

JONATAN ERSCHING

Estudo das bases celulares e moleculares do controle da resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ específicos durante a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* e vacinação com vetor adenoviral recombinante

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Maurício Martins Rodrigues
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Karina Ramalho Bortoluci

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

ERSCHING, J. **Estudo das bases celulares e moleculares do controle da resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ específicos durante a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* e vacinação com vetor adenoviral recombinante.** 2015 237 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

O reconhecimento por linfócitos T CD8⁺ de antígenos expostos no contexto de MHC classe I é fundamental para o controle de tumores e de infecções intracelulares virais, fúngicas, bacterianas e parasitárias. No entanto, o controle da indução destes linfócitos é ainda incompletamente conhecido. *Trypanosoma cruzi* é o protozoário intracelular causador da doença de Chagas, uma patologia crônica cardíaca e/ou digestiva largamente negligenciada. O controle da infecção pelo *T. cruzi* depende da resposta de linfócitos T CD8⁺. Porém, o parasito evade a imunidade do hospedeiro através da indução subótima destes linfócitos e alteração do seu fenótipo para um perfil pró-apoptótico. Esta resposta subótima pode ser corrigida pela vacinação genética com adenovírus recombinantes. No entanto, não se sabe como *T. cruzi* induz uma resposta defeituosa dos linfócitos T CD8⁺, nem como o vírus reverte esta resposta. Estas questões são importantes para o entendimento geral da imunidade mediada por linfócitos T CD8⁺ e foram objeto de estudo da presente tese. Inicialmente, foi caracterizada *in vitro* a via de processamento dos epítomos de *T. cruzi* restritos a MHC classe I, que é citosólica: dependente do proteassomo, TAP e realçada pelo imunoproteassomo, um complexo molecular análogo ao proteassomo convencional, porém com subunidades catalíticas alteradas. O envolvimento do imunoproteassomo na indução de imunidade dos linfócitos T CD8⁺ foi investigado *in vivo* utilizando animais triplamente deficientes das subunidades β1i, β2i e β5i (TKO). Estes animais exibiram uma resposta de linfócitos T CD8⁺ drasticamente reduzida após a infecção por *T. cruzi* ou vacinação genética, avaliada pela frequência e número de linfócitos específicos, bem como pela diferenciação *in vivo* e função efetora destas células. Entretanto, a resposta dos linfócitos T CD4⁺ não foi alterada. Além disso, os clones de linfócitos T CD8⁺ ativados pela infecção ou vacinação foram diferentes nos animais TKO em comparação aos normais. Surpreendentemente, ainda, a resistência à infecção na ausência do imunoproteassomo foi seriamente comprometida e a proteção induzida pela vacinação foi completamente abolida, indicando que o imunoproteassomo é essencial para o processamento dos epítomos de *T. cruzi* relacionados à imunidade protetora gerada tanto durante a infecção como na vacinação. Na segunda parte desta tese, foi observado que *T. cruzi*, mas não adenovírus, é capaz de tornar uma resposta ótima de linfócitos transgênicos induzidos *in vivo* em subótima. Esta interferência reproduziu o fenótipo pró-apoptótico descrito para os clones de linfócitos T CD8⁺ que naturalmente reconhecem o parasito, mas foi independente da molécula CD95. A interferência do parasito envolveu a supressão ativa do *priming* dos linfócitos T CD8⁺ mediada por linfócitos T CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁺ de modo independente de IL-10, mas parcialmente dependente de TGF-β e CTLA-4. Animais depletados de células Foxp3⁺ infectados com *T. cruzi* controlaram melhor a parasitemia e tiveram uma resposta mais intensa de linfócitos T CD8⁺ específicos. Estes dados sugerem pela primeira vez a participação de linfócitos T CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁺ na supressão do *priming* de linfócitos T CD8⁺ e representam um mecanismo importante para a evasão da resposta imune pelo *T. cruzi*, o que não ocorre durante a vacinação genética.

Palavras-chave: Linfócitos T CD8⁺. *Trypanosoma cruzi*. Vacina. Adenovírus. Foxp3. Imunoproteassomo.

ABSTRACT

ERSCHING, J. **Study of the cellular and molecular basis of specific CD8⁺ T lymphocyte immune response control during experimental infection by *Trypanosoma cruzi* and vaccination with recombinant adenoviral vector.** 2015 237 p. Ph.D. Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

The recognition by CD8⁺ T lymphocytes of antigens displayed on the context of MHC class I molecules is a fundamental requirement for the control of tumors and intracellular infections by viruses, fungi, bacteria and parasites. However, the control of the induction of these lymphocytes is yet ill defined. *Trypanosoma cruzi* is the intracellular protozoan that causes Chagas disease, a highly neglected cardiac and/or digestive chronic pathology. The control of *T. cruzi* infection is dependent on CD8⁺ T cell response. However, the parasite evades host immunity through the suboptimal induction of these lymphocytes and shift of their phenotype into a proapoptotic profile. This suboptimal response can be corrected by genetic vaccination with recombinant adenoviruses. Although, it is unknown how *T. cruzi* induces the poor response of CD8⁺ T cells, and how adenovirus circumvents it. These questions are important for the general understanding of CD8⁺ T lymphocyte-mediated immunity and were subject of investigation in this thesis. Initially, the processing pathway of MHC class I-restricted epitopes from *T. cruzi* was characterized *in vitro*, which is cytosolic: dependent on proteasome, TAP, and enhanced by the immunoproteasome, a molecular complex analogous to the conventional proteasome, but featuring altered catalytic subunits. The involvement of the immunoproteasome in the induction of CD8⁺ T lymphocyte immunity was investigated *in vivo* using triply deficient animals in the subunits $\beta 1i$, $\beta 2i$ and $\beta 5i$ (TKO). These mice exhibited a drastically reduced response of CD8⁺ T cells after *T. cruzi* infection or genetic vaccination, assessed by the frequency and numbers of epitope-specific lymphocytes, as well as their differentiation and function *in vivo*. Despite, the response of CD4⁺ T cells was unaltered. Moreover, CD8⁺ T cell clones activated by infection or vaccination were different in TKO animals compared to normal mice. Surprisingly, yet, resistance to infection in the absence of immunoproteasomes was seriously compromised and the protection induced by vaccination completely abolished, indicating that the immunoproteasome is essential for the processing of *T. cruzi* epitopes related to protective immunity generated during infection or vaccination. In the second part of this thesis, was observed that *T. cruzi*, rather than adenovirus, is capable of modifying an optimal response of *in vivo*-induced transgenic CD8⁺ T cells to suboptimal. This interference resembled the proapoptotic phenotype of naturally occurring CD8⁺ T cell clones that recognize the parasite, although it was independent of CD95 molecule. Parasite interference involved the active suppression of CD8⁺ T cell priming mediated by CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁺ T cells in an IL-10-independent, but TGF- β and CTLA-4 partially dependent manner. Foxp3⁺ cells-depleted animals infected with *T. cruzi* controlled better the parasitemia and presented a stronger response of specific CD8⁺ T cells. These data suggest for the first time the involvement of CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁺ T cells in the suppression of CD8⁺ T cell priming and represent an important mechanism for immunity evasion by *T. cruzi*, which does not occur during genetic vaccination.

Keywords: CD8⁺ T lymphocytes. *Trypanosoma cruzi*. Vaccine. Adenovirus. Foxp3. Immunoproteasome.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Papel dos linfócitos T CD8⁺ no controle de infecções

Os linfócitos T CD8⁺ são células do sistema imune adaptativo que possuem a elegante habilidade de reconhecer o ambiente intracelular de outras células e responder às perturbações deste meio, eliminando células anômalas. Este reconhecimento decorre da ubíqua exposição de peptídeos citosólicos ligados a moléculas de MHC classe Ia na superfície celular. O complexo peptídeo-MHC classe Ia é capaz de interagir com o TCR de linfócitos T CD8⁺, como revisado recentemente em detalhe (ROSSJOHN et al., 2015), e (no caso do peptídeo sinalizar uma condição de infecção ou anomalia) desencadear a proliferação, diferenciação e função citotóxica destes linfócitos. Este mecanismo de reconhecimento mediado pela interação MHC Ia-TCR sustenta o controle de tumores e infecções intracelulares virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias, bem como a rejeição de transplantes; e seu descobrimento foi de tamanha importância para a Imunologia que rendeu o Prêmio Nobel de Medicina à Rolf Martin Zinkernagel e Peter Doherty em 1996 (HAMMERLING, 1997; ZINKERNAGEL, 1974; ZINKERNAGEL; DOHERTY, 1974).

A relevância dos linfócitos T CD8⁺ para os animais dotados de sistema imune adaptativo, *Gnathostomata*, também pode ser sugerida pelo sequenciamento do genoma do bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*). Evolutivamente, este peixe mandibulado perdeu todos os genes de MHC classe II, CD4 e cadeia invariante, o que não o tornou mais susceptível a infecções no ambiente natural. A imunidade deste animal depende de um número expandido de genes de MHC classe I, sugerindo que o reforço da resposta por diferentes subtipos de linfócitos T CD8⁺ poderia compensar a falta de imunidade mediada por linfócitos T CD4⁺ (STAR et al., 2011). Nos mamíferos, os mecanismos específicos de controle de infecções intracelulares por linfócitos T CD8⁺ são múltiplos e a preponderância de cada um em particular varia de acordo com o patógeno (WONG; PAMER, 2003). Os patógenos mais amplamente utilizados pela comunidade científica para estudar a resposta de linfócitos T CD8⁺ em modelos murinos são o vírus *Lymphocytic Choriomeningitis* (LCMV) e a bactéria *Listeria monocytogenes*. Estes foram os primeiros patógenos utilizados nos trabalhos seminais de Zinkernagel e são bons modelos experimentais porque induzem uma resposta de linfócitos T CD8⁺ bastante conspícua. No entanto, inúmeros outros patógenos são estudados em modelos experimentais que

contribuem para o melhor entendimento de como se dá a resposta de linfócitos T CD8⁺. Estes incluem os vírus da influenza (SCHLIE et al., 2015), herpes (CUBURU et al., 2015), hepatite B (GUIDOTTI et al., 2015), HIV/SIV (MUDD et al., 2012), vírus sincicial respiratório (ROSSEY et al., 2014) e vaccinia (ARAKI et al., 2009); as bactérias *Mycobacterium tuberculosis* (TZELEPIS et al., 2015) e *Salmonella typhimurium* (BINDER et al., 2013); bem como os protozoários *Plasmodium spp* (RADTKE et al., 2015), *Leishmania spp* (GAUTAM et al., 2014), *Toxoplasma gondii* (GROVER et al., 2014) e *Trypanosoma cruzi* (VASCONCELOS; BRUNA-ROMERO; et al., 2012).

Os linfócitos T CD8⁺ podem secretar citocinas importantes para o controle de infecções, como IL-2, IFN- γ e TNF. Outro mecanismo relevante de efetuação da resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ corresponde à citotoxicidade: indução de morte celular da célula-alvo infectada, a qual pode ser induzida por inúmeras vias (LIEBERMAN, 2010), como a interação de FasL (CD178) no linfócito T CD8⁺ com Fas (CD95) na célula-alvo, ou ainda pela liberação de vesículas contendo TNF e linfotóxina pelo linfócito, as quais ligam-se ao receptor TNFR-1 na célula-alvo. Tanto Fas como TNFR-1 possuem domínios citoplasmáticos de morte que recrutam as caspases 8 e 10 e levam à apoptose. Outra forma de induzir morte da célula-alvo consiste na liberação de grânulos citotóxicos pelos linfócitos T CD8⁺ (YANNELLI et al., 1986). Estes grânulos podem conter moléculas que abrem poros na membrana da célula-alvo e causam morte celular. Estas moléculas incluem perforinas, proteínas monoméricas que formam poros na membrana ao se polimerizarem de modo dependente de Ca²⁺; e os poros formados permitem a entrada de granzimas, que são serina esterases que podem interferir com vias intracelulares na célula-alvo, levando à degradação do DNA e apoptose (LIEBERMAN, 2010).

O reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T CD8⁺ é necessário tanto para a ativação inicial destes linfócitos quanto para sua ação efetora e depende do processamento e apresentação de epítopos ligados a moléculas de MHC classe Ia. Enquanto qualquer célula que expressa MHC classe Ia é virtualmente capaz de se tornar uma célula-alvo da resposta efetora de linfócitos T CD8⁺, apenas as células apresentadoras de antígeno profissionais são postuladas como capazes de induzir a ativação inicial de linfócitos T *naïve* (STEINMAN; WITMER, 1978). Esta ativação inicial depende, além da presença de epítopos ligados a moléculas de MHC, do reconhecimento de padrões moleculares por receptores do sistema imune inato que

ativam vias nas células apresentadoras de antígenos que levam à secreção de citocinas e expressão de moléculas coestimuladoras, sinalizando assim um contexto inflamatório (JANEWAY, 1989). As células dendríticas (DC) são ótimas provedoras destes três sinais e acredita-se que sejam as melhores células capazes de induzir uma resposta primária de linfócitos T CD8⁺. Esta ativação pode ocorrer tanto pela apresentação direta de antígenos presentes no citosol que são processados via proteassomo e transportadas por TAP para o retículo endoplasmático, onde se ligam a moléculas de MHC classe I recém-sintetizadas, quanto pela apresentação cruzada de antígenos de origem exógena que, por diferentes vias, citosólicas ou endossomais, acessam as moléculas de MHC classe I (JOFFRE et al., 2012; NAIR-GUPTA; BLANDER, 2013). Corroborando a importância da apresentação cruzada para o controle de infecções, inúmeros modelos experimentais utilizando microscopia intravital sugerem que subtipos específicos de DC capturam antígenos no tecido infectado, migram e transferem estes antígenos para as DC residentes nos linfonodos drenantes, onde ocorre a indução primária da resposta dos linfócitos T CD8⁺ (JOHN et al., 2009; ROTHFUCHS et al., 2009), enquanto outros modelos sugerem que as DC diretamente infectadas são as mais relevantes para induzir respostas primárias de linfócitos T CD8⁺ (DUPONT et al., 2014; RADTKE et al., 2015). Estes linfócitos T CD8⁺ *naïve* podem se diferenciar em inúmeros subtipos, controlados por citocinas, fatores de transcrição e modificações epigenéticas (GRAY; KAECH; STARON, 2014). De modo simplificado, estes subtipos podem ser agrupados em células efetoras (com fenótipo CD62L^{baixo}, CD44^{alto}, KLRG1^{alto}, CD127^{baixo}), que recirculam e controlam a infecção; em células de memória efetora (com fenótipo CD62L^{baixo}, CD44^{alto}, KLRG1^{alto}, CD127^{alto}), residentes no tecido; ou ainda em células de memória central (com fenótipo CD62L^{baixo}, CD44^{baixo}, KLRG1^{baixo}, CD127^{alto}), residentes no linfonodo e que sustentam respostas anamnésicas quando de uma infecção secundária (BELZ; KALLIES, 2010; OBAR; LEFRANCOIS, 2010; SALLUSTO; GEGINAT; LANZAVECCHIA, 2004). Ainda, os linfócitos T CD8⁺ podem ser regulados e induzidos a estados de tolerância, anergia ou ignorância imunológica (AYRES; SCHNEIDER, 2012; BILATE; LAFAILLE, 2012; MAEDA et al., 2014).

Em todas as etapas de ativação primária ou secundária de linfócitos T CD8⁺ descritas acima já foram relatados mecanismos de evasão dos patógenos, levando a um controle subótimo da infecção, que comumente progride para uma fase crônica.

Estes mecanismos incluem a indução de morte de células apresentadoras de antígeno (AMARAL et al., 2014), falta ou inibição ativa do reconhecimento pelos receptores do sistema imune inato (PADILLA; SIMPSON; TARLETON, 2009; YEN et al., 2014), produção de sinais anti-inflamatórios pelas células apresentadoras de antígenos (FU et al., 2015; NIESEN et al., 2015; RUFFELL et al., 2014), a modulação negativa do processamento de epítomos e da expressão de MHC classe I (SMED-SORENSEN et al., 2012; STEERS et al., 2009), a alteração funcional das DC por citocinas (HAQUE et al., 2014), a indução de morte dos linfócitos T CD8⁺ (CHEN et al., 2015; DAY et al., 2014; GUILLERMO et al., 2007), a alteração da capacidade de migração das células apresentadoras de antígenos ou dos linfócitos T CD8⁺ (COLEMAN et al., 2015; HERMIDA et al., 2014; LEE et al., 2014), bem como inúmeros mecanismos de regulação ativa desencadeada pelas DC (CARRANZA et al., 2012; LUO et al., 2014; MASCANFRONI et al., 2013; NORRIS et al., 2013).

Em muitos casos, ainda, a indução subótima dos linfócitos T CD8⁺ pode ser acompanhada de constante estimulação antigênica e a progressão para uma fase crônica de infecção pode levar a um estado de exaustão destes linfócitos (GAUTAM et al., 2014), ou ainda de erosão da resposta imune (GRUJIC et al., 2010). Em outros casos, os linfócitos T CD8⁺ cronicamente estimulados podem se ativar e passar a responder contra o tecido do hospedeiro, levando a quadros de imunopatologia mediada por linfócitos citotóxicos (MARTIN et al., 2007).

Por outro lado, a utilização de vetores que são sabidamente ótimos na indução de resposta de linfócitos T CD8⁺ pode ser cooptada para a entrega de antígenos de patógenos que naturalmente evadem esta resposta. Esta estratégia tem sido amplamente estudada para o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra os três patógenos de maior impacto no mundo: HIV, *Mycobacterium tuberculosis* e *Plasmodium spp* (BOURZAC, 2014), além de outros agentes infecciosos importantes (ERSCHING; PINTO, 2009; KOUP; DOUEK, 2011; RODRIGUES; ERSCHING, 2015). Apesar de atualmente nenhuma vacina baseada na indução de linfócitos T CD8⁺ estar disponível no mercado, diversos estudos de prova de conceito sustentam sua possibilidade teórico-científica. Especialmente, o emprego de vetores genéticos virais, como vaccínia, adenovírus, influenza, ou o vírus da febre amarela figuram entre as estratégias mais promissoras para a indução de linfócitos T CD8⁺ por vacinação.

1.2 Imunoproteassomo

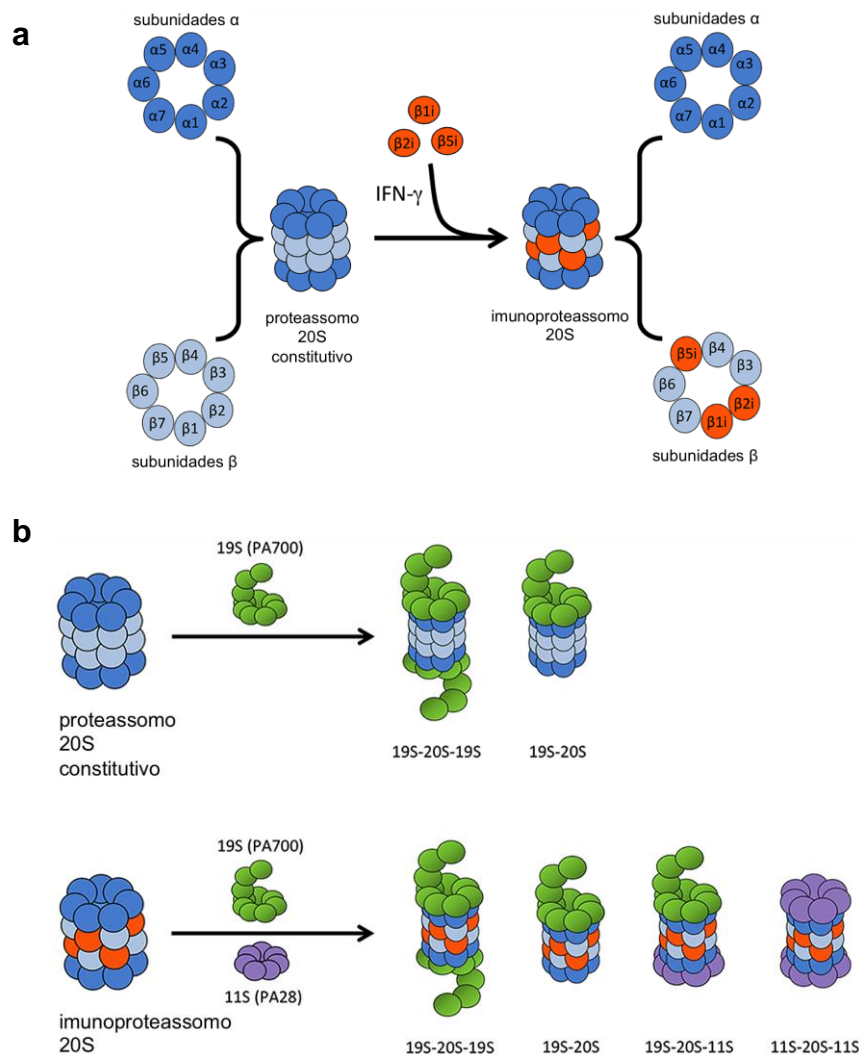
A degradação de proteínas celulares maduras, sejam próprias ou derivadas de patógenos, bem como a degradação de produtos defectivos do ribossomo (DRiPs), gerados durante a síntese de proteínas novas, estão intimamente associadas à produção de peptídeos restritos a MHC classe Ia. A cinética e eficiência desta produção é estreitamente ligada à indução de linfócitos T CD8⁺ (ANTON; YEWDELL, 2014; DE GRAAF et al., 2011).

A degradação de proteínas e DRiPs é mediada por estruturas em forma de barril, denominadas proteassomos, que se localizam no citoplasma e núcleo. As proteínas que são endereçadas ao proteassomo normalmente contêm resíduos poliubiquitinados onde cada monômero de ubiquitina está ligado ao outro pelo resíduo de lisina da posição 48. O proteassomo é formado por uma partícula catalítica 20S cilíndrica constituída de quatro anéis empilhados, cada um formado de sete subunidades (BLUM; WEARSCH; CRESSWELL, 2013; COUX; TANAKA; GOLDBERG, 1996). Os dois anéis internos são formados por subunidades β , das quais três ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$) possuem atividade catalítica de caspase, quimotripsina ou tripsina. Portanto, cada proteassomo possui seis sítios com atividade catalítica que são expostos à face interna do cilindro 20S. Os dois anéis externos da partícula 20S são formados por subunidades α que formam um poro de 13 Ångström, o que exige a denaturação parcial prévia do substrato para entrada no cilindro catalítico. A partícula 20S é flanqueada por uma ou duas tampas, as partículas reguladoras 19S, formando o complexo 26S do proteassomo (19S-20S-19S). As partículas 19S controlam a entrada das proteínas na partícula 20S catalítica, normalmente via reconhecimento dos resíduos poliubiquitinados. A partícula 19S contém ATPases que auxiliam no desdobraimento e denaturação das proteínas-substrato e auxiliam sua entrada na partícula 20S. Em resposta a IFN- γ , a subunidade 19S pode ser substituída pela subunidade ativadora do proteassomo, 11S (também denominada PA28 $\alpha\beta$), que recruta proteínas para degradação mais rapidamente (BASLER; KIRK; GROETTRUP, 2013; DE GRAAF et al., 2011).

As subunidades catalíticas do proteassomo convencional denominadas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ são codificadas pelos genes *Psmb6*, *Psmb7* e *Psmb5*, respectivamente. No entanto, algumas células hematopoiéticas, incluindo DC, expressam formas alternativas das subunidades catalíticas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ do proteassomo convencional.

Estas subunidades alternativas são codificadas pelos genes *Psmb9*, *Psmb10* e *Psmb8* e são denominadas $\beta 1i$ (ou LMP2), $\beta 2i$ (ou MECL1) e $\beta 5i$ (ou LMP7), respectivamente. Em outras células, estas subunidades catalíticas alternativas do proteassomo só são expressas quando induzidas principalmente pela exposição a IFN- γ (BOES et al., 1994; NANDI; JIANG; MONACO, 1996), mas também TNF (HALLERMALM et al., 2001) ou interferons do tipo 1 (SHIN et al., 2006). Os complexos proteolíticos contendo estas subunidades alternativas indutíveis são denominados imunoproteassomo (Figura 1).

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura molecular do imunoproteassomo.



O núcleo catalítico 20S é formado por dois anéis externos α e dois anéis internos β . As subunidades com atividade proteolítica $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ podem, constitutivamente em algumas células ou em resposta a estímulos como IFN- γ , ser trocadas pelas subunidades $\beta 1i$, $\beta 2i$ e $\beta 5i$, caracterizando o imunoproteassomo (a). A unidade 20S do imunoproteassomo pode se associar às partículas reguladora 19S e ativadora 11S em diferentes combinações (b). Adaptado de um trabalho de revisão recente (MCCARTHY; WEINBERG, 2015).

Durante uma infecção um mesmo proteossomo pode ainda exibir subunidades catalíticas mistas, expressas por genes do proteossomo convencional e do imunoproteossomo (ZANKER et al., 2013). Em oposição ao proteossomo convencional, o imunoproteossomo cliva preferencialmente resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e básicos, o que leva à geração mais eficiente de peptídeos que se ligam a moléculas de MHC classe Ia.

Por conseguinte, especula-se que o imunoproteossomo tenha evoluído em resposta a patógenos, pois é induzido num contexto inflamatório característico de infecções, sinalizado pela presença de citocinas, e assumiu um papel importante na geração de peptídeos antigênicos reconhecidos por linfócitos T CD8⁺ os quais controlam estes patógenos. No entanto, alguns autores defendem a ideia de que a indução do imunoproteossomo seja uma resposta fisiológica ao estresse oxidativo e tem por função primária evitar o acúmulo de proteínas defectivas no citoplasma, com a geração de epítomos restritos a MHC classe I ocupando um papel secundário nesta resposta (SEIFERT et al., 2010). Neste trabalho, foi sugerido que a exposição celular ao IFN- γ induz acúmulo de proteínas defeituosas, e que as proteínas poliubiquitinadas são preferencialmente reconhecidas e também degradadas mais rapidamente pelo imunoproteossomo, quando comparado ao proteossomo convencional. No entanto, esta hipótese foi bastante questionada, e inclusive refutada experimentalmente (NATHAN et al., 2013). A sugestão de uma maior eficiência no recrutamento de proteínas poliubiquitinadas pelo imunoproteossomo não poderia ser deduzida, tampouco explicada pela ação exclusiva das subunidades $\beta 1i$, $\beta 2i$ ou $\beta 5i$, já que estas estão no interior da partícula 20S, que não tem papel no recrutamento de substrato. Mas sim, a aceleração na degradação de proteínas pelo proteossomo poderia ser explicada pela troca da subunidade 19S por PA28 $\alpha\beta$, que sabidamente ocorre em resposta ao IFN- γ . No entanto, tanto o proteossomo convencional quanto o imunoproteossomo podem apresentar configurações que exibem a subunidade ativadora PA28 $\alpha\beta$, o que portanto não atribuiria o reconhecimento preferencial e a aceleração do processamento de epítomos exclusivamente ao imunoproteossomo.

Também já foi sugerido que em decorrência de infecções virais a produção de IFN- β poderia levar à indução da expressão de genes do imunoproteossomo em células pancreáticas, e isto estaria associado à geração de epítomos que levam a

auto-reatividade de linfócitos T CD8⁺ e desenvolvimento de diabetes tipo I (FREUDENBURG et al., 2013).

No que tange às subunidades catalíticas indutíveis, diversos trabalhos que utilizaram camundongos deficientes nas cadeias $\beta 1i$, $\beta 2i$ ou $\beta 5i$ sugeriram um papel do imunoproteassomo no incremento da geração de epítomos antigênicos restritos a MHC classe I e na formação da hierarquia de imunodominância destes epítomos (BASLER et al., 2011; DE GRAAF et al., 2011; FEHLING et al., 1994; HENSLEY et al., 2010; PANG et al., 2006; TU et al., 2009; VAN KAER et al., 1994). No entanto, apenas mais recentemente foi possível gerar um camundongo concomitantemente deficiente nas três subunidades catalíticas indutíveis do imunoproteassomo, o que lançou mais clareza no entendimento de se e quão diferente é o conjunto de peptídeos antigênicos gerados pelo imunoproteassomo em comparação ao proteassomo convencional (KINCAID et al., 2012).

Os camundongos deficientes das três subunidades catalíticas que formam o imunoproteassomo (TKO) gerados neste estudo exibiram níveis de proteínas poliubiquitinadas e expressão de subunidades α do proteassomo comparáveis a animais normais, enquanto a expressão de TAP-1 e MHC classe I era menor nos animais triplamente deficientes. Ainda, o número de células T CD8⁺ no timo e baço dos animais TKO correspondeu a aproximadamente 50% do encontrado em animais normais. Os autores atribuíram a falta de TAP-1 a uma questão metodológica, uma vez que o gene *Tap1* é flanqueado por *Psm8* e *Psm9* e sua expressão poderia ser comprometida pela excisão dos exons necessária para a geração do animal TKO. Porém os níveis de MHC classe I dos animais TKO eram ainda mais baixos do que de animais TAP-1^{+/-} controles, justificando a sugestão dos autores de que não a falta de TAP

1, mas principalmente a provisão deficiente de peptídeos na ausência do imunoproteassomo poderia comprometer a estabilidade e exportação de moléculas de MHC classe I para a superfície celular. Na mesma direção, o menor número de linfócitos T CD8⁺ seria decorrente da menor estimulação antigênica oriunda da redução da quantidade de complexos peptídeo-MHC classe I (KINCAID et al., 2012).

Experimentos *in vitro* mostraram que em comparação a DC de animais C57BL/6, as DC de animais TKO eram menos capazes de estimular linfócitos T CD8⁺ com TCR transgênicos específicos para epítomos endógenos, derivados de influenza ou mesmo da proteína ovalbumina. Mas quando as células eram forçadas

a expressar um mini-gene que codificava um epítopo de ovalbumina que não precisava ser processado, as DC de ambos animais estimulavam igualmente os linfócitos T CD8⁺ transgênicos cognatos, a despeito das diferenças na expressão de TAP-1 e MHC classe I, corroborando a ideia de que a deficiência observada nos animais TKO deve-se ao processamento de antígenos (KINCAID et al., 2012).

In vivo, camundongos TKO infectados com o vírus LCMV foram menos capazes do que seus pares C57BL/6 de estimular linfócitos T CD8⁺ transgênicos que foram transferidos para os animais e eram específicos para o epítopo GP33 do vírus. Animais TKO que receberam transferência adotiva de linfócitos T CD8⁺ policlonais normais e foram infectados com LCMV também tiveram resposta reduzida para os epítopos GP34 e GP118, enquanto a resposta específica para NP396 não foi alterada, e no caso do epítopo GP276 a resposta foi aumentada em comparação aos animais C57BL/6, sugerindo que a falta de imunoproteassomo pode alterar a imunodominância dos linfócitos T CD8⁺. Em contraste, a resposta de linfócitos T CD4⁺ observada em animais TKO infectados com LCMV era indistinguível da observada em camundongos C57BL/6, indicando que as células T e as células apresentadoras de antígenos não estavam globalmente afetadas nos animais TKO, cuja deficiência restringiu-se à apresentação de antígenos restritos a MHC classe I. Apesar disto, os autores não relataram maior susceptibilidade ao LCMV na ausência de imunoproteassomo (KINCAID et al., 2012).

Notavelmente, e contrastando com trabalhos anteriores que empregaram animais deficientes em apenas uma ou duas das subunidades catalíticas indutíveis, os animais TKO rejeitaram células de animais C57BL/6 rapidamente após a transferência adotiva de esplenócitos, indicando que os peptídeos restritos a MHC classe I gerados pelo imunoproteassomo presente nos animais C57BL/6 são tão distintos dos peptídeos gerados pelo proteassomo convencional (única forma presente nos camundongos TKO) que são reconhecidos como estranhos. Já a transferência de esplenócitos de animais TKO para C57BL/6 não gerou rejeição, o que pode ser esperado e explicado pela presença das duas formas de proteassomo nos camundongos C57BL/6, os quais toleram o conjunto de peptídeos gerados pelos animais TKO (KINCAID et al., 2012).

Em conjunto, os dados apresentados neste estudo mostraram pela primeira vez de forma sistemática que a quantidade e especificidade dos peptídeos gerados pelas três subunidades catalíticas específicas do imunoproteassomo são

marcadamente distintas da quantidade e especificidade dos peptídeos gerados pelo proteassomo convencional.

Em humanos, ainda, um estudo clínico de Fase 2b correlacionou a expressão de genes do imunoproteassomo com a proteção conferida pela vacina RTS,S contra malária após desafio (VAHEY et al., 2010). Esta é uma vacina recombinante constituída da subunidade correspondente aos domínios repetidos e porção C-terminal da proteína do circumsporozoítio de *Plasmodium falciparum* covalentemente ligada ao antígeno S do vírus da hepatite B e representa o melhor candidato vacinal já desenvolvido contra malária. No referido estudo, 39 voluntários receberam a vacina juntamente com os adjuvantes AS01 ou AS02, dos quais 13 foram protegidos. Análises de enriquecimento de grupos em experimentos de microarranjo identificaram genes relacionados a vias do imunoproteassomo e processamento de epítomos restritos a MHC classe I como os genes associados com proteção após três doses da vacina, e foram sugeridos pelos autores como possíveis marcadores para avaliação da eficiência das imunizações (VAHEY et al., 2010).

O papel do imunoproteassomo na indução de resposta imune que medeia o controle de infecções intracelulares, como sugerido nos parágrafos anteriores, representaria uma forte pressão seletiva para os patógenos, que poderiam desenvolver mecanismos adaptativos de evasão. De fato, isto já foi sugerido em trabalhos que reportam infecções experimentais por HIV-1, onde a proteína viral Gag p24 foi capaz de suprimir a expressão das subunidades $\beta 2i$ e $\beta 5i$ e inibir a apresentação de antígenos para linfócitos T $CD8^+$ *in vitro* (STEERS et al., 2009). Por outro lado, a proteína Tat do HIV-1 foi capaz de induzir a expressão de $\beta 2i$ e $\beta 5i$, enquanto inibiu a expressão de $\beta 1i$, o que em conjunto melhorou a geração e apresentação de epítomos subdominantes restritos a MHC classe I (GAVIOLI et al., 2004). A existência de mecanismos antagônicos de indução e inibição do imunoproteassomo induzidos pelo mesmo patógeno pode ser de difícil interpretação. Uma possibilidade é que tais mecanismos sirvam justamente para garantir a permanência do patógeno concomitante ao seu controle pelo hospedeiro, em um equilíbrio que viabilize a coexistência de ambos por longos períodos.

Portanto, cada vez mais tem sido mostrada a relevância do imunoproteassomo para a geração, magnitude e diversidade da resposta de linfócitos T $CD8^+$ que controlam infecções.

1.3 Regulação da resposta de linfócitos T CD8⁺

Para que os linfócitos T promovam a homeostase, eles devem ser adequadamente induzidos, e definir o tom da resposta imune envolve a integração de sinais intrincados e complexos. Respostas insuficientes são incapazes de controlar infecções e podem permitir a progressão de diversos tipos de câncer, enquanto respostas exacerbadas podem gerar danos por excesso de inflamação, bem como levar a quadros de alergia e autoimunidade, como ilustram os casos de asma, doença celíaca, lupus, diabetes autoimune, vitiligo e esclerose múltipla.

Um dos mecanismos mais importantes para o silenciamento da resposta de linfócitos T envolve a participação de células T reguladoras (Treg), originalmente descritas como CD4⁺ CD25⁺ (SAKAGUCHI et al., 1995). Mais tarde, ainda, o fator de transcrição Foxp3 foi proposto como um marcador relacionado à ontogenia e função das Treg (BENNETT et al., 2001; KASPROWICZ et al., 2003; ZIEGLER, 2006). Além de CD25 e Foxp3, outros marcadores têm sido propostos para caracterizar subpopulações destas células, incluindo Helios, Nrp1, PD-1, Swap70, Dapl1, Igfbp4, GITR, galectina-1, CD38, OX40 e CTLA-4, entre outros, como revisto recentemente (BILATE; LAFAILLE, 2012). A indução de Treg pode ocorrer no timo (nTreg) ou na periferia (iTreg), e envolve sinalização via TCR e CD28, mas sua função efetora não é necessariamente antígeno-específica. A indução de iTreg na periferia pode ocorrer num contexto inflamatório ou não inflamatório, e pode envolver a participação de IL-2, TGF- β , ácido retinóico, bem como ligantes do receptor de aril-hidrocarboneto (Ahr) (MUCIDA et al., 2007; QUINTANA et al., 2008).

Inúmeros mecanismos distintos de regulação mediados por Treg são conhecidos, como o consumo de IL-2, a produção de IL-35, TGF- β , IL-10, bem como a expressão de indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) e mecanismos dependentes de contato mediados pela interação com LAG-3, CD39, CTLA-4 e GITR, ou ainda a citotoxicidade mediada por Treg expressando granzima B e perforina.

No entanto, a maioria dos mecanismos descritos para a função das Treg relata a regulação de linfócitos T CD4⁺ e nunca foram observados, ou sabidamente não se aplicam, durante o silenciamento de linfócitos T CD8⁺. Apenas muito recentemente, foi observado a indução de anergia em linfócitos T CD8⁺ humanos mediada por Treg (MAEDA et al., 2014). Neste trabalho, os autores identificaram em indivíduos saudáveis linfócitos T CD8⁺ anérgicos específicos para um antígeno da

pele relacionado ao desenvolvimento de vitiligo que por efeito de Treg tornam-se hiporresponsivos à reestimulação *in vitro*, quantificada pela capacidade dos linfócitos T CD8⁺ específicos proliferarem e produzirem citocinas.

Em um modelo murino de infecção por LCMV, a depleção de Treg levou a um aumento de até 100 vezes no número de linfócitos T CD8⁺ efetores, rompendo o estado de exaustão destas células. Porém, este aumento não teve nenhum efeito na redução da carga viral (PENALOZA-MACMASTER et al., 2014). Por outro lado, o bloqueio concomitante de PD-L1 e da sinalização por prostaglandina E2 durante a infecção por LCMV melhorou a função e sobrevivência dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, contribuindo para o controle do vírus (CHEN et al., 2015).

Outro mecanismo de regulação dos linfócitos T CD8⁺ descrito num modelo de infecção pelo parasito *Encephalitozoon cuniculum* sugere a participação de TGF- β na apoptose e redução da funcionalidade destes linfócitos (BHADRA et al., 2014).

Portanto, muito pouco se sabe ainda sobre a participação de Treg na indução e efetuação da resposta mediada por linfócitos T CD8⁺, tampouco se a indução de Treg por patógenos pode representar um mecanismo de evasão do controle por linfócitos T CD8⁺.

1.4 Doença de Chagas

A Doença de Chagas, também conhecida como tripanosomíase americana, é uma condição cardíaca e/ou digestiva crônica, ou eventualmente aguda, causada pelo protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi*, o qual infecta estimadamente 10 milhões de pessoas no mundo, principalmente nas regiões tropicais pobres (HOTEZ et al., 2008; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Esta é apontada pela Organização Mundial da Saúde como uma das 13 doenças tropicais negligenciadas mais importantes, e também é a principal doença cardíaca por causa infecciosa (KIRCHHOFF et al., 2004; WHO, 2009).

O ciclo de vida do *T. cruzi* foi originalmente descrito no Brasil por Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909), o que talvez explique a tradição no estudo deste parasito entre a comunidade científica brasileira. Os parasitos são transmitidos para humanos pelos vetores *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata*, normalmente através das fezes contaminadas deixadas sobre a pele enquanto o inseto se alimenta de sangue humano. A transmissão não vetorial também é importante, ocorrendo principalmente por transfusão de sangue ou órgãos sólidos,

por via congênita, ou mesmo pela ingestão de alimentos contaminados (BERN et al., 2008; CENTERS FOR DISEASE; PREVENTION, 2006; PEREIRA et al., 2009; TORRICO et al., 2004).

O desenvolvimento de patologia crônica característica da Doença de Chagas ocorre anos após a infecção, em aproximadamente 30% dos indivíduos infectados. Os sintomas cardíacos e/ou digestivos são bastante variados e os fatores que levam à patologia são ainda pouco claros (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). O tratamento é quimioterápico e baseia-se principalmente nas drogas benzonidazol e nifurtimox. Estes tratamentos provocam efeitos colaterais adversos e sua eficácia é limitada e controversa, com os melhores resultados obtidos na fase aguda (BERN, 2011; MATTA GUEDES et al., 2012; MUNOZ et al., 2013).

A prevenção, por outro lado, baseia-se no controle vetorial, uma vez que não existe ainda uma vacina contra *T. cruzi*. Contudo, o fato de pacientes imunossuprimidos reativarem a Doença de Chagas, com ressurgimento de parasitemia no sangue, é um indicativo de que o sistema imune confere algum grau de controle da infecção em humanos (BESTETTI et al., 2012; BRAZ; AMATO NETO; OKAY, 2008). Além disso, evidências experimentais pré-clínicas sugerem que é possível induzir uma resposta imune capaz de controlar a infecção por *T. cruzi*, sustentando a hipótese de que uma vacina para prevenir a Doença de Chagas é possível. No entanto, o desenvolvimento de vacinas contra protozoários permanece um desafio bastante complexo e no caso de doenças negligenciadas, como Chagas, restringe-se à pesquisa acadêmica básica, evidenciando o hiato entre a possibilidade teórico-científica e a existência real de uma vacina.

1.5 Papel dos linfócitos T CD8⁺ no controle da infecção por *T. cruzi*

Na infecção experimental de camundongos C57BL/6 com *T. cruzi* observa-se o controle da infecção concomitante ao aparecimento de uma resposta mediada por linfócitos T CD8⁺. Notavelmente, a depleção nestes animais de linfócitos T CD8⁺ com anticorpos ou o uso de linhagens deficientes em CD8 ou β -2 microglobulina, mas de mesmo fundo genético, levam a um aumento da parasitemia e mortalidade em resposta à infecção por *T. cruzi*, sugerindo a relevância dos linfócitos T CD8⁺ para o controle do parasito (ROTTENBERG et al., 1993; TARLETON, 1990; TARLETON et al., 1992). Os mecanismos responsáveis por este controle são múltiplos, incluindo, principalmente, a secreção de IFN- γ e a citotoxicidade direta

contra células infectadas, dependente de perforina (DE ALENCAR et al., 2009; MARTIN; TARLETON, 2004; MULLER et al., 2003; TZELEPIS et al., 2006).

Apesar do parasito expressar mais de 12 mil genes, os epítomos de *T. cruzi* reconhecidos por linfócitos T CD8⁺ durante a infecção experimental são poucos e encontrados em proteínas de superfície da família das *trans*-sialidasas, incluindo a própria *trans*-sialidase (TS) e a proteína 2 da superfície de amastigotas (ASP-2) (MARTIN et al., 2006). Animais C57BL/6 infectados com a cepa Y de *T. cruzi* reconhecem o epítomo imunodominante VNHRFTLV (PA8) da ASP-2, o qual pode corresponder a até 30% da resposta de linfócitos T CD8⁺. Os epítomos subdominantes reconhecidos por estes animais são ANYDFTLV (TsKb-18) e ANYKFTLV (TsKb-20) do antígeno TSA (TZELEPIS et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2004). Os mecanismos responsáveis pelo controle da imunodominância destes linfócitos T CD8⁺ permanecem desconhecidos, mas evidências prévias de nosso grupo sugerem a competição de linfócitos por células apresentadoras de antígenos como um fator preponderante (TZELEPIS et al., 2008). Ainda, é possível que a forte imunodominância de linfócitos T CD8⁺ consista em um mecanismo de evasão do controle mediado pelo hospedeiro, já que o reconhecimento de epítomos subdominantes de *T. cruzi* em um modelo experimental incrementou a proteção mediada por estes linfócitos (DOMINGUEZ et al., 2011).

Enquanto na maioria das infecções por diferentes patógenos a indução de linfócitos T CD8⁺ ocorre em aproximadamente 5 dias, o aparecimento destas células produtoras de IFN- γ é atrasado na infecção experimental por *T. cruzi*, sendo primeiramente observado em torno do décimo dia pós-infecção (TZELEPIS et al., 2006). Este atraso permite uma intensa replicação inicial do parasito, o que potencialmente pode levar ao estabelecimento precoce de reservatórios no hospedeiro que favoreceriam a progressão para a fase crônica.

Além do forte perfil de imunodominância e do atraso na indução de linfócitos T CD8⁺ em resposta à infecção por *T. cruzi*, estas células exibem baixa viabilidade, com um fenótipo caracterizado pela expressão de altos níveis do receptor pró-apoptótico Fas (CD95) (GUILLERMO et al., 2007; VASCONCELOS; BRUNA-ROMERO; et al., 2012). Assim, é plausível sugerir que a indução de apoptose utilizando a via de sinalização de CD95 nos linfócitos T CD8⁺ específicos para epítomos de *T. cruzi* poderia estar associada à incapacidade de um controle eficiente da infecção.

Ainda, a imunopatologia observada experimentalmente na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* pode estar associada à reativação dos linfócitos T CD8⁺ que permaneceram mas foram ineficazes em conferir imunidade estéril na fase aguda (GARZON et al., 2005).

Portanto, os estudos pré-clínicos sugerem que a resposta de linfócitos T CD8⁺ é ao mesmo tempo forte e essencial para o controle da fase aguda da infecção por *T. cruzi*, mas subótima e insuficiente para eliminar completamente o parasito, o que permitiria a progressão para a fase crônica da doença. Esta insuficiência da resposta pode ser correlacionada a um atraso na indução, forte padrão de imunodominância e perfil pró-apoptótico dos linfócitos T CD8⁺.

1.6 Indução de resposta de linfócitos T CD8⁺ contra *T. cruzi* através de vacinação com vetores adenovirais recombinantes

Para testar a hipótese de que é possível fortalecer a resposta de linfócitos T CD8⁺ para controlar a infecção por *T. cruzi*, nosso grupo desenvolveu um vetor adenoviral humano tipo 5 não replicativo que expressa ASP-2 (AdASP-2), o qual foi utilizado em um protocolo de imunização de uma linhagem de camundongos altamente susceptível (DE ALENCAR et al., 2009). Enquanto camundongos A/Sn imunizados com o vetor adenoviral que expressa beta-galactosidase (Adβ-gal) sucumbem rapidamente ao desafio subcutâneo com apenas 150 formas sanguíneas de *T. cruzi*, animais imunizados com AdASP-2 controlam a parasitemia e sobrevivem por anos após o desafio. Esta proteção, no entanto, é completamente abolida quando linfócitos T CD8⁺ são depletados com anticorpos, confirmando a hipótese de que a imunização com o vetor adenoviral é capaz de induzir uma resposta de linfócitos T CD8⁺ que, contrastando com a induzida naturalmente pelo *T. cruzi*, controla a infecção (DE ALENCAR et al., 2009; VASCONCELOS; BRUNA-ROMERO; et al., 2012).

A eficiência da resposta de linfócitos T CD8⁺ induzidos pela imunização experimental com AdASP-2 pode ser explicada, em parte, por uma cinética acelerada da indução destas células em comparação a animais *naïve* em resposta ao desafio (TZELEPIS et al., 2006). De fato, a imunização com vetor adenoviral induz uma resposta de longa duração, gerando um *pool* de linfócitos T CD8⁺ de memória efetora (CD127^{alto} CD62L^{baixo} CD44^{alto}) que persiste por mais de 98 dias

após a imunização e é resistente à erosão (RIGATO et al., 2011; VASCONCELOS; DOMINGUEZ; et al., 2012).

A presença de um *pool* de células específicas gerado antes da infecção explicam a proteção conferida pela vacinação de modo quantitativo e temporal. No entanto, a qualidade da resposta de linfócitos T CD8⁺ é também alterada pela imunização com AdASP-2. Um aspecto qualitativo divergente é a indução de resposta contra epítomos subdominantes observada durante a imunização com o vetor adenoviral, mas não durante a infecção com o parasito (DOMINGUEZ et al., 2011). Outro aspecto notável da imunização com o vetor adenoviral refere-se à indução de um *pool* de linfócitos TCD8⁺ de alta viabilidade, com baixa expressão de CD95, que predominam mesmo quando a imunização se dá no mesmo dia da infecção (VASCONCELOS; BRUNA-ROMERO; et al., 2012). Portanto, além da diferença quantitativa e temporal conferida pela vacinação, o vetor adenoviral é capaz de modificar a qualidade da resposta de linfócitos T CD8⁺ que medeiam o controle da infecção por *T. cruzi* (VASCONCELOS; DOMINGUEZ; et al., 2012). Evidências experimentais do nosso grupo sugerem que neste modelo as células T CD8⁺ que expandem e conferem proteção após o desafio com *T. cruzi* são mesmo aquelas induzidas pela imunização prévia, e não as células *naïve* recém-ativadas pela infecção. Ainda, a proliferação de linfócitos TCD8⁺ observada após o desafio é desnecessária à proteção mediada pela vacinação com AdASP-2, enquanto a recirculação dos linfócitos é, de fato, importante para a proteção (DOMINGUEZ et al., 2012).

1.7 Justificativa

O modelo murino experimental de infecção por *T. cruzi* e vacinação com vetor adenoviral recombinante evidencia a importância da resposta de linfócitos T CD8⁺ no controle de infecções intracelulares de maneira didática. Explorar o paralelo entre a resposta subótima destes linfócitos, induzida pela infecção por *T. cruzi*, e a resposta ótima, cooptada pela vacinação com vetor adenoviral, enseja a identificação precisa de bases celulares e moleculares que controlam a indução e efetuação da resposta de linfócitos T CD8⁺ em cada caso, o que pode ser extrapolado para o entendimento mais geral de mecanismos que levam à cronicidade de infecções intracelulares e o direcionamento para desenvolver estratégias vacinais ou terapêuticas mais eficientes contra estes patógenos.

Especificamente, não existem informações na literatura corrente acerca do papel do imunoproteassomo na indução e efetuação da resposta de linfócitos T CD8⁺ contra um patógeno intracelular que induz uma infecção crônica em que estes linfócitos podem ainda contribuir para a imunopatologia. Tampouco é sabido se o imunoproteassomo tem relevância para o sucesso de uma estratégia vacinal eficaz contra qualquer patógeno. Dada a importância basilar dos linfócitos T CD8⁺ e IFN- γ no modelo experimental de infecção por *T. cruzi* e vacinação com adenovírus recombinante, nós julgamos que este modelo poderia maximizar a possibilidade de observar algum papel do imunoproteassomo na ativação, especificidade e resposta efetora dos linfócitos T CD8⁺.

Outro ponto essencial relacionado à resposta de linfócitos T CD8⁺ contra *T. cruzi* que ainda é muito pouco entendido consiste nos mecanismos que levam a resposta contra este parasito ser subótima. A identificação destes mecanismos pode ser importante para compreender a progressão da infecção e eventualmente direcionar intervenções imunoterapêuticas. Para estudar o que leva a resposta de linfócitos T CD8⁺ ser subótima na presença de *T. cruzi* nós consideramos que seria interessante desenvolver um modelo no qual a célula apresentadora de antígeno, o linfócito T CD8⁺ e a quantidade de antígeno processado são normalizados. Com estas variáveis controladas, seria possível observar o impacto específico do *T. cruzi* na indução destes linfócitos *in vivo* e identificar mecanismos pelos quais o parasito interfere nesta indução.

6 CONCLUSÕES

Utilizando o modelo de infecção experimental pelo *T. cruzi* e vacinação com vetor adenoviral recombinante contendo um gene do parasito, foi possível identificar novas bases celulares e moleculares que governam a resposta de linfócitos T CD8⁺. Estas bases incluem o envolvimento do imunoproteassomo e de Tregs CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁺ respectivamente na indução e na supressão do *priming* induzido pelo *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS *

ALIBERTI, J. C. et al. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 6, p. 1961-1967, 1996.

ALMEIDA, I. C. et al. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. **EMBO J.**, v. 19, n. 7, p. 1476-1485, 2000.

AMARAL, E. P. et al. Pulmonary infection with hypervirulent *Mycobacteria* reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. **PLoS Pathog.**, v. 10, n. 7, p. e1004188, 2014.

ANTON, L. C.; YEWDELL, J. W. Translating DRiPs: MHC class I immunosurveillance of pathogens and tumors. **J. Leukoc. Biol.**, v. 95, n. 4, p. 551-562, 2014.

ARAKI, K. et al. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. **Nature**, v. 460, n. 7251, p. 108-112, 2009.

AYRES, J. S.; SCHNEIDER, D. S. Tolerance of infections. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 30, p. 271-294, 2012.

BAFICA, A. et al. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v. 177, n. 6, p. 3515-3519, 2006.

BASLER, M. et al. The antiviral immune response in mice devoid of immunoproteasome activity. **J. Immunol.**, v. 187, n. 11, p. 5548-5557, 2011.

BASLER, M.; KIRK, C. J.; GROETTRUP, M. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 25, n. 1, p. 74-80, 2013.

BELZ, G. T.; KALLIES, A. Effector and memory CD8⁺ T cell differentiation: toward a molecular understanding of fate determination. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 22, n. 3, p. 279-285, 2010.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BENNETT, C. L. et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. **Nat. Genet.**, v. 27, n. 1, p. 20-21, 2001.

BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 364, n. 26, p. 2527-2534, 2011.

BERN, C. et al. Chagas disease and the US blood supply. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 21, n. 5, p. 476-482, 2008.

BERTHOLET, S. et al. Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. **J. Immunol.**, v. 177, n. 6, p. 3525-3533, 2006.

BESTETTI, R. B. et al. Trypanosoma cruzi infection reactivation manifested by encephalitis in a Chagas heart transplant recipient. **Int. J. Cardiol.**, 2012.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235-238, 2006.

BHADRA, R. et al. Intrinsic TGF-beta signaling promotes age-dependent CD8+ T cell polyfunctionality attrition. **J. Clin. Invest.**, v. 124, n. 6, p. 2441-2455, 2014.

BILATE, A. M.; LAFAILLE, J. J. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 30, p. 733-758, 2012.

BINDER, D. C. et al. Antigen-specific bacterial vaccine combined with anti-PD-L1 rescues dysfunctional endogenous T cells to reject long-established cancer. **Cancer Immunol. Res.**, v. 1, n. 2, p. 123-133, 2013.

BLUM, J. S.; WEARSCH, P. A.; CRESSWELL, P. Pathways of antigen processing. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 31, p. 443-473, 2013.

BOES, B. et al. Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. **J. Exp. Med.**, v. 179, n. 3, p. 901-909, 1994.

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, n. 2, p. 145-156, 2013.

BOSCARDIN, S. B. et al. Immunization with cDNA expressed by amastigotes of *Trypanosoma cruzi* elicits protective immune response against experimental infection. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 5, p. 2744-2757, 2003.

BOURZAC, K. Infectious disease: Beating the big three. **Nature**, v. 507, n. 7490, p. S4-7, 2014.

BRAZ, L. M.; AMATO NETO, V.; OKAY, T. S. Reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in immunosuppressed patients: contributions for the laboratorial diagnosis standardization. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 50, n. 1, p. 65-66, 2008.

CAETANO, B. C. et al. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v. 187, n. 4, p. 1903-1911, 2011.

CAMARGO, R. et al. *Trypanosoma cruzi* infection down-modulates the immunoproteasome biosynthesis and the MHC class I cell surface expression in HeLa cells. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e95977, 2014.

CAMPOS, M. A. et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J. Immunol.**, v. 167, n. 1, p. 416-423, 2001.

CARRANZA, F. et al. Helminth antigens enable CpG-activated dendritic cells to inhibit the symptoms of collagen-induced arthritis through Foxp3+ regulatory T cells. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40356, 2012.

CENTERS FOR DISEASE, C.; PREVENTION. Chagas disease after organ transplantation--Los Angeles, California, 2006. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 55, n. 29, p. 798-800, 2006.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo de *Schizotripanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHEN, J. H. et al. Prostaglandin E2 and programmed cell death 1 signaling coordinately impair CTL function and survival during chronic viral infection. **Nat. Med.**, v. 21, n. 4, p. 327-334, 2015.

COCKBURN, I. A. et al. Dendritic cells and hepatocytes use distinct pathways to process protective antigen from plasmodium in vivo. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 3, p. e1001318, 2011.

COLEMAN, C. B. et al. Epstein-Barr virus type 2 latently infects T cells, inducing an atypical activation characterized by expression of lymphotactic cytokines. **J. Virol.**, v. 89, n. 4, p. 2301-2312, 2015.

COUX, O.; TANAKA, K.; GOLDBERG, A. L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 65, p. 801-847, 1996.

CUBURU, N. et al. Topical herpes simplex virus 2 (HSV-2) vaccination with human papillomavirus vectors expressing gB/gD ectodomains induces genital-tissue-resident memory CD8⁺ T cells and reduces genital disease and viral shedding after HSV-2 challenge. **J. Virol.**, v. 89, n. 1, p. 83-96, 2015.

DAY, C. L. et al. Patients with tuberculosis disease have Mycobacterium tuberculosis-specific CD8 T cells with a pro-apoptotic phenotype and impaired proliferative capacity, which is not restored following treatment. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94949, 2014.

DE ALENCAR, B. C. et al. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4⁺ and CD8⁺ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 10, p. 4383-4395, 2009.

DE GRAAF, N. et al. PA28 and the proteasome immunosubunits play a central and independent role in the production of MHC class I-binding peptides in vivo. **Eur. J. Immunol.**, v. 41, n. 4, p. 926-935, 2011.

DOMINGUEZ, M. R. et al. Re-circulation of lymphocytes mediated by sphingosine-1-phosphate receptor-1 contributes to resistance against experimental infection with the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Vaccine**, v. 30, n. 18, p. 2882-2891, 2012.

DOMINGUEZ, M. R. et al. Subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes contribute to resistance against experimental infection with a human protozoan parasite. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22011, 2011.

DOS SANTOS, L. I. et al. Blockade of CTLA-4 promotes the development of effector CD8⁺ T lymphocytes and the therapeutic effect of vaccination with an attenuated protozoan expressing NY-ESO-1. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 64, n. 3, p. 311-323, 2015.

DUPONT, C. D. et al. Parasite fate and involvement of infected cells in the induction of CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses to *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathog.**, v. 10, n. 4, p. e1004047, 2014.

ERDMANN, H. et al. IL-17A promotes macrophage effector mechanisms against *Trypanosoma cruzi* by trapping parasites in the endolysosomal compartment. **Immunobiology**, v. 218, n. 6, p. 910-923, 2013.

ERSCHING, J.; PINTO, A. R. HIV-1 vaccine clinical trials: the Brazilian experience. **Rev. Med. Virol.**, v. 19, n. 5, p. 301-311, 2009.

FARIA, L. O.; LIMA, B. D.; DE SA, C. M. *Trypanosoma cruzi*: effect of the infection on the 20S proteasome in non-immune cells. **Exp. Parasitol.**, v. 120, n. 3, p. 261-268, 2008.

FEHLING, H. J. et al. MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. **Science**, v. 265, n. 5176, p. 1234-1237, 1994.

FREUDENBURG, W. et al. Reduction in ATP levels triggers immunoproteasome activation by the 11S (PA28) regulator during early antiviral response mediated by IFN β in mouse pancreatic beta-cells. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e52408, 2013.

FU, C. et al. beta-Catenin in dendritic cells exerts opposite functions in cross-priming and maintenance of CD8 $^{+}$ T cells through regulation of IL-10. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 112, n. 9, p. 2823-2828, 2015.

GAO, W.; PEREIRA, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, n. 2, p. 167-170, 2002.

GARZON, E. et al. Differential infectivity and immunopathology in murine experimental infections by two natural clones belonging to the *Trypanosoma cruzi* I lineage. **Parasitology**, v. 131, n. Pt 1, p. 109-119, 2005.

GAUTAM, S. et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 209, n. 2, p. 290-299, 2014.

GAVIOLI, R. et al. HIV-1 tat protein modulates the generation of cytotoxic T cell epitopes by modifying proteasome composition and enzymatic activity. **J. Immunol.**, v. 173, n. 6, p. 3838-3843, 2004.

GONCALVES, V. M. et al. NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 10, p. e2469, 2013.

GRAEFE, S. E. et al. Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 10, p. 833-839, 2003.

GRAY, S. M.; KAECH, S. M.; STARON, M. M. The interface between transcriptional and epigenetic control of effector and memory CD8(+) T-cell differentiation. **Immunol. Rev.**, v. 261, n. 1, p. 157-168, 2014.

GROVER, H. S. et al. Impact of regulated secretion on antiparasitic CD8 T cell responses. **Cell Rep.**, v. 7, n. 5, p. 1716-1728, 2014.

GRUJIC, M. et al. The role of CD80/CD86 in generation and maintenance of functional virus-specific CD8+ T cells in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. **J. Immunol.**, v. 185, n. 3, p. 1730-1743, 2010.

GUIDOTTI, L. G. et al. Immunosurveillance of the liver by intravascular effector CD8(+) T cells. **Cell**, v. 161, n. 3, p. 486-500, 2015.

GUILLERMO, L. V. et al. The Fas death pathway controls coordinated expansions of type 1 CD8 and type 2 CD4 T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Leukoc. Biol.**, v. 81, n. 4, p. 942-951, 2007.

HALLERMALM, K. et al. Tumor necrosis factor-alpha induces coordinated changes in major histocompatibility class I presentation pathway, resulting in increased stability of class I complexes at the cell surface. **Blood**, v. 98, n. 4, p. 1108-1115, 2001.

HAMANO, S. et al. WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. **Immunity**, v. 19, n. 5, p. 657-667, 2003.

HAMMERLING, G. J. The 1996 Nobel Prize to Rolf Zinkernagel and Peter Doherty. **Cell Tissue Res.**, v. 287, n. 1, p. 1-2, 1997.

HAQUE, A. et al. Type I IFN signaling in CD8- DCs impairs Th1-dependent malaria immunity. **J. Clin. Invest.**, v. 124, n. 6, p. 2483-2496, 2014.

HENSLEY, S. E. et al. Unexpected role for the immunoproteasome subunit LMP2 in antiviral humoral and innate immune responses. **J. Immunol.**, v. 184, n. 8, p. 4115-4122, 2010.

HERMIDA, M. D. et al. Leishmania amazonensis infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. **BMC Infect. Dis.**, v. 14, p. 450, 2014.

HOTEZ, P. J. et al. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 9, p. e300, 2008.

JANEWAY, C. A., JR. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v. 54 Pt 1, p. 1-13, 1989.

JOFFRE, O. P. et al. Cross-presentation by dendritic cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 12, n. 8, p. 557-569, 2012.

JOHN, B. et al. Dynamic Imaging of CD8(+) T cells and dendritic cells during infection with Toxoplasma gondii. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 7, p. e1000505, 2009.

KASPROWICZ, D. J. et al. Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4+ T cell effector function. **J. Immunol.**, v. 171, n. 3, p. 1216-1223, 2003.

KAYAMA, H. et al. NFATc1 mediates Toll-like receptor-independent innate immune responses during Trypanosoma cruzi infection. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 7, p. e1000514, 2009.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection. **Microbes Infect.**, v. 12, n. 7, p. 511-517, 2010.

KINCAID, E. Z. et al. Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. **Nat. Immunol.**, v. 13, n. 2, p. 129-135, 2012.

KIRCHHOFF, L. V. et al. Parasitic diseases of the heart. **Front. Biosci.**, v. 9, p. 706-723, 2004.

KOTNER, J.; TARLETON, R. Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of Trypanosoma cruzi infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 2, p. 861-869, 2007.

KOUP, R. A.; DOUEK, D. C. Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 1, n. 1, p. a007252, 2011.

LEE, I. P. et al. Toxoplasma gondii is dependent on glutamine and alters migratory profile of infected host bone marrow derived immune cells through SNAT2 and CXCR4 pathways. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109803, 2014.

LIEBERMAN, J. Anatomy of a murder: how cytotoxic T cells and NK cells are activated, develop, and eliminate their targets. **Immunol. Rev.**, v. 235, n. 1, p. 5-9, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LUO, Y. et al. Suppression of antigen-specific adaptive immunity by IL-37 via induction of tolerogenic dendritic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 111, n. 42, p. 15178-15183, 2014.

MACHADO, A. V. et al. Long-term protective immunity induced against Trypanosoma cruzi infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. **Hum. Gene. Ther.**, v. 17, n. 9, p. 898-908, 2006.

MAEDA, Y. et al. Detection of self-reactive CD8(+) T cells with an anergic phenotype in healthy individuals. **Science**, v. 346, n. 6216, p. 1536-1540, 2014.

MARTIN, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 304-317, 2004.

MARTIN, D. L. et al. TGF-beta regulates pathology but not tissue CD8+ T cell dysfunction during experimental Trypanosoma cruzi infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, n. 10, p. 2764-2771, 2007.

MARTIN, D. L. et al. CD8+ T-Cell responses to Trypanosoma cruzi are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. **PLoS Pathog.**, v. 2, n. 8, p. e77, 2006.

MARTINS, G. A. et al. CTLA-4 blockage increases resistance to infection with the intracellular protozoan Trypanosoma cruzi. **J. Immunol.**, v. 172, n. 8, p. 4893-4901, 2004.

MASCANFRONI, I. D. et al. IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. **Nat. Immunol.**, v. 14, n. 10, p. 1054-1063, 2013.

MATTA GUEDES, P. M. et al. Antiparasitological chemotherapy in Chagas' disease cardiomyopathy: current evidence. **Trop. Med. Int. Health**, v. 17, n. 9, p. 1057-1065, 2012.

MCCARTHY, M. K.; WEINBERG, J. B. The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. **Front. Microbiol.**, v. 6, p. 21, 2015.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J. Parasitol.**, v. 64, n. 3, p. 475-482, 1978.

MICHAILOWSKY, V. et al. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am. J. Pathol.**, v. 159, n. 5, p. 1723-1733, 2001.

MIYAHIRA, Y. et al. Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. **J. Immunol. Methods**, v. 181, n. 1, p. 45-54, 1995.

MUCIDA, D. et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **Science**, v. 317, n. 5835, p. 256-260, 2007.

MUDD, P. A. et al. Vaccine-induced CD8+ T cells control AIDS virus replication. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 129-133, 2012.

MULLER, U. et al. Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, n. 1, p. 70-78, 2003.

MUNOZ, C. et al. Evaluation of nifurtimox treatment of chronic chagas disease by means of several parasitological methods. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n. 9, p. 4518-4523, 2013.

NAIR-GUPTA, P.; BLANDER, J. M. An Updated View of the Intracellular Mechanisms Regulating Cross-Presentation. **Front. Immunol.**, v. 4, p. 401, 2013.

NANDI, D.; JIANG, H.; MONACO, J. J. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. **J. Immunol.**, v. 156, n. 7, p. 2361-2364, 1996.

NATHAN, J. A. et al. Immuno- and constitutive proteasomes do not differ in their abilities to degrade ubiquitinated proteins. **Cell**, v. 152, n. 5, p. 1184-1194, 2013.

NIESEN, E. et al. Suppressive effect of interleukin 10 on priming of naive hepatitis C virus-specific CD8+ T cells. **J. Infect. Dis.**, v. 211, n. 5, p. 821-826, 2015.

NORRIS, B. A. et al. Chronic but not acute virus infection induces sustained expansion of myeloid suppressor cell numbers that inhibit viral-specific T cell immunity. **Immunity**, v. 38, n. 2, p. 309-321, 2013.

OBAR, J. J.; LEFRANCOIS, L. Early events governing memory CD8+ T-cell differentiation. **Int. Immunol.**, v. 22, n. 8, p. 619-625, 2010.

OLIVEIRA, A. C. et al. Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 4, p. e1000870, 2010.

OLIVEIRA, A. C. et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. **J. Immunol.**, v. 173, n. 9, p. 5688-5696, 2004.

OPITZ, E. et al. Impairment of immunoproteasome function by beta5i/LMP7 subunit deficiency results in severe enterovirus myocarditis. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 9, p. e1002233, 2011.

PADILLA, A. M.; SIMPSON, L. J.; TARLETON, R. L. Insufficient TLR activation contributes to the slow development of CD8+ T cell responses in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v. 183, n. 2, p. 1245-1252, 2009.

PANG, I. K.; ICHINOHE, T.; IWASAKI, A. IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8(+) T cell responses to influenza A virus. **Nat. Immunol.**, v. 14, n. 3, p. 246-253, 2013.

PANG, K. C. et al. Immunoproteasome subunit deficiencies impact differentially on two immunodominant influenza virus-specific CD8+ T cell responses. **J. Immunol.**, v. 177, n. 11, p. 7680-7688, 2006.

PENALOZA-MACMASTER, P. et al. Interplay between regulatory T cells and PD-1 in modulating T cell exhaustion and viral control during chronic LCMV infection. **J. Exp. Med.**, v. 211, n. 9, p. 1905-1918, 2014.

PEREIRA, K. S. et al. Chagas' disease as a foodborne illness. **J. Food. Prot.**, v. 72, n. 2, p. 441-446, 2009.

PIRON, M. et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta Trop.**, v. 103, n. 3, p. 195-200, 2007.

PONCE, N. E. et al. Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 201, n. 2, p. 145-155, 2012.

QUINTANA, F. J. et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v. 453, n. 7191, p. 65-71, 2008.

RADTKE, A. J. et al. Lymph-node resident CD8alpha+ dendritic cells capture antigens from migratory malaria sporozoites and induce CD8+ T cell responses. **PLoS Pathog.**, v. 11, n. 2, p. e1004637, 2015.

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

RIGATO, P. O. et al. Heterologous plasmid DNA prime-recombinant human adenovirus 5 boost vaccination generates a stable pool of protective long-lived CD8(+) T effector memory cells specific for a human parasite, *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 5, p. 2120-2130, 2011.

ROCK, K. L.; SHEN, L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. **Immunol. Rev.**, v. 207, p. 166-183, 2005.

RODRIGUES, M. M.; ERSCHING, J. Neglected tropical diseases, bioinformatics, and vaccines. **J. Infect. Dis.**, v. 211, n. 2, p. 175-177, 2015.

ROPERT, C. et al. Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Microbes Infect.**, v. 4, n. 9, p. 1015-1025, 2002.

ROSSEY, I. et al. CD8+ T cell immunity against human respiratory syncytial virus. **Vaccine**, v. 32, n. 46, p. 6130-6137, 2014.

ROSSJOHN, J. et al. T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 33, p. 169-200, 2015.

ROTHFUCHS, A. G. et al. In situ IL-12/23p40 production during mycobacterial infection is sustained by CD11bhigh dendritic cells localized in tissue sites distinct from those harboring bacilli. **J. Immunol.**, v. 182, n. 11, p. 6915-6925, 2009.

ROTTENBERG, M. E. et al. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 12, p. 5129-5133, 1993.

RUFFELL, B. et al. Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. **Cancer Cell**, v. 26, n. 5, p. 623-637, 2014.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.**, v. 155, n. 3, p. 1151-1164, 1995.

SALES, P. A., JR. et al. The regulatory CD4+CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect.**, v. 10, n. 6, p. 680-688, 2008.

SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 745-763, 2004.

SAVINO, W. et al. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 18, n. 1-2, p. 107-124, 2007.

SCHENTEN, D. et al. Signaling through the adaptor molecule MyD88 in CD4+ T cells is required to overcome suppression by regulatory T cells. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 78-90, 2014.

SCHLIE, K. et al. Survival of Effector CD8+ T Cells during Influenza Infection Is Dependent on Autophagy. **J. Immunol.**, v. 194, n. 9, p. 4277-4286, 2015.

SEIFERT, U. et al. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. **Cell.**, v. 142, n. 4, p. 613-624, 2010.

SHIN, E. C. et al. Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 11, p. 3006-3014, 2006.

SILVA, G. K. et al. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1 β response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v. 191, n. 6, p. 3373-3383, 2013.

SILVA, G. K. et al. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v. 184, n. 3, p. 1148-1152, 2010.

SMED-SORENSEN, A. et al. Influenza A virus infection of human primary dendritic cells impairs their ability to cross-present antigen to CD8 T cells. **PLoS Pathog.**, v. 8, n. 3, p. e1002572, 2012.

STAR, B. et al. The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. **Nature**, v. 477, n. 7363, p. 207-210, 2011.

STEERS, N. J. et al. Human immunodeficiency virus type 1 Gag p24 alters the composition of immunoproteasomes and affects antigen presentation. **J. Virol.**, v. 83, n. 14, p. 7049-7061, 2009.

STEINMAN, R. M.; WITMER, M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 75, n. 10, p. 5132-5136, 1978.

TARLETON, R. L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v. 144, n. 2, p. 717-724, 1990.

TARLETON, R. L. et al. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, v. 356, n. 6367, p. 338-340, 1992.

TORRICO, F. et al. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, n. 2, p. 201-209, 2004.

TU, L. et al. Critical role for the immunoproteasome subunit LMP7 in the resistance of mice to *Toxoplasma gondii* infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 39, n. 12, p. 3385-3394, 2009.

TZELEPIS, F. et al. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. **J. Immunol.**, v. 180, n. 3, p. 1737-1748, 2008.

TZELEPIS, F. et al. Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 4, p. 2477-2481, 2006.

TZELEPIS, F. et al. Annexin1 regulates DC efferocytosis and cross-presentation during Mycobacterium tuberculosis infection. **J. Clin. Invest.**, v. 125, n. 2, p. 752-768, 2015.

VAHEY, M. T. et al. Expression of genes associated with immunoproteasome processing of major histocompatibility complex peptides is indicative of protection with adjuvanted RTS,S malaria vaccine. **J. Infect. Dis.**, v. 201, n. 4, p. 580-589, 2010.

VAN KAER, L. et al. Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. **Immunity**, v. 1, n. 7, p. 533-541, 1994.

VASCONCELOS, J. R. et al. Pathogen-induced proapoptotic phenotype and high CD95 (Fas) expression accompany a suboptimal CD8+ T-cell response: reversal by adenoviral vaccine. **PLoS Pathog.**, v. 8, n. 5, p. e1002699, 2012.

VASCONCELOS, J. R. et al. Relevance of long-lived CD8(+) T effector memory cells for protective immunity elicited by heterologous prime-boost vaccination. **Front. Immunol.**, v. 3, p. 358, 2012.

VASCONCELOS, J. R. et al. Protective immunity against trypanosoma cruzi infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. **Hum. Gene. Ther.**, v. 15, n. 9, p. 878-886, 2004.

WHO. **Neglected tropical diseases, hidden successes, emerging oportunites.** WHO. Genebra, Suíça: 2010.

WILSON, N. S. et al. Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. **Nat. Immunol.**, v. 7, n. 2, p. 165-172, 2006.

WONG, P.; PAMER, E. G. CD8 T cell responses to infectious pathogens. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 29-70, 2003.

YANNELLI, J. R. et al. Reorientation and fusion of cytotoxic T lymphocyte granules after interaction with target cells as determined by high resolution cinemicrography. **J. Immunol.**, v. 136, n. 2, p. 377-382, 1986.

YEN, B. et al. Molecular basis for ebolavirus VP35 suppression of human dendritic cell maturation. **J. Virol.**, v. 88, n. 21, p. 12500-12510, 2014.

ZANKER, D. et al. Mixed proteasomes function to increase viral peptide diversity and broaden antiviral CD8+ T cell responses. **J. Immunol.**, v. 191, n. 1, p. 52-59, 2013.

ZIEGLER, S. F. FOXP3: of mice and men. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 209-226, 2006.

ZINKERNAGEL, R. M. Restriction by H-2 gene complex of transfer of cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes*. **Nature**, v. 251, n. 5472, p. 230-233, 1974.

ZINKERNAGEL, R. M.; DOHERTY, P. C. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. **Nature**, v. 251, n. 5475, p. 547-548, 1974.