C

Numa tentativa de estimular uma resposta a vírus nas DCs murinas, elas foram cultivadas com Poli I:C durante 8 ou 24 h. Após 8 h, foi possível observar uma diminuição de aproximadamente 50% nas células expressando os marcadores de maturação CD80, CD86 e CD40 (Figura 18). Por outro lado, as BM-DCs incubadas durante 24 h não mostraram diferença significativa com suas contrapartes incubadas somente no meio, mas os dois grupos mostraram-se diminuídos na expressão de CD80 e CD40, e aumentados na expressão de MHC-II quando comparados com as BM-DCs recém diferenciadas (Figura 19).

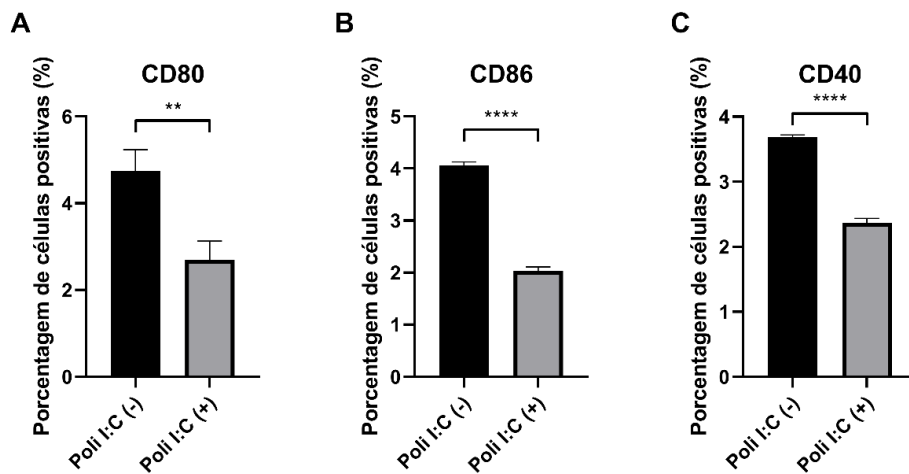


Figura 18. Marcadores de maturação nas BM-DCs treinadas durante 8 h com Poli I:C. BM-DCs imaturas foram estimuladas por 8 h usando 10µg/mL de Poli I:C, lavadas e marcadas com anticorpos anti-CD80 (A), -CD86 (B) e -CD40 (C). No gráfico é mostrada a média da porcentagem positiva de células ± SD, n=3. A normalidade foi verificada usando D’Agostino & Pearson e as comparações foram feitas usando teste t não pareado. \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

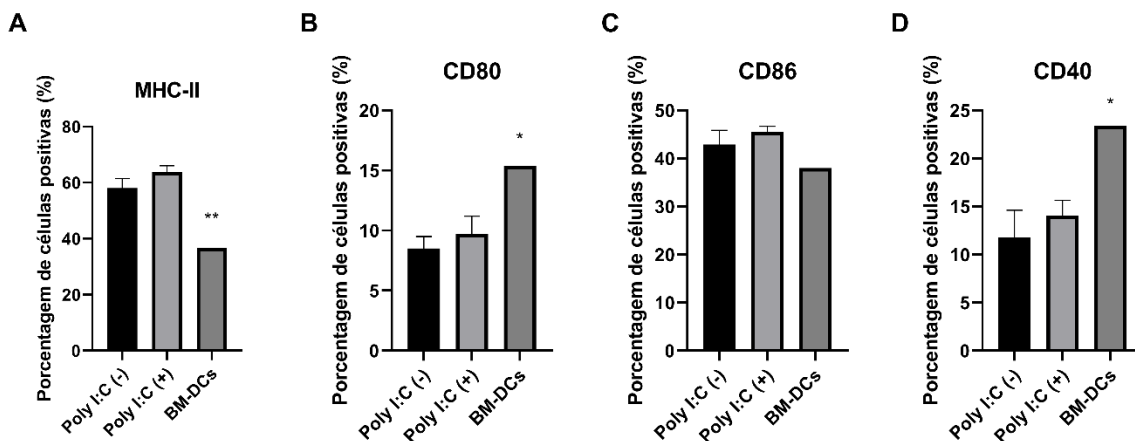


Figura 19. Marcadores de maturação nas BM-DCs treinadas durante 24 h com Poli I:C. BM-DCs imaturas foram estimuladas por 24 h usando 10µg/mL de Poli I:C, lavadas e marcadas com anticorpos anti-MHC-

II (A), -CD80 (B), -CD86 (C) e -CD40 (D). No gráfico é mostrada a média da porcentagem positiva de células  $\pm$  SD, n=3. A normalidade foi verificada usando D’Agostino & Pearson e as comparações foram feitas usando teste de Turkey. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ , valor de  $p$  mostrado para as BM-DCs imaturas quando comparadas com as que foram estimuladas ou não com poli I:C 24 h depois.

Após o treinamento por 8 h com o Poli I:C, tanto as DCs infectadas (INF) quanto as DCs treinadas e infectadas (tINF) mostraram maior expressão de MHC-II do que as DCs treinadas (tCTR) ou não (CTR). Adicionalmente, todas elas mostraram maior expressão dessa molécula do que foi visto justo depois da diferenciação. Não teve diferença entre as amostras INF e tINF (Figura 20A). Ademais, o CD86 mostrou diferença significativa entre células controle e infectadas, aumentando no caso das células não treinadas e diminuindo no caso das BM-DCs que foram estimuladas com o Poli I:C. Neste caso, as amostras INF expressaram mais CD86 do que as tINF (Figura 20B).

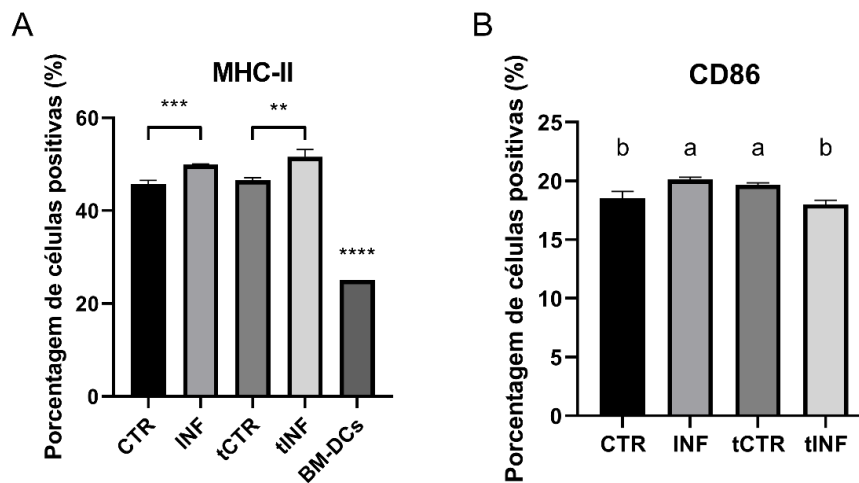


Figura 20. Marcadores de maturação nas BM-DCs treinadas ou não por 8 h com Poli I:C após 12 h de infecção. Após 8 h de treinamento com 10 mg/mL de Poli I:C, as BM-DCs foram postas em contato com as formas MTs do *T. cruzi* e sua expressão de MHC-II (A) e CD86 (B) foi avaliada mediante citometria de fluxo. A média da porcentagem positiva de células  $\pm$  SD é apresentada, n = 3. A normalidade foi verificada usando D’Agostino & Pearson e as comparações foram feitas usando teste de Turkey. \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,01$ . As BM-DCs foram significativamente diferentes a todas as condições testadas com um valor de  $p \leq 0,0001$  (\*\*\*\*). Em B, grupos com igual letra não apresentam diferença significativa, grupos com letras diferentes apresentam diferença com  $p < 0,05$ . CTR: BM-DCs não infectadas; INF: BM-DCs infectadas; tCTR: BM-DCs treinadas com Poli I:C não infectadas; tINF: BM-DCs treinadas com Poli I:C infectadas.

No caso das 24 h de treinamento, foi vista também uma maior expressão de MHC-II e CD86 em todos os grupos quando comparados com os valores das BM-

DCs justo depois da diferenciação ( $p \leq 0,001$  e  $0,0001$ , respetivamente), mas uma diminuição de aproximadamente 90% da expressão de CD40 (Figura 21A-C). Aproveitando a fluorescência da cepa usada para a infecção, foi possível identificar as BM-DCs que tinham sido infectadas, com uma média de 1,6% e 1,2% delas sendo positivas no grupo INF e tINF, respetivamente, mas sem diferença significativa entre os grupos (Figura 21D).

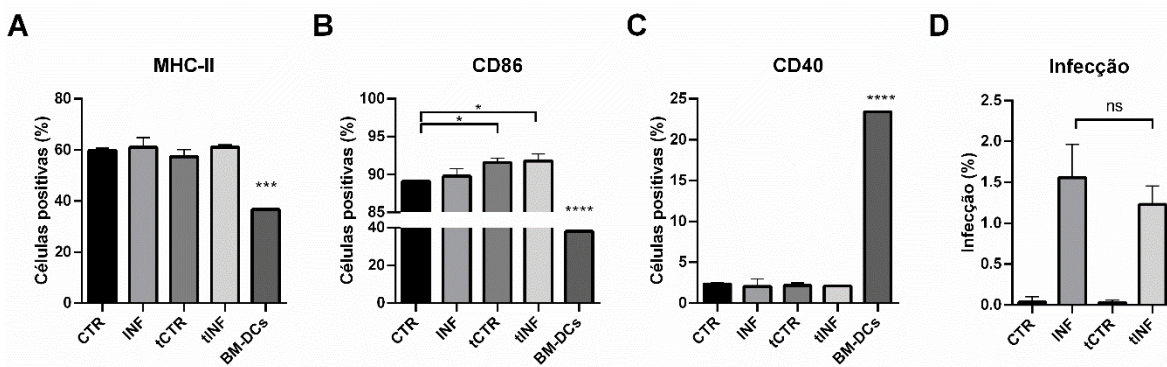


Figura 21. Marcadores de maturação após treinamento ou não por 24 h com Poli I:C e 12 h de infecção. Após 24 h de treinamento com 10 mg/mL de Poli I:C, as BM-DCs foram postas em contato com as formas TMs do *T. cruzi* e sua expressão de MHC-II (A), CD86 (B), CD40 (C) e taxa de infecção (D) foi avaliada mediante citometria de fluxo. A média da porcentagem positiva de células  $\pm$  SD é apresentada,  $n = 3$ . A normalidade foi verificada usando D’Agostino & Pearson e as comparações foram feitas usando teste de Turkey. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ ; ns: não significativo.

### 5.9. Manuscrito “The first contact of human dendritic cells with *Trypanosoma cruzi* reveals response to virus as an unexplored central pathway”

Os resultados do presente trabalho foram usados para a escrita do artigo que se encontra adjunto no Anexo 5.

## 6. DISCUSSÃO

Durante as principais formas de infecção (inseto vetor e via oral), o *T. cruzi* é inoculado nas membranas mucosas ou na pele lesada antes de chegar à corrente sanguínea para infectar outras células do corpo (DE LANA; MARQUES; MACHADO, 2010; MACHADO et al., 2013). A pele é habitada por populações de células imunes que servem como uma primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos. Entre essas populações estão as DCs, que desempenham uma função sentinela essencial, captando antígenos ou agentes infecciosos e transportando-os para o linfonodo para o reconhecimento de células T e a iniciação de respostas imunes (HILLIGAN; RONCHESE, 2020; RONCHESE; HILLIGAN; MAYER, 2020). As células de Langerhans, DCs associadas a tecidos e especialmente a mucosas, incluem-se entre as primeiras células em contato com o parasito, enquanto outros subtipos de DCs serão recrutados no lugar da infecção nas seguintes 8 a 24 h (KELLY; HWANG; KUBES, 2007; LUTZ et al., 2017). As células de Langerhans apresentam como principais marcadores Langerina e CD1a (COLLIN; MCGOVERN; HANIFFA, 2013); este último foi verificado também nas DCs obtidas no presente trabalho e está relacionado com DCs de tecidos mucosos (SEGURA; AMIGORENA, 2015). No contexto da infecção pelo *T. cruzi*, um estudo demonstrou que a inoculação intradérmica do parasito produz durante as primeiras 72 h um infiltrado baixo, com poucos macrófagos, neutrófilos e monócitos; mas que consegue induzir a mobilização de DCs inflamatórias derivadas de monócito até os órgãos linfoides secundários. Além disso, eles mostraram que essas MoDCs são provavelmente responsáveis por impedir a ativação de linfócitos T (PONCINI; GONZÁLEZ-CAPPA, 2017). Isto justifica a escolha das DCs derivadas de monócito como modelo para o estudo do que acontece durante o primeiro contato do sistema imune do hospedeiro humano com as formas TMs do parasito. Vale ressaltar que o conhecimento atual da interação DCs-*T. cruzi* em humanos limita-se quase exclusivamente à quantificação de alguns marcadores de superfície e dosagem de citocinas (GIL-JARAMILLO et al., 2016). Com isso em mente, o transcritoma da interação DCs humanas com o *T. cruzi* foi obtido, analisado e validado aqui.

Na tentativa de simulação das condições do primeiro contato entre o hospedeiro humano e o *T. cruzi*, as formas TMs foram obtidas a partir de cultivo em meio TAU3AAG, que contém os três aminoácidos necessários para a metaciclogênese, assim como lise dos epimastigotas usando soro ativo (CONTRERAS et al., 1985; CANAVACI et al., 2010). Essas formas são precisamente as que penetram nas lesões formadas após a picada do vetor e as que conseguem estabelecer uma infecção oral mediante a ingestão de alimentos contaminados (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014). Está demonstrado que os TMs gerados em meio de cultura conservam as características de TMs derivados de insetos, e, por tanto, vários estudos importantes foram baseados em TMs derivados *in vitro* (CONTRERAS et al., 1985, 1988; TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986; BONALDO et al., 1988; GONZALES-PERDOMO; ROMERO; GOLDENBERG, 1988; DORTA et al., 1995; SCHUSTER; SCHAUB, 2000; MENDES et al., 2016; AMORIM et al., 2017; LEWIS et al., 2018; MONTEON, 2019). Os meios TAU e TAU3AAG foram projetados para simular as condições intestinais dos insetos e estimular um processo de metaciclogênese o mais natural possível. Por exemplo, Contreras e colegas mostraram morfologia, capacidade de infecção *in vitro* e *in vivo* e curva de parasitemia semelhante entre TMs derivados de inseto e aqueles derivados de meio de cultura (CONTRERAS et al., 1985, 1988). Resistência comparável ao complemento e lise de macrófagos também foram demonstradas (BONALDO et al., 1988; GONZALES-PERDOMO; ROMERO; GOLDENBERG, 1988). Finalmente, as mesmas características antigênicas foram detectadas em múltiplas cepas de *T. cruzi* quando os dois tipos de TMs foram comparados (TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986). Além disso, este método é amplamente utilizado devido à sua simplicidade e alto rendimento (obtenção de grande volume de parasitas para testes biológicos, uma característica importante considerando que os TMs são incapazes de se dividir) (DORTA et al., 1995; AMORIM et al., 2017).

Entre os poucos estudos feitos em DCs humanas, a interação DCs-*T. cruzi* sempre foi avaliada após 16 a 72 h (VAN OVERTVELT et al., 1999, 2002; BRODSKYN et al., 2002; OUAISSI et al., 2002; RODRIGUEZ; CARLIER;

TRUYENS, 2012). Sendo o intuito do presente estudo avaliar o que acontece no início da interação, decidiu-se trabalhar com um tempo menor aos estudados por outros laboratórios, o qual foi definido mediante experimentos preliminares entre 4 e 24 h (GIL-JARAMILLO, 2016). Pensando em avaliar se 12 h de interação DCs-*T. cruzi* seriam suficientes para representar a modulação gênica do evento, a taxa de infecção e o número de amastigotas por célula infectada foram determinados, obtendo uma média de 31,5% de DCs infectadas e de 2,2 amastigotas/DC infectada (Figura 4). Em adição, 12 h e sob nossas condições experimentais as células apresentam bem diferenciadas sob o ponto de vista morfológico. Estudos anteriores de infecção do *T. cruzi* em DCs humanas mostraram taxas de infecção similares usando técnicas diferentes, como imunofluorescência ou citometria de fluxo. Em 1999, Van Overtvelt e colaboradores, demonstraram que o *T. cruzi* tinha a capacidade de infectar DCs humanas, apresentando uma taxa de infecção variável de 45 a 80% após 24 h de interação com tripomastigotas da cepa Tehuantepec derivados de cultura com MOI igual ao usado no presente trabalho (10:1) (VAN OVERTVELT et al., 1999). Mais tarde, o mesmo grupo obteve uma porcentagem de 30% de infecção após 24 h usando a mesma cepa e o mesmo MOI, porém realizando a quantificação por citometria de fluxo (VAN OVERTVELT et al., 2002). Outros estudos testaram também a infecção do *T. cruzi* em populações celulares similares, como é o caso dos monócitos, e apresentaram perto de 100% de infecção quando testados com cepas altamente infectivas, como Y e Col cl 1.7, após 15 h de interação e MOI 10:1 (MAGALHÃES et al., 2015). Cabe perguntar então qual influência teriam os 68,5% das células não infectadas nas amostras incubadas com o parasito. Apesar dessas DCs não estarem infectadas, tiveram contato com o *T. cruzi*, e múltiplos trabalhos já demonstraram seu efeito de ativação “espectadora” em diferentes linhagens celulares (MOSCA; BRICEÑO, 2009; RODRIGUEZ; CARLIER; TRUYENS, 2012; DE BONA et al., 2018), e mais especificamente, em DCs humanas (VAN OVERTVELT et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2015). Portanto, no presente trabalho os resultados obtidos devem interpretar-se como o reflexo de um perfil de expressão misto de células infectadas e espectadoras, que é precisamente o que acontece durante um primeiro contato natural (PONCINI;

GONZÁLEZ-CAPPA, 2017). No referente ao número de amastigotas por célula infectada, somente Van Overtvelt e colaboradores reportam esse resultado com 4 a 10 amastigotas intracelulares após 24 h de infecção para o MOI de 10:1 (VAN OVERTVELT et al., 1999).

No que diz respeito ao número de *reads* de boa qualidade obtidas por amostra, com mais de 23 milhões para cada (Tabela 4), outros transcritomas de células humanas tem apresentado números similares, permitindo cobertura e profundidade suficiente para a identificação de genes diferencialmente expressos. Entre eles, Kaakoush e colaboradores obtiveram 29 milhões de *reads* por amostra e 8343 DEGs em macrófagos diferenciados a partir de THP-1 (KAAKOUSH et al., 2015); Fernandes e colaboradores, usando macrófagos derivados de monócitos de sangue periférico, obtiveram 85 milhões de *reads* por amostra com mais de 5000 DEGs (FERNANDES et al., 2016), e Li e colaboradores conseguiram o total de 77 milhões de *reads* por amostra, representando 450 DEGs a partir de fibroblastos humanos de linhagem (LI et al., 2016).

O PCA obtido após a exclusão das amostras A1C, B1I e C2I apresentou um padrão de agrupamento bem definido segundo a condição (infectado ou controle) (Figura 5). A eliminação desses dados dentro do contexto da análise global é válida porque a abordagem tem enfoque na condição e não no indivíduo, ou seja, ignorar uma amostra de cada doador não provoca nenhum vícios. No relativo à variância apresentada entre as amostras e a vista no PCA, ela se encontra dentro do aceitável para amostras de transcritomas de células humanas, tendo em conta que indivíduos diferentes foram escolhidos como doadores (FERNANDES et al., 2016; HOUSTON-LUDLAM; BELEW; EL-SAYED, 2016; D'ERCHIA et al., 2017).

Outro aspecto importante é o número de DEGs obtidos na análise (468) (Figura 6 e Anexo 1), um número pertinente para um estudo complexo e abrangente como o presente, onde é de interesse encontrar genes importantes durante a interação DC-*T. cruzi* e que sejam comuns dentro de uma população diversa, como a dos indivíduos propensos a contrair a doença, incluindo humanos. De maneira interessante, os dois estudos com células humanas e *T. cruzi* existentes até o momento apresentaram uma quantidade similar de DEGs (800 e 500,



respectivamente), apesar de terem uma cobertura significativa com 69 e 77 milhões de *reads* por amostra, respectivamente (HOUSTON-LUDLAM; BELEW; EL-SAYED, 2016; LI et al., 2016).

Com relação à quantidade de genes regulados negativamente (Figura 6), o transcritoma de fibroblastos humanos quando infectados com a cepa Sylvio durante 24 h apresentou 46 genes regulados negativamente contra 243 regulados positivamente (HOUSTON-LUDLAM; BELEW; EL-SAYED, 2016), resultado similar ao presente, tendo aquele, todavia, uma cobertura maior (77 milhões de *reads* por amostra). Com isto, pode-se inferir que a quantidade de DEGs e, principalmente de genes com regulação negativa, não está relacionada a uma análise errada, mas provavelmente à variação entre as amostras, já que são obtidas de doadores e não de linhagens.

A partir dos 468 DEGs obtidos no transcritoma, uma análise de enriquecimento de termos no GO e de vias no KEGG foi realizada, obtendo 520 termos e 32 vias, respectivamente. Entre essas análises, a *resposta a vírus* mostrou-se muito importante, incluindo termos relativos ao interferon do tipo I (IFN-I), e vias como resposta a influenza, herpes, hepatite, entre outras (Anexo 2 e Anexo 4). Por essa razão, a via de resposta de defesa a vírus foi selecionada para análise da expressão diferencial de genes em células dendríticas humanas quando infectadas por formas TMs do *T. cruzi* (Figura 7 e Figura 11). Além disso, a via de sinalização por receptores do tipo NOD (NLRs) e a de secreção de IL-1 $\beta$  foram também reguladas de acordo com as análises de enriquecimento e, por isso, foram escolhidas para análise aprofundada (Figura 8 e Figura 10). Um dos objetivos do presente trabalho consistia em identificar novos alvos de estudo da fase inicial da doença de Chagas, e vias pouco estudadas na interação DCs-*T. cruzi* como a de resposta a vírus e de sinalização por NLRs se apresentam como boas opções.

A via de sinalização desencadeada por NLRs tem sido bastante estudada na imunidade murina e humana, tendo papéis na transdução de sinais, autofagia, ativação transcricional e montagem do inflamassoma (MOTTA et al., 2015). Igualmente, o papel desses receptores tem sido descrito nas DCs, pois são importantes reguladores da transcrição das moléculas de MHC assim como de

moléculas acessórias recrutadas no processo de apresentação de antígenos (KRISHNASWAMY; CHU; EISENBARTH, 2013). Ademais, alguns estudos sugerem uma relação direta entre alguns NLRs e a maturação e migração das DCs (LI et al., 2007; EISENBARTH et al., 2012). No entanto, a importância dos NLRs na interação DCs-*T. cruzi* não está completamente definida e até o momento existem poucos estudos relacionados. No modelo murino, existe um trabalho descrevendo o papel fundamental de Nod1 em macrófagos derivados de medula para a expressão de produtos dependentes do fator de transcrição NF- $\kappa$ B durante a infecção pelo *T. cruzi*, demonstrando também que camundongos deficientes neste gene eram altamente susceptíveis ao parasito (SILVA et al., 2010).

Além de NOD1 y NOD2, NLRP3 também já foi estudado no contexto da infecção pelo *T. cruzi* com resultados aparentemente contraditórios. Inicialmente foi comprovado que NLRP3, mas não NLRC4 nem NLRP6, era requerido durante a infecção do parasito para a ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 $\beta$  (SILVA et al., 2013). Posteriormente foi visto que macrófagos peritoneais de camundongos deficientes em NLRP3 ou caspase-1 apresentavam uma produção reduzida de óxido nítrico sem capacidade de eliminar o parasito, o que se refletia em uma alta parasitemia nos camundongos, isto usando a cepa Y (GONÇALVES et al., 2013). No entanto, outro trabalho observou um número de parasitos intracelulares 4 vezes menor nos macrófagos derivados de medula que não expressavam NLRP3 infectados pela cepa Tulahuen durante 3 ou 18 h, com produção desregulada de citocinas, mas uma alta produção de espécies reativas de oxigênio. Os autores propuseram que era possível que no começo da infecção a super produção de espécies reativas de oxigênio compensaram a falta de NLRP3 para favorecer a eliminação do parasito, mas finalmente, a falta de ativação da óxido nítrico sintase induzível/óxido nítrico impediu o controle no longo prazo do *T. cruzi* (DEY et al., 2014). Todavia, um terceiro estudo demonstrou que não havia diferença na parasitemia dos camundongos selvagens e aqueles deficientes para NLRP3, mas que a carga parasitaria no fígado era maior no último grupo, indicando que NLRP3 não é indispensável para o controle da infecção, mas necessário para a eliminação do parasito no fígado (PAROLI et al., 2018). De igual maneira, a diferença entre os

resultados poderia ser questão do ponto na linha do tempo onde eles são obtidos, pois é possível que os parasitos poderiam usar o fígado como reservatório. Em humanos, foi visto que NLRP3, ASC e IL-1 $\beta$  são mais expressos em pacientes chagásicos com anomalias cardíacas quando comparados com os pacientes indeterminados, sugerindo que a alta expressão do receptor pode induzir uma maior produção de citocinas, o que pode desencadear o desenvolvimento das formas clínicas (PEREIRA et al., 2018).

No presente transcritoma, NOD2 (2x mais expresso) e NLRC5 (2,8x mais expresso) foram os receptores tipo NOD diferencialmente expressos, assim como várias das moléculas relacionadas com esta via, segundo o KEGG (GBP4, OAS3, GBP1, OAS2, STAT1, OAS1, IRF7, AIM2, MYD88, GBP5, STAT2, TNF, CARD16, GBP3, CCL5, CASP1, NAMPT, CXCL8, MFN1, PLCB2, IFR9, GBP2, RBCK1, PNX1, IL1B, IFI16, CASP4, IKBKE, RIPK2, CCL2). Porém, nem NOD1 nem NLRP3 foram diferencialmente expressos, o que poderia significar que realmente estes receptores têm importância numa fase mais avançada da infecção, e, portanto, é provável que outros sensores desencadeiem a ativação dos inflamassomas nas fases iniciais. RIG-I e AIM2, sensores reportados em resposta a vírus (CHEN; ICHINOHE, 2015), foram mais expressos segundo o transcritoma nas DCs infectadas, e se apresentam como alternativas naquele processo. No entanto, Chessler e colaboradores demonstraram que RIG-I e AIM2 não são necessários para a produção de IFN- $\beta$  nos macrófagos infectados com a cepa Y do parasito (CHESSLER et al., 2008). Possivelmente, a produção de IFN do tipo I não é uma consequência exclusiva da ativação desses inflamassomas, mas é provável que o IL-1 $\beta$  produzido por eles seja útil para desencadear inflamação, proliferação celular ou apoptose (REN; TORRES, 2009).

Os inflamassomas ativados por esses sensores são complexos de proteínas ensamblados no citoplasma das células, que induzem respostas inflamatórias mediante a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18, e podem guiar à morte celular programada inflamatória chamada piroptose (MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009). Sua importância já foi relatada para muitos patógenos, incluindo *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. e *Toxoplasma* spp., assim como em doenças autoimunes

(ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015), e como foi visto nos poucos estudos registrados na literatura, sua ativação pode significar uma eliminação efetiva do parasito na fase aguda, mas uma inflamação potencialmente danosa aos órgãos quando exacerbada na fase crônica (SILVA et al., 2010, 2013; GONÇALVES et al., 2013; DEY et al., 2014; PAROLI et al., 2018; PEREIRA et al., 2018). Portanto, a avaliação de inflamassomas ativados por outros sensores apresenta-se como um alvo de estudo interessante, pois pode representar um ponto de inflexão entre as fases e uma diferença no desenlace entre os indivíduos.

A resposta a vírus mediada por IFN-I também se encontra bem descrita e sabe-se que toda célula mamífera tem capacidade de produzir IFN-I após infecção viral para limitar a replicação e dispersão do vírus (ALSHARIFI; MÜLLBACHER; REGNER, 2008). Entre os mecanismos pelos quais o IFN-I regula a resposta a vírus podem-se destacar: ativação das células NK para sua função citotóxica e não para a produção de IFN- $\gamma$  (NGUYEN et al., 2000), a sinergia com TNF para induzir a produção de iNOS em macrófagos (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997), a regulação positiva da expressão de MHC do tipo I e II, e a indução da maturação das DCs (LUFT et al., 1998). Adicionalmente, a literatura relata que o IFN-I apresenta efeitos antitumorais e anti-inflamatórios, e portanto, há expectativa de sua aplicação em tratamentos de algumas doenças autoimunes, câncer e infecções virais (HAJI ABDOLVAHAB; MOFRAD; SCHELLEKENS, 2016). Porém, pouco é sabido da função do IFN-I durante a infecção pelo *T. cruzi* e é intrigante ver a regulação positiva de genes da via de resposta a vírus na interação das DCs com o parasito. Um estudo em camundongos sem expressão do receptor de IFN- $\alpha/\beta$  demonstrou que suas células NK são incapazes de mediar função citotóxica, mas há produção de IFN- $\gamma$  que protege o hospedeiro da infecção pelo *T. cruzi* (UNE; ANDERSSON; ÖRN, 2003). Mais tarde, Costa e colaboradores provaram a importância do IFN-I na coestimulação da produção de óxido nítrico em macrófagos murinos e portanto, no controle da parasitemia em camundongos resistentes à infecção pelo *T. cruzi* (COSTA et al., 2006). Por outro lado, foi comprovado que a inibição da produção de IFN- $\beta$  dependente do reconhecimento do parasito mediante TLRs inibe também a eliminação dele, tornando em susceptíveis aos camundongos

deficientes em MyD88 e TRIF, adaptadores desses receptores (KOGA et al., 2006). No entanto, existe um trabalho contraditório, onde os mesmos adaptadores foram eliminados e ainda assim os camundongos infectados conseguiam produzir IFN- $\beta$  e controlar a parasitemia, descartando a dependência de reconhecimento por TLRs. Os autores propuseram a hipótese de uma diferença baseada na cepa utilizada, havendo eles usado a cepa Y e o grupo anterior a cepa Tulahuen (CHESSLER et al., 2008). Adicionalmente, os mesmos autores demonstraram a indução da produção de IFN do tipo I no lugar da inoculação do *T. cruzi*, a qual depende precisamente da cepa do parasito, pois em cepas menos infectivas esta produção era anulada. Igualmente, quando a ação do IFN-I era inibida, a resposta no sítio da infecção era totalmente “desligada” (CHESSLER et al., 2009). Outro estudo demonstrou que, embora o IFN-I não seja necessário para a produção de linfócitos T específicos contra o *T. cruzi*, este é crítico para a expansão dessas células durante a infecção (MARTIN; MURALI-KRISHNA; TARLETON, 2010). Esses estudos demonstram então a importância do IFN-I durante o início da infecção para a eliminação do parasito, mas existe um trabalho recente que prova a existência de uma correlação entre alta expressão de IFN- $\beta$  e o passo na fase crônica de uma forma indeterminada a uma doença cardíaca ou digestiva (PEREIRA et al., 2018), sugerindo um papel protetor na fase aguda e não na crônica. Esses são até agora os estudos que descrevem uma relação direta entre o *T. cruzi* e o IFN-I, e nenhum deles tem como célula alvo as DCs, reforçando a importância de aprofundar o estudo desta via para ampliar o conhecimento da infecção por este tripanossomatídeo.

Entre os termos GO que foram menos representados do estatisticamente esperado, encontram-se a biossíntese de tetrapirróis e o desenvolvimento de órgãos sensoriais (Figura 9). Os tetrapirróis são conhecidos como os pigmentos da vida, pois formam estruturas complexas indispensáveis para a fotossíntese, respiração e catálise (BRYANT; HUNTER; WARREN, 2020). Por exemplo, o Heme é um grupo prostético necessário para realizar diversas funções biológicas, essencial em proteínas como a hemoglobina e a mioglobina. Outras enzimas que usam heme como grupo prostético incluem os citocromos da cadeia de transporte

de elétrons, a catalase e a óxido nítrico sintase (OGUN; VALENTINE, 2018). É possível que o *T. cruzi* esteja manipulando as DCs para reduzir a ação da óxido nítrico sintase, interferindo na sua síntese para evadir a degradação no fagolisossomo. Por exemplo, foi visto que o *T. cruzi* consegue inibir o processo de síntese do óxido nítrico em macrófagos murinos mediante a indução da produção de IL-10 e TGF- $\beta$  (GAZZINELLI et al., 1992). No entanto, tendo uma variedade de tetrapirróis cuja síntese pode ter sido afetada, é necessário verificar se realmente há regulação negativa nos genes envolvidos na expressão da óxido nítrico sintase. Este foi um termo sub representado, ou seja, as amostras infectadas mostraram menor expressão dos genes no termo do que é esperado numa expressão aleatória de genes. Portanto, não necessariamente este processo tenha genes regulados negativamente, e isto deve ser examinado. Numa análise da via de biossíntese das coenzimas no KEGG (map01240), que contém a síntese de vários tetrapirróis, dos genes regulados negativamente unicamente foi achado o MMAB, envolvido na conversão da vitamina B12, pelo que é possível inferir que biologicamente este seja o tetrapirrol afetado pela infecção do *T. cruzi*. Este processo que não seria fundamental durante um processo infecção (KRÄUTLER, 2012) e faz sentido que seja menos expresso nas DCs infectadas. No caso do desenvolvimento de órgãos sensoriais, este termo de GO da categoria processo biológico está definido como o processo cujo resultado específico é a progressão dos órgãos sensoriais ao longo do tempo, desde sua formação até a estrutura madura (GO:0007423). O desenvolvimento de órgãos como olhos, nariz e orelhas não representaria um processo biológico importante durante a resposta a uma infecção, e, portanto, sua sub representação é esperada.

A construção de uma rede de interação proteína-proteína é importante em um estudo como este porque permite identificar conexões físicas entre os produtos dos genes diferencialmente expressos, outorgando uma visão global da arquitetura funcional e organização da célula e facilitando o entendimento desde o ponto de vista biológico do que foi encontrado no transcritoma (VANDERSLUIS et al., 2018). No entanto, mais de 170.000 interações proteína-proteína estão descritas para o humano e a identificação de um padrão de regulação nas funções reveladas por

estas interações é bastante complexo (SALAZAR et al., 2014). Com isto em mente, realizou-se uma análise de correlação, onde os 50 primeiros DEGs foram correlacionados segundo sua similitude em nível de expressão, favorecendo a identificação de padrões de regulação entre determinados genes (Figura 12). Adicionalmente, foi obtida uma rede de PPI com os dados dos DEGs e seus respectivos *Fold change* (Figura 13). Nesta rede, os genes pertencentes à resposta a vírus apresentam evidências robustas de interação, operando como hubs na rede (Figura 13, magenta), indicando a importância dessa via durante o início da infecção pelo *T. cruzi*. Além disso, outras vias enriquecidas na rede PPI também estão intimamente relacionadas à resposta a vírus. Por exemplo, os antígenos virais são geralmente apresentados aos linfócitos T por moléculas de MHC-I após a degradação pela ubiquitina-proteassoma (amarelo) (VAN DE WEIJER; LUTEIJN; WIERTZ, 2015). Da mesma forma, as metalotioneínas (laranja) são relatadas como moduladas durante a infecção viral ou estímulo de citocinas, regulando a liberação de íons de metal do hospedeiro, estado redox, função enzimática e sinalização celular (VIGNESH; DEEPE, 2017). Além disso, a produção de espécies reativas de oxigênio (ciano) e o recrutamento e coestimulação de linfócitos T (verde hortelã e rosa pálido, respectivamente) são conhecidos por serem processos essenciais na infecção viral e por *T. cruzi* (SANT; MCMICHAEL, 2012; BASSO, 2013; MOLTENI; PRINCIPI; ESPOSITO, 2014; KIM; SHIN, 2019).

A RT-qPCR é uma técnica amplamente usada para quantificação da expressão de determinados genes e aceita na validação de transcritomas obtidos mediante RNASeq. Porém, a técnica inclui múltiplos passos que introduzem viés na amostra, como a síntese de cDNA e o impacto do grau de degradação da amostra (NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006; BUSTIN; VANDESOMPELE; PFAFFL, 2009). Isto faz da RT-qPCR uma técnica menos potente mas ainda útil para a validação do transcritoma sempre e quando se tenham em conta certas regras de controle de qualidade, como a eficiência da amplificação de cada par de iniciadores, a escolha da região de amplificação, a escolha de genes de referência, entre outros (BUSTIN et al., 2009). Aqui, os transcritomas dos doadores A, B e C foram validados usando três genes regulados positivamente: CXCL9, TNFSF18 e USP18, todos eles

importantes na resposta imune. CXCL9 (8,1 vezes mais expresso segundo o transcritoma) é uma quimiocina produzida principalmente por monócitos, células epiteliais, fibroblastos e células tumorais, e induzida por IFN- $\gamma$  cuja função principal é atrair linfócitos ao local de infecção (TOKUNAGA et al., 2018). TNFSF18 (5,7 vezes mais expresso segundo o transcritoma) é uma molécula expressa principalmente em células apresentadoras de antígenos que estimula e potencializa a ativação de DCs e linfócitos T e B (CROFT; SIEGEL, 2017). USP18 (8,7 vezes mais expresso segundo o transcritoma) é uma cisteína protease que hidrolisa moléculas de ISG15, regulando negativamente a sinalização por IFN do tipo I e III. Isto acontece porque ISG15 estabiliza e inibe a degradação de algumas moléculas na via do IFN-I (HONKE et al., 2016; VILLARROYA-BELTRI; GUERRA; SÁNCHEZ-MADRID, 2017). Além disso, USP18 também promove a diferenciação de DCs CD11b<sup>+</sup> mediante a inibição da sinalização do IFN-I (CONG et al., 2012). Esses três genes foram, de forma consistente, mais expressos nas amostras infectadas dos seis doadores, validando a análise do transcritoma (Figura 14), e eles se apresentam como genes importantes no contexto de uma infecção inicial onde é necessário que as DCs se diferenciem para apresentar antígenos e recrutar os linfócitos ao lugar da entrada do parasito (LEWIS; REIZIS, 2012).

Os genes GBP4, MX1 e OASL mostraram-se regulados positivamente, enquanto PLCB2 e WNT5B foram regulados negativamente na condição infectada tanto no transcritoma quanto na RT-qPCR de 6 doares (Figura 14), reforçando a validação prévia feita com CXCL9, TNFSF18 e USP18. GBP4 é uma GTPase induzível por IFN- $\gamma$  que contém um domínio CARS C-terminal requerido para a ativação de inflamassoma, de vital importância para o reconhecimento e eliminação de bactérias intracelulares e vírus (KONERMANN et al., 2007; HU et al., 2011; TYRKALSKA et al., 2016). MX1 também é uma GTPase que bloqueia replicação viral, cuja função foi estudada principalmente na infecção do vírus da Influenza (HALLER et al., 2015; PILLAI et al., 2016). OASL é uma proteína induzível por IFN do tipo I conhecida por sua atividade contra vírus de RNA, ao interagir com o sensor RIG-I para a formação do inflamassoma, mas também pela inibição da resposta a vírus de DNA (ZHU et al., 2014; GHOSH et al., 2019). Assim, a formação e ativação



dos inflamassomas relacionados à resposta contra os vírus durante o início da infecção mostra-se importante, e de maneira interessante, parece ser que a resposta se encontra mais dirigida a vírus de RNA do que a vírus de DNA. Do lado dos genes menos expressos nas DCs infectadas, PLCB2 regula negativamente a resposta pró-inflamatória induzida por infecções virais inibindo a ativação de TAK1, proteína central para a ativação das vias NF- $\kappa$ B, JNK e p38 (WANG et al., 2019). Portanto, faz sentido que sua expressão seja menor numa célula que se encontra desenvolvendo uma resposta viral. E do outro lado, WNT5B é um gene classicamente relacionado à progressão de câncer, promovendo a migração de células cancerígenas e sua proliferação (HARADA et al., 2017). No entanto, também foi demonstrada a correlação desse ligande com a diferenciação de células hematopoiéticas ou derivadas de medula óssea, pois aumenta a diferenciação induzida por GM-CSF; assim como com a regulação de citocinas pró-inflamatórias durante uma infecção (GATICA-ANDRADES et al., 2017; DE REZENDE et al., 2020). É possível que as DCs infectadas estejam saindo da sua programação para se diferenciar a partir de monócitos mais rapidamente do que as células controle, e por isso a regulação negativa desse gene.

No que diz respeito à validação em nível de proteína via dosagem de citocinas, IL-8 e TNF apresentaram-se significativamente mais expressas, como era o esperado (Figura 15 e Tabela 5). IL-8 é conhecida por ser um polipeptídeo quimioatrativo de neutrófilos com certa atividade também para linfócitos T e basófilos (HARADA et al., 1994; MUKAIDA; HARADA; MATSUSHIMA, 1998). Os neutrófilos são classicamente conhecidos como a primeira linha de defesa contra patógenos, mas seu curto tempo de vida e sua remoção pelos macrófagos mediante fagocitose favorece efetivamente a própria sobrevivência do *T. cruzi* (MAGALHÃES et al., 2017). Assim, a produção de IL-8 poderia significar uma desvantagem para o indivíduo infectado pelo *T. cruzi*. Contudo, IL-8 também possui a capacidade de atrair linfócitos T tanto direta quanto indiretamente ao induzir a degranulação dos neutrófilos, processo que libera outro quimioatrativo para monócitos e células T (TAUB et al., 1996); pelo que pode-se inferir que esta citocina estaria jogando um duplo papel durante a infecção. Por outro lado, TNF- $\alpha$  é uma citocina conhecida

por ser fundamental no estabelecimento de resposta inflamatória, conferindo imunidade a diferentes infecções, incluindo o *T. cruzi* (GOLDFELD; TSAI, 1996; IDRIS; NAISMITH, 2000; PLANELLES et al., 2003). TNF contribui na resistência às infecções mediante ativação de neutrófilos e plaquetas, o incremento da capacidade de eliminação de patógenos nos macrófagos e o estímulo do sistema imune (FIERS, 1991). Todavia, TNF tem um papel importante na patologia de doenças autoimunes quando os indivíduos apresentam algum tipo de disfunção nas redes autorreguladoras naturais, podendo ser fundamental nas patologias da fase crônica da doença de Chagas quando presente de maneira prolongada e/ou desregulada (FIERS, 1991; BEUTLER; BAZZONI, 1998).

Essas duas citocinas, junto com IL-12 e IL-1 $\beta$  fazem parte do coquetel pró-inflamatório produzido pelas DCs onde uma resposta do tipo Th1 é necessária (BLANCO et al., 2009), como é o caso da eliminação do *T. cruzi* (SILVA et al., 1995, 2013; GUILMOT et al., 2013; ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; DA COSTA et al., 2014). No entanto, IL-12 não foi regulada positivamente no transcritoma nem no sobrenadante da interação. Em contraste, IL-1 $\beta$  e IL-10 o foram, mas não significativamente na quantificação das proteínas no sobrenadante (Tabela 5 e Figura 15). Essa aparente contradição na regulação das citocinas apropriadas para o controle da infecção foi observada por outros autores, onde diferentes cepas do parasito pareciam manipular a resposta das DCs ao seu favor. Por exemplo, as DCs humanas derivadas de monócito apresentam uma produção reduzida de IL-12 e TNF- $\alpha$  após 24 h de infecção com a cepa Tehuantepec (VAN OVERTVELT et al., 1999). Usando BM-DCs murinas, foi visto que estas produzem menos IL-12 e começam a produzir mais IL-10 a partir das 24 h de infecção com a cepa RA (PONCINI et al., 2008). Ademais, foi visto que as DCs derivadas de monócito induzidas *in vivo* pela infecção intradérmica da mesma cepa, no modelo murino, são produtoras tanto de TNF quanto de IL-10, o que pode estar relacionado com uma ativação linfocitária ineficiente (PONCINI; GONZÁLEZ-CAPPA, 2017). Em relação à IL-1 $\beta$  e IL-10, foi observado que CARD16, uma proteína inibidora da caspase-1, foi regulada positivamente no transcritoma, o que explicaria a regulação em nível de transcrito da IL-1 $\beta$ , mas ausência do produto ativo no sobrenadante (DRUILHE

et al., 2001; LEE; STEHLIK; REED, 2001). O transcrito de IL-10, por outro lado, contem múltiplos motivos de desestabilização e sua estrutura é sensível inclusive à IL-10 (BROWN et al., 1996; KISHORE et al., 1999; POWELL et al., 2000).

Em adição, é possível que 12 h não sejam suficientes para o estabelecimento de um perfil de citocinas detectável, alterando-se ao longo do tempo até atingir o padrão relatado por outros autores que realizaram os ensaios após 24 h de interação entre as células (VAN OVERTVELT et al., 1999; PONCINI et al., 2008; PONCINI; GONZÁLEZ-CAPPA, 2017); inclusive mostrar o perfil pró-inflamatório requerido para a eliminação do parasito. Também é possível que IL-10 e IL-1 $\beta$  não tenham sido reguladas positivamente em nível de proteína pelo curto tempo de incubação ou simplesmente por regulação pós-transcricional, dado que as citocinas apresentam uma forte regulação desse tipo (MINO; TAKEUCHI, 2018). Além disso, IL-10 e IL-1 $\beta$  apresentaram um valor de  $p$  maior no transcritoma, o que representa maior variabilidade, e, portanto, maior dificuldade de identificar diferença significativa por método menos sensível. Cabe ressaltar que não foi vista correlação entre a porcentagem de infecção de cada réplica e sua respectiva produção de citocinas, pelo que a variação observada provavelmente é devida a fatores que afetaram os doadores nos diferentes tempos de coleta do sangue.

Em nível de proteínas também foram preparadas amostras de boa qualidade para a realização de um proteoma diferencial entre as DCs controle e as infectadas. Este proteoma validará o visto no transcritoma, tendo ademais, o potencial de conhecer qual das isoformas de cada gene está tendo maior importância na interação DCs-*T. cruzi* ou inclusive analisar algumas modificações pós-traducionais, dando maior profundidade a este estudo. Por exemplo, proteomas em *T. cruzi* contemplaram modificações do tipo oxidação de metionina, fosforilação e acetilação N-terminal, identificando novas proteínas e modificações não relatadas anteriormente (ATWOOD III et al., 2005; QUEIROZ et al., 2014). Igualmente, existem múltiplos trabalhos onde proteomas complementam transcritomas feitos previamente. Um estudo em DCs derivadas de monócito de sangue periférico demonstrou que embora a correlação geral entre níveis de expressão de transcritos e proteínas não é muito alta, vias específicas de grande importância sob

determinado estímulo apresentam correlação significativa (BUSCHOW et al., 2010). No caso do presente trabalho, o fato de achar a via de resposta a vírus significativamente enriquecida, validaria nossa hipótese. De igual maneira, Worah e colaboradores integraram os dados de transcritomas e proteomas de diferentes subtipos de DCs no sangue humano, conseguindo identificar padrões característicos de cada subtipo e inclusive, vias que determinado grupo de DCs estava predisposto a ativar com maior ou menor dificuldade ou até estar impossibilitado de expressar (WORAH et al., 2016).

Sabe-se que as cepas de *T. cruzi* podem modular diferencialmente o sistema imune do hospedeiro e há múltiplos trabalhos descrevendo como diferentes linhagens estimulam determinado padrão de citocinas, conseguem infectar camundongo enquanto outras não. Influenciam também a diferença entre o inóculo requerido para a dose letal em determinada linhagem murina, sendo estes fatores relacionados diretamente com a virulência da cepa (ALBA SOTO et al., 2003; BARTHOLOMEU et al., 2008; TERRAZAS et al., 2011; BORGES et al., 2012; GRAVINA et al., 2013). Portanto, além do fator “resposta imune do hospedeiro” é importante ter em conta a virulência da cepa infectante para entender melhor a biologia da interação patógeno-hospedeiro. É possível que o padrão de expressão estimulado por cepas com níveis de infectividade diferentes não seja igual ao presente, e que algumas cepas do *T. cruzi* estimulem ou inibam a ativação da via de resposta a vírus nas DCs para que elas consigam ou não ativar os linfócitos T, protegendo ao hospedeiro ou facilitando o estabelecimento da infecção. Um transcritoma comparativo entre a infecção da cepa Sylvio (DTU I) e a infecção da cepa Y (DTU II), detectou diferença de expressão nos fibroblastos humanos hospedeiros, principalmente após 4 e 72 h e não após 24 h de infecção; sugerindo que a cepa Sylvio é mais silenciosa no começo e que somente após 72 h induz maior produção de algumas citocinas que poderiam ser chave na diferença do quadro clínico geral dos indivíduos infectados pelas duas cepas (HOUSTON-LUDLAM; BELEW; EL-SAYED, 2016). Portanto, novos experimentos deverão ser feitos para comprovar a modulação diferencial da via de resposta a vírus nas DCs segundo a cepa usada.

Observando o conjunto da expressão gênica das DCs infectadas, é possível pensar no desenvolvimento de uma resposta tolerogênica. Isto devido a uma expressão aumentada de FAS (1,6x mais expresso), IL-10 (2x mais expresso), TRAIL (4,6x mais expresso) e ao fato de não ter aumento na expressão de IL-12, moléculas coestimulatórias nem dos complexos de histocompatibilidade (ZHANG et al., 2014). No entanto, a expressão de HLA-DR, CD80 e CD68 das DCs sempre foi elevada, com uma média de 80% de células com expressão positiva, tanto nas DCs controle quanto nas infectadas (GIL-JARAMILLO, 2016). De igual forma, não foi visto incremento na expressão de PD-L1 nem de CTLA-4, moléculas conhecidas pela estimulação negativa dos linfócitos T e classicamente relacionadas com a DCs tolerogênicas (WEI; LETTERIO; PAREEK, 2018). Assim, é necessário confirmar se realmente a interação com as formas TMs da cepa CL Brener estimula tolerância nas DCs e que, portanto, a ativação da resposta a vírus talvez represente uma vantagem para o parasito.

Outro ponto de estudo na interação é a capacidade das DCs para apresentar antígenos e estimular a ativação dos linfócitos T. Como foi falado anteriormente, cepas de *T. cruzi* que tem sucesso durante a infecção tem demonstrado evitar a ativação dos linfócitos T mediante a manipulação das DCs (GIL-JARAMILLO et al., 2016), fazendo necessário analisar se o padrão de expressão obtido no transcritoma se traduz em ativação ou não. Futuros trabalhos deverão implementar um modelo adequado para verificação desse assunto.

Imunidade treinada é uma reprogramação metabólica e epigenética a longo prazo da imunidade inata, causada pelo contato com um antígeno que ativa uma resposta secundária a determinado patógeno (DOMINGUEZ-ANDRES; NETEA, 2018). Os mecanismos de reprogramação ainda são objeto de estudo, sendo o mais caracterizado a trimetilação K4 das histonas H3 (H3K4me3), típica da imunidade treinada produzida pelo  $\beta$ -glucano ou pela vacina de BCG, que deixa determinado padrão gênico mais exposto à transcrição para uma resposta mais rápida em caso de um segundo estímulo (KLEINNIJENHUIS et al., 2012; QUINTIN et al., 2012). Esse treinamento pode ser em nível celular, expondo grupos de células a padrões moleculares associados a patógenos, ou sistêmico onde os progenitores de medula

óssea seriam estimulados a produzir células mieloides treinadas por um período prolongado (MULDER et al., 2019). Cabe ressaltar que o doador C foi quem obteve a taxa de infecção mais baixa dentro dos três doadores do transcritoma, com média de 21,7%, o que pode significar uma baixa capacidade de fagocitose das DCs deste doador, baixa susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* ou rápida eliminação do parasito pelas células desse indivíduo. De maneira interessante, o doador C foi quem mostrou maior número de imunizações virais, sendo também o único vacinado contra raiva (Tabela 3). Anteriormente, foi demonstrado que a vacina da raiva pode desencadear uma proteção inespecífica do sistema nervoso central contra infecções (GESSNER et al., 2017), o que poderia explicar a resposta do indivíduo ante a infecção pelo *T. cruzi*, reforçando as expectativas da ideia da imunidade treinada.

Neste caso, é proposto um desafio com cepas de vírus não patogênicas ou inativadas, principalmente aqueles vírus cujas vias foram enriquecidas e que já tem vacinas desenvolvidas (como influenza A e sarampo), para avaliar a possível indução de uma resposta protetiva contra o *T. cruzi*. Esta proposta apresenta-se atraente por conta das vias de sinalização ativadas por vírus serem enriquecidas pela infecção nas DCs, e encontra-se levemente apoiada também pelo fato do doador C ser aquele com menor infecção e maior número de imunizações virais. Múltiplas tentativas de vacinas específicas contra *T. cruzi* tem mostrado relativa eficiência, e nenhuma ainda foi testada em humanos pela possibilidade de causar reações adversas em troca de não tão bons resultados na eliminação do parasito (RIOS et al., 2019). A utilização de vacinas já aprovadas para uso humano simplificaria alguns passos para o desenvolvimento de um tratamento para a doença de Chagas, e economizaria muito dinheiro aos países afetados, dando melhor qualidade de vida para centenas de milhares de pessoas. Adicionalmente, seria uma estratégia simples de implementar em caso de surtos, como os vistos nos últimos anos no Brasil, por exemplo na Bahia, Pernambuco e no DF, onde foram achados triatomíneos infectados, e pessoas e animais foram afetados (ARAÚJO et al., 2014; G1 DF, 2016; METRÓPOLES, 2016; JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2018; GÓES, 2019). No entanto, dado o curto tempo de vida das células do sistema imune

inato, uma desvantagem esperada dessa estratégia seria o provável breve tempo de proteção. Porém, existem estudos de treinamentos com BCG que comprovam uma proteção cruzada entre um e 12 meses (KLEINNIJENHUIS et al., 2012; GUERRA-MAUPOME; VANG; MCGILL, 2019; WALK et al., 2019), tempo necessário para o controle de um surto, e curto o suficiente para não afetar permanentemente a resposta imune dos indivíduos.

Seguindo com a proposta da imunidade treinada, alguns experimentos foram feitos nos Estados Unidos, na Instituição Cedars-Sinai Medical Center, sob a orientação do Dr. David M. Engman. O objetivo era tentar obter uma resposta similar nas DCs murinas mediante o estímulo com vacinas virais, e ver se esse estímulo prévio conseguia treinar as DCs para apresentar antígenos de maneira eficiente, ou se pelo contrário, um estímulo viral anterior à infecção pelo *T. cruzi* poderia piorar a resposta imune contra o parasito. Uma primeira tentativa com Poli I:C para simular uma infecção viral, demonstrou que as DCs murinas apresentam uma resposta diferencial ao *T. cruzi* quando treinadas (Figura 20 e Figura 21). Resultados mais significativos e promissórios foram obtidos com o treinamento feito durante 8 h, e 4 h prévias à infecção, onde foi visto que o tratamento com Poli I:C reduz a expressão de moléculas coestimulatórias antes da infecção (Figura 18) e, após 12 h de infecção, embora a expressão de MHC-II incremente em comparação às amostras não infectadas, a molécula coestimulatória CD86 é menos expressa (Figura 20). Em contraste, o treinamento durante 24 h não mostrou diferença nas moléculas coestimulatórias (Figura 19). Assim, estes resultados parciais parecem significar que um estímulo viral provavelmente diminuiria ainda mais a eficiência das DCs para responder à infecção pelo parasito, impedindo a ativação dos linfócitos T. No entanto, algumas questões surgem ante estes resultados: os resultados *in vivo* teriam sido iguais? São esses resultados extrapoláveis ao modelo humano? O que aconteceria na ativação linfocitária quando as DCs fossem expostas a cepas mais ou menos infectivas?

A simulação de uma resposta a vírus mediante Poli I:C é amplamente usada (GREEN; MONTAGNANI, 2013; WU et al., 2019), mas não sendo uma infecção propriamente dita, ela poderia não estar modulando os genes da forma requerida e



talvez essa seja uma das razões pelas que os resultados obtidos não sejam os esperados. É possível também que os tempos e concentrações usadas não tenham sido os ideais e que melhores resultados possam ser obtidos variando estes parâmetros. No presente trabalho, os tempos de incubação e a concentração do Poli I:C foram escolhidos segundo trabalhos com resultados promissores em DCs, mas existem múltiplas combinações com efeitos positivos que poderiam ser testadas (REIMER et al., 2008; JONES et al., 2010; TORRI et al., 2010; MALIK et al., 2015; ZHOU et al., 2015).

Mesmo que os resultados da primeira tentativa com a imunidade treinada não tenham sido os esperados, este trabalho reúne múltiplas provas de que a via de resposta a vírus é fundamental no início da infecção pelo *T. cruzi*. Os termos e as vias enriquecidas do GO e o KEEG, a correlação dos primeiros 50 genes mais expressos, a rede de proteínas obtida a partir dos mesmos que mostra hubs importantes na resposta a vírus, assim como a expressão aumentada dos inflamassomas virais reforçam essa hipótese e demonstram o potencial a explorar nessa via para achar novos conhecimentos sobre a patogenia e possíveis alvos de tratamento na doença de Chagas.





## 7. CONCLUSÃO

Estando o conhecimento atual da interação DCs-*T. cruzi* limitado praticamente ao modelo murino, este trabalho apresenta um enfoque totalmente diferente ante a resposta imune inata inicial durante a infecção por esse parasito no humano. Ao analisar e validar o transcritoma produzido, foi desvendada a via resposta a vírus, pouco explorada até então na doença de Chagas, como fundamental na interação. Adicionalmente, foi demonstrado que esta via é consistentemente modulada em outros doadores, incrementando a produção de TNF e IL-8. Embora a proposta de um treinamento da imunidade inata para induzir uma ativação rápida dos genes da via de resposta a vírus tenha sido pouco explorada, ela se apresenta ainda como promissora, pois existem múltiplas variáveis a testar e será necessário também demonstrar a duração do efeito protetor ou deletério obtido. Por último, este trabalho se apresenta como o primeiro do tipo investigando o primeiro contato do *T. cruzi* com uma célula do sistema imune inato e os resultados obtidos aqui, incluindo DEGs e vias enriquecidas serão geradores de novas pesquisas relacionadas à doença de Chagas.

## 8. PERSPECTIVAS

Referente a este trabalho, as perspectivas principais são:

- Imunidade adaptativa: validação da ativação ou anergia de linfócitos T mediante apresentação de antígenos por DCs que apresentem o padrão de expressão observado no transcritoma.
- Imunidade treinada:
  - Estudar diferentes parâmetros de incubação com Poli I:C para verificar se induziria um efeito protetor ou danoso;
  - Testar vacinas de vírus atenuados e estudar se existe um efeito protetor ou deletério;
  - Testar *in vivo* com as mesmas vacinas;
  - Estudar a duração dos efeitos.
- Estudo aprofundado nas vias enriquecidas, validando-as completamente mediante deleção ou sobre-expressão de genes, entre outras abordagens.
- Realização do proteoma diferencial da interação DC-*T. cruzi* cujas amostras foram preparadas no presente trabalho.

## 9. REFERÊNCIAS

ACEVEDO, G. R.; GIRARD, M. C.; GÓMEZ, K. A. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. **Frontiers in immunology** NLM (Medline), 2018.

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. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=148822&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

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. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X10012958>>.

ALSHARIFI, M.; MÜLLBACHER, A.; REGNER, M. Interferon type I responses in primary and secondary infections. **Immunology and Cell Biology**, v. 86, n. 3, p. 239–245, 2008.

ALVAREZ, J. M. et al. Chagas Disease: Still Many Unsolved Issues. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p. 912965, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4101227&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

AMORIM, J. C. et al. Quantitative proteome and phosphoproteome analyses highlight the adherent population during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2017. Disponível em: <[www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports)>. Acesso em: 25 jan. 2021.

ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq – A Python framework to work with high-throughput sequencing data HTSeq – A Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics.**, v. 31, n. 2, p. 0–5, 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. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003010>>.

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.

ARAÚJO, R. F. et al. Description of a newly discovered *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) foci in Ibipeba, State of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 4, p. 513–516, 2014.

ATWOOD III, J. A. et al. The *Trypanosoma cruzi* Proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473–476, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1110289>>.

BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 18, n. 1, p. 767–811, 2000. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>>.

BARBOSA, C. G. et al. *Trypanosoma cruzi* mexican strains differentially modulate surface markers and cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells from C57BL/6 and BALB/c Mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, p. 7214798, 2019.

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. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=18606688&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/37166399-D5D1-4D61-9ADF-04678C06A2A1>>.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2013. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/2220-315X/full/v3/i1/%5Cn.htm>>.

BATALLA, E. I. et al. Impairment in natural killer cells editing of immature dendritic cells by infection with a virulent *Trypanosoma cruzi* population. **Journal of Innate Immunity**, v. 5, p. 494–504, 2013.

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. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3652755&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BEISSBARTH, T.; SPEED, T. P. GOstat: Find statistically overrepresented Gene Ontologies with a group of genes. **Bioinformatics**, v. 20, n. 9, p. 1464–1465, 2004.

BERN, C. Chagas' Disease. **The New England journal of medicine**, v. 373, n. 19, 2015.

BEUTLER, B.; BAZZONI, F. TNF, apoptosis and autoimmunity: a common thread? **Blood cells, molecules & diseases**, v. 24, n. 2, p. 216–30, jun. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9645922>>. Acesso em: 12 mar. 2020.

BLANCO, P. et al. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 19, n. 1, p. 41–52, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2413068/>>.

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.

BORGES, D. C. et al. Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 138, p. 145–156, 2012.

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.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina tropica de São Paulo**, v. 5, n. 5, p. 220–224, 1963.

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.

BROWN, C. Y. et al. Differential regulation of the stability of cytokine mRNAs in lipopolysaccharide-activated blood monocytes in response to interleukin-10. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 33, p. 20108–20112, 16 ago. 1996. Disponível em: <<http://www.jbc.org/>>. Acesso em: 26 ago. 2020.

BRYANT, D. A.; HUNTER, C. N.; WARREN, M. J. **Biosynthesis of the modified tetrapyrroles—the pigments of life. Journal of Biological Chemistry.** American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 15 maio 2020. Disponível em: <<http://www.jbc.org/article/S0021925817481956/fulltext>>. Acesso em: 8 maio. 2021.

BUSCHOW, S. I. et al. Dominant processes during human dendritic cell maturation revealed by integration of proteome and transcriptome at the pathway level. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 4, p. 1727–1737, 2010.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, 2009. Disponível em: <<http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2008.112797%0AClinical>>.

BUSTIN, S. A.; VANDESOMPELE, J.; PFAFFL, M. W. Standardization of qPCR and RT-qPCR. **Genetic Engineering & Biotechnology News**, v. 29, n. 14, 2009. Disponível em: <<http://www.genengnews.com/gen-articles/pcr-technology-review-standardization-of-qpcr-and-rt-qpcr/2992>>.

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. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2903469&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CARDILLO, F. et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: Role of NK cells. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 1, p. 128–134, 1996.



CARDOSO, M. S. et al. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. January, p. 1–15, 2016.

CARREIRA, J. C. et al. Structural variation in the glycoinositolphospholipids of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Glycoconjugate Journal**, v. 13, n. 6, p. 955–966, 1996. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01053191>>. Acesso em: 8 maio. 2021.

CAVALCANTI, D. P.; DE SOUZA, W. The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. **Scanning**, v. 2018, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2018/9603051>>.

CAVALIER-SMITH, T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification on protozoa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Society for General Microbiology, 2002.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze 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.

CHEN, I. Y.; ICHINOHE, T. Response of host inflammasomes to viral infection. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 55–63, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.007>>.

CHESSLER, A.-D. C. et al. A Novel IFN Regulatory Factor 3-Dependent Pathway Activated by Trypanosomes Triggers IFN- in Macrophages and Fibroblasts. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 11, p. 7917–7924, 2008. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/181/11/7917>>.

CHESSLER, A.-D. C. et al. *Trypanosoma cruzi* Triggers an Early Type I IFN Response In Vivo at the Site of Intradermal Infection . **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 4, p. 2288–2296, 15 fev. 2009.

COLLIN, M.; MCGOVERN, N.; HANIFFA, M. Human dendritic cell subsets. **Immunology**, v. 140, n. 1, p. 22–30, 2013.

CONG, X.-L. et al. Usp18 promotes conventional CD11b+ dendritic cell development. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 10, p. 4776–4781, 2012.

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.

CONTRERAS, V. T. et al. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1988.

COSTA, V. M. A. et al. Type I IFNs Stimulate Nitric Oxide Production and Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 5, p. 3193–3200, 2006. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.177.5.3193>>.

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, dez. 2007.

CROFT, M.; SIEGEL, R. M. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 4, p. 217–233, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2017.22>>.

D'ERCHIA, A. M. et al. Massive transcriptome sequencing of human spinal cord tissues provides new insights into motor neuron degeneration in ALS. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–20, 2017.

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. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jir/2014/962047/>>.

DE ALBUQUERQUE, J. B. et al. Oral versus intragastric inoculation: Similar Pathways of *Trypanosoma cruzi* experimental infection? From Target Tissues, Parasite evasion, and immune Response. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. July, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01734>>.

DE BONA, E. et al. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. August, p. 1–8, 2018. Disponível em:



<<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01842/full>>.

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

DE OLIVEIRA, R. B. et al. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 93, n. 6, p. 884–889, 1998.

DE REZENDE, M. M. et al. Divergent effects of Wnt5b on IL-3- and GM-CSF-induced myeloid differentiation. **Cellular Signalling**, v. 67, p. 109507, 1 mar. 2020.

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. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijcb/2010/295394/>>.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25455596>>.

DEY, N. et al. Caspase-1/ASC Inflammasome-Mediated Activation of IL-1 $\beta$ –ROS–NF- $\kappa$ B Pathway for Control of *Trypanosoma cruzi* Replication and Survival Is Dispensable in NLRP3–/– Macrophages. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e111539, 5 nov. 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0111539>>. Acesso em: 7 abr. 2020.

DOMINGUEZ-ANDRES, J.; NETEA, M. G. Long-term reprogramming of the innate immune system. **Journal of Leukocyte Biology**, n. June, p. 1–10, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/JLB.MR0318-104R>>.

DORTA, M. L. et al. Ca<sup>2+</sup> signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 73, n. 1–2, p. 285–289, 1995.

DOS SANTOS, M. A. et al. Human B cells infected by *Trypanosoma cruzi* undergo F-actin disruption and cell death via caspase-7 activation and cleavage of phospholipase C $\gamma$ 1. **Immunobiology**, 2020.

DRUILHE, A. et al. Regulation of IL-1 $\beta$  generation by Pseudo-ICE and ICEBERG, two dominant negative caspase recruitment domain proteins. **Cell Death**

**and Differentiation**, v. 8, n. 6, p. 649–657, 10 jul. 2001. Disponível em: <[www.nature.com/cdd](http://www.nature.com/cdd)>. Acesso em: 1 ago. 2020.

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

EISENBARTH, S. C. et al. NLRP10 is a NOD-like receptor essential to initiate adaptive immunity by dendritic cells. **Nature**, v. 484, n. 7395, p. 510–513, 2012.

EL-SAYED, N. M. et al. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404–409, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1112181>>.

ERSCHING, J. et al. A Human Trypanosome Suppresses CD8+ T Cell Priming by Dendritic Cells through the Induction of Immune Regulatory CD4+ Foxp3+ T Cells. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 6, p. e1005698, 22 jun. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005698>>. Acesso em: 29 jan. 2020.

FERNANDES, M. C. et al. Dual Transcriptome Profiling of *Leishmania*-infected human macrophages reveals distinct reprogramming signatures. **mBio**, v. 7, n. 3, p. 1–16, 2016.

FIERS, W. Tumor necrosis factor Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. **FEBS Letters**, 1991.

G1 DF. Estudo acha transmissor da doença de Chagas em área urbana no DF. **TV Globo**, 2016. Disponível em: <<http://g1.globo.com/distrito-federal/noticia/2016/06/estudo-acha-transmissor-da-doenca-de-chagas-em-area-urbana-no-df.html>>.

GATICA-ANDRADES, M. et al. WNT ligands contribute to the immune response during septic shock and amplify endotoxemia-driven inflammation in mice. **Blood Advances**, v. 1, n. 16, p. 1274–1286, 11 jul. 2017.

GAZZINELLI, R. T. et al. The microbicidal activity of interferon- $\gamma$ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ . **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 10, p. 2501–2506, 1 out. 1992. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.1830221006>>. Acesso em: 8

maio. 2021.

GESSNER, B. D. et al. Could the RTS,S/AS01 meningitis safety signal really be a protective effect of rabies vaccine? **Vaccine**, v. 35, n. 5, p. 716–721, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.12.067>>.

GHOSH, A. et al. Oligoadenylate-Synthetase-Family Protein OASL Inhibits Activity of the DNA Sensor cGAS during DNA Virus Infection to Limit Interferon Production. **Immunity**, v. 50, n. 1, p. 51- 63.e5, 15 jan. 2019.

GIL-JARAMILLO, N. et al. Dendritic cells: A double-edged sword in immune responses during chagas disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUL, 2016.

GIL-JARAMILLO, N. **ANÁLISE PRELIMINAR DO TRANSCRIPTOMA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS APÓS INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi***. 2016. Universidade de Brasília, 2016.

GÓES, C. Chega a 40 número de pessoas em tratamento por causa de surto de doença de Chagas. **TV Globo**, 2019. Disponível em: <<https://g1.globo.com/pe/peernambuco/noticia/2019/06/28/chega-a-40-numero-de-pessoas-em-tratamento-por-cao-de-surto-de-doenca-de-chagas.ghtml>>.

GOLDFELD, A. E.; TSAI, E. Y. TNF- $\alpha$  and genetic susceptibility to parasitic disease. **Experimental Parasitology**, v. 84, n. 2, p. 300–303, 1 nov. 1996.

GONÇALVES, V. M. et al. NLRP3 Controls *Trypanosoma cruzi* Infection through a Caspase-1-Dependent IL-1R-Independent NO Production. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. e2469, 3 out. 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002469>>. Acesso em: 7 abr. 2020.

GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Experimental Parasitology**, 1988.

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.

GREEN, T. J.; MONTAGNANI, C. Poly I: C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1  $\mu$ var). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 2, p. 382–388, 1 ago. 2013.

GUERRA-MAUPOME, M.; VANG, D. X.; MCGILL, J. L. Aerosol vaccination with Bacille Calmette-Guerin induces a trained innate immune phenotype in calves. **PLOS ONE**, v. 14, n. 2, p. e0212751, 22 fev. 2019. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0212751>>. Acesso em: 24 abr. 2020.

GUILMOT, A. et al. Monocytes Play an IL-12-Dependent Crucial Role in Driving Cord Blood NK Cells to Produce IFN- $\gamma$  in Response to *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. e2291, 20 jun. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002291>>. Acesso em: 27 mar. 2020.

HAJI ABDOLVAHAB, M.; MOFRAD, M. R. K.; SCHELLEKENS, H. **Interferon Beta: From Molecular Level to Therapeutic Effects**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 326

HALLER, O. et al. Mx GTPases: Dynamin-like antiviral machines of innate immunity. **Trends in Microbiology**. Elsevier Ltd, 1 mar. 2015.

HARADA, A. et al. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 56, n. 5, p. 559–564, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jlb.56.5.559>>.

HARADA, T. et al. Wnt5b-associated exosomes promote cancer cell migration and proliferation. **Cancer Science**, v. 108, n. 1, p. 42–52, 1 jan. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cas.13109>>. Acesso em: 18 abr. 2020.

HILLIGAN, K. L.; RONCHESE, F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4<sup>+</sup> T helper cell responses. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 17, n. 6, p. 587–599, 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41423-020-0465-0>>. Acesso em: 5 abr. 2021.

HONKE, N. et al. Multiple functions of USP18. **Cell death & disease**, v. 7, n. 11, p. e2444, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2016.326>>.

HOUSTON-LUDLAM, G. A.; BELEW, A. T.; EL-SAYED, N. M. Comparative transcriptome profiling of human foreskin fibroblasts infected with the Sylvio and y strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–15, 2016.

HU, Y. et al. Guanylate Binding Protein 4 Negatively Regulates Virus-Induced Type I IFN and Antiviral Response by Targeting IFN Regulatory Factor 7. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 12, p. 6456–6462, 15 dez. 2011.

HYLAND, K. V et al. Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection. **International journal for parasitology**, v. 38, n. 12, p. 1391–1400, 2008.

Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0020751908001458?via%3Dihub>>.

IDRISS, H. T.; NAISMITH, J. H. TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). **Microscopy Research and Technique**, v. 50, n. 3, p. 184–195, 1 ago. 2000.

IMAI, K. et al. Chronic Chagas disease with advanced cardiac complications in Japan: Case report and literature review. **Parasitology International**, v. 64, n. 5, p. 240–242, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2015.02.005>>.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. D. C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–25, 2018.

JONES, L. A. et al. Differential Modulation of TLR3- and TLR4-Mediated Dendritic Cell Maturation and Function by Progesterone. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 8, p. 4525–4534, 15 out. 2010.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25486993>>.

KELLY, M.; HWANG, J. M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 1, p. 3–10, 2007.

KIAMA, S. G. et al. Evaluation of phagocytic activity in human monocyte-derived dendritic cells. **Journal of Aerosol Medicine**, v. 14, n. 3, p. 289–299, 2001.

KIM, D.; LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. **Nature Methods**, v. 12, n. 4, p. 357–360, 2015.

KIM, T.-S.; SHIN, E.-C. The activation of bystander CD8 + T cells and their roles in viral infection. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 51, n. 12, p. 154, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s12276-019-0316-1>>. Acesso em: 26

ago. 2020.

KISHORE, R. et al. Cutting Edge: Clustered AU-Rich Elements Are the Target of IL-10-Mediated mRNA Destabilization in Mouse Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 5, p. 2457–2461, 1999. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/162/5/2457>>. Acesso em: 26 ago. 2020.

KLEINNIJENHUIS, J. et al. Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 43, p. 17537–17542, 23 out. 2012.

KOGA, R. et al. TLR-Dependent Induction of IFN- $\beta$  Mediates Host Defense against *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 7059–7066, 2006. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/177/10/7059>>.

KONERMANN, C. et al. *In silico* and *in vitro* characterization of mGBP4 splice variants. **DNA and Cell Biology**, v. 26, n. 12, p. 847–851, 1 dez. 2007.

KRÄUTLER, B. Biochemistry of B12-cofactors in human metabolism. In: **Sub-Cellular Biochemistry**. [s.l.] Springer New York, 2012. 56p. 323–346.

KRISHNASWAMY, J. K.; CHU, T.; EISENBARTH, S. C. Beyond pattern recognition: NOD-like receptors in dendritic cells. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 5, p. 224–233, 2013.

LEE, S. H.; STEHLIK, C.; REED, J. C. COP, a Caspase Recruitment Domain-containing Protein and Inhibitor of Caspase-1 Activation Processing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 37, p. 34495–34500, 14 set. 2001. Disponível em: <<http://www.jbc.org/>>. Acesso em: 1 ago. 2020.

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. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3405856&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

LEWIS, M. D. et al. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. **International Journal**

for **Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1305–1317, out. 2009.

LEWIS, M. D. et al. A new experimental model for assessing drug efficacy against *Trypanosoma cruzi* infection based on highly sensitive *in vivo* imaging. **Journal of biomolecular screening**, v. 20, n. 1, p. 36–43, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25296657>>. Acesso em: 28 jan. 2020.

LEWIS, M. D. et al. Imaging the development of chronic Chagas disease after oral transmission. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018. Disponível em: <<http://pmc/articles/PMC6062536/>>. Acesso em: 2 mar. 2021.

LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 2009.

LI, J. et al. Caspase-11 regulates cell migration by promoting Aip1-Cofilin-mediated actin depolymerization. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 276–286, 2007.

LI, Y. et al. Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005511, 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005511>>.

LOVE, M. I.; ANDERS, S.; HUBER, W. **Differential analysis of count data - the DESeq2 package**. [s.l: s.n.]v. 15

LUFT, T. et al. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 4, p. 1947–53, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712065>>.

LUO, W.; BROUWER, C. Pathview: An R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. **Bioinformatics**, v. 29, n. 14, p. 1830–1831, 2013.

LUTZ, M. B. et al. GM-CSF monocyte-derived cells and Langerhans cells as part of the dendritic cell family. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. OCT, p. 1–11, 2017.

MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis os Chagas disease. **Semin Immunopathol.**, v. 34, n. 6, p. 753–770, 2013.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual review of immunology**, v. 15, n. 1, p. 323–50, 1997. Disponível

em:

<[http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.immunol.15.1.323?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub=pubmed](http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.immunol.15.1.323?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed)>.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. e0003816, 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003816>>.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. Distinct *Trypanosoma cruzi* isolates induce activation and apoptosis of human neutrophils. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–17, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188083>>.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. Chagas Heart Disease: An Update. **The American journal of medicine**, v. 128, n. 11, p. 1251.e7-1251.e9, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26052027>>.

MALIK, N. et al. Suppression of interferon  $\beta$  gene transcription by inhibitors of bromodomain and extra-terminal (BET) family members. **Biochemical Journal**, v. 468, n. 3, p. 363–372, 15 jun. 2015.

MARTIN, D. L.; MURALI-KRISHNA, K.; TARLETON, R. L. Generation of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8+T-cell immunity is unaffected by the absence of type I interferon signaling. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 7, p. 3154–3159, 2010.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 229–265, 20 abr. 2009.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **The Journal of parasitology**, v. 64, n. 3, p. 475–482, 1978.

MENDES, M. T. et al. Effect of the saliva from different triatomine species on the biology and immunity of TLR-4 ligand and *Trypanosoma cruzi*-stimulated dendritic cells. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 634, 9 dez. 2016.

METRÓPOLES. Barbeiros contaminados com doença de Chagas são encontrados no DF. **Saúde-DF**, 2016. Disponível em: <<https://www.metropoles.com/distrito-federal/saude-df/barbeiros-contaminados-com-doenca-de-chagas-sao-encontrados-no-df?amp>>.

MINO, T.; TAKEUCHI, O. Post-transcriptional regulation of immune



responses by RNA binding proteins. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 94, n. 6, p. 248–258, 11 jun. 2018. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/pjab/94/6/94\\_PJA9406B-02/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/pjab/94/6/94_PJA9406B-02/_article)>. Acesso em: 31 mar. 2020.

MINOPRIO, P. et al. Immunobiology of Murine *T. Cruzi* Infection: The Predominance of Parasite-nonspecific Responses and the Activation of TCRIT Cells. **Immunological Reviews**, v. 112, n. 1, p. 183–207, dez. 1989. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.1989.tb00558.x>>. Acesso em: 27 jan. 2020.

MOLTENI, C. G.; PRINCIPI, N.; ESPOSITO, S. Reactive oxygen and nitrogen species during viral infections. **Free Radical Research**, v. 48, n. 10, p. 1163–1169, 11 out. 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10715762.2014.945443>>. Acesso em: 26 ago. 2020.

MONTEON, V. *Trypanosoma cruzi*: the early contact between insect-derived metacyclic trypomastigotes and the mammalian cells. **Annals of parasitology**, v. 65, n. 3, p. 193–204, 2019.

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1507574>>.

MOSCA, W.; BRICEÑO, L. Proliferation and bystander suppression induced by membrane and flagellar antigens of *Trypanosoma cruzi*. **Investigación Clínica**, v. 50, n. 1, p. 77–87, 2009. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=372937675009>>.

MOTTA, V. et al. NOD-Like Receptors: Versatile Cytosolic Sentinels. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 1, p. 149–178, 2015. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00009.2014>>.

MUKAIDA, N.; HARADA, A.; MATSUSHIMA, K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 9, n. 1, p. 9–23, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/S1359->



6101(97)00022-1>.

MULDER, W. J. M. et al. Therapeutic targeting of trained immunity. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. July, p. 553–566, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41573-019-0025-4>>.

NEIRA, I. et al. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 557–561, 1 jan. 2003.

NGUYEN, K. B. et al. Interferon  $\alpha/\beta$ -mediated inhibition and promotion of interferon  $\gamma$ : STAT1 resolves a paradox. **Nature Immunology**, v. 1, n. 1, p. 70–76, 2000. Disponível em: <[https://www.nature.com/articles/ni0700\\_70](https://www.nature.com/articles/ni0700_70)>.

NOGUEIRA, P. M. et al. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, p. 28734, 26 jan. 2015. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v4.28734>>. Acesso em: 29 jan. 2020.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1559–1582, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nprot.2006.236>>.

OGUN, A. S.; VALENTINE, M. **Biochemistry, Heme Synthesis**. [s.l.]: StatPearls Publishing, 2018.

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. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=79673&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

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. Disponível em: <<http://http://www.jimmunol.org/content/168/12/6366>>.

PAHO. **Chagas in the Americas for Public Health Workers**. [s.l.: s.n.].

Disponível em: <<https://www.paho.org/en/documents/chagas-americas-public-health-workers-2017>>.

PAROLI, A. F. et al. NLRP3 inflammasome and caspase-1/11 pathway orchestrate different outcomes in the host protection against *Trypanosoma cruzi* acute infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAY, p. 913, 3 maio 2018.

PEREIRA, N. de S. et al. Innate immune receptors over expression correlate with chronic chagasic cardiomyopathy and digestive damage in patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006589, 25 jul. 2018. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006589>>. Acesso em: 7 abr. 2020.

PEREIRA, S. R. et al. Changes in the proteomic profile during differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells stimulated with granulocyte macrophage colony stimulating factor/interleukin-4 and lipopolysaccharide. **Proteomics**, v. 5, n. 5, p. 1186–1198, 2005.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, p. 82–94, 2018. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)>.

PILLAI, P. S. et al. Mx1 reveals innate pathways to antiviral resistance and lethal influenza disease. **Science**, v. 352, n. 6284, p. 463–466, 22 abr. 2016.

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. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1808596&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PONCINI, C. V. et al. *Trypanosoma cruzi* Induces Regulatory Dendritic Cells In Vitro. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 6, p. 2633–2641, 2008. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.01298-07>>.

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. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589010001550>>.

PONCINI, C. V.; GONZÁLEZ-CAPPA, S. M. Dual role of monocyte-derived

dendritic cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 11, p. 1936–1948, 2017.

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. Disponível em: <[www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1403019](http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1403019)>.

POWELL, M. J. et al. Posttranscriptional Regulation of IL-10 Gene Expression Through Sequences in the 3'-Untranslated Region. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 1, p. 292–296, 1 jul. 2000. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/165/1/292><http://www.jimmunol.org/content/165/1/292.full#ref-list-1>>. Acesso em: 26 ago. 2020.

QUEIROZ, R. M. L. et al. Quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* amastigogenesis. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 13, n. 12, p. 3457–3472, 2014.

QUINTIN, J. et al. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 2, p. 223–232, 16 ago. 2012.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **Vienna, Austria**, 2019.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Chronic chagas cardiomyopathy: A review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 224–235, 1 mar. 2017.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067361060061X>>.

RASSI, A.; RASSI, S. G.; RASSI, A. Sudden death in chagas' disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 76, n. 1, p. 86–96, 2001.

REIMER, T. et al. poly(I:C) and LPS induce distinct IRF3 and NF- $\kappa$ B signaling during type-I IFN and TNF responses in human macrophages. **Journal of**

**Leukocyte Biology**, v. 83, n. 5, p. 1249–1257, 1 maio 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0607412>>. Acesso em: 30 abr. 2020.

REN, K.; TORRES, R. Role of interleukin-1 $\beta$  during pain and inflammation. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 57–64, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.020>>.

RIBEIRO, V. et al. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 12, p. 7–17, 1 abr. 2020.

RIOS, L. E. et al. Immunity and vaccine development efforts against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**. Elsevier B.V., 1 dez. 2019.

RODRIGUES, J. P. F. et al. Host cell protein LAMP-2 is the receptor for *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 that mediates invasion. **Cellular Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 1–11, 2019.

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, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22327272>%5Cn<http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00430-012-0230-9>.pdf>.

RONCHESE, F.; HILLIGAN, K. L.; MAYER, J. U. Dendritic cells and the skin environment. **Current Opinion in Immunology**, v. 64, p. 56–62, 1 jun. 2020.

SALAZAR, G. A. et al. A web-based protein interaction network visualizer. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 1, 2014.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor Plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. April, p. 1109–1118, 1994. Disponível em: <<http://jem.rupress.org/content/179/4/1109.full.pdf>>.

SANT, A. J.; MCMICHAEL, A. Revealing the role of CD4+ T cells in viral immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 8, p. 1391–1395, 2012. Disponível em: <[www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20121517](http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20121517)>. Acesso em: 27 ago.

2020.

SCHMUNIS, G. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. SUPPL. 1, p. 75–85, 2007.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>>.

SCHUSTER, J. P.; SCHAUB, G. A. *Trypanosoma cruzi*: Skin-penetration kinetics of vector-derived metacyclic trypomastigotes. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 14, p. 1475–1479, 1 dez. 2000.

SEGURA, E.; AMIGORENA, S. **Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. v. 127

SHANNON, P. et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003. Disponível em: <<http://genome.cshlp.org/content/13/11/2498.full.pdf>>.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845–852, 2012.

SILVA, G. K. et al. Cutting Edge: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1-Dependent Responses Account for Murine Resistance against *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 3, p. 1148–1152, 2010. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0902254>>.

SILVA, G. K. et al. Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain Inflammasomes Mediate IL-1 $\beta$  Response and Host Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 6, p. 3373–3383, 15 set. 2013.

SILVA, J. S. et al. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 12, p. 4862–4867, 1 dez. 1995.

STURM, N. R. et al. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma*

*cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 269–279, 2003.

SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D362–D368, 2017.

TAUB, D. D. et al. T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8): IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 8, p. 1931–1941, 1996.

TEIXEIRA, A. et al. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 592–630, 2011. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00063-10>>.

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.

TERRAZAS, C. A. et al. MIF synergizes with *Trypanosoma cruzi* antigens to promote efficient dendritic cell maturation and IL-12 production via p38 MAPK. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 9, p. 1298–1310, 2011.

TOKUNAGA, R. et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation – A target for novel cancer therapy. **Cancer Treatment Reviews**, v. 63, p. 40–47, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.007>>.

TORRI, A. et al. Gene Expression Profiles Identify Inflammatory Signatures in Dendritic Cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. e9404, 24 fev. 2010. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0009404>>. Acesso em: 29 abr. 2020.

TYRKALSKA, S. D. et al. Neutrophils mediate *Salmonella typhimurium* clearance through the GBP4 inflammasome-dependent production of prostaglandins. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1–17, 1 jul. 2016.

TZELEPIS, F. et al. Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naïve or vaccinated mice. **Infection and Immunity**, 2006.

UNE, C.; ANDERSSON, J.; ÖRN, A. Role of IFN- $\alpha/\beta$  and IL-12 in the

activation of natural killer cells and interferon- $\gamma$  production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Clinical and Experimental Immunology**.

UNE, C., ANDERSSON, J., & ÖRN, A. (2003). Role of IFN- $\alpha/\beta$  and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon- $\gamma$  production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Clinical and Experimental I**, v. 134, n. 2, p. 195–201, 2003.

VAN DE WEIJER, M. L.; LUTEIJN, R. D.; WIERTZ, E. J. H. J. **Viral immune evasion: Lessons in MHC class I antigen presentation Seminars in Immunology**. Academic Press, 1 mar. 2015.

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. Disponível em: <papers3://publication/uuid/E7EDB0A6-58C2-4C69-A9D3-923DD6E42196>.

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. Disponível em: <<http://intimm.oxfordjournals.org/content/14/10/1135.full?sid=097135c9-6a3f-4221-8767-7e0e51e28d71>>.

VANDERSLUIS, B. et al. Integrating genetic and protein–protein interaction networks maps a functional wiring diagram of a cell. **Current Opinion in Microbiology**, 2018.

VIGNESH, K. S.; DEEPE, G. S. Metallothioneins: Emerging modulators in immunity and infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, p. 2197, 2017.

VILLARROYA-BELTRI, C.; GUERRA, S.; SÁNCHEZ-MADRID, F. ISGylation – a key to lock the cell gates for preventing the spread of threats. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 18, p. 2961–2969, 2017. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.205468>>.

WALK, J. et al. Outcomes of controlled human malaria infection after BCG vaccination. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019. Disponível em:



<<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-08659-3>>.

WANG, L. et al. PLC $\beta$ 2 negatively regulates the inflammatory response to virus infection by inhibiting phosphoinositide-mediated activation of TAK1. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2019.

WEI, H. J.; LETTERIO, J. J.; PAREEK, T. K. Development and functional characterization of murine tolerogenic dendritic cells. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2018, n. 135, p. 1–12, 2018.

WHO. **Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2018**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[https://www.who.int/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b_2)>.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#>>.

WILKINSON, S. R. et al. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2072–2084, 2011.

WORAH, K. et al. Proteomics of Human Dendritic Cell Subsets Reveals Subset-Specific Surface Markers and Differential Inflammasome Function. **Cell Reports**, v. 16, p. 2953–2966, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.023>>.

WU, C. et al. BioGPS: An extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. **Genome Biology**, 2009.

WU, J. et al. MicroRNA transcriptome analysis of poly I:C-stimulated and PRRSV-infected porcine alveolar macrophages. **Journal of Applied Genetics**, v. 60, n. 3–4, p. 375–383, 1 nov. 2019.

YE, J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC bioinformatics**, 2012.

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.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 101–107, 2009.



ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 156–171, 2015.

ZHANG, Q. et al. Generation and characterization of regulatory dendritic cells derived from murine induced pluripotent stem cells. **Scientific Reports**, v. 4, p. 12–14, 2014.

ZHOU, L. et al. Macrophages polarization is mediated by the combination of PRR ligands and distinct inflammatory cytokines. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 9, p. 10964–10974, 2015. Disponível em: <[www.ijcep.com/](http://www.ijcep.com/)>. Acesso em: 29 abr. 2020.

ZHU, J. et al. Antiviral Activity of Human OASL Protein Is Mediated by Enhancing Signaling of the RIG-I RNA Sensor. **Immunity**, v. 40, n. 6, p. 936–948, 19 jun. 2014.

ZINGALES, B. et al. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. **Acta Tropica**, v. 68, n. 2, p. 159–173, 1997.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>>.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, v. 184, p. 38–52, 1 ago. 2018.

## 10. ANEXOS

### Anexo 1. Análise de expressão diferencial do transcrito global (primeiros 100 genes).

Gene ID	symbol	gene	log2FoldChange	padj
ENSG00000128383	APOBEC3A	apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3A	3.997	3.E-38
ENSG00000134321	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	3.713	5.E-34
ENSG00000119922	IFIT2	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2	3.820	1.E-31
ENSG00000188313	PLSCR1	phospholipid scramblase 1	2.928	2.E-30
ENSG00000010030	ETV7	ETS variant 7	3.804	3.E-29
ENSG00000119917	IFIT3	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3	3.337	3.E-29
ENSG00000176046	NUPR1	nuclear protein 1, transcriptional regulator	3.163	3.E-29
ENSG00000138646	HERC5	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5	3.031	7.E-29
ENSG00000165949	IFI27	interferon alpha inducible protein 27	3.295	7.E-27
ENSG00000157601	MX1	MX dynamin like GTPase 1	3.032	2.E-26
ENSG00000173193	PARP14	poly(ADP-ribose) polymerase family member 14	2.070	2.E-26
ENSG00000138035	PNPT1	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	2.361	9.E-26
ENSG00000181381	DDX60L	DEAD-box helicase 60-like	2.599	1.E-25
ENSG00000124256	ZBP1	Z-DNA binding protein 1	3.588	2.E-25
ENSG00000135114	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase like	3.157	2.E-25
ENSG00000137198	GMPR	guanosine monophosphate reductase	2.453	5.E-25
ENSG00000163666	HESX1	HESX homeobox 1	3.410	9.E-25
ENSG00000137959	IFI44L	interferon induced protein 44 like	3.162	6.E-24
ENSG00000162654	GBP4	guanylate binding protein 4	3.198	4.E-23
ENSG00000173821	RNF213	ring finger protein 213	1.796	2.E-22
ENSG00000111331	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3	2.136	2.E-22
ENSG00000122643	NT5C3A	5'-nucleotidase, cytosolic IIIA	2.636	1.E-21
ENSG00000133106	EPSTI1	epithelial stromal interaction 1 (breast)	2.299	2.E-21
ENSG00000125148	MT2A	metallothionein 2A	2.981	5.E-21
ENSG00000172183	ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20	2.996	1.E-20



<b>ENSG00000184979</b>	USP18	ubiquitin specific peptidase 18	3.129	1.E-20
<b>ENSG00000107201</b>	DDX58	DEXD/H-box helicase 58	2.807	2.E-20
<b>ENSG00000117228</b>	GBP1	guanylate binding protein 1	2.666	2.E-20
<b>ENSG00000168062</b>	BATF2	basic leucine zipper ATF-like transcription factor 2	2.612	3.E-20
<b>ENSG00000131979</b>	GCH1	GTP cyclohydrolase 1	3.009	6.E-20
<b>ENSG00000115267</b>	IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	2.155	1.E-19
<b>ENSG00000136514</b>	RTP4	receptor transporter protein 4	2.576	4.E-19
<b>ENSG00000138496</b>	PARP9	poly(ADP-ribose) polymerase family member 9	2.093	5.E-19
<b>ENSG00000163840</b>	DTX3L	deltex E3 ubiquitin ligase 3L	1.702	9.E-19
<b>ENSG00000177409</b>	SAMD9L	sterile alpha motif domain containing 9 like	1.955	1.E-18
<b>ENSG00000204616</b>	TRIM31	tripartite motif containing 31	2.769	6.E-18
<b>ENSG00000138755</b>	CXCL9	C-X-C motif chemokine ligand 9	3.025	1.E-17
<b>ENSG00000134326</b>	CMPK2	cytidine/uridine monophosphate kinase 2	2.824	3.E-17
<b>ENSG00000187608</b>	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	2.606	8.E-17
<b>ENSG00000137965</b>	IFI44	interferon induced protein 44	2.480	1.E-16
<b>ENSG00000130589</b>	HELZ2	helicase with zinc finger 2	2.211	6.E-16
<b>ENSG00000055332</b>	EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2	1.906	8.E-16
<b>ENSG00000111335</b>	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	2.206	8.E-16
<b>ENSG00000185885</b>	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	2.717	8.E-16
<b>ENSG00000142089</b>	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	2.443	5.E-15
<b>ENSG00000112773</b>	FAM46A	family with sequence similarity 46 member A	1.656	5.E-15
<b>ENSG00000089692</b>	LAG3	lymphocyte activating 3	2.677	6.E-15
<b>ENSG00000179044</b>	EXOC3L1	exocyst complex component 3 like 1	2.256	2.E-14
<b>ENSG00000255690</b>	TRIL	TLR4 interactor with leucine rich repeats	2.834	2.E-14
<b>ENSG00000121060</b>	TRIM25	tripartite motif containing 25	1.477	4.E-14
<b>ENSG00000079263</b>	SP140	SP140 nuclear body protein	2.346	5.E-14
<b>ENSG00000183486</b>	MX2	MX dynamin like GTPase 2	2.370	9.E-14
<b>ENSG00000120337</b>	TNFSF18	tumor necrosis factor superfamily member 18	2.508	1.E-13

ENSG00000138642	HERC6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6	2.183	1.E-13
ENSG00000188820	FAM26F	family with sequence similarity 26 member F	2.099	3.E-13
ENSG00000148926	ADM	adrenomedullin	2.062	4.E-13
ENSG00000135899	SP110	SP110 nuclear body protein	2.037	5.E-13
ENSG00000169245	CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10	2.807	5.E-13
ENSG00000221963	APOL6	apolipoprotein L6	1.726	5.E-13
ENSG00000156587	UBE2L6	ubiquitin conjugating enzyme E2 L6	1.739	5.E-13
ENSG00000120539	MASTL	microtubule associated serine/threonine kinase like	1.914	8.E-13
ENSG00000068079	IFI35	interferon induced protein 35	1.852	2.E-12
ENSG00000146425	DYNLT1	dynein light chain Tctex-type 1	1.521	3.E-12
ENSG00000225492	GBP1P1	guanylate binding protein 1 pseudogene 1	2.712	3.E-12
ENSG00000108771	DHX58	DEXH-box helicase 58	1.774	6.E-12
ENSG00000237276	NA	NA	2.392	8.E-12
ENSG00000115415	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1	1.960	1.E-11
ENSG00000136492	BRIP1	BRCA1 interacting protein C- terminal helicase 1	2.187	2.E-11
ENSG00000126709	IFI6	interferon alpha inducible protein 6	2.073	4.E-11
ENSG00000089127	OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1	1.983	9.E-11
ENSG00000100342	APOL1	apolipoprotein L1	1.632	1.E-10
ENSG00000152778	IFIT5	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 5	1.828	2.E-10
ENSG00000267369	NA	NA	1.980	2.E-10
ENSG00000140464	PML	promyelocytic leukemia	1.470	2.E-10
ENSG00000123609	NMI	N-myc and STAT interactor	1.419	3.E-10
ENSG00000240065	PSMB9	proteasome subunit beta 9	1.455	3.E-10
ENSG00000239713	APOBEC3G	apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3G	1.689	4.E-10
ENSG00000162614	NEXN	nexilin F-actin binding protein	2.280	4.E-10
ENSG00000185507	IRF7	interferon regulatory factor 7	1.721	5.E-10
ENSG00000152061	RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1 like	1.622	6.E-10
ENSG00000205413	SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9	2.006	6.E-10
ENSG00000163568	AIM2	absent in melanoma 2	2.360	9.E-10



<b>ENSG00000130813</b>	C19orf66	chromosome 19 open reading frame 66	1.426	1.E-09
<b>ENSG00000172936</b>	MYD88	myeloid differentiation primary response 88	1.538	1.E-09
<b>ENSG00000132109</b>	TRIM21	tripartite motif containing 21	1.493	1.E-09
<b>ENSG00000115155</b>	OTOF	otoferlin	2.310	2.E-09
<b>ENSG00000272821</b>	NA	NA	1.407	4.E-09
<b>ENSG00000125347</b>	IRF1	interferon regulatory factor 1	1.446	4.E-09
<b>ENSG00000038210</b>	PI4K2B	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta	1.731	4.E-09
<b>ENSG00000106785</b>	TRIM14	tripartite motif containing 14	1.230	6.E-09
<b>ENSG00000223960</b>	LOC101927027	uncharacterized LOC101927027	1.324	6.E-09
<b>ENSG00000017483</b>	SLC38A5	solute carrier family 38 member 5	2.291	6.E-09
<b>ENSG00000136816</b>	TOR1B	torsin family 1 member B	1.610	8.E-09
<b>ENSG00000154451</b>	GBP5	guanylate binding protein 5	2.019	1.E-08
<b>ENSG00000137628</b>	DDX60	DEXD/H-box helicase 60	1.824	1.E-08
<b>ENSG00000102524</b>	TNFSF13B	tumor necrosis factor superfamily member 13b	1.287	1.E-08
<b>ENSG00000213533</b>	TMEM110	transmembrane protein 110	1.683	1.E-08
<b>ENSG00000124201</b>	ZNFX1	zinc finger NFX1-type containing 1	1.188	3.E-08
<b>ENSG00000092295</b>	TGM1	transglutaminase 1	1.933	3.E-08



## Anexo 2. Análise de enriquecimento Gene Ontology (primeiros 100 termos)

GOBPID	Pvalue	OddsRatio	ExpCount	Count	Size	Term
GO:0006952	4.3E-56	6.7E+00	3.5E+01	148	1461	defense response
GO:0006955	4.7E-51	6.1E+00	3.6E+01	144	1509	immune response
GO:0045087	3.3E-49	7.9E+00	2.0E+01	106	811	innate immune response
GO:0009615	3.1E-44	1.3E+01	7.3E+00	66	304	response to virus
GO:0034097	1.3E-43	7.4E+00	1.9E+01	98	782	response to cytokine
GO:0051607	2.8E-43	1.6E+01	5.4E+00	58	226	defense response to virus
GO:0043207	5.7E-41	6.9E+00	1.9E+01	96	801	response to external biotic stimulus
GO:0051707	5.7E-41	6.9E+00	1.9E+01	96	801	response to other organism
GO:0002376	1.0E-40	4.5E+00	5.6E+01	164	2348	immune system process
GO:0019221	1.5E-39	8.4E+00	1.3E+01	79	543	cytokine-mediated signaling pathway
GO:0009607	3.1E-39	6.6E+00	2.0E+01	96	839	response to biotic stimulus
GO:0006950	7.2E-37	3.8E+00	8.6E+01	199	3557	response to stress
GO:0071345	3.1E-36	6.9E+00	1.7E+01	84	688	cellular response to cytokine stimulus
GO:0002252	1.1E-35	6.8E+00	1.6E+01	83	682	immune effector process
GO:0034340	9.0E-35	3.2E+01	2.0E+00	35	84	response to type I interferon
GO:0098542	1.7E-33	8.0E+00	1.1E+01	68	475	defense response to other organism
GO:0016032	1.8E-33	5.6E+00	2.3E+01	94	942	viral process
GO:0044764	2.7E-33	5.5E+00	2.3E+01	94	947	multi-organism cellular process
GO:0044403	4.4E-33	5.4E+00	2.3E+01	95	973	symbiosis, encompassing mutualism through parasitism
GO:0044419	4.4E-33	5.4E+00	2.3E+01	95	973	interspecies interaction between organisms
GO:0060337	1.2E-32	3.1E+01	1.9E+00	33	80	type I interferon signaling pathway
GO:0071357	1.2E-32	3.1E+01	1.9E+00	33	80	cellular response to type I interferon
GO:0048525	2.9E-31	2.3E+01	2.5E+00	35	102	negative regulation of viral process
GO:0034341	8.1E-31	1.6E+01	3.8E+00	41	159	response to interferon-gamma
GO:0050792	1.7E-30	1.1E+01	6.1E+00	49	252	regulation of viral process
GO:1903901	2.3E-30	2.7E+01	2.0E+00	32	84	negative regulation of viral life cycle
GO:0031347	6.2E-30	6.2E+00	1.6E+01	74	647	regulation of defense response



<b>GO:0043903</b>	9.8E-30	1.0E+01	6.6E+00	50	274	regulation of symbiosis, encompassing mutualism through parasitism
<b>GO:0002682</b>	2.9E-28	4.3E+00	3.1E+01	103	1302	regulation of immune system process
<b>GO:0043901</b>	3.9E-27	1.5E+01	3.6E+00	37	150	negative regulation of multi-organism process
<b>GO:0045071</b>	2.6E-26	4.1E+01	1.2E+00	24	49	negative regulation of viral genome replication
<b>GO:0009605</b>	3.0E-26	3.6E+00	4.8E+01	127	1996	response to external stimulus
<b>GO:0043900</b>	1.1E-25	7.6E+00	8.7E+00	52	363	regulation of multi-organism process
<b>GO:0002684</b>	7.5E-25	4.7E+00	2.2E+01	80	903	positive regulation of immune system process
<b>GO:0051704</b>	2.4E-24	3.3E+00	5.4E+01	133	2262	multi-organism process
<b>GO:0010033</b>	3.4E-24	3.1E+00	6.6E+01	149	2741	response to organic substance
<b>GO:0071346</b>	7.6E-24	1.4E+01	3.3E+00	33	138	cellular response to interferon-gamma
<b>GO:0045069</b>	5.9E-23	2.1E+04	1.9E+00	26	79	regulation of viral genome replication
<b>GO:0050776</b>	7.5E-23	4.5E+00	2.1E+01	75	860	regulation of immune response
<b>GO:1903900</b>	8.5E-23	1.1E+01	4.1E+00	35	171	regulation of viral life cycle
<b>GO:0031349</b>	2.2E-21	6.4E+00	9.5E+00	49	396	positive regulation of defense response
<b>GO:0080134</b>	2.7E-21	3.7E+00	3.0E+01	89	1241	regulation of response to stress
<b>GO:0045088</b>	3.4E-21	6.8E+00	8.4E+00	46	350	regulation of innate immune response
<b>GO:0001817</b>	1.1E-20	5.2E+00	1.3E+01	57	557	regulation of cytokine production
<b>GO:0019079</b>	1.7E-20	1.5E+01	2.5E+00	27	106	viral genome replication
<b>GO:0001816</b>	4.5E-20	4.9E+00	1.5E+01	59	613	cytokine production
<b>GO:0071310</b>	4.7E-20	3.0E+00	5.1E+01	120	2134	cellular response to organic substance
<b>GO:0070887</b>	6.1E-20	2.9E+00	6.2E+01	135	2586	cellular response to chemical stimulus
<b>GO:0060333</b>	1.7E-19	1.7E+01	2.0E+00	24	85	interferon-gamma-mediated signaling pathway
<b>GO:0050896</b>	1.6E-18	2.5E+00	1.9E+02	280	8081	response to stimulus
<b>GO:0006954</b>	2.5E-18	4.5E+00	1.6E+01	58	645	inflammatory response
<b>GO:0007166</b>	5.2E-18	2.7E+00	6.2E+01	131	2595	cell surface receptor signaling pathway



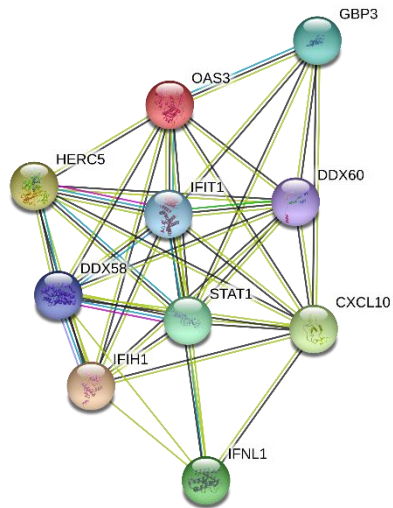


<b>GO:0048583</b>	1.7E-17	2.5E+00	8.4E+01	158	3503	regulation of response to stimulus
<b>GO:0050778</b>	3.8E-17	4.4E+00	1.5E+01	56	641	positive regulation of immune response
<b>GO:0019058</b>	5.0E-17	5.2E+00	1.1E+01	46	444	viral life cycle
<b>GO:0045089</b>	4.3E-16	6.3E+00	6.9E+00	36	288	positive regulation of innate immune response
<b>GO:0001819</b>	4.7E-16	5.4E+00	9.0E+00	41	376	positive regulation of cytokine production
<b>GO:0042221</b>	5.7E-16	2.4E+00	9.7E+01	169	4014	response to chemical
<b>GO:0032101</b>	9.8E-16	4.0E+00	1.7E+01	56	690	regulation of response to external stimulus
<b>GO:0048584</b>	1.8E-15	2.7E+00	4.6E+01	103	1928	positive regulation of response to stimulus
<b>GO:0032479</b>	1.2E-14	1.1E+01	2.6E+00	22	109	regulation of type I interferon production
<b>GO:0032606</b>	1.5E-14	1.1E+01	2.6E+00	22	110	type I interferon production
<b>GO:0002697</b>	2.6E-14	5.6E+00	7.5E+00	35	310	regulation of immune effector process
<b>GO:0023052</b>	4.7E-14	2.1E+00	1.5E+02	219	6071	signaling
<b>GO:0035456</b>	6.6E-14	4.2E+01	5.8E-01	12	24	response to interferon-beta
<b>GO:0044700</b>	8.8E-14	2.1E+00	1.5E+02	218	6064	single organism signaling
<b>GO:0007154</b>	1.4E-13	2.1E+00	1.5E+02	218	6089	cell communication
<b>GO:0051716</b>	2.5E-13	2.1E+00	1.6E+02	234	6756	cellular response to stimulus
<b>GO:0002218</b>	2.6E-13	6.0E+00	5.9E+00	30	246	activation of innate immune response
<b>GO:0048519</b>	4.7E-13	2.1E+00	1.1E+02	174	4486	negative regulation of biological process
<b>GO:0007165</b>	6.3E-13	2.1E+00	1.4E+02	204	5623	signal transduction
<b>GO:0002253</b>	7.8E-13	4.1E+00	1.2E+01	43	510	activation of immune response
<b>GO:0032103</b>	1.2E-12	5.6E+00	6.3E+00	30	261	positive regulation of response to external stimulus
<b>GO:0035455</b>	2.1E-12	5.2E+01	4.3E-01	10	18	response to interferon-alpha
<b>GO:0002237</b>	4.4E-12	5.0E+00	7.5E+00	32	311	response to molecule of bacterial origin
<b>GO:0002758</b>	4.5E-12	5.7E+00	5.7E+00	28	239	innate immune response-activating signal transduction
<b>GO:0032480</b>	5.0E-12	2.0E+01	9.6E-01	13	40	negative regulation of type I interferon production
<b>GO:0002757</b>	6.7E-12	4.1E+00	1.1E+01	39	457	immune response-activating signal transduction



<b>GO:0032496</b>	7.2E-12	5.0E+00	7.2E+00	31	298	response to lipopolysaccharide
<b>GO:0002764</b>	1.4E-11	3.9E+00	1.2E+01	40	490	immune response-regulating signaling pathway
<b>GO:0035556</b>	2.2E-11	2.2E+00	6.2E+01	114	2588	intracellular signal transduction
<b>GO:0009967</b>	2.6E-11	2.6E+00	3.3E+01	74	1370	positive regulation of signal transduction
<b>GO:0032612</b>	8.7E-11	1.1E+01	1.7E+00	15	70	interleukin-1 production
<b>GO:0010647</b>	9.1E-11	2.5E+00	3.6E+01	77	1494	positive regulation of cell communication
<b>GO:0023056</b>	1.1E-10	2.5E+00	3.6E+01	77	1501	positive regulation of signaling
<b>GO:0050727</b>	1.4E-10	4.7E+00	7.1E+00	29	295	regulation of inflammatory response
<b>GO:0002683</b>	2.5E-10	4.2E+00	8.7E+00	32	363	negative regulation of immune system process
<b>GO:0050729</b>	2.8E-10	7.8E+00	2.8E+00	18	115	positive regulation of inflammatory response
<b>GO:0009617</b>	3.6E-10	3.5E+00	1.3E+01	39	522	response to bacterium
<b>GO:0009966</b>	4.2E-10	2.1E+00	6.4E+01	112	2646	regulation of signal transduction
<b>GO:0023051</b>	4.4E-10	2.0E+00	7.2E+01	122	2984	regulation of signaling
<b>GO:1902533</b>	4.5E-10	2.9E+00	2.1E+01	53	872	positive regulation of intracellular signal transduction
<b>GO:0010646</b>	6.4E-10	2.0E+00	7.1E+01	120	2933	regulation of cell communication
<b>GO:0032611</b>	7.0E-10	1.2E+01	1.4E+00	13	57	interleukin-1 beta production
<b>GO:0002221</b>	9.8E-10	6.3E+00	3.7E+00	20	155	pattern recognition receptor signaling pathway
<b>GO:0051701</b>	1.7E-09	6.0E+00	3.8E+00	20	160	interaction with host
<b>GO:0001818</b>	1.7E-09	5.2E+00	5.1E+00	23	212	negative regulation of cytokine production
<b>GO:0032647</b>	2.1E-09	3.7E+01	4.1E-01	8	17	regulation of interferon-alpha production
<b>GO:0071222</b>	2.2E-09	6.3E+00	3.5E+00	19	146	cellular response to lipopolysaccharide
<b>GO:0048523</b>	2.7E-09	1.9E+00	1.0E+02	153	4169	negative regulation of cellular process

Anexo 3. Correlação dos genes CXCL10, IFIT1, IFNL1, DDX58, OAS3, HERC5, IFIH1, DDX60, GBP3, STAT1, segundo STRING.



**Anexo 4. Análise de enriquecimento KEGG**

<b>ID</b>	<b>Description</b>	<b>GeneRatio</b>	<b>BgRatio</b>	<b>pvalue</b>	<b>p.adjust</b>
<b>hsa04621</b>	NOD-like receptor signaling pathway	31/233	168/7383	5.8E-16	1.4E-13
<b>hsa05164</b>	Influenza A	29/233	173/7383	7.5E-14	9.2E-12
<b>hsa05168</b>	Herpes simplex infection	27/233	185/7383	1.7E-11	1.4E-09
<b>hsa04620</b>	Toll-like receptor signaling pathway	18/233	104/7383	3.0E-09	1.8E-07
<b>hsa04060</b>	Cytokine-cytokine receptor interaction	28/233	270/7383	2.1E-08	1.0E-06
<b>hsa05162</b>	Measles	19/233	134/7383	3.3E-08	1.3E-06
<b>hsa04623</b>	Cytosolic DNA-sensing pathway	12/233	64/7383	5.6E-07	2.0E-05
<b>hsa05160</b>	Hepatitis C	17/233	131/7383	6.5E-07	2.0E-05
<b>hsa05323</b>	Rheumatoid arthritis	13/233	90/7383	4.2E-06	1.1E-04
<b>hsa04622</b>	RIG-I-like receptor signaling pathway	11/233	70/7383	1.0E-05	2.5E-04
<b>hsa04217</b>	Necroptosis	17/233	164/7383	1.5E-05	3.3E-04
<b>hsa05142</b>	Chagas disease (American trypanosomiasis)	13/233	102/7383	1.7E-05	3.5E-04
<b>hsa04062</b>	Chemokine signaling pathway	18/233	185/7383	2.0E-05	3.7E-04
<b>hsa05161</b>	Hepatitis B	15/233	144/7383	4.5E-05	7.8E-04
<b>hsa05143</b>	African trypanosomiasis	7/233	35/7383	9.0E-05	1.5E-03
<b>hsa04978</b>	Mineral absorption	8/233	51/7383	1.7E-04	2.6E-03
<b>hsa04064</b>	NF-kappa B signaling pathway	11/233	95/7383	1.8E-04	2.7E-03
<b>hsa05167</b>	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection	16/233	186/7383	2.5E-04	3.4E-03
<b>hsa05140</b>	Leishmaniasis	9/233	74/7383	4.9E-04	6.4E-03
<b>hsa04668</b>	TNF signaling pathway	11/233	108/7383	5.7E-04	7.0E-03
<b>hsa05133</b>	Pertussis	9/233	76/7383	6.0E-04	7.0E-03
<b>hsa05144</b>	Malaria	7/233	49/7383	7.9E-04	8.8E-03
<b>hsa05330</b>	Allograft rejection	6/233	38/7383	1.1E-03	1.2E-02
<b>hsa05132</b>	Salmonella infection	9/233	86/7383	1.5E-03	1.5E-02
<b>hsa05332</b>	Graft-versus-host disease	6/233	41/7383	1.6E-03	1.6E-02
<b>hsa04940</b>	Type I diabetes mellitus	6/233	43/7383	2.1E-03	2.0E-02
<b>hsa03050</b>	Proteasome	6/233	45/7383	2.7E-03	2.5E-02
<b>hsa04933</b>	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	9/233	99/7383	3.9E-03	3.4E-02
<b>hsa04672</b>	Intestinal immune network for IgA production	6/233	49/7383	4.2E-03	3.4E-02
<b>hsa05321</b>	Inflammatory bowel disease (IBD)	7/233	65/7383	4.2E-03	3.4E-02
<b>hsa05152</b>	Tuberculosis	13/233	179/7383	4.2E-03	3.4E-02
<b>hsa05165</b>	Human papillomavirus infection	19/233	319/7383	5.6E-03	4.3E-02

1 Anexo 5. Manuscrito aceito para publicação

2 **The first contact of human dendritic cells with *Trypanosoma cruzi***  
3 **reveals response to virus as an unexplored central pathway**

4 **Natalia Gil-Jaramillo<sup>1</sup>, Amanda Rocha<sup>1</sup>, Tainá Raiol<sup>2</sup>, Flávia Nader Motta<sup>1,3</sup>, Cecília Favali<sup>4</sup>,**  
5 **Marcelo M. Brigido<sup>5</sup>, Izabela M. D. Bastos<sup>1\*</sup>, Jaime M. Santana<sup>1\*</sup>**

6 <sup>1</sup>Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

7 <sup>2</sup>Fiocruz Brasília - Gerência Regional de Brasília (GEREB), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Brasília, Brazil

8 <sup>3</sup>Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

9 <sup>4</sup>Laboratório de Imunologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

10 <sup>5</sup>Laboratório de Imunologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

11 **\*Correspondence:**

12 Izabela M. D. Bastos

13 dourado@unb.br;

14 Jaime M. Santana

15 jsantana@unb.br

16 **Keywords: Chagas disease, inflammasome, metacyclic trypomastigotes, transcriptome, virus**  
17 **infection.**

18 **Abstract**

19 Chagas disease is a debilitating and neglected disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*.  
20 Soon after infection, interactions among *T. cruzi* and host innate immunity cells can drive/contribute  
21 to disease outcome. Dendritic cells (DCs), present in all tissues, are one of the first immune cells to  
22 interact with *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. Elucidating the immunological events  
23 triggered immediately after parasite-human DCs encounter may aid in understanding the role of DCs  
24 in the establishment of infection and in the course of the disease. Therefore, we performed a  
25 transcriptomic analysis of a 12 h interaction between *T. cruzi* and MoDCs (monocyte-derived DCs)  
26 from three human donors. Enrichment analyses of the 468 differentially expressed genes (DEGs)  
27 revealed viral infection response as the most regulated pathway. Additionally, exogenous antigen  
28 processing and presentation through MHC-I, chemokine signaling, lymphocyte co-stimulation,  
29 metallothioneins, and inflammasome activation were found up-regulated. Notable, we were able to  
30 identify the increased gene expression of alternative inflammasome sensors such as AIM2, IFI16, and  
31 RIG-I for the first time in a *T. cruzi* infection. Both transcript and protein expression levels suggest  
32 proinflammatory cytokine production during early *T. cruzi*-DCs contact. Our transcriptome data unveil  
33 antiviral pathways as an unexplored process during *T. cruzi*-DC initial interaction, disclosing a new  
34 panorama for the study of Chagas disease outcomes.

35 **Introduction**

36 Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is an endemic parasitic disease that affects  
37 approximately seven million people in Latin America, with over 65 million estimated to be at risk of  
38 contracting the disease (1,2). The disease has turned into a global health concern, mainly because of  
39 migratory flow and lack of treatment or vaccine (3–6). Individuals who are infected by the parasite

40 initially develop an acute asymptomatic phase, with only 1% manifesting nonspecific symptoms (7).  
41 After 20 to 30 years, however, approximately one-third of infected individuals will progress to the  
42 chronic phase, which is characterized by cardiomegaly and mega viscera, which can lead to death (8,9).  
43 The outcome of the infection depends upon the combination of many complex processes, with accurate  
44 prediction regarding progression to the chronic phase remaining a challenge. Immunological events  
45 within the acute phase influence the development of either a protective or a pathogenic response in  
46 later stages of Chagas disease (10). Likewise, parasite genetic diversity and tissue tropism, inoculum  
47 and transmission route, together with host genetic background, age, and nutritional conditions, may all  
48 modulate immunological and pathogenesis mechanisms (10,11).

49 Chagas disease is a vector-borne disease, with the parasite transmitted by blood-sucking bugs from the  
50 Triatominae family (12). Its oral transmission is of increasing epidemiological importance, with  
51 frequent outbreaks of acute and, at times, lethal cases. In these episodes, *T. cruzi* is acquired through  
52 food or drink products contaminated with bugs and/or bug feces/urine (13,14). During its complex life  
53 cycle, the parasite evolves through different forms, including epimastigotes - the insect replicative  
54 midgut forms, metacyclic trypomastigotes (MTs) - the infective and non-replicative rectum insect  
55 forms, amastigotes - the intracellular vertebrate replicative forms, and bloodstream trypomastigotes -  
56 the infective and non-replicative vertebrate forms (12,15). Natural insect-derived MTs are found in  
57 triatomine feces/urine and invade vertebrate cells through the insect bite site or mucosal tissues (13,16).  
58 MTs are thus responsible for the parasite's first interaction with the host cells.

59 MT has a variety of cellular membrane and secreted virulence factors that allow for mammalian cell  
60 invasion, host immune response evasion, and parasite intracellular survival (17). Once inside the host,  
61 the parasite may be recognized and able to infect phagocytic and/or non-phagocytic cells through a  
62 variety of host cell factors. Among the molecules on non-phagocytic cells, mucins, laminins,  
63 fibronectins, thrombospondins, heparan sulfate proteoglycans, and bradykinin B<sub>2</sub> receptors have been  
64 reported to mediate parasite entrance (18–22). Otherwise, classic and non-classic pattern recognition  
65 receptors (PRRs) such as TLR2, TLR4, TLR9, NOD2, lectins, C5a, Slamf1, and LAMP-2 have shown  
66 their importance for *T. cruzi* internalization in monocytes, macrophages, and dendritic cells (DCs) (23–  
67 28).

68 *Ex vivo* studies in indeterminate patients have shown that the activation of Th1, Th2, Treg and Th17  
69 cells can lead to the control of parasitemia and tissue damage and the development of immunological  
70 memory against *T. cruzi* (29–31). However, an excessive and/or prolonged response of any of these  
71 types may contribute to the disease pathogenesis (32). Therefore, the signaling pathways unleashed by  
72 the host innate immune system immediately after sensing the infection will impact almost every aspect  
73 of the subsequent adaptive immune response (33,34). In this sense, DCs perform a crucial role in  
74 controlling infection at the beginning of the acute phase and in coordinating innate and adaptive  
75 immune response (35).

76 Since they are present in all tissues, DCs show potential to be the first immune cells to interact with  
77 the pathogen (36). Nevertheless, the DC molecular signature, subtypes and maturation are needed to  
78 provide a precise understanding of these cell functions (37), especially under *T. cruzi* infection.  
79 Recently, it was demonstrated that several subtypes of murine DCs, examined after infection by *T.*  
80 *cruzi*, showed a lower expression of MHC class II when compared to the steady-state (35). A lower  
81 expression of MHC class I and II was also found when human monocyte-derived DCs (MoDCs)  
82 interacted with the parasite (38–41). T cell co-stimulatory molecules CD80, CD86, CD83, and CD40  
83 showed a reduced expression on murine DC surface after infection with different *T. cruzi* strains. On  
84 the other hand, the expression of PD-L1, a molecule that suppresses the proliferation of antigen-specific  
85 T-cells, was decreased (42–44). Regarding cytokine production, in most cases, human and murine

86 models showed an increased production of anti-inflammatory cytokines IL-10, TGF- $\beta$ , and IL-4,  
87 responsible for host susceptibility to parasite infection, and a decreased production of IL-12 and TNF-  
88  $\alpha$ , important protective molecules against the parasite (28,38,39,42–44). Therefore, *T. cruzi* seems to  
89 have the capacity of downregulating the expression of MHC class I and II molecules, co-stimulatory  
90 molecules, and proinflammatory cytokines, modulating host DCs that may help to modulate the  
91 adaptive immune response.

92 Studies on *T. cruzi*-DC interactions and their importance in the establishment of infection are scarce.  
93 In addition, the majority of published investigations are restricted to the murine model, hindering the  
94 capability to elucidate the first immunological events triggered immediately after parasite-human DC  
95 interaction (45). Moreover, data from murine Chagas disease immune response may not be  
96 extrapolated to human infection, which highlights the necessity of comprehending *T. cruzi*-DC  
97 interactions using human leukocytes. To address these goals, we carried out a comparative RNA-  
98 sequencing-based transcriptome analysis of human MoDCs after exposure to MTs vs. non-infected  
99 MoDCs. Analyses of differentially expressed gene (DEG) profiles revealed that *T. cruzi* is able to elicit  
100 a virus-related response in MoDCs. These discoveries open up new perspectives for the pathogenesis  
101 of this disease, with better-elucidated viral infection mechanisms expanding understanding of Chagas  
102 disease.

## 103 **Materials and methods**

### 104 **Parasite**

105 *T. cruzi* CL Brener strain epimastigotes were cultivated in liver infusion tryptose (LIT) medium (46),  
106 pH 7.0, supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 0.1 mg/mL gentamicin  
107 at 28°C. For metacyclogenesis, epimastigotes in final stationary phase were cultivated in triatomine  
108 artificial urine (TAU) medium for 2 h at 28°C as previously described (47). After this period, TAU was  
109 replaced by TAU3AAG medium (TAU medium added with 10 mM L-proline, 10 mM glutamic acid,  
110 2 mM aspartic acid, and 10 mM glucose) and the parasites were cultivated for 6 days at 28°C. Parasites  
111 were harvested and incubated in 100% active FBS (non-heat inactivated) for 24 h to assure residual  
112 epimastigote lysis (48). Epimastigote cellular debris was decanted twice for 2 h and the resulting  
113 swimming MTs were washed thrice in PBS. Clean MTs were resuspended in RPMI 1640. The  
114 differentiated parasites (MTs) were quantified using instant prov stain (NewProv) to visualize the  
115 nucleus and kinetoplast localization.

### 116 **Donors**

117 Donors were composed of 3 male and 3 female individuals between 22-33 years old ( $\bar{x} = 28.3 \pm 2.9$ )  
118 which were not previously infected with *T. cruzi*, as verified by PCR (**Figure S1**) (49). Infection and  
119 vaccination data from each donor were collected in **Table S1**. The study protocol was reviewed and  
120 approved by the Research Ethics Committee from the Medicine Faculty (Comitê de Ética em Pesquisa  
121 da Faculdade de Medicina) – The University of Brasília (CAAE: 54822616.7.0000.5558). Written  
122 informed consent for the work was collected from all subjects.

### 123 **Human MoDCs**

124 Blood was collected from healthy donors and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were  
125 obtained through density gradient centrifugation using Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Monocytes  
126 were then purified from PBMCs using the CD14 microbead human kit (Miltenyi Biotec). Monocytes  
127 recovered from the positive fraction were cultivated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 7 days in a concentration of  
128  $5 \times 10^5$  cells/mL in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated FBS

129 (Gibco), 0.15 mg/mL gentamicin, 0.05 µg/mL of human GM-CSF (Peprotech) and 0.16 µg/mL of  
130 human IL-4 (Peprotech) (34,50). Cytokine stimulus was maintained by replacing 10% of medium every  
131 3-culture days. To evaluate activation/maturation in MoDCs, the three criteria of morphological  
132 changes considered were: size, presence of cytoplasmic prolongations, and non-spherical shape  
133 (36,51,52).

### 134 **MoDCs infection**

135 After DC differentiation,  $5 \times 10^5$  cells/mL were plated in 24-well plates at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and  
136 infected with MTs in a 10:1 MOI for 12 h (final volume: 1.1 mL RPMI 1640). After this period,  
137 infected and control MoDCs were harvested, washed and counted. To estimate the infection rate,  $10^5$   
138 MoDCs were collected and stained with instant prov stain (NEWPROV). A total of 300 cells were  
139 counted in double-blind format, identifying infected cells (infection rate) and amount of intracellular  
140 amastigotes per infected cell. An unpaired Student t-test was used to determine differences in infection  
141 rate, number of amastigotes per infected cell among donors, and activation between Infected and  
142 Control groups (n = 8).

### 143 **Cytokine quantification**

144 After infection, supernatant was collected and stored at -80°C until post-analysis. IL-1β, IL-8, IL-10,  
145 and TNF were measured using a cytometric bead array (CBA) Human Inflammatory Cytokine  
146 Cytometric Bead Array (CBA) - I Kit (BD) and analyzed by flow cytometry using a FACs Verse (BD  
147 Bioscience), following the manufacturer's recommendations. Briefly, 50 µL of a solution containing  
148 the capture beads for each cytokine were mixed with 50 µL of cell culture supernatant and 50 µL of  
149 Human Inflammatory Cytokine PE Detection Reagent. After 3 h of incubation at room temperature,  
150 samples were washed and resuspended in the indicated buffer.

### 151 **RNA extraction**

152 Infected and control MoDCs were harvested and RNA extracted using Trizol reagent (Ambion), as  
153 suggested by the manufacturer's recommendations. The final material was eluted in RNase free water  
154 and RNA integrity was assessed using bioanalyzer (Agilent Technologies). Samples with RINs below  
155 8 were excluded from the transcriptome analysis.

### 156 **RNA-seq**

157 Two replicates from each donor were used to perform transcriptome sequencing at Novogen  
158 (<http://www.novogen.com>) according to their protocols. Briefly, oligo d(T) beads were employed to  
159 perform mRNA enrichment, which were then fragmented randomly and converted into cDNA. Poly(A)  
160 tails were added and enriched by PCR to generate a cDNA library using NEBNext® Ultra™ RNA  
161 Library Prep Kit for Illumina® (NEB, USA). Illumina HiSeq 2500 was used to perform paired-end  
162 sequencing of 150 bp reads. The Illumina sequence reads were analyzed for quality control with  
163 FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), with reads then aligned  
164 simultaneously to the human (Ensembl GRCh38.87) and *T. cruzi* (Ensembl Protists ASM20906v1)  
165 reference genomes using HISAT2 v2.0.6 (53). The aligned files were ordered and indexed using  
166 Samtools v0.1.18 (54) followed by read count calculation using the human genome annotation files of  
167 Ensembl genome build GRCh38.87 and the software HTSeq-count v. 0.6.0 (-m intersection-nonempty)  
168 (55).

### 169 **Transcriptomics analysis**



170 The relationship among Infected and Control biological replicates of donors A, B and C for  
 171 transcriptomes were analyzed through a principal component analysis (PCA) using the ggfortify  
 172 package R (<https://CRAN.R-project.org/package=ggfortify>). Differential expression analysis was  
 173 performed using the DEseq2 package v2.14 from R/Bioconductor (56), comparing infected and control  
 174 samples ( $\text{padj} \leq 0.05$ ). All analyses were performed after exclusion of outliers (based on Clustering),  
 175 leaving at least one representative sample of each donor. Gene ontology enrichment and KEGG  
 176 Pathway analysis were performed using GOSTat (57) and Pathview (58) packages, respectively.  
 177 Heatmaps for z-score of mean fold change by patient were generated using the gplots package in R  
 178 (<https://CRAN.R-project.org/package=gplots>). DEGs were used as input for protein-protein  
 179 interaction (PPI) analysis using the STRING database (<https://string-db.org/>) (59). A confidence score  
 180 of 0.6 was set as a cut-off for protein-protein interaction. The PPI took into account co-expression, co-  
 181 occurrence, and experimental evidence. The generated interaction networks were uploaded in  
 182 Cytoscape 3.8.0 for graphical representation (60). DEGs were assigned as functional groups using GO  
 183 and KEGG databases and specific references.

## 184 Validation

185 For RT-qPCR, cDNA was synthesized from MoDC RNA and amplified using a GoTaq 2 Step RT  
 186 qPCR System (Promega) on a StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystem) and the  
 187 StepOne™ Software v2.3 (Applied Biosystems), following the manufacturer's protocol. *B2M* was used  
 188 as reference gene (61). Specific primers were designed using primer blast  
 189 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)). Designed  
 190 primers: CXCL9-F: 5'-GTGGTGTCTTTTCTCTTGGG, CXCL9-R: 5'-  
 191 CCTTCACATCTGCTGAATCTGG-3', TNSFS18-F: 5'-GAGATCATCCTGGAAGCTGTGG-3',  
 192 TNSFS18-R: 5'-CCAGTCAGACACCTTATTCACG-3', USP18-F: 5'-  
 193 ATCCGGAATGCTGTGGATGG-3', USP18-R: 5'-AGACTCCGTAGATCCAGGAACG-3'.  
 194 Additionally, RT<sup>2</sup> qPCR Primers Cat# PPH02447C, PPH02815F, PPH01325A, PPH05983A, and  
 195 PPH58151A (Qiagen) were used as well. Differential gene expression between Control and Infected  
 196 group treatments was analyzed by the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method (62).

## 197 Statistical analysis

198 All statistical tests were attributed to a  $p\text{-value} \leq 0.05$ . Sample raw data distribution was primarily  
 199 evaluated by the Shapiro-Wilk test to define a statistical test between parametric or non-parametric in  
 200 each experiment. The Unpaired Student t-test was applied to parametric tests when comparing Infected  
 201 and Control groups, and for non-parametric tests, the Wilcoxon test was used. GraphPad Prism 6.01  
 202 was used for calculations ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). The statistical details employed in each experiment  
 203 can be found in the figure legends.

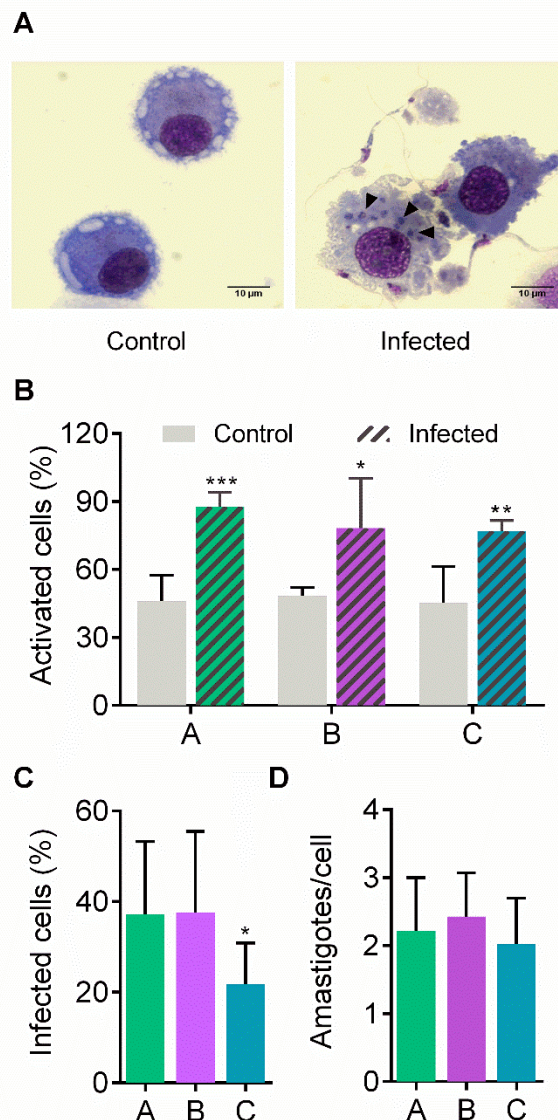
## 204 Data availability

205 The accession number for the transcriptome data reported in this paper is NCBI: GSE158986  
 206 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE158986>).

## 207 Results

### 208 Metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi* CL Brener strain can infect and promote human MoDCs 209 activation

210 MoDCs from six healthy donors were employed to assess their overall transcriptional response to the  
 211 presence of *T. cruzi*. Donor characteristics are shown in **Table S1** and **Figure S1**. The morphological  
 212 changes from peripheral blood monocyte-derived cells, such as cell size increase and the presence of  
 213 cytoplasmic prolongations, were taken into account to confirm MoDC differentiation (**Figure S2A** and  
 214 **S2B**). Additionally, MoDCs were characterized by flow cytometry, with at least 80% of the population  
 215 expressing CD1a, CD80, CD86, and CD206 DC markers. Also, CD11c, HLA-DR were detected, in at  
 216 least 55% of cells (**Figure S2C**). Differentiated MoDCs were placed in contact with *T. cruzi* MTs for  
 217 12 h to simulate an early parasite-host cell contact. This time was sufficient for parasite entry (**Figure**  
 218 **S3, Figure 1A**). The significant morphology change due to the infected condition indicates that  
 219 interaction with the parasite triggered bystander activation in a heterogeneous population (**Figure 1B**).  
 220 Interestingly, MoDCs from donor C were significantly less infected than cells from donors A and B,  
 221 whereas these latter two donors presented a similar infection rate (**Figure 1C**). Despite the difference  
 222 in the infection rate, the three donors exhibited two amastigotes per infected cell, which may be  
 223 associated with 12 h incubation and with DC phagocytic features (**Figure 1D**). Thus, the MT forms of  
 224 CL Brener strain can infect and activate MoDCs, eliciting morphology modifications in the host cell.

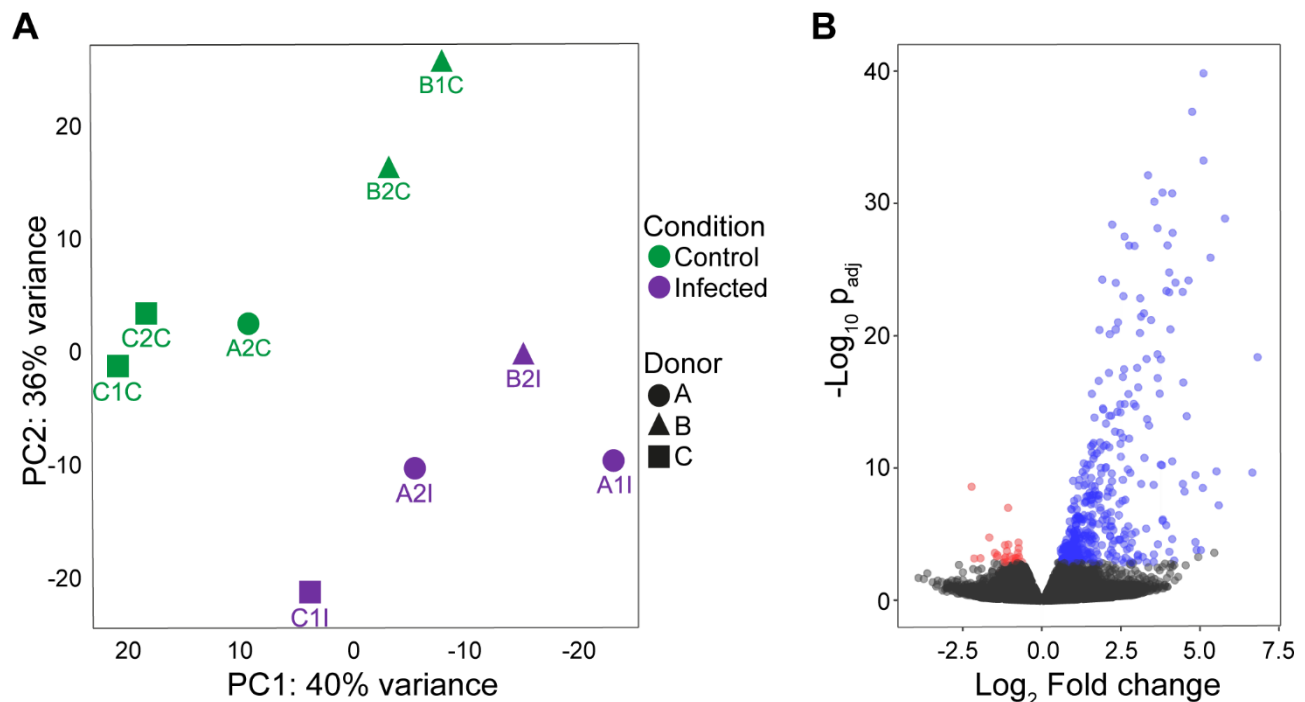


226 **Figure 1. Human MoDCs-*T. cruzi* interaction.** Dendritic cells were infected with metacyclic forms  
 227 of *T. cruzi* for 12 h (A) to determine the percentage of activated cells based on the morphology change  
 228 (B), percentage of infected cells (C), and number of amastigotes per infected cell (D). A, B, and C  
 229 under X axis refer to donors A, B, and C, respectively. Full arrows: intracellular amastigotes. Mean  $\pm$   
 230 SD, n = 8, double-blind count. Normal distribution was confirmed using Shapiro-Wilk test. Unpaired  
 231 t-test was used for comparisons. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, and \*\*\* p < 0.001. Scale bar: 10  $\mu$ m.

232

### 233 *T. cruzi*-infection modulates gene expression in MoDCs

234 RNA-Seq of infected and non-infected MoDCs (used as control) was performed using the Illumina Hi-  
 235 Seq platform. The experiments were carried out in biological duplicates for each group (n = 3 per  
 236 group), with an average of 21 million reads obtained for each set. Since each sample from infected  
 237 cells consisted of a pool of mixed RNAs from MTs and MoDCs, filtered reads were simultaneously  
 238 mapped onto both human and *T. cruzi* genomes to avoid incorrect mapping of parasite genes onto the  
 239 human genome (**Table S2**). From infected samples, 2 to 21% of total reads mapped onto the parasite  
 240 genome. On the other hand, non-infected MoDCs presented less than 0.02% of the total mapped reads  
 241 miss-mapping onto the *T. cruzi* genome (**Table S3**). A total of 16,264 human genes were annotated at  
 242 least once in the samples (**GEO accession GSE158986**), representing more than 76% of the total  
 243 known protein-coding genes in the human genome (63), and indicating high breadth of coverage for  
 244 the transcriptome. A clear separation between infected and control samples was obtained in a principal  
 245 component analysis (PCA) after the removal of three outliers (**Figure 2A**). A total of 468 DEGs were  
 246 identified, with 439 up-regulated and 29 down-regulated (**Figure 2B** and **Table S4**). These results  
 247 show that *T. cruzi* infection modulates the gene expression profile of MoDCs during a simulated first  
 248 contact and that a modulation signature can be observed, despite the natural variation among donors.



249

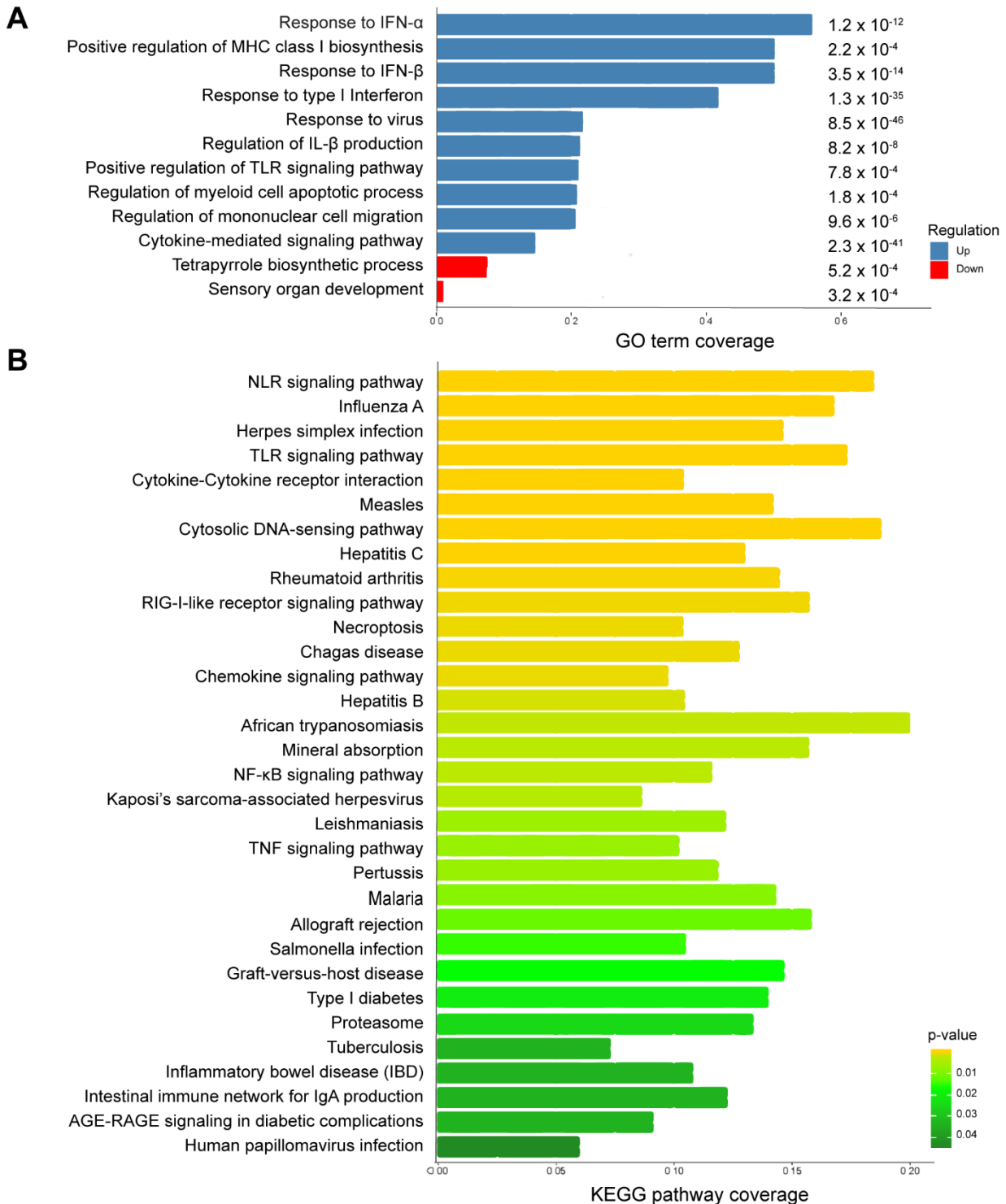
250 **Figure 2. MoDC gene expression profiles during interaction with *T. cruzi* metacyclic forms.** (A)  
 251 Principal component analysis (PCA) to evaluate the relationships between control and infected groups.

252 Magenta: control group and violet: infected group. (B) Volcano plot of expression profiles of both  
253 groups and DEGs ( $p_{adj} \leq 0.05$ ) shown according to regulation. Blue: up-regulated, red: down-regulated  
254 and black: no significant difference. All analyses were performed after excluding outliers.

255

### 256 **Response to virus as the most represented biological function**

257 To identify known cellular processes and functional annotations associated with the transcriptome  
258 presented here, the resulting DEGs were analyzed using Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia  
259 of Genes and Genomes (KEGG) databases. GO enrichment analysis revealed 517 up- and 2 down-  
260 represented terms (**Table S5**). In a more comprehensive analysis, taking into account p-value  $\leq 0.0008$   
261 coverage and non-redundant GO terms, the top 10 up-represented terms were selected (**Figure 3A**).  
262 Response to type I interferon, response to virus, MHC class I processing and some PRRs signaling  
263 were the most important terms among the up-regulated genes. Expression levels of genes encoding  
264 proteins known to be important for inflammasome activation (e.g., RIG-I, IFI16, and AIM2) in  
265 response to virus were significantly enriched (p-value 0.00009). Regarding KEGG enrichment  
266 analysis, 32 differentially regulated pathways were seen among the samples (**Table S6**). Among the  
267 highlighted KEGG terms, multiple PRR signaling pathways were found, including inflammasomes  
268 (NLRs and cytosolic DNA sensors), and disease-specific pathways such as measles, herpes, hepatitis,  
269 leishmaniasis and African trypanosomiasis (**Figure 3B**). Interestingly, viruses were included in 28%  
270 of the KEGG pathways enriched terms. Taken together the enrichment analyses, it seems that antiviral  
271 response may have an important function in the early *T. cruzi* infection.



272

273

274

275

276

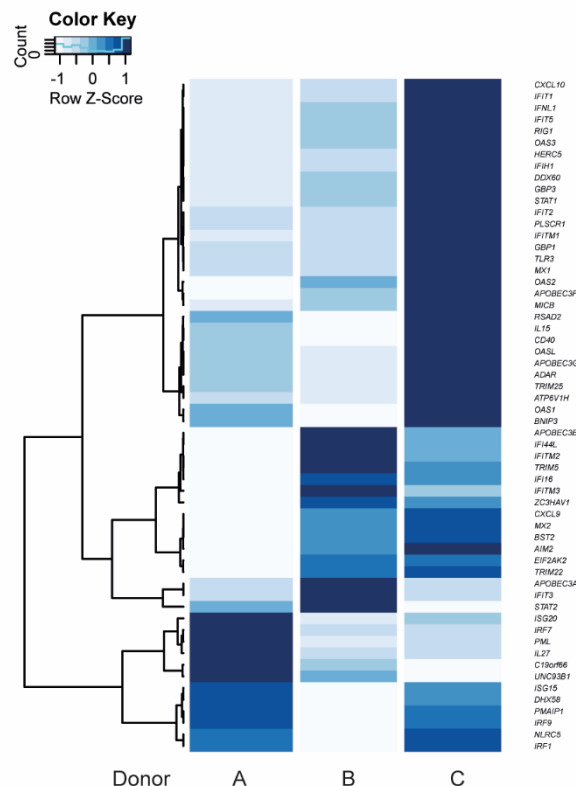
277

**Figure 3. Analysis of biological function in differentially expressed genes between infected and control MoDCs.** (A) A summary of the enriched biological processes from GO is shown as coverage (number of DEGs per total number of genes in each GO term). Blue bars: up-represented processes and red bars: down-represented processes. p-value is displayed at the end of each bar. (B) KEGG enriched pathways are represented as KEGG coverage (DEGs per total number of genes in each KEGG

278 pathway). Bar colors indicate p-values.

279

280 To compare the intra-donor expression pattern from the up-regulated genes belonging to "defense  
 281 response to virus" (GO:0051607) term, a heat map was elaborated (**Figure 4**). Donor C showed an  
 282 above-average expression in 78% of the genes, with the exception of *APOBEC3B*, *IFIT3*, *UNC93B1*,  
 283 *C19orf66*, *IL27*, *PML*, *IRF7*, *ISG20*, and *STAT2*. On the other hand, the latter seven genes were  
 284 expressed above average in donor A, which has an above-average expression in 21% of the genes.  
 285 Donor B presented an above-average expression in 31% of the genes (**Figure 4**, **GEO accession**  
 286 **GSE158986**). Notably, the genes coding for the inflammasome sensor proteins AIM2 and IFI16 were  
 287 expressed above the average in donors B and C, while *RIG-I* was expressed above average only in C.



288

289 **Figure 4. Individual gene expression patterns according to GO terms.** Response to virus is shown  
 290 in a heatmap. Blue color scale: variation of mean fold change from each gene (Z-Score). Every gene  
 291 in the heatmaps was up-regulated in the transcriptome.

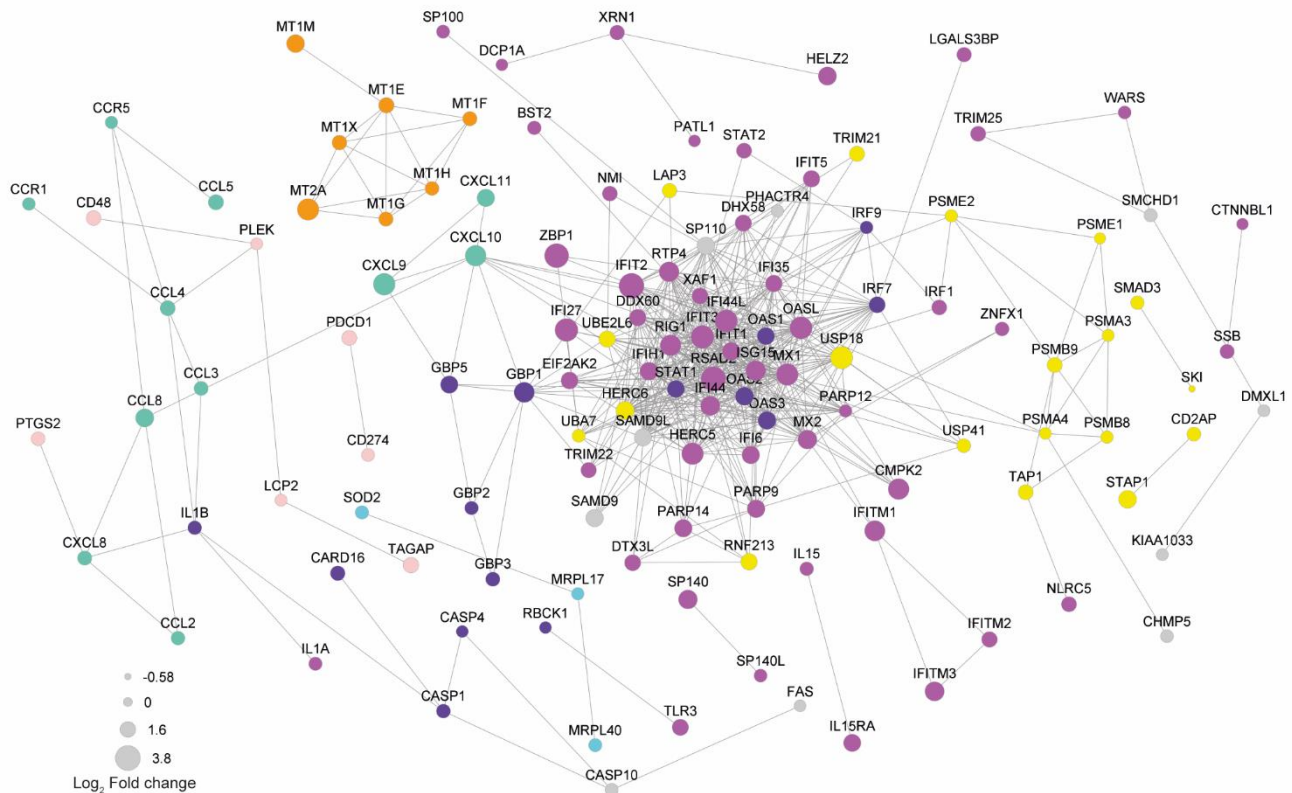
292

### 293 Virus response as a central pathway in the protein-protein interaction network

294 In order to determine biological significance in controlling the magnitude of differential expression of  
 295 each gene, a protein-protein interaction (PPI) network of DEGs was generated using the STRING  
 296 database. After excluding unannotated genes and proteins with no reported interactions, the 126  
 297 proteins participating in the network presented seven consistent functional patterns (**Figure 5**).  
 298 Remarkably, four of them are closely related to virus response: Virus response (magenta), MHC-I  
 299 antigen processing and presentation through ubiquitin-proteasome (yellow), NOD-like receptor  
 300 signaling pathway (violet), and metallothioneins (orange). Moreover, three typical DC functions were



301 up-regulated and highlighted in the PPI network: reactive oxygen species production (cyan),  
 302 lymphocyte recruitment (mint green), and co-stimulation (shell pink). Regarding the virus-related  
 303 response, a direct correlation between fold change and PPI probability (represented by diameter and  
 304 edge length, respectively) was observed. Noteworthy, the top 10 network-hubs: ISG15, IFIT3, MX1,  
 305 RSAD2, STAT1, IFIH1, OASL, IFIT1, IFI44L, and IFI44 belong to the "response to virus" GO term,  
 306 reinforcing that *T. cruzi* may activate a virus-related response in MoDCs. This pattern indicates that  
 307 the differential expression obtained through the transcriptome analysis is not random and supports a  
 308 biological significance for the triggered pathways. Within the PPI network, the virus response pathway  
 309 was connected to NOD-like receptor signaling, lymphocyte recruitment, and MHC-I antigen  
 310 processing and presentation pathways through GBP1, CXCL10, and USP18, respectively.  
 311 Furthermore, CCL4 links the lymphocyte recruitment cluster to the co-stimulation-related proteins.  
 312 Finally, metallothioneins clustered into a single group that presents a strong PPI probability.



313

314 **Figure 5. Protein-protein interaction underlines genes from virus response as network-hubs.**

315 DEGs were used as input for protein-protein interaction (PPI) analysis in STRING database.

316 Magenta ● : virus response (GO:0009615); yellow ● : exogenous antigen processing and presentation

317 (GO:0002479) including proteasome (hsa03050) and ubiquitination/deubiquitination

318 (GO:0016567/GO:0016579); violet ● : NOD-like receptor signaling pathway (hsa04621);

319 mint green ● : chemokine signaling pathway (hsa04602); shell pink ● : lymphocyte co-stimulation;

320 orange ● : metallothioneins related to virus response; cyan ● : protein related to reactive oxygen

321 species. A confidence score of 0.6 was set as a cut-off allowing co-expression, co-occurrence, and

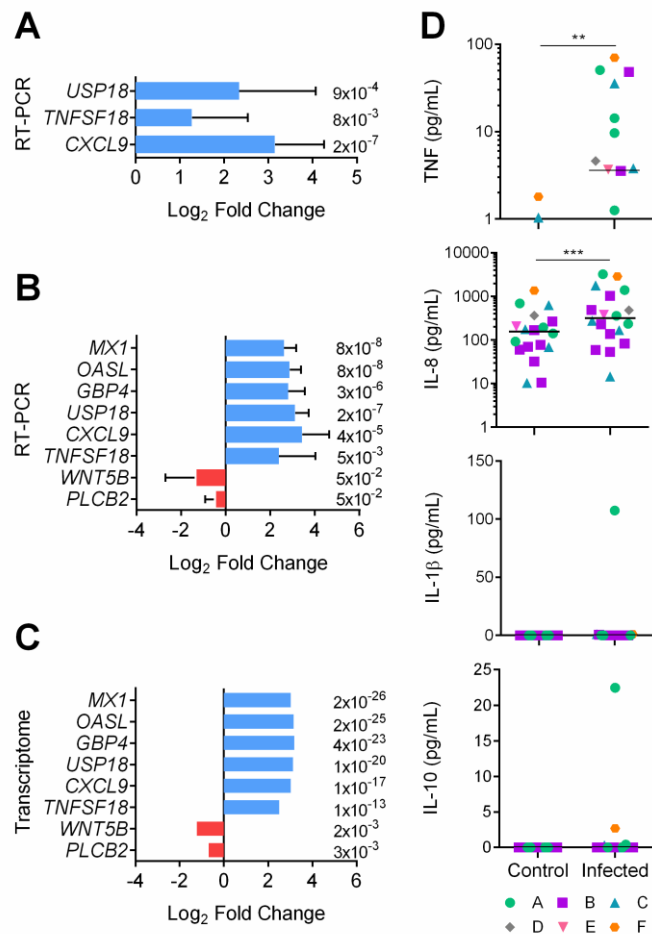
322 experimental as evidences. Edge lengths represent the STRING score of evidence: higher scores reflect

323 shorter lengths.

324

325 **Transcriptome validation**

326 RT-qPCR validation assays were performed for three up-regulated genes chosen from the RNA-seq  
 327 data as being related to the DC function of antigen presentation: *USP18*, *TNFSF18*, *CXCL9*. Three  
 328 independent infections from each donor (A, B and C) were carried out and expression modulation  
 329 evaluated in the selected genes. The analysis of these nine samples presented concordance between  
 330 RNA-seq and RT-qPCR data, thus validating the RNA-seq results (**Figure 6A**). Our next goal was to  
 331 determine if other donors would present the same expression signature found in the transcriptomic data  
 332 demonstrated here. Therefore, MoDCs from three new donors (D, E, and F) were obtained, infected  
 333 with *T. cruzi* and analyzed by RT-qPCR. To reinforce our validation assay, five modulated genes were  
 334 included in this analysis: *MX1*, *OASL*, *GBP4*, *WNT5B*, *PLCB2* (**Figure 6B-C**). These genes were  
 335 selected from Human papillomavirus infection (hsa:05165), Influenza A (hsa:05164) and NOD-like  
 336 receptor signaling (hsa:04621) KEGG pathways, including up- and down-regulated genes. Compatible  
 337 with the previous results, with fold changes and p-values closely related to the transcriptome data, we  
 338 observed concordance between both techniques. Together, these two analyses validate the obtained  
 339 transcriptome among our original three donors, with the same patterns presented.



340  
 341 **Figure 6. Transcript and protein expression levels after MoDCs and *T. cruzi* first contact.**  
 342 Differential expression of genes was confirmed by RT-qPCR. (A) Mean Log<sub>2</sub> Fold change ± SD  
 343 was calculated using *USP18*, *TFSF18*, and *CXCL9* genes from donors A, B, and C in triplicate (n = 9). (B)  
 344 Mean Log<sub>2</sub> Fold change ± SD was calculated using *USP18*, *TFSF18*, *CXCL9*, *WNT5B*, *PLCB2*, *OASL*,  
 345 *MX1*, and *GBP4* genes from the six donors (n = 6). (C) Transcriptome Log<sub>2</sub> Fold change is shown for  
 346 comparisons. Red: down-regulated genes, blue: up-regulated genes. Data from figures A and B present  
 347 a normal distribution according to Shapiro-Wilk test. Unpaired t-test was used for comparisons. p-



348 value is displayed at the end of each bar. (D) Control and infected MoDC culture supernatants were  
 349 collected after 12 h-interaction assays. TNF, IL-8, IL-1 $\beta$ , and IL-10 cytokine concentrations were  
 350 measured using a cytometric bead array kit. Horizontal lines inside the graphics represent median  
 351 values and each point represents a replicate (n = 19). Data from figure D did not present a normal  
 352 distribution according to Shapiro-Wilk test. Significant differences were tested using the Mann  
 353 Whitney test. \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.

354

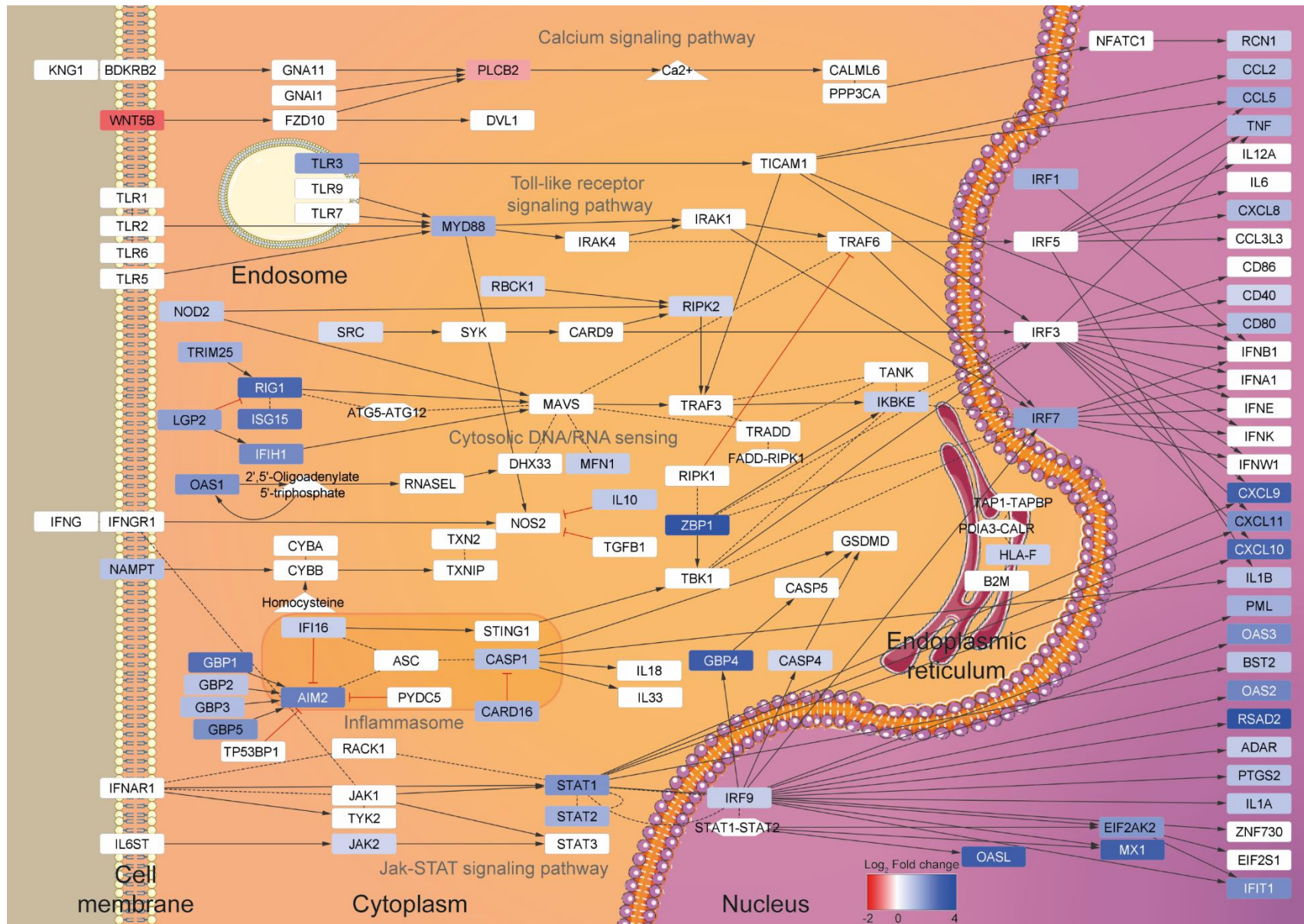
### 355 **Proinflammatory cytokines characterize the early contact between DCs and *T. cruzi***

356 According to the presented transcriptome, cytokine and chemokine genes, such as *TNF*, *IL-1 $\beta$* , *IL-1 $\alpha$* ,  
 357 *IL-15*, and *IL-8*, were up-regulated after the MoDCs-*T. cruzi* interaction. Among the anti-inflammatory  
 358 cytokines, only *IL-10* was up-regulated, with a fold change close to 2 and a q-value of 0.009 (see **Table**  
 359 **S4**). These results provide evidence for a tendency of proinflammatory cytokine production after the  
 360 first 12 h of interaction between DCs and *T. cruzi*. To investigate if the transcriptome-predicted  
 361 proinflammatory milieu is reflected at a protein level, innate immune cytokines were measured in the  
 362 culture supernatants, with a significant increase in the production of TNF and IL-8 observed in the  
 363 infected samples (**Figure 6D**). On the other hand, no significant difference was detected in the  
 364 production of IL-1 $\beta$  and IL-10 (**Figure 6D**).

### 365 **Discussion**

366 Early immunological events on Chagas disease are the result of diverse molecular pathways modulated  
 367 by a combination of *T. cruzi* and host factors, such as secreted and cell surface polymorphic molecules  
 368 (64). In this work, we revealed a set of genes modulated in human dendritic cells after contact with *T.*  
 369 *cruzi* metacyclic forms, since both cells represent the first actors in a natural infection that can affect  
 370 the progress of the disease. It is worth to note that MTs obtained under chemically conditions are  
 371 capable of reproducing the parasite biological behavior (47). Since control MoDCs presented a  
 372 relatively high expression of typical activation markers, morphological change is a useful tool for  
 373 assessing maturation of DCs (36,51,52). Using this approach, a high percentage of morphological  
 374 changes was observed in the MoDCs, indicating bystander activation after contact with the parasite  
 375 (65–68), and a similar infection rate to those seen in other studies (39,40). A mixed gene expression  
 376 profile from bystander and infection activation in MoDCs is the expected scenario in the initial stage  
 377 of natural infection when not every cell is infected or mature (35).

378 Using this RNA-seq approach, we identified 468 DEGs from 3 healthy female donors that shared a  
 379 gene expression pattern. Our main finding was that, during the initial contact with *T. cruzi*, MoDCs  
 380 trigger a response similar to that of a viral infection, including expression of several type I interferon-  
 381 induced genes derived from JAK/STAT signaling pathway (69,70) and viral inflammasome activation  
 382 (**Figure 7**). Transcriptome analyses using human foreskin fibroblasts infected by Y strain (71) or  
 383 Sylvio strain (72) blood trypomastigotes showed induction of cytokine production and enhanced  
 384 expression of type I interferon-inducible genes. These two studies corroborate our results regarding the  
 385 activation of a viral response in human cells infected by *T. cruzi*, although they did not explore those  
 386 findings. The immune aspect was explored using human monocyte-derived macrophages infected by  
 387 two *Leishmania* species (73). In this case, the results were filtered for phagocytosis-related genes, and  
 388 among the up-regulated genes, inflammatory IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF cytokines, and metallothionein 1  
 389 family members were highlighted. Additionally, 16 of the 39 KEGG enriched pathways observed after  
 390 *Leishmania* infection are identical to those obtained in our study, including herpes simplex, hepatitis  
 391 C and B, influenza A virus, and measles pathways (73).



393 **Figure 7. Summary of the regulated pathways during DCs-*T. cruzi* first contact.** A view of the  
394 gene expression patterns was generated using the transcriptome data and the enriched KEGG pathways  
395 as input for BioNSi in Cytoscape v.3.8.0. The KEGG pathways (named in grey) are displayed  
396 according to the transcriptome Log<sub>2</sub> Fold change scale (blue: up-regulated genes, red: down-regulated  
397 genes) and cellular localization.

398

399 Currently, the immune response to viruses is well elucidated, and it is known that besides limiting viral  
400 replication (74), type I IFN regulates the activation of NK cytotoxic function (75), synergizes with  
401 TNF to induce iNOS in macrophages (76), and induces DC maturation (77). Notwithstanding, there  
402 are no studies that associate human Chagas disease acute phase and type I interferon-inducible genes  
403 or that directly correlate the host response during the parasite infection with a virus-like response. Only  
404 a few studies using the murine model have shown the importance of type I IFNs during parasite  
405 infection. For instance, mouse NK cells lacking IFN- $\alpha/\beta$  receptor were unable to activate their  
406 cytotoxic function (78), and murine macrophages seem to need type I IFN co-stimulation for nitric  
407 oxide production (79). Also, MyD88/TRIF deficient mice did not produce IFN- $\beta$  and could not control  
408 *T. cruzi* proliferation (80). Interestingly, type I IFN released at the parasite inoculation site seems to be  
409 strain-dependent, since less infective strains were incapable of triggering the cytokine production (81).

410 Similar to antiviral pathways, inflammasome activation has been widely studied in mammal models,  
411 revealing a fundamental role in signal transduction and pyroptosis, a proinflammatory form of cell  
412 death (82). Among the inflammasome sensor proteins, NOD1, NOD2 and NLRP3 have been studied  
413 in the host-*T. cruzi* context, with apparent contradictory results regarding their effective roles in the  
414 protection against infection (83–86). Interestingly, we have identified up-regulation of the virus-related  
415 IFI16, RIG-I and AIM2 sensor proteins, which are known to drive the maturation and secretion of IL-  
416 1 $\beta$  after foreign RNA/DNA recognition (87–89). In *Plasmodium berghei* and *Aspergillus fumigatus*,  
417 AIM2 and NLRP3 may function in a redundant manner to trigger inflammasome activation and,  
418 consequently, aid in pathogen infection control (90,91). Additionally, in *Leishmania* and *Toxoplasma*,  
419 inflammasome activation can lead to parasite clearance, host susceptibility or even an exacerbated  
420 immune response (92). Nevertheless, the role of inflammasomes and their relationship to Chagas  
421 disease need to be further explored.

422 According to our PPI analysis, the genes belonging to virus response show robust evidence for  
423 interaction, operating as hubs in the network (**Figure 5**, magenta), and indicating the importance of  
424 this pathway during the early *T. cruzi* infection. Moreover, other enriched pathways in the PPI network  
425 are also closely related to virus response. For example, viral antigens are usually presented to T  
426 lymphocytes by MHC-I molecules after ubiquitin-proteasome degradation (**Figure 5**, yellow) (93).  
427 Equally, metallothioneins (**Figure 5**, orange) are reported to be modulated during viral infection or  
428 cytokine stimulus, regulating host metal ion release, redox status, enzymatic function, and cell  
429 signaling (94). Additionally, reactive oxygen species production (**Figure 5**, cyan) and T lymphocyte  
430 recruitment and co-stimulation (**Figure 5**, mint green and shell pink, respectively) are known to be  
431 essential processes in both viral and *T. cruzi* infection (95–98).

432 Inflammatory cytokines such as IL-8, TNF, IL-12, and IL-1 $\beta$ , are the typical cocktail (99) that  
433 contribute to *T. cruzi* elimination (10,43,84,100,101). Looking at the secreted set of cytokines after 12  
434 h of MoDCs-*T. cruzi* metacyclic interaction, an increment of IL-8 and TNF were detected as early  
435 products of gene transcription, while IL-12 expression did not change at transcriptional or protein level.  
436 MoDCs presented a reduced production of IL-12 and TNF- $\alpha$  after 24 h of infection with the

437 Tehuantepec strain (39), while BM-DCs showed diminished IL-12 secretion but higher IL-10  
438 production 24 h post-infection (102). On the other hand, IL-10 and IL-1 $\beta$  transcripts were up-regulated,  
439 but these proteins were not detected in culture supernatants. In the case of IL-1 $\beta$ , CARD16, a protein  
440 reported as an inhibitor of the caspase-1 activation, was found up-regulated at the transcriptional level  
441 (103,104). Without caspase-1 activity, pro-IL-1 $\beta$  is not cleaved into an active IL-1 $\beta$ , which could be  
442 one of the reasons for its absence in culture supernatants. Concerning IL-10, it is classically produced  
443 upon activation of type I-IFN response (105), and also induced through NOD2, here up-regulated,  
444 along with TLRs (106–110). However, IL-10 transcript contains multiple copies of destabilizing motifs  
445 and its stability is affected by several factors, including IL-10 itself (111–113), which could explain a  
446 rapid IL-10 transcription but a short-lasting or even null secretion.

447 Despite the viral-related response being common among the donors, donor C showed the lowest  
448 infection rates, and this is probably related to the set of genes that were expressed above or below  
449 average in this donor. Nevertheless, the high variations among experiments in the human model make  
450 the evaluation of these differences difficult at the transcript or protein level. Within the "defense  
451 response to virus" GO term, donor C showed an above-average expression in 45 of the 58 total  
452 regulated genes. This stronger expression in the virus response genes could be the explanation for the  
453 lower infection in donor C. Given the supposed importance of a viral immune response during the  
454 host's first contact with the parasite, one could hypothesize that donor C's longer history of viral  
455 immunizations may confer some form of protection against *T. cruzi* infection. This type of nonspecific  
456 protection, provided by commercial vaccines, has recently been explored and is known as trained innate  
457 immunity, where epigenetic changes in innate immune cells can be observed after vaccination and may  
458 prepare them to respond to a different pathogen (114,115).

459 To validate the transcriptome and increase the studied individuals, some relevant regulated genes were  
460 selected. CXCL9 (fold change = 8.1) is a chemokine mainly produced by monocytes, epithelial cells,  
461 fibroblasts and tumor cells, which attracts T lymphocytes to the infection site (116). TNFSF18 (fold  
462 change = 5.7) is a molecule mainly expressed by antigen-presenting cells that enhances DC and  
463 lymphocyte activation (117). USP18 (fold change = 8.7) is a cysteine protease that negatively regulates  
464 type I IFN signaling, promoting CD11b<sup>+</sup> DC differentiation (118). Then, these three proteins seem to  
465 be important during early infection, when DCs need to differentiate to present antigens and recruit T  
466 cells, and they were consistently more expressed in the infected MoDCs from six donors. Additionally,  
467 the regulation of *GBP4*, *MX1*, *OASL*, *PLCB2* and *WNT5B*, genes related to the virus response, was  
468 consistent among the donors. GBP4 (fold change = 9.2) is a IFN- $\gamma$  inducible GTPase containing a C-  
469 terminal domain that enable inflammasome activation to eliminate intracellular bacteria and virus  
470 (119–121). MX1 (fold change = 8) is also a GTPase that blocks viral replication, and is widely studied  
471 in the Influenza infection (122,123). OASL (fold change = 8.9) is a type I IFN inducible protein that  
472 inhibits viral replication during the early phase of infection by degrading viral RNA (124,125).  
473 Therefore, our data show that virus-related inflammasome induction is important during the first  
474 contact between DCs and *T. cruzi*, and this response is more similar to that directed to RNA viruses.  
475 On the other hand, *PLCB2* (fold change = - 0.6) and *WNT5B* (fold change = - 0.4) were down-  
476 regulated in transcriptional levels. WNT5B is correlated with hematopoietic/bone marrow cell  
477 differentiation GM-CSF-induced and to proinflammatory cytokine regulation during infections  
478 (126,127). PLCB2 negatively regulates the proinflammatory response produced by viral infections  
479 (128). Down-regulated expression of *WNT5B* and *PLCB2* was expected. Further studies are required  
480 to test if other strains of *T. cruzi* up-regulate the same gene set, or if a strain of different infection  
481 capacity will induce different gene expression patterns that can be associated with pathogeny.

482 A vast range of pathogens, from viruses to multicellular parasites, may also shape DC metabolism and  
 483 immune functions leading towards a tolerogenic phenotype. Hepatitis C virus (HCV) NS3 and HCV  
 484 core proteins can inhibit DC differentiation via an IL-10 induction (129). Moreover, DCs recovered  
 485 from patients infected with hepatitis B virus exhibited decreased antigen-presenting, migration, and  
 486 cytokine production capacity (130). Human DC exposure to *Mycobacterium tuberculosis* resulted in  
 487 the downregulation of CD11a, CD11b, and CD18 expression with compromised DC adherence to  
 488 endothelial cells and migration toward a chemokine gradient (131). Finally, *Plasmodium falciparum*  
 489 binds to the surface of myeloid DCs and deeply reduces the expression of MHC class II, CD83 and  
 490 CD86 co-stimulatory molecules, and maturation of DCs (132). However, the delimited conditions  
 491 (in vitro, 12h after infection, parasite strain, DC subset) in which we carried out our tests do not allow  
 492 us to conclude whether the antiviral response will be exclusively to the detriment or the benefit of the  
 493 parasite.

494 In conclusion, our transcriptome has brought to light virus response as an important and unexplored  
 495 process during the first hours of *T. cruzi*-host interaction. These discoveries open up new perspectives  
 496 for the study of this disease, with better-elucidated viral infection mechanisms expanding current  
 497 knowledge. Future work regarding the role of the type I interferon-induced genes for antigen  
 498 presentation and T lymphocyte activation should be conducted to elucidate the immune response  
 499 against *T. cruzi* and disease progression.

## 500 **Conflict of Interest**

501 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial  
 502 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## 503 **Author Contributions**

504 Conceptualization N.G-J., A.P.R., F.N.M., I.B., J.M.S.; Methodology N.G-J., A.P.R., T.R., F.N.M.,  
 505 C.F., M.B., I.B., J.M.S.; Software T.R., N.G-J.; Formal Analysis N.G-J., A.P.R., T.R.; Investigation  
 506 N.G-J., A.P.R.; Resources C.F., I.B., J.M.S.; Data Curation N.G-J., A.P.R., T.R.; Writing – Original  
 507 Draft N.G-J., A.P.R., F.N.M.; Writing – Review & Editing N.G-J., F.N.M., T.R., C.F., M.B., I.B.,  
 508 J.M.S.; Visualization N.G-J., I.B.; Supervision C.F., M.B., I.B., J.M.S.; Funding Acquisition I.B.,  
 509 J.M.S.

## 510 **Funding**

511 This work was supported by grants and fellowships awarded by the Fundação de Amparo à Pesquisa  
 512 do Distrito Federal (FAP-DF, 0193.001803/2017 and 0193.001485/2017), Coordenação de  
 513 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, grant 923/18 CAPES-COFECUB), Conselho  
 514 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, INCT-MCTI/CNPq/FAPs 16/2014).  
 515 N.G-J. and A.P.R. received scholarships from CNPq and CAPES. The funders had no role in study  
 516 design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

## 517 **Acknowledgments**

518 The authors thank the Program for Technological Development of Tools for Health-PDTIS-Fiocruz  
 519 for use of its facilities (Bioinformatics Platform - Fiocruz Minas). We also thank Professors Concepta  
 520 Macmanus Pimentel and Robert Miller, The University of Brasilia, for reading the manuscript.

## 521 **References**



- 522 1. WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). (2020) Available at:  
523 <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#>
- 524 2. PAHO. Chagas in the Americas for Public Health Workers. (2017). Available at:  
525 <https://www.paho.org/en/documents/chagas-americas-public-health-workers-2017>
- 526 3. WHO. Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2018. (2018).  
527 Available at: [https://www.who.int/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-](https://www.who.int/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b_2)  
528 [cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b_2)
- 529 4. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world  
530 health problem. *Acta Trop* (2010) **115**:14–21. doi:10.1016/j.actatropica.2009.11.003
- 531 5. Imai K, Maeda T, Sayama Y, Osa M, Mikita K, Kurane I, Miyahira Y, Kawana A, Miura S.  
532 Chronic Chagas disease with advanced cardiac complications in Japan: Case report and literature  
533 review. *Parasitol Int* (2015) **64**:240–242. doi:10.1016/j.parint.2015.02.005
- 534 6. Rios LE, Vázquez-Chagoyán JC, Pacheco AO, Zago MP, Garg NJ. Immunity and vaccine  
535 development efforts against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* (2019) **200**:105168.  
536 doi:10.1016/j.actatropica.2019.105168
- 537 7. Rassi AJ, Rassi A, Marcondes De Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease).  
538 *Infect Dis Clin North Am* (2012)275–291. doi:10.1016/j.idc.2012.03.002
- 539 8. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* (2010) **375**:1388–1402.  
540 doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- 541 9. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med* (2015) **373**: doi:10.1056/NEJMc1510996
- 542 10. Andrade D V., Gollob KJ, Dutra WO. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an  
543 Old Neglected Disease. *PLoS Negl Trop Dis* (2014) **8**:e3010. doi:10.1371/journal.pntd.0003010
- 544 11. Bonney KM, Engman DM. Autoimmune pathogenesis of chagas heart disease: Looking back,  
545 looking ahead. *Am J Pathol* (2015) doi:10.1016/j.ajpath.2014.12.023
- 546 12. Chagas C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do  
547 *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem*  
548 *Inst Oswaldo Cruz* (1909) **1**:159–218. doi:10.1590/S0074-02761909000200008
- 549 13. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis* (2012)  
550 **54**:845–852. doi:10.1093/cid/cir956
- 551 14. Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst*  
552 *Oswaldo Cruz* (2009) **104**:101–107. doi:10.1590/S0074-02762009000900015
- 553 15. de Lana M, Marques E, Machado DM. *Biology of Trypanosoma cruzi and Biological Diversity*.  
554 First Edit. Elsevier Inc. (2010). doi:10.1016/B978-0-12-384876-5.00014-9
- 555 16. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet* (2018) **391**:82–94. doi:10.1016/S0140-  
556 6736(17)31612-4

- 557 17. Monteon V. *Trypanosoma cruzi*: the early contact between insect-derived metacyclic  
558 trypomastigotes and the mammalian cells. *Ann Parasitol* (2019) **65**:193–204.  
559 doi:10.17420/ap6503.201
- 560 18. Giordano R, Fouts DL, Tewari D, Colli W, Manning JE, Alves MJM. Cloning of a surface  
561 membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive  
562 properties to laminin. *J Biol Chem* (1999) **274**:3461–3468. doi:10.1074/jbc.274.6.3461
- 563 19. Scharfstein J, Schmitz V, Morandi V, Capella MMA, Lima APCA, Morrot A, Juliano L, Müller-  
564 Esterl W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin  
565 B2 receptors. *J Exp Med* (2000) **192**:1289–1299. doi:10.1084/jem.192.9.1289
- 566 20. Turner CW, Lima MF, Villalta F. *Trypanosoma cruzi* uses a 45-kDA mucin for adhesion to  
567 mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2002) **290**:29–34.  
568 doi:10.1006/bbrc.2001.6189
- 569 21. Herrera EM, Ming M, Ortega-Barria E, Pereira ME. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion  
570 by heparan sulfate receptors on host cells and penetrin counter-receptors on the trypanosomes.  
571 *Mol Biochem Parasitol* (1994) **65**:73–83. doi:10.1016/0166-6851(94)90116-3
- 572 22. Alves M, Colli W. “Role of the gp85/Trans-Sialidase Superfamily of Glycoproteins in the  
573 Interaction of *Trypanosoma cruzi* with Host Structures,” in *Molecular Mechanisms of Parasite*  
574 *Invasion*, 58–69. doi:10.1007/978-0-387-78267-6\_4
- 575 23. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting Edge: TLR9  
576 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in  
577 *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol* (2006) **177**:3515–3519.  
578 doi:10.4049/jimmunol.177.6.3515
- 579 24. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith  
580 JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. Activation of Toll-like receptor-2 by  
581 glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* (2001) **167**:416–  
582 423. doi:10.4049/jimmunol.167.1.416
- 583 25. Calderón J, Maganto-Garcia E, Punzón C, Carrión J, Terhorst C, Fresno M. The receptor Slamf1  
584 on the surface of myeloid lineage cells controls susceptibility to infection by *Trypanosoma cruzi*.  
585 *PLoS Pathog* (2012) **8**: doi:10.1371/journal.ppat.1002799
- 586 26. Medeiros MM, Peixoto JR, Oliveira A-C, Cardilo-Reis L, Koatz VLG, Van Kaer L, Previato  
587 JO, Mendonça-Previato L, Nobrega A, Bellio M. Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent  
588 proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL)  
589 from *Trypanosoma cruzi*. *J Leukoc Biol* (2007) **82**:488–496. doi:10.1189/jlb.0706478
- 590 27. Schmitz V, Almeida LN, Svensjö E, Monteiro AC, Köhl J, Scharfstein J. C5a and bradykinin  
591 receptor cross-talk regulates innate and adaptive immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *J*  
592 *Immunol* (2014) **193**:3613–23. doi:10.4049/jimmunol.1302417
- 593 28. Poncini C V., Giménez G, Pontillo CA, Alba-Soto CD, de Isola ELD, Piazzón I, González Cappa  
594 SM. Central role of extracellular signal-regulated kinase and Toll-like receptor 4 in IL-10  
595 production in regulatory dendritic cells induced by *Trypanosoma cruzi*. *Mol Immunol* (2010)

- 596           **47**:1981–1988. doi:10.1016/j.molimm.2010.04.016
- 597   29.   Araujo FF, Gomes JAS, Rocha MOC, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJF, Correa-  
598   Oliveira R. Potential role of CD4 +CD25 HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas  
599   disease. *Front Biosci* (2007) **12**: doi:10.2741/2273
- 600   30.   Souza PEA, Rocha MOC, Rocha-Vieira E, Menezes CAS, Chaves ACL, Gollob KJ, Dutra WO.  
601   Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display  
602   distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun*  
603   (2004) **72**:5283–5291. doi:10.1128/IAI.72.9.5283-5291.2004
- 604   31.   de Araújo FF, Corrêa-Oliveira R, Rocha MOC, Chaves AT, Fiuza JA, Fares RCG, Ferreira KS,  
605   Nunes MCP, Keesen TS, Damasio MPS, et al. Foxp3 +CD25 high CD4 + regulatory T cells  
606   from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines  
607   and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology* (2012) **217**:768–777.  
608   doi:10.1016/j.imbio.2012.04.008
- 609   32.   Dutra WO, Menezes CAS, Magalhães LMD, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human  
610   Chagas disease. *Parasite Immunol* (2015) **36**:377–387. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate
- 611   33.   Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob K, Teixeira M, Factor SM, Weiss LM, Nagajyothi F,  
612   Herbert B. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis  
613   os Chagas disease. *Semin Immunopathol* (2013) **34**:753–770. doi:10.1007/s00281-012-0351-  
614   7.Current
- 615   34.   Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human  
616   Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor Plus  
617   Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor-alpha. *J Exp Med* (1994) **179**:1109–  
618   1118. Available at: <http://jem.rupress.org/content/179/4/1109.full.pdf>
- 619   35.   Poncini C V., González-Cappa SM. Dual role of monocyte-derived dendritic cells in  
620   *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur J Immunol* (2017) **47**:1936–1948. doi:10.1002/eji.201646830
- 621   36.   Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, Pulendran B, Palucka K.  
622   Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* (2000) **18**:767–811.  
623   doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767
- 624   37.   Amigorena S. Dendritic Cells on the Way to Glory. *J Immunol* (2018) **200**:885–886.  
625   doi:10.4049/jimmunol.1701693
- 626   38.   Brodskyn C, Patricio J, Oliveira R, Lobo L, Arnholdt A, Mendonça-previato L, Barral A, Barral-  
627   netto M. Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* Interfere with Macrophages and  
628   Dendritic Cell Responses. *Infect Immun* (2002) **70**:3736–3743. doi:10.1128/IAI.70.7.3736–  
629   3743.2002
- 630   39.   Van Overtvelt L, Vanderheyde N, Verhasselt V, Ismaili J, De Vos L, Goldman M, Willems F,  
631   Vray B. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation:  
632   inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect Immun* (1999) **67**:4033–  
633   4040. doi:10.1128/IAI.67.8.4033-4040.1999



- 634 40. Van Overtvelt L, Andrieu M, Verhasselt V, Connan F, Choppin J, Vercruyssen V, Goldman M,  
635 Hosmalin A, Vray B. *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC  
636 class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8 + T  
637 lymphocytes. *Int Immunol* (2002) **14**:1135–1144. doi:1135-1144 doi:10.1093/intimm/14.11.1135
- 638 41. Mendes MT, Carvalho-Costa TM, Da Silva MV, Anê ACBM, Guimarães RM, Da Costa TA,  
639 Ramirez LE, Rodrigues V, Oliveira CJF. Effect of the saliva from different triatomine species  
640 on the biology and immunity of TLR-4 ligand and *Trypanosoma cruzi*-stimulated dendritic cells.  
641 *Parasites and Vectors* (2016) **9**: doi:10.1186/s13071-016-1890-x
- 642 42. Barbosa CG, Carvalho Costa TM, Desidério CS, Ferreira PTM, Silva MDO, Hernández CG,  
643 Santos MM, Trevisan RO, Bovi WG, Rodrigues V, et al. *Trypanosoma cruzi* mexican strains  
644 differentially modulate surface markers and cytokine production in bone marrow-derived  
645 dendritic cells from C57BL/6 and BALB/c Mice. *Mediators Inflamm* (2019) **2019**:  
646 doi:10.1155/2019/7214798
- 647 43. da Costa TA, Silva MV, Mendes MT, Carvalho-Costa TM, Batista LR, Lages-Silva E,  
648 Rodrigues V, Oliveira CJ, Ramirez LE. Immunomodulation by *Trypanosoma cruzi* : Toward  
649 Understanding the Association of Dendritic Cells with Infecting TcI and TcII Populations. *J*  
650 *Immunol Res* (2014) **2014**:1–12. doi:10.1155/2014/962047
- 651 44. Planelles L, Thomas MC, Marañón C, Morell M, López MC. Differential CD86 and CD40 co-  
652 stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs  
653 from resistant or susceptible mice. *Clin Exp Immunol* (2003) **131**:41–7. doi:10.1046/j.1365-  
654 2249.2003.02022.x
- 655 45. Gil-Jaramillo N, Motta FN, Favali CBF, Bastos IM, Santana JM. Dendritic cells: a double-edged  
656 sword in immune responses during Chagas Disease. *Front Microbiol* (2016) **7**:  
657 doi:10.3389/fmicb.2016.01076
- 658 46. Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic  
659 trypanosomes in liquid media. *Rev do Inst Med Trop São Paulo* (1964) **6**:93–100.
- 660 47. Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. *In vitro* differentiation of  
661 *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* (1985)  
662 **16**:315–327. doi:10.1016/0166-6851(85)90073-8
- 663 48. Canavaci AMC, Bustamante JM, Padilla AM, Perez Brandan CM, Simpson LJ, Xu D, Boehlke  
664 CL, Tarleton RL. *In vitro* and *in vivo* high-throughput assays for the testing of anti-*Trypanosoma*  
665 *cruzi* compounds. *PLoS Negl Trop Dis* (2010) **4**:e740. doi:10.1371/journal.pntd.0000740
- 666 49. Moser DR, Kirchhoff L V., Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA  
667 amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* (1989) **27**:1477–1482.  
668 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC267598/pdf/jcm00067-0069.pdf>
- 669 50. Ebstein F, Lange N, Urban S, Seifert U, Krüger E, Kloetzel PM. Maturation of human dendritic  
670 cells is accompanied by functional remodelling of the ubiquitin-proteasome system. *Int J*  
671 *Biochem Cell Biol* (2009) **41**:1205–1215. doi:10.1016/j.biocel.2008.10.023
- 672 51. Pereira SR, Faça VM, Gomes GG, Chammas R, Fontes AM, Covas DT, Greene LJ. Changes in

- 673 the proteomic profile during differentiation and maturation of human monocyte-derived  
674 dendritic cells stimulated with granulocyte macrophage colony stimulating factor/interleukin-4  
675 and lipopolysaccharide. *Proteomics* (2005) **5**:1186–1198. doi:10.1002/pmic.200400988
- 676 52. Kiama SG, Cochand L, Karlsson L, Nicod LP, Gehr P. Evaluation of phagocytic activity in  
677 human monocyte-derived dendritic cells. *J Aerosol Med* (2001) **14**:289–299.  
678 doi:10.1089/089426801316970240
- 679 53. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: A fast spliced aligner with low memory  
680 requirements. *Nat Methods* (2015) **12**:357–360. doi:10.1038/nmeth.3317
- 681 54. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R.  
682 The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* (2009) **25**:2078–2079.  
683 doi:10.1093/bioinformatics/btp352
- 684 55. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq – A Python framework to work with high-throughput  
685 sequencing data HTSeq – A Python framework to work with high-throughput sequencing data.  
686 *Bioinformatics* (2014) **31**:0–5. doi:10.1093/bioinformatics/btu638
- 687 56. Love MI, Anders S, Huber W. *Differential analysis of count data - the DESeq2 package*. (2014).  
688 doi:110.1186/s13059-014-0550-8
- 689 57. Beißbarth T, Speed TP. GStat: Find statistically overrepresented Gene Ontologies with a group  
690 of genes. *Bioinformatics* (2004) **20**:1464–1465. doi:10.1093/bioinformatics/bth088
- 691 58. Luo W, Brouwer C. Pathview: An R/Bioconductor package for pathway-based data integration  
692 and visualization. *Bioinformatics* (2013) **29**:1830–1831. doi:10.1093/bioinformatics/btt285
- 693 59. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT,  
694 Roth A, Bork P, et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein  
695 association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* (2017) **45**:D362–D368.  
696 doi:10.1093/nar/gkw937
- 697 60. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B,  
698 Ideker T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular  
699 Interaction Networks Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of  
700 Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res* (2003)2498–2504. doi:10.1101/gr.1239303
- 701 61. Plaisier CL, Horvath S, Huertas-Vazquez A, Cruz-Bautista I, Herrera MF, Tusie-Luna T,  
702 Aguilar-Salinas C, Pajukanta P. A Systems Genetics Approach Implicates USF1, FADS3, and  
703 Other Causal Candidate Genes for Familial Combined Hyperlipidemia. *PLoS Genet* (2009)  
704 **5**:e1000642. doi:10.1371/journal.pgen.1000642
- 705 62. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative  
706 PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* (2001) **25**:402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- 707 63. Willyard C. New human gene tally reignites debate. *Nature* (2018) **558**:354–355. Available at:  
708 <https://www.nature.com/articles/d41586-018-05462-w> [Accessed June 15, 2020]
- 709 64. Covarrubias C, Cortez M, Ferreira D, Yoshida N. Interaction with host factors exacerbates

- 710 *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. *Int J Parasitol* (2007) **37**:1609–  
711 1616. doi:10.1016/j.ijpara.2007.05.013
- 712 65. Mosca W, Briceño L. Proliferation and bystander suppression induced by membrane and  
713 flagellar antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Invest Clin* (2009) **50**:77–87. Available at:  
714 <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=372937675009>
- 715 66. De Bona E, Lidani KCF, Bavia L, Omidian Z, Gremski LH, Sandri TL, de Messias Reason IJ.  
716 Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy?  
717 *Front Immunol* (2018) **9**:1–8. doi:10.3389/fimmu.2018.01842
- 718 67. Rodriguez P, Carlier Y, Truyens C. *Trypanosoma cruzi* activates cord blood myeloid dendritic  
719 cells independently of cell infection. *Med Microbiol Immunol* (2012) **201**:287–296.  
720 doi:10.1007/s00430-012-0230-9
- 721 68. Magalhães LMD, Viana A, Chiari E, Galvão LMC, Gollob KJ, Dutra WO. Differential  
722 Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*.  
723 *PLoS Negl Trop Dis* (2015) **9**:e0003816. doi:10.1371/journal.pntd.0003816
- 724 69. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, Rice CM. A diverse  
725 array of gene products are effectors of type I Interferon Antiviral Response. *Nature* (2011)  
726 **472**:481–485. doi:10.1038/nature09907
- 727 70. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* (2014)  
728 **14**:36–49. doi:10.1038/nri3581
- 729 71. Li Y, Shah-Simpson S, Okrah K, Belew AT, Choi J, Caradonna KL, Padmanabhan P, Ndegwa  
730 DM, Temanni MR, Corrada Bravo H, et al. Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi*  
731 and Human Cells during Intracellular Infection. *PLOS Pathog* (2016) **12**:e1005511.  
732 doi:10.1371/journal.ppat.1005511
- 733 72. Houston-Ludlam GA, Belew AT, El-Sayed NM. Comparative transcriptome profiling of human  
734 foreskin fibroblasts infected with the Sylvio and y strains of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*  
735 (2016) **11**:1–15. doi:10.1371/journal.pone.0159197
- 736 73. Fernandes MC, Dillon LAL, Belew AT, Corrada Bravo H, Mosser DM, El-Sayed NM. Dual  
737 Transcriptome Profiling of *Leishmania*-infected human macrophages reveals distinct  
738 reprogramming signatures. *MBio* (2016) **7**:1–16. doi:10.1128/mBio.00027-16
- 739 74. Alsharifi M, Müllbacher A, Regner M. Interferon type I responses in primary and secondary  
740 infections. *Immunol Cell Biol* (2008) **86**:239–245. doi:10.1038/sj.icb.7100159
- 741 75. Nguyen KB, Cousens LP, Doughty LA, Pien GC, Durbin JE, Biron CA. Interferon  $\alpha/\beta$ -mediated  
742 inhibition and promotion of interferon  $\gamma$ : STAT1 resolves a paradox. *Nat Immunol* (2000) **1**:70–  
743 76. doi:10.1038/76940
- 744 76. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*  
745 (1997) **15**:323–50. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.323
- 746 77. Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J, Cebon J. Type I IFNs enhance the

- 747 terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol* (1998) **161**:1947–53.  
748 doi:10.4049/jimmunol.178.12.7540
- 749 78. Une C, Andersson J, Örn A. Role of IFN- $\alpha/\beta$  and IL-12 in the activation of natural killer cells  
750 and interferon- $\gamma$  production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp*  
751 *Immunol C, Andersson, J, Örn, A (2003) Role IFN- $\alpha/\beta$  IL-12 Act Nat Kill cells Interf Prod Dur*  
752 *Exp Infect with Trypanos cruzi Clin Exp I (2003) 134*:195–201. doi:10.1046/j.1365-  
753 2249.2003.02294.x
- 754 79. Costa VMA, Torres KCL, Mendonca RZ, Gresser I, Gollob KJ, Abrahamsohn IA. Type I IFNs  
755 Stimulate Nitric Oxide Production and Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol*  
756 (2006) **177**:3193–3200. doi:10.4049/jimmunol.177.5.3193
- 757 80. Koga R, Hamano S, Kuwata H, Atarashi K, Ogawa M, Hisaeda H, Yamamoto M, Akira S,  
758 Himeno K, Matsumoto M, et al. TLR-Dependent Induction of IFN- $\beta$  Mediates Host Defense  
759 against *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* (2006) **177**:7059–7066.  
760 doi:10.4049/jimmunol.177.10.7059
- 761 81. Chessler A-DC, Unnikrishnan M, Bei AK, Daily JP, Burleigh BA. *Trypanosoma cruzi* Triggers  
762 an Early Type I IFN Response In Vivo at the Site of Intradermal Infection . *J Immunol* (2009)  
763 **182**:2288–2296. doi:10.4049/jimmunol.0800621
- 764 82. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu Rev*  
765 *Immunol* (2009) **27**:229–265. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132715
- 766 83. Gonçalves VM, Matteucci KC, Buzzo CL, Miollo BH, Ferrante D, Torrecilhas AC, Rodrigues  
767 MM, Alvarez JM, Bortoluci KR. NLRP3 Controls *Trypanosoma cruzi* Infection through a  
768 Caspase-1-Dependent IL-1R-Independent NO Production. *PLoS Negl Trop Dis* (2013) **7**:e2469.  
769 doi:10.1371/journal.pntd.0002469
- 770 84. Silva GK, Costa RS, Silveira TN, Caetano BC, Horta CV, Gutierrez FRS, Guedes PM da M,  
771 Andrade WA, De Niz M, Gazzinelli RT, et al. Apoptosis-Associated Speck-like Protein  
772 Containing a Caspase Recruitment Domain Inflammasomes Mediate IL-1 $\beta$  Response and Host  
773 Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection . *J Immunol* (2013) **191**:3373–3383.  
774 doi:10.4049/jimmunol.1203293
- 775 85. Dey N, Sinha M, Gupta S, Gonzalez MN, Fang R, Endsley JJ, Luxon BA, Garg NJ. Caspase-  
776 1/ASC inflammasome-mediated activation of IL-1 $\beta$ -ROS-NF- $\kappa$ B pathway for control of  
777 *Trypanosoma cruzi* replication and survival is dispensable in NLRP3 $^{-/-}$  macrophages. *PLoS One*  
778 (2014) **9**: doi:10.1371/journal.pone.0111539
- 779 86. Huante MB, Gupta S, Calderon VC, Koo SJ, Sinha M, Luxon BA, Garg NJ, Endsley JJ.  
780 Differential inflammasome activation signatures following intracellular infection of human  
781 macrophages with *Mycobacterium bovis* BCG or *Trypanosoma cruzi*. *Tuberculosis* (2016)  
782 **101**:S35–S44. doi:10.1016/j.tube.2016.09.026
- 783 87. Poeck H, Bscheider M, Gross O, Finger K, Roth S, Rebsamen M, Hanneschläger N, Schlee M,  
784 Rothenfusser S, Barchet W, et al. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of  
785 CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 $\beta$  production. *Nat Immunol* (2010)  
786 **11**:63–69. doi:10.1038/ni.1824

- 787 88. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome  
788 and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* (2009) **458**:509–513.  
789 doi:10.1038/nature07710
- 790 89. Kerur N, Veettil MV, Sharma-Walia N, Bottero V, Sadagopan S, Otageri P, Chandran B. IFI16  
791 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-  
792 associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe* (2011) **9**:363–375.  
793 doi:10.1016/j.chom.2011.04.008
- 794 90. Karki R, Man SM, Malireddi RKS, Gurung P, Vogel P, Lamkanfi M, Kanneganti TD. Concerted  
795 activation of the AIM2 and NLRP3 inflammasomes orchestrates host protection against  
796 aspergillus infection. *Cell Host Microbe* (2015) **17**:657–368. doi:10.1016/j.chom.2015.01.006
- 797 91. Kalantari P, DeOliveira RB, Chan J, Corbett Y, Rathinam V, Stutz A, Latz E, Gazzinelli RT,  
798 Golenbock DT, Fitzgerald KA. Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by  
799 *Plasmodium*-derived hemozoin and DNA during Malaria. *Cell Rep* (2014) **6**:196–210.  
800 doi:10.1016/j.celrep.2013.12.014
- 801 92. Zamboni DS, Lima-Junior DS. Inflammasomes in host response to protozoan parasites.  
802 *Immunol Rev* (2015) **265**:156–171. doi:10.1111/imr.12291
- 803 93. van de Weijer ML, Luteijn RD, Wiertz EJHJ. Viral immune evasion: Lessons in MHC class I  
804 antigen presentation. *Semin Immunol* (2015) **27**:125–137. doi:10.1016/j.smim.2015.03.010
- 805 94. Vignesh KS, Deepe GS. Metallothioneins: Emerging modulators in immunity and infection. *Int*  
806 *J Mol Sci* (2017) **18**: doi:10.3390/ijms18102197
- 807 95. Molteni CG, Principi N, Esposito S. Reactive oxygen and nitrogen species during viral  
808 infections. *Free Radic Res* (2014) **48**:1163–1169. doi:10.3109/10715762.2014.945443
- 809 96. Kim T-S, Shin E-C. The activation of bystander CD8 + T cells and their roles in viral infection.  
810 *Exp Mol Med* (2019) **51**: doi:10.1038/s12276-019-0316-1
- 811 97. Sant AJ, McMichael A. Revealing the role of CD4+ T cells in viral immunity. *J Exp Med* (2012)  
812 **209**:1391–1395. doi:10.1084/jem.20121517
- 813 98. Basso B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World J Exp Med*  
814 (2013) **3**:1–10. doi:10.5493/wjem.v3.i1.World
- 815 99. Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human  
816 inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* (2009) **19**:41–52.  
817 doi:10.1016/j.cytogfr.2007.10.004
- 818 100. Silva JS, Vespa GNR, Cardoso MAG, Aliberti JCS, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha  
819 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production  
820 in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun* (1995) **63**:4862–4867.  
821 doi:10.1128/iai.63.12.4862-4867.1995
- 822 101. Guilmot A, Bosse J, Carlier Y, Truyens C. Monocytes Play an IL-12-Dependent Crucial Role  
823 in Driving Cord Blood NK Cells to Produce IFN-g in Response to *Trypanosoma cruzi*. *PLoS*

- 824 *Negl Trop Dis* (2013) **7**:e2291. doi:10.1371/journal.pntd.0002291
- 825 102. Poncini C V., Soto CDA, Batalla E, Solana ME, Gonzalez Cappa SM. *Trypanosoma cruzi*  
826 Induces Regulatory Dendritic Cells In Vitro. *Infect Immun* (2008) **76**:2633–2641.  
827 doi:10.1128/IAI.01298-07
- 828 103. Lee SH, Stehlik C, Reed JC. COP, a Caspase Recruitment Domain-containing Protein and  
829 Inhibitor of Caspase-1 Activation Processing. *J Biol Chem* (2001) **276**:34495–34500.  
830 doi:10.1074/jbc.M101415200
- 831 104. Druilhe A, Srinivasula SM, Razmara M, Ahmad M, Alnemri ES. Regulation of IL-1 $\beta$  generation  
832 by Pseudo-ICE and ICEBERG, two dominant negative caspase recruitment domain proteins.  
833 *Cell Death Differ* (2001) **8**:649–657. doi:10.1038/sj.cdd.4400881
- 834 105. Chang EY, Guo B, Doyle SE, Cheng G. Cutting Edge: Involvement of the Type I IFN  
835 Production and Signaling Pathway in Lipopolysaccharide-Induced IL-10 Production. *J Immunol*  
836 (2007) **178**:6705–6709. doi:10.4049/jimmunol.178.11.6705
- 837 106. Moreira LO, El Kasmi KC, Smith AM, Finkelstein D, Fillon S, Kim YG, Núñez G, Tuomanen  
838 E, Murray PJ. The TLR2-MyD88-NOD2-RIPK2 signalling axis regulates a balanced pro-  
839 inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory cytokine response to Gram-positive cell  
840 walls. *Cell Microbiol* (2008) **10**:2067–2077. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01189.x
- 841 107. Hovingh ES, van Gent M, Hamstra H-J, Demkes M, Mooi FR, Pinelli E. Emerging *Bordetella*  
842 *pertussis* Strains Induce Enhanced Signaling of Human Pattern Recognition Receptors TLR2,  
843 NOD2 and Secretion of IL-10 by Dendritic Cells. *PLoS One* (2017) **12**:e0170027.  
844 doi:10.1371/journal.pone.0170027
- 845 108. Jamontt J, Petit S, Clark N, Parkinson SJ, Smith P. Nucleotide-Binding Oligomerization Domain  
846 2 Signaling Promotes Hyperresponsive Macrophages and Colitis in IL-10-Deficient Mice. *J*  
847 *Immunol* (2013) **190**:2948–2958. doi:10.4049/jimmunol.1201332
- 848 109. Hedl M, Abraham C. Secretory Mediators Regulate Nod2-Induced Tolerance in Human  
849 Macrophages in Human Macrophages. *Gastroenterology* (2011) **140**:231–241.  
850 doi:10.1053/j.gastro.2010.09.009
- 851 110. Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Jansen T, Jacobs L, Kramer M, Naber THJ, Drenth JPH,  
852 Girardin SE, Jan Kullberg B, et al. Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-2 Modulates  
853 Specific TLR Pathways for the Induction of Cytokine Release. *J Immunol* (2005) **174**:6518–  
854 6523. doi:10.4049/jimmunol.174.10.6518
- 855 111. Powell MJ, Thompson SAJ, Tone Y, Waldmann H, Tone M. Posttranscriptional Regulation of  
856 IL-10 Gene Expression Through Sequences in the 3'-Untranslated Region. *J Immunol* (2000)  
857 **165**:292–296. doi:10.4049/jimmunol.165.1.292
- 858 112. Brown CY, Lagnado CA, Vadas MA, Goodall GJ. Differential regulation of the stability of  
859 cytokine mRNAs in lipopolysaccharide-activated blood monocytes in response to interleukin-  
860 10. *J Biol Chem* (1996) **271**:20108–20112. doi:10.1074/jbc.271.33.20108
- 861 113. Kishore R, Tebo JM, Kolosov M, Hamilton TA. Cutting Edge: Clustered AU-Rich Elements

- 862 Are the Target of IL-10-Mediated mRNA Destabilization in Mouse Macrophages. *J Immunol*  
 863 (1999) **162**:2457–2461. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/162/5/2457> [Accessed  
 864 August 26, 2020]
- 865 114. Block BA, Arts RJW, van Crevel R, Benn CS, Netea MG. Trained innate immunity as  
 866 underlying mechanism for the long-term, nonspecific effects of vaccines. *J Leukoc Biol* (2015)  
 867 **98**:347–356. doi:10.1189/jlb.5ri0315-096r
- 868 115. van Crevel R, Netea MG, Koeken VACM, Joosten LAB, Benn CS, de Bree LCJ, Aaby P. Non-  
 869 specific effects of vaccines: Current evidence and potential implications. *Semin Immunol* (2018)  
 870 **39**:35–43. doi:10.1016/j.smim.2018.06.002
- 871 116. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S, McSkane M, Baba H, Lenz  
 872 HJ. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation – A target for novel cancer  
 873 therapy. *Cancer Treat Rev* (2018) **63**:40–47. doi:10.1016/j.ctrv.2017.11.007
- 874 117. Croft M, Siegel RM. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of  
 875 rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* (2017) **13**:217–233. doi:10.1038/nrrheum.2017.22
- 876 118. Cong X-L, Lo M-C, Reuter BA, Yan M, Fan J-B, Zhang D-E. Usp18 promotes conventional  
 877 CD11b+ dendritic cell development. *J Immunol* (2012) **188**:4776–4781.  
 878 doi:10.4049/jimmunol.1101609
- 879 119. Konermann C, Kresse A, Beuter-Gunia C, Würthner J, Degrandi D, Pfeffer K, Beer S. *In silico*  
 880 and *in vitro* characterization of mGBP4 splice variants. *DNA Cell Biol* (2007) **26**:847–851.  
 881 doi:10.1089/dna.2007.0637
- 882 120. Hu Y, Wang J, Yang B, Zheng N, Qin M, Ji Y, Lin G, Tian L, Wu X, Wu L, et al. Guanylate  
 883 Binding Protein 4 Negatively Regulates Virus-Induced Type I IFN and Antiviral Response by  
 884 Targeting IFN Regulatory Factor 7. *J Immunol* (2011) **187**:6456–6462.  
 885 doi:10.4049/jimmunol.1003691
- 886 121. Tyrkalska SD, Candel S, Angosto D, Gómez-Abellán V, Martín-Sánchez F, García-Moreno D,  
 887 Zapata-Pérez R, Sánchez-Ferrer Á, Sepulcre MP, Pelegrín P, et al. Neutrophils mediate  
 888 *Salmonella Typhimurium* clearance through the GBP4 inflammasome-dependent production of  
 889 prostaglandins. *Nat Commun* (2016) **7**:1–17. doi:10.1038/ncomms12077
- 890 122. Haller O, Staeheli P, Schwemmler M, Kochs G. Mx GTPases: Dynammin-like antiviral machines  
 891 of innate immunity. *Trends Microbiol* (2015) **23**:154–163. doi:10.1016/j.tim.2014.12.003
- 892 123. Pillai PS, Molony RD, Martinod K, Dong H, Pang IK, Tal MC, Solis AG, Bielecki P, Mohanty  
 893 S, Trentalange M, et al. Mx1 reveals innate pathways to antiviral resistance and lethal influenza  
 894 disease. *Science (80- )* (2016) **352**:463–466. doi:10.1126/science.aaf3926
- 895 124. Ghosh A, Shao L, Sampath P, Zhao B, Patel N V., Zhu J, Behl B, Parise RA, Beumer JH,  
 896 O’Sullivan RJ, et al. Oligoadenylate-Synthetase-Family Protein OASL Inhibits Activity of the  
 897 DNA Sensor cGAS during DNA Virus Infection to Limit Interferon Production. *Immunity*  
 898 (2019) **50**:51-63.e5. doi:10.1016/j.immuni.2018.12.013
- 899 125. Choi UY, Kang JS, Hwang YS, Kim YJ. Oligoadenylate synthase-like (OASL) proteins: dual

- 900 functions and associations with diseases. *Exp Mol Med* (2015) **47**:e144.  
901 doi:10.1038/emm.2014.110
- 902 126. Gatica-Andrades M, Vagenas D, Kling J, Nguyen TTK, Benham H, Thomas R, Körner H,  
903 Venkatesh B, Cohen J, Blumenthal A. WNT ligands contribute to the immune response during  
904 septic shock and amplify endotoxemia-driven inflammation in mice. *Blood Adv* (2017) **1**:1274–  
905 1286. doi:10.1182/bloodadvances.2017006163
- 906 127. de Rezende MM, Ng-Blichfeldt JP, Justo GZ, Paredes-Gamero EJ, Gosens R. Divergent effects  
907 of Wnt5b on IL-3- and GM-CSF-induced myeloid differentiation. *Cell Signal* (2020) **67**:109507.  
908 doi:10.1016/j.cellsig.2019.109507
- 909 128. Wang L, Zhou Y, Chen Z, Sun L, Wu J, Li H, Liu F, Wang F, Yang C, Yang J, et al. PLCβ2  
910 negatively regulates the inflammatory response to virus infection by inhibiting  
911 phosphoinositide-mediated activation of TAK1. *Nat Commun* (2019) **10**:1–13.  
912 doi:10.1038/s41467-019-08524-3
- 913 129. Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A, Marshall C, Do T, Romics L, Mandrekar P, Zapp M, Szabo  
914 G. Hepatitis C Virus Core and Nonstructural Protein 3 Proteins Induce Pro- and Anti-  
915 inflammatory Cytokines and Inhibit Dendritic Cell Differentiation. *J Immunol* (2003) **170**:5615–  
916 5624. doi:10.4049/jimmunol.170.11.5615
- 917 130. Yonejima A, Mizukoshi E, Tamai T, Nakagawa H, Kitahara M, Yamashita T, Arai K, Terashima  
918 T, Iida N, Fushimi K, et al. Characteristics of Impaired Dendritic Cell Function in Patients With  
919 Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology* (2019) **70**:25–39. doi:10.1002/hep.30637/supinfo
- 920 131. Roberts LL, Robinson CM. *Mycobacterium tuberculosis* infection of human dendritic cells  
921 decreases integrin expression, adhesion and migration to chemokines. *Immunology* (2013)  
922 **141**:39–51. doi:10.1111/imm.12164
- 923 132. Urban BC, Ferguson DJ, Pain A, Willcox N, Plebanski M, Austyn JM, Roberts DJ. *Plasmodium*  
924 *falciparum* infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature* (1999)  
925 **400**:73–77. doi:10.1038/21900

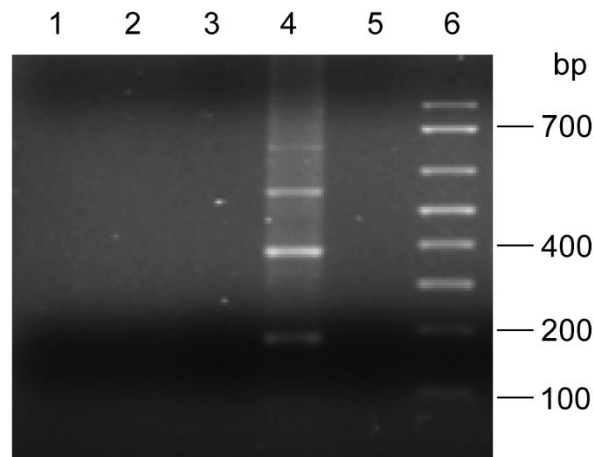
926

927 **6.1.1.1.1.1 Data Availability Statement**

928 The accession number for the transcriptome data reported in this paper is NCBI: GSE158986  
929 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE158986>).

930

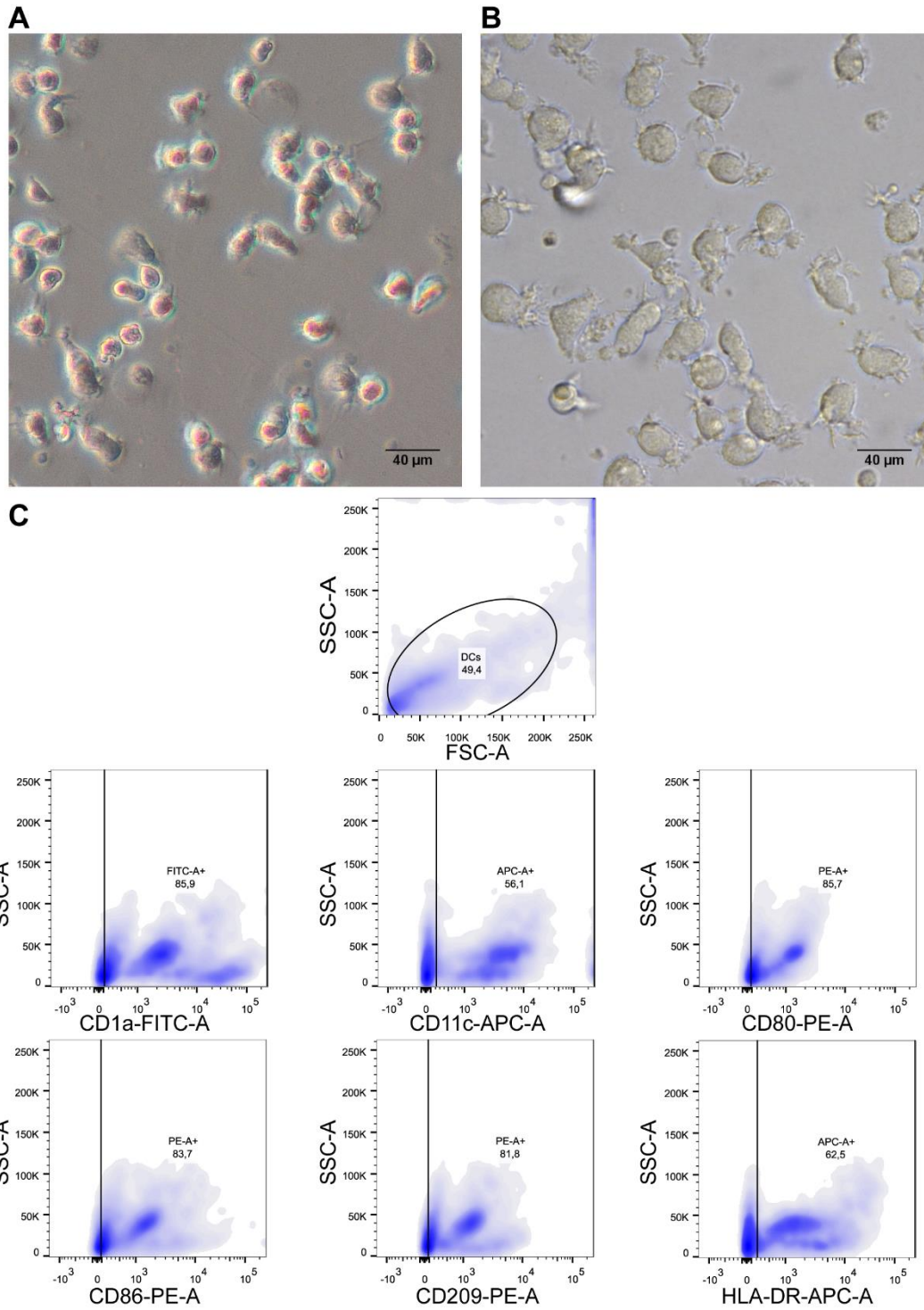




931

932 **Supplementary Figure 1. TCZ PCR to confirm no *T. cruzi* infection in the donors**  
933 (Related to Figure 1). TCZ region (188 bp) in the *T. cruzi* genome was amplified from total  
934 DNA extracted from donors' PBMCs. PCR products from donor A (line 1), donor B (line 2),  
935 donor C (line 3), *T. cruzi* total DNA (line 4), and non-infected donor (line 5) are shown in a  
936 1% Agarose gel.

937

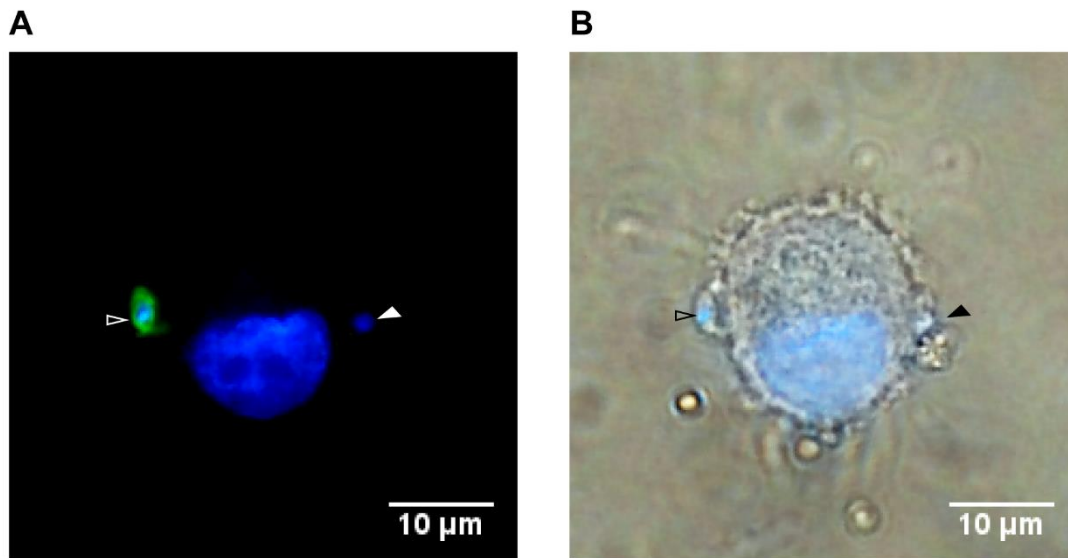


938

939 **Supplementary Figure 2. Human dendritic cells differentiation** (Related to Figure 1).  
 940 Monocytes were purified from peripheral blood of donors (A) and differentiated into MoDCs

941 in the presence of IL-4 and GM-CSF cytokines during 7 days (B) (Scale bar: 40  $\mu$ m). Flow  
942 cytometry was performed to assess the differentiation efficiency, evaluating expression of  
943 CD1a, CD11c, CD80, CD86, CD209, and HLA-DR. The upper density plot shows the whole  
944 population and the selected dendritic cell gate. The other density plots show the positive  
945 populations within the selected gate (C). Data from a representative experiment.

946



947

948 **Supplementary Figure 3. Percentage of infected cells in the Infected group** (Related to  
949 Figure 1). To identify intracellular amastigotes, in/out immunofluorescence was performed  
950 using chagasic mice serum. MoDCs were not permeabilized in order to recognize  
951 extracellular parasites (green). DAPI was used to detect nuclei (blue). A representative  
952 fluorescence micrograph is shown in A, and its respective phase-contrast micrograph is  
953 shown in B. A full arrow shows an intracellular amastigote inside the MoDC, whereas an  
954 empty arrow shows an extracellular parasite. Scale bar: 10 µm