FERNANDO BANDEIRA SULCZEWSKI

Influência das Vias de Sinalização de STAT3 e STAT6 em Células Dendríticas Convencionais do Tipo 1 e 2 na Instrução da Polarização da Resposta de Células T Auxiliares

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Sulczewski, Fernando Bandeira
Influência das Vias de Sinalização de STAT3 e STAT6 em Células Dendríticas Convencionais do Tipo 1 e 2 na Instrução da Polarização da Resposta de Células T Auxiliares / Fernando Bandeira Sulczewski; orientadora Silvia Beatriz Boscardin. -- São Paulo, 2021.
149 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Células Dendríticas. 2. Direcionamento de antígenos. 3. cDC1s. 4. cDC2s. 5. STAT. I. Boscardin, Silvia Beatriz, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fernando Bandeira Sulczewski

Titulo da Dissertação/Tese: Influência das Vias de Sinalização de STAT3 e STAT6 em Células Dendríticas Convencionais do Tipo 1 e 2 na Instrução da Polarização da Resposta de Células T Auxiliares

Orientador: Prof. Dra. Silvia Beatriz Boscardin

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Trabalho realizado no Laboratório de Direcionamento de Antígenos para Células Dendríticas, no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com auxílios financeiros concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2018/00145-2 e 2018/07142-9), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Instituto
de Ciências
Biomédicas
ICBUSP
Excelência em Ensino e Pesquisa

Universidade de São Paulo
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência das Vias de Sinalização de STAT1, STAT3, STAT5 e STAT6 em Células Dendríticas Convencionais na Instrução da Resposta de Células T Auxiliares", protocolada sob o CEUA nº 7937100118, sob a responsabilidade de **Silvia Beatriz Boscardin** *e equipe; Fernando Bandeira Sulczewski* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 27/02/2018.

We certify that the proposal "Influence of STAT1, STAT3, STAT5 and STAT6 Signaling Pathways on Conventional Dendritic Cells in the Instruction of Auxiliary T Cell Response", utilizing 1129 Genetically modified mice (GMO) (522 males and 607 females), 160 Isogenics mice (79 males and 81 females), protocol number CEUA 7937100118, under the responsibility of **Silvia Beatriz Boscardin** *and team; Fernando Bandeira Sulczewski* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 02/27/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: 48 meses Depto/Setor: Parasitologia

Origem:	Biotério de matrizes de Camundongos do ICB			
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Machos	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	B6.Cg-Tg(Itgax-cre)1-1Reiz		**N amostral:**	4
Origem:	Biotério de matrizes de Camundongos do ICB			
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Fêmeas	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	B6.Cg-Tg(Itgax-cre)1-1Reiz		**N amostral:**	8
Origem:	Biotério de matrizes de Camundongos do ICB			
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Machos	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	B6.Cg-Tg(Itgax-cre)1-1Reiz		**N amostral:**	4
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia			
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Fêmeas	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	B6.Cg-Zbtb46tm3.1(cre)Mnz/J		**N amostral:**	8
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia			
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Machos	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	B6.Cg-Zbtb46tm3.1(cre)Mnz/J		**N amostral:**	4
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia			
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Fêmeas	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	B6;129S-Stat1tm1Mam/Mmjax		**N amostral:**	8

Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	B6;129S-Stat1tm1Mam/Mmjax			**N amostral:**	4
Origem:	Biotério de matrizes de Camundongos do ICB				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	B6.129S1-Stat3tm1Xyfu			**N amostral:**	8
Origem:	Biotério de matrizes de Camundongos do ICB				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	B6.129S1-Stat3tm1Xyfu			**N amostral:**	4
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	B6.129S6-Stat5btm1Mam Stat5atm2Mam/			**N amostral:**	8
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	B6.129S6-Stat5btm1Mam Stat5atm2Mam/			**N amostral:**	4
Origem:	Centro de Criação de Camundongos Especiais				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	C.129S2-Stat6tm1Gru/J			**N amostral:**	8
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	C.129S2-Stat6tm1Gru/J			**N amostral:**	4
Origem:	Centro de Criação de Camundongos Especiais				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	CD11c-CreSTAT1flox/flox			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	CD11c-CreSTAT1flox/flox			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	CD11c-CreSTAT3flox/flox			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	CD11c-CreSTAT3flox/flox			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	CD11c-CreSTAT5flox/flox			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Idade ou peso:	4 a 6 semanas

Linhagem:	CD11c-CreSTAT5flox/flox			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 5 semanas
Linhagem:	C.129S2-Stat6tm1Gru/J			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	C.129S2-Stat6tm1Gru/J			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	B6;129S-Stat1tm1Mam/Mmjax			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	B6;129S-Stat1tm1Mam/Mmjax			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	B6.129S1-Stat3tm1Xyfu			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	B6.129S1-Stat3tm1Xyfu			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	B6.129S6-Stat5btm1Mam Stat5atm2Mam/			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	B6.129S6-Stat5btm1Mam Stat5atm2Mam/			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	Balb-C			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	Idade ou peso:	4 a 5 semanas
Linhagem:	Balb-C			**N amostral:**	70
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 5 semanas
Linhagem:	C57BL/6			**N amostral:**	9
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	Idade ou peso:	4 a 6 semanas
Linhagem:	C57BL/6			**N amostral:**	9
Origem:	Biotério de matrizes de Camundongos do ICB				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	C57BL/6 OTII			**N amostral:**	2

Origem:	Biotério de matrizes de Camundongos do ICB				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	C57BL/6 OTII			**N amostral:**	2
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 8 semanas
Linhagem:	C57BL/6 OTII			**N amostral:**	25
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	C57BL/6 CD45.1			**N amostral:**	2
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 8 semanas
Linhagem:	C57BL/6 OTII CD45.1			**N amostral:**	22
Origem:	Biotério de matrizes de Camundongos do ICB				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	Balb-C DO11.10			**N amostral:**	2
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Machos	Idade ou peso:	1 a 12 meses
Linhagem:	Balb-C DO11.10			**N amostral:**	2
Origem:	Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia				
Espécie:	Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo:	Fêmeas	Idade ou peso:	4 a 8 semanas
Linhagem:	Balb-C DO11.10			**N amostral:**	18

São Paulo, 27 de fevereiro de 2018

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Aos meus pais Enio e Elena e
ao meu noivo Dérick pelo amor,
apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em especial o Departamento de Parasitologia por ter fornecido a estrutura para realização dessa pesquisa e do meu curso de pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2018/00145-2 e 2018/07142-9) pelo suporte financeiro deste estudo.

Gostaria de agradecer a Prof. Dra Silvia Beatriz Boscardin, minha orientadora. Muito obrigado por possibilitar a realização dessa tese. Gostaria de agradecer por sua dedicação e empenho, não apenas em relação a essa pesquisa, mas também em relação a minha carreira e crescimento pessoal. Muito obrigado por me ensinar a ser um “cientista”, por apoiar a minha trajetória acadêmica e me ajudar a alcançar os meus objetivos. Seus conselhos, suas histórias e suas experiências que compartilhou com o Lab. 46 foram e serão de grande valia. E, agora, abrimos um vinho e vamos brindar!

Muito obrigado aos meus colegas de laboratório: Marcio Massao Yamamoto, Bianca da Silva Almeida, Higo Fernando Santos Souza, Arthur Zanetti, Natália Ferreira, Larissa Martins, Gustavo Soares, Isabela Daher, Davi Salles, Flávia Adami, Mirian Bruni, Jéssica Amaral Martinho muito obrigado pela ajuda. Gostaria de agradecer a todos pela amizade, companheirismo e principalmente por me apoiarem nos momentos difíceis, por me ouvirem e me incentivarem a seguir em frente para a realização desse sonho. Sou muito grato por todos os cafés que tomamos juntos, mas sobre tudo, por carregarmos juntos nossos medos e incertezas, especialmente nesse momento da pandemia COVID-19. E “vamos tomar um café, por favor?!”. Agradeço a todos pela ajuda nos experimentos e nas discussões dos resultados. Em especial, gostaria de agradecer ao Márcio, à Bianca, à Larissa, ao Davi e ao Gustavo por ter

me auxiliado com a clonagem e produção dos anticorpos e também com as reações de genotipagem dos camundongos utilizados nesse trabalho.

Agradeço à prof. Dra. Daniela Santoro Rosa pela constante troca de informações e discussão de resultados, as suas críticas e opiniões enriqueceram este trabalho e ajudaram a moldar o profissional que me tornei hoje. Gostaria de agradecer também aos integrantes do seu laboratório (o Lavex), pelas discussões científicas e troca de conhecimentos em nossos seminários, em especial Edgar Ruz Fernandes, pela disponibilidade e ajuda em alguns experimentos.

Gostaria de agradecer a Dra Stephanie Eisenbarth por ter me dado a oportunidade de realizar um doutorado sanduiche em seu laboratório, muito obrigado por compartilhar comigo um pouco da sua visão sobre as DCs e principalmente por toda a sua ajuda com o projeto e a documentação necessária para isso. Infelizmente, as restrições impostas pela pandemia de COVID-19 impossibilitaram os nossos planos.

Muito obrigado ao Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Parasitologia e toda a sua equipe (Anderson Domingos Silva, Bruno de Castro Bertoldo, Daniela Chagas e Juliana Afonso), ao Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, ao Laboratório de Imunoparasitologia Experimental, ao Laboratório de Leishmanioses e ao Serviço de Citometria de Fluxo do Departamento de Imunologia.

Gostaria de agradecer às comissões organizadoras das edições VII e VIII do Curso de Férias de Imunologia do ICB, muito obrigado por me receberam tão bem como membro da comissão! As experiências propiciadas ao longo dessas duas edições foram muito enriquecedoras e me fizeram muito feliz!

À minha família gostaria de dizer muito obrigado! Ao meu pai (Enio Irineu Sulczewski) e a minha mãe (Elena Maris Bandeira Sulczewski), agradeço por estarem

sempre ao meu lado, por me apoiarem nas minhas decisões e torcerem para que tudo dê certo. Muito obrigado por acreditarem em mim e nunca terem saído do meu lado! Muito obrigado pelas orações. Sem a coragem que vocês me passam eu não estaria em um curso de pós-graduação. Essa conquista é de vocês também. Muito obrigado a minha irmã (Aline Bandeira Sulczewski Greter) pelo apoio nesses anos de pós-graduação.

Ao meu noivo Dérick Andrade Moreira, muito obrigado por estar ao meu lado em todos os momentos. O teu apoio foi fundamental durante todo esse período! Muito obrigado pela compreensão quando, muitas vezes cheguei tarde em casa e por colocar vários alarmes bem cedo da manhã e te acordar também. Sou muito grato a você por toda a sua ajuda diária que fez com que eu conseguisse focar em meus estudos. Obrigado por segurar a minha mão e olhar nos meus olhos com um olhar de quem diz que tudo vai dar certo. Essa conquista é tua também.

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Nós devemos ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, [...], deve ser alcançada”

Marie Curie

RESUMO

SULCZEWSKI, F.B. **Influência das Vias de Sinalização de STAT3 e STAT6 em Células Dendríticas Convencionais do Tipo 1 e 2 na Instrução da Polarização da Resposta de Células T Auxiliares** [149 páginas. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2021.

No baço de camundongos encontram-se principalmente dois subtipos de células dendríticas convencionais (cDCs) conhecidas como cDC1s e cDC2s. As cDC1s expressam o receptor endocítico DEC205 e a cadeia alfa do receptor CD8 ($DEC205^+CD8\alpha^+$), enquanto as cDC2s expressam o receptor endocítico DCIR2, mas não expressam a molécula CD8α ($DCIR2^+CD8\alpha^-$). As cDC1s tem capacidade de promover respostas de linfócitos T CD4 e também T $CD8^+$ pois são capazes de fazer apresentação cruzada de antígenos extracelulares. Já as cDC2s estão mais associadas com a instrução de células T $CD4^+$. Recentemente, através do direcionamento de um antígeno para cada um desses subtipos utilizando anticorpos monoclonais quiméricos, identificamos que cDC1s e cDC2s induzem respostas distintas de células T auxiliares. Então, para entender melhor os mecanismos que os diferentes subtipos de cDCs utilizam para induzir as distintas respostas, neste estudo avaliamos o papel das vias de sinalização de STAT3 e STAT6 em cDC1s e cDC2s. O objetivo foi estudar a influência dessas vias de sinalização na capacidade que cada subtipo de DC possui de instruir respostas de células T auxiliares. Para isso, utilizamos camundongos em que a molécula STAT3 é deletada especificamente nas DCs e camundongos STAT6 nocaute. Inicialmente avaliamos se a deleção de STAT3 ou de STAT6 prejudicaria a diferenciação de cDCs. Os resultados mostram que os números de cDC1s e cDC2s esplênicas dos camundongos deficientes de STAT3 ou STAT6 foram semelhantes aos animais controle. Também foi avaliado se essas vias de sinalização alteram a maturação de cDCs analisando a expressão de moléculas coestimulatórias após a administração de um adjuvante: tanto as cDCs deficientes de STAT3 quando as cDCs deficientes de STAT6 sofrem maturação de forma semelhante às cDCs que sinalizam pelas vias de STAT3 e STAT6. Para estudar a influência das vias de STATs na instrução de células T $CD4^+$ por ambos os subtipos de cDCs *in vivo*, utilizamos a estratégia de direcionamento de antígenos para cDC1s e cDC2s via os receptores DEC205 e DCIR2, respectivamente. Nossos resultados mostram que, na ausência da via de sinalização de STAT3, o direcionamento de antígenos para cDC2s induziu frequências similares de células T_{FH} entre os grupos que sinalizam ou não via STAT3. No entanto, a respostas de células T_H1 e T_{FH} promovidas após o direcionamento de antígenos para cDC1s foram significativamente menores nos camundongos deficientes de STAT3. Por outro lado, na ausência da sinalização por STAT6, quando o antígeno foi direcionado para cDC2s, as respostas de células T_{FH}, de células B do centro germinativo estavam significativamente menores. Com isso, pode-se concluir que a sinalização de STAT3 e STAT6 não controla a diferenciação nem a maturação de cDCs esplênicas. No entanto, a via de sinalização de STAT3 estimula cDC1s a promoverem respostas de células T_H1 e de células T_{FH}, enquanto a via de STAT6 modula a promoção de respostas mediadas por cDC2s.

Palavras-chave: Células Dendríticas. Direcionamento de antígenos. cDC1s. cDC2s. STAT3. STAT6. Via de sinalização JAK/STAT.

ABSTRACT

SULCZEWSKI, F.B. **Influence of STAT3 and STAT6 Signaling Pathways in Conventional Type 1 and 2 Dendritic Cells to Prime Auxiliary T Cell Responses** [149 p. PhD Thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2017.

In the murine spleen there are mainly two subsets of conventional dendritic cells (cDCs), one that expresses the endocytic receptor DEC205 and the alpha chain of the CD8 molecule ($DEC205^+CD8\alpha^+$), it is known as conventional type 1 dendritic cell (cDC1); another subset expresses the endocytic receptor DCIR2, but not CD8α molecule ($DCIR2^+CD8\alpha^-$), it is known as the conventional type 2 dendritic cell (cDC2). cDC1s are able to prime both $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes via antigen cross-presentation of extracellular antigens. cDC2s are more associated with $CD4^+$ T cell responses. Recently, using a strategy of antigen targetingn to each of these subsets of cDCs with chimeric monoclonal antibodies, we have identified that cDC1s and cDC2s prime different T helper cell responses. So, to better understand the mechanisms that cDC1s and cDC2s use to promote different responses, in this study we evaluated the role of STAT3 and STAT6 signaling pathways in cDC1s and cDC2s. The aim was to study the influence of these signaling pathways on the ability that each DC subset has to promote T helper cell responses. For this, we used mice in which the STAT3 molecules are deleted in the cDCs and STAT6 knockout mice. Initially, we measured whether STAT3 or STAT6 depletion would impair the differentiation of splenic cDCs, the results showed that the numbers of splenic cDC1s and cDC2s in STAT3- or STAT6-deficient mice were similar to the control group. We also analyzed whether these signaling pathways regulate the maturation of cDCs by analyzing the expression of costimulatory molecules after administration of an adjuvant, both STAT3- and STAT6-deficient cDCs matured similarly to fully competent cDCs. To study the influence of STAT signaling pathways in cDC1s and cDC2s function to prime T helper cells responses *in vivo*, we used a strategy of antigen targeting to cDC1s and cDC2s via DEC205 and DCIR2 receptors, respectively. Our results showed that in the absence of the STAT3 signaling pathway, antigen targeting to cDC2s induced similar frequencies of T_{FH} cells between the groups that signal or not via the STAT3. In addition, the responses of Th1 and T_{FH} cells promoted after antigen targeting to cDC1s were significantly lower in STAT3-deficient mice. On the other hand, when antigens were targeted to cDC2s in STAT6 KO mice, the responses of T_{FH} cells, germinal center B cells were significantly lower. Thus, STAT3 and STAT6 signaling do not control the differentiation or maturation of splenic cDCs. The STAT3 signaling pathway stimulates cDC1s to promote Th1 and T_{FH} cell responses. STAT6 modulates the promotion cDC2-mediated responses.

Keywords: Dendritic cell, Antigen targeting, DC subsets, Cellular immune response, Humoral immune response.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células Dendríticas

As células dendríticas (DCs) foram descobertas em 1973 por Ralph Steinman e Zanvil Cohn na Universidade de Rockfeller no Estados Unidos. Essas células foram inicialmente descritas a partir de células de baço de camundongo como células semi-aderentes com a presença de inúmeros dendritos e poucos lisossomos (STEINMAN; COHN, 1973). A caracterização das funções das DCs iniciou-se com estudos de reação mista de linfócitos, onde os linfócitos foram misturados com DCs halogênicas purificadas ou com leucócitos presentes no sangue de camundongos. As DCs purificadas foram capazes de promover a proliferação de linfócitos em uma escala 100 mais maior que os leucócitos totais presentes no sangue (STEINMAN; WITMER, 1978). Mais tarde, as DCs foram classificadas como células apresentadoras de antígenos (APCs) por serem capazes de adquirir antígenos, apresentá-los às células T e promover a expansão clonal de células antígeno-específicas (CABEZA-CABRERIZO *et al.*, 2021; NUSSENZWEIG *et al.*, 1980).

Desde a descoberta das DCs, muito esforço foi empregado para melhor caracterizar a biologia e a função dessas células. Atualmente, sabe-se que as DCs estão localizadas tanto em tecidos linfoides e como em tecidos não-linfoides, em diferentes espécies, e exercem um papel central na vigilância imunológica, sendo células que conectam o sistema imune inato ao sistema imune adaptativo (CABEZA-CABRERIZO *et al.*, 2021; STRIOGA *et al.*, 2013). Elas expressam diversos receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos e a danos, bem como receptores de endocíticos (AMORIM, K. N. S. *et al.*, 2016). Assim, quando as DCs entram em contato com patógenos e/ou células mortas, elas capturam e processam esses antígenos, passando por um processo chamado de maturação. A maturação das DCs consiste no aumento da expressão das moléculas coestimulatórias, MHCII e citocinas para que essas células migrem e apresentam antígenos eficientemente às células T (MELLMAN; STEINMAN, 2001; PATENTE *et al.*, 2018).

Uma importante característica das DCs é a capacidade que essas células possuem de migrar. Quando maduras, as DCs que se localizam em tecidos não-linfoides, expressam o receptor de quimiocina CCR7 que, a partir de um gradiente de concentração, estimula a migração dessas células para os órgãos linfoides

secundários como os linfonodos, levando os antígenos que foram capturados no tecido (EISENBARTH, 2019). As DCs apresentam esses antígenos e interagem com as células T nos órgãos linfoides secundários no interior das zonas de células T (LEWIS *et al.*, 2019). Assim, as DCs controlam e coordenam a instrução da resposta imune adaptativa, pois além de fornecer os sinais necessários para a ativação das células T, também são capazes de promover diferentes respostas de células T auxiliares. dependendo de quais moléculas coestimulatórias e quais citocinas são expressas durante a interação com a células T. Nesse sentido, as DCs são consideradas APCs profissionais por serem especializadas na instrução de células T virgens em células T efetoras (STEINMAN, 2007; YIN *et al.*, 2021)

1.2 Ontogenia e Classificação de DCs

As DCs estão presentes em tecidos distintos do organismo, tanto de camundongos quanto humanos, podendo expressar diferentes marcadores e receptores em sua membrana, dependendo de sua localização (MERAD *et al.*, 2013). Dessa forma, ao longo do tempo, diferentes células foram agrupadas e chamadas de DCs (SHORTMAN; LIU, 2002). Atualmente, as DCs que foram inicialmente identificadas como APCs especializadas na instrução de resposta de células T são classificadas como células dendríticas convencionais (cDCs). Por sua vez, as cDCs são ainda subdivididas em dois subtipos que divergem entre si pela sua ontogenia, função e expressão de receptores de membrana, as células dendríticas convencionais do tipo 1 (cDC1s) e as células dendríticas convencionais do tipo 2 (cDC2s) (GUILLIAMS *et al.*, 2014). Além disso, há DCs que possuem uma baixa capacidade de apresentar antígenos, mas são especializadas na expressão de interferons do tipo I, respondendo rápida e eficientemente a infecções virais, sendo chamadas de células dendríticas plasmocitoides (pDCs) (LEYLEK; IDOYAGA, 2019).

Nos últimos anos, a classificação das DCs em diferentes subtipos vem sendo associada ao processo de diferenciação de cada um dos subtipos a partir de precursores mieloides e linfoides da medula óssea (GUILLIAMS *et al.*, 2014). As células-tronco hematopoiéticas originam os precursores mieloides comuns (CMPs) que são precursores para o desenvolvimento de linhagens de DCs e de monócitos (FOGG *et al.*, 2006). A linhagem de DCs e a linhagem monocítica são atualmente

consideradas completamente distintas. A linhagem monocítica começa com a diferenciação dos CMPs para o precursor comum de monócitos (cMoP). O CMoP está associado a geração de monócitos, macrófagos e células inflamatórias derivadas de monócitos (também chamadas de DCs derivadas de monócitos ou moDCs, que atualmente não são consideradas DCs) (GRETER *et al.*, 2012; HETTINGER *et al.*, 2013). A diferenciação de DCs inicia-se quando CMPs são diferenciados em precursores comuns de DCs (CDPs) (NAIK *et al.*, 2007; ONAI *et al.*, 2007). CDPs diferenciam-se em células conhecidas como pré-DCs que completam o seu processo de diferenciação para DCs imaturas (LIU *et al.*, 2009). Além disso, nos últimos anos, pré-cDC1s ou pré-cDC2s já comprometidos com a sua diferenciação final em cDC1 e cDC2 foram identificados em camundongos e humanos. Eles são originados de pré-cDC não comprometidas que dão origem a pré-cDC1s ou pré-cDC2s, processo denominado pelos autores de "*priming* de células dendríticas" (SCHLITZER *et al.*, 2015; SEE *et al.*, 2017). Ainda não sabemos os mecanismos que coordenam o comprometimento de pré-cDC em pré-cDC1 e pré-cDC2, nem mesmo conhecemos os fatores de transcrição que controlam essa etapa da ontogenia. A figura 1 resume as principais etapas do processo de diferenciação de DCs.

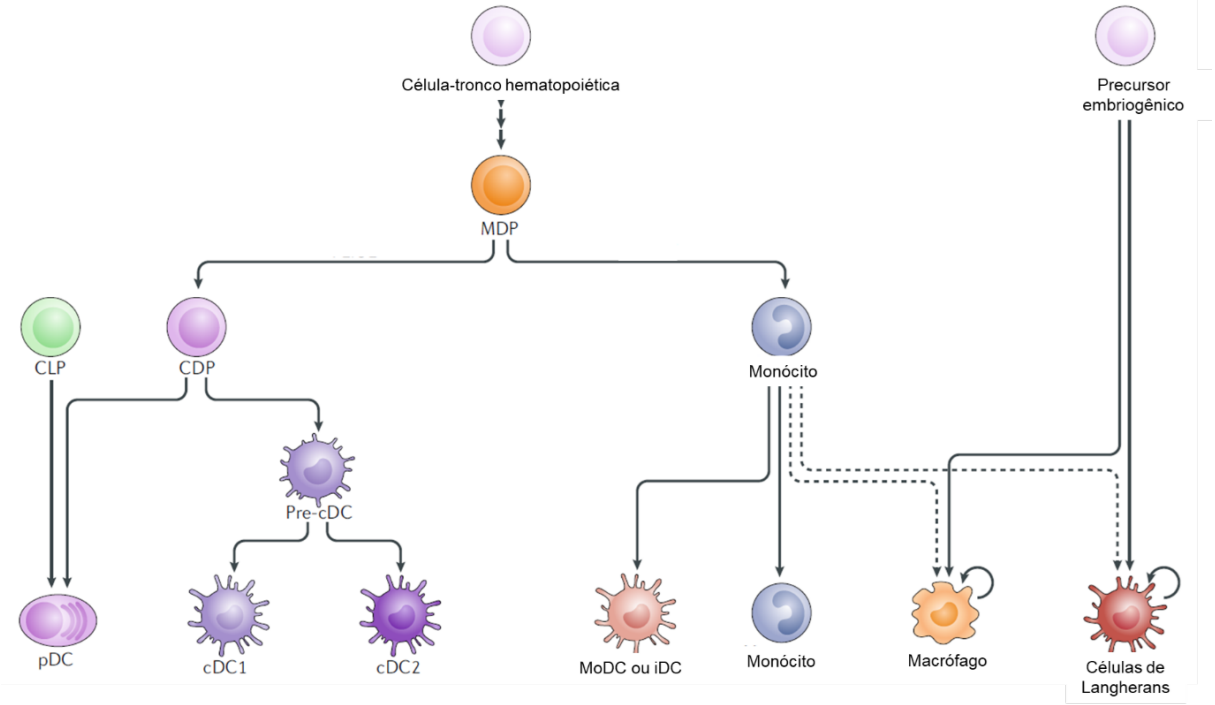

Figura 1 - Classificação e Ontogenia de DCs. Esquema de classificação atual de DCs baseado na diferenciação a partir de precursores da medula óssea. A célula-tronco hematopoiética diferencia-se em precursor mieloide comum (CMPs) que origina o precursor comum de monócitos (CMoP) e o precursor comum de DC (CDP). O CDP se diferencia em pDC ou pré-cDC que posteriormente se diferencia em cDC1 ou cDC2. pDC também pode se diferenciar a partir de precursores linfoides comuns (CLP). As MoDC, os monócitos e os macrófagos se originam a partir de precursores da linhagem monocítica diferentes dos precursores de DCs. Ainda, macrófagos e células de Langherans se diferenciam de precursores embriogênicos. Fonte: (EISENBARTH, 2019) (adaptada)

Interessantemente, pré-cDCs foram encontradas fora da medula óssea em tecidos como o sangue e a mucosa intestinal. Nesses locais, as pré-cDCs ainda possuem uma capacidade proliferativa remanescente. Usando camundongos Clec9a^{Confetti}, nos quais cada clone de DC é marcado por uma coloração específica, Cabeza-Cabrerizo e colaboradores mostraram que as cDCs se localizam na mucosa intestinal em agrupamentos celulares da mesma cor, sugerindo que essas células agrupadas são clonalmente relacionadas, provavelmente originadas de um mesmo precursor. Seu estudo também evidencia que as cDCs agrupadas são geradas por pré-cDCs já comprometidos em cDC1 ou cDC2 (precursores pré-cDC1 e pré-cDC2) porque as cDCs próximas são geralmente do mesmo subtipo (CABEZA-CABRERIZO *et al.*, 2019).

Com isso, esses dados evidenciam que ambas as cDC1s e cDC2 terminam sua diferenciação no tecido, destacando a hipótese de que o microambiente local pode modular a função das cDCs. De fato, uma comparação sistemática do transcriptoma

de cDCs linfáticas com o transcriptoma de cDCs do pulmão e da pele mostrou que, em humanos, as cDCs do pulmão e da pele adquiriram programas de transcrição específicos devido a sinais locais (HEIDKAMP *et al.*, 2016). No entanto, esses dados também indicam uma expressão conservada de fatores de transcrição relacionados às assinaturas ontogenéticas de cada subtipo de cDCs, como a expressão de IRF8 em cDC1s e IRF4 em cDC2s (GUILLIAMS *et al.*, 2016; HEIDKAMP *et al.*, 2016).

Diferentes fatores de transcrição são expressos durante a ontogenia de cDC1 e cDC2. Alguns dos fatores de transcrição importantes para o desenvolvimento de cDC1s são: fator regulador de interferon 8 (IRF8), inibidor de proteína de ligação de DNA ID2, fator transcricional de zipper de leucina básico ATF-like 3 (BATF3) e proteína reguladora por fator nuclear interleucina (IL)-3 (NFIL3) (HILDNER *et al.*, 2008; KASHIWADA *et al.*, 2011; SICHIEN *et al.*, 2016). Por outro lado, alguns dos fatores de transcrição importantes para o desenvolvimento de cDC2s são principalmente: proteína homóloga de entalhe de locus neurogênico 2 (Notch2), fator 4 semelhante a Kruppel (KLF4) e fator regulador de interferon 4 (IRF4) (LEWIS *et al.*, 2011; PERSSON *et al.*, 2013; SCHLITZER *et al.*, 2013; TUSSIWAND *et al.*, 2015). Inclusive, IRF8 e IR4 foram eficientemente usados para identificar cDC1s e cDC2s em vários tecidos e espécies, sendo as cDC1s caracterizadas como $MHCII^{+}F4/80^{-}CD64^{-}CD11c^{+}CD26^{+}XCR1^{hi}CD172a^{lo}IRF8^{hi}IRF4^{lo}$ e as cDC2s como $MHCII^{+}F4/80^{-}CD64^{-}CD11c^{+}CD26^{+}XCR1^{lo}CD172a^{hi}IRF8^{lo}IRF4^{hi}$ (GUILLIAMS *et al.*, 2016).

Classicamente, os estudos de desenvolvimento de DCs indicavam que as pDCs se diferenciavam de dois precursores, um precursor mieloide e um precursor linfoide, o CDP e o precursor linfoide comum (CLP), respectivamente. Cada uma dessas células seria capaz de originar uma pré-pDC que termina o seu processo de diferenciação em pDC (EISENBARTH, 2019). Nos últimos anos, tem-se mostrado cada vez mais, a origem linfoide das pDCs, pois elas expressam enzimas que promovem a recombinação das frações V-D-J do DNA dessas células (MUSUMECI *et al.*, 2019; SATHE *et al.*, 2014). Até o momento, os fatores de transcrição caracterizados por influenciarem a diferenciação de pDCs são principalmente: homeobox 2 de ligação à E-box do dedo de zinco (Zeb2), fator de transcrição 4 (Tcf4), BAF Subunidade 11A do complexo de remodelamento da cromatina (Bcl11a), fator de transcrição 1 relacionado à runx (Runx1) e fator de transcrição SpiB (SpiB) (ANDERSON *et al.*, 2020).

Com o desenvolvimento de novas tecnologias que permitiram a análise de células únicas, novos subtipos de DCs estão sendo caracterizados e outros deixaram de ser classificados como DCs. Há evidências indicando que a população de cDC2s de sangue periférico humano pode ser subdividida em cDC2s e em DC3, por apresentarem identidades transcricionais diferentes. Esse novo subtipo de cDC (cDC3) expressa CD163 e genes relacionados à inflamação aguda, incluindo CD14. Por outro lado, as células que não expressam CD163, CD14 e genes relacionados com inflamação corresponderiam a cDC2s clássicas (BOURDELY *et al.*, 2020; DUTERTRE *et al.*, 2019; VILLANI *et al.*, 2017). Muito pouco se sabe sobre a ontologia de DC3s. Dutertre et. argumenta que as cDC2s surgem de um precursor de pré-cDCs que pode estar relacionado à sua diferenciação em DC3s devido à sua similaridade transcricional e porque as DC3s aumentam sua frequência quando o ligante FLT3 (citocina que promove a diferenciação de cDCs) é administrado em camundongos. Contudo, Bourdely e colaboradores mostram que as DC3s não se diferenciam do mesmo precursor comum DCs (CDP) que origina as cDC1s e as cDC2s. Os dados deste grupo mostram também que as DC3s se diferenciam de progenitores que expressam Clec12a, sendo um progenitor com capacidade de gerar DCs e macrófagos de maneira dependente de GM-CSF e independente de FLT3L (BOURDELY *et al.*, 2020).

Além disso, dois subtipos de cDC2 foram identificados em camundongos. Nesses animais, as cDC2s podem ser subdivididas de acordo com a expressão de fatores de transcrição como T-bet (cDC2A) e Ror-γt (cDC2B), que foram associados a respostas anti- e pró-inflamatórias, respectivamente. Além disso, cDC2s inflamatórias em camundongos foram descritas em infecções por vírus no pulmão e infecções bacterianas e por nematoides na pele (BROWN *et al.*, 2019). Bosteels e colaboradores mostraram que as cDC2s inflamatórias são transcricionalmente diferentes dos cDC2s. Elas adquiriram a expressão de receptores Fc (CD64 e MAR-1) e IRF8 através de uma via de sinalização do interferon tipo 1 (BOSTEELS *et al.*, 2020; BROWN *et al.*, 2019).

Ainda é possível adicionar mais complexidade ao entendimento da linhagem das DCs ao considerarmos as DCs transicionais (tDCs). As tDCs são células $AXL^{+}SIGLEC6^{+}$ que expressam genes relacionados tanto a pDCs como a cDCs. As tDCs são caracterizadas por uma expressão aumentada de CD123 e uma expressão diminuída de MHC classe II no sangue humano e em tecidos linfoides de camundongo

(ALCANTARA-HERNANDEZ *et al.*, 2017; LEYLEK *et al.*, 2019). Dados recentes sugerem que as tDCs têm uma programação genética intermediária entre cDC2s e pDCs, mas não mostram uma relação de diferenciação em pDCs nem cDCs (LEYLEK *et al.*, 2020).

As DCs derivadas de monócitos (MoDCs), também chamadas de DCs induzidas (iDCs), se diferenciam a partir de monócitos em ambientes inflamatórios, principalmente via sinalização de GM-CSF. Apesar de serem capazes de apresentar antígenos, atualmente refere-se a essas células como células inflamatórias derivadas de monócitos, pois elas não se diferenciam de precursores mieloides responsáveis pela ontogenia de DCs (EISENBARTH, 2019; GUILLIAMS *et al.*, 2014). Da mesma forma, as células de Langerhans (LCs), que incialmente também eram consideradas pertencentes a linhagem de DCs, atualmente não são mais consideradas DCs por serem derivadas de precursores embrionários (CARPENTIER *et al.*, 2016; EISENBARTH, 2019; GUILLIAMS *et al.*, 2014). Assim, ainda não entendemos totalmente a classificação e a ontogenia de diferentes subtipos de DCs conhecidos até o momento, principalmente os subtipos tDC e DC3. Novas pesquisas são necessárias para entendermos melhor esse assunto e esclarecer não apenas as diferentes classificações de DCs, mas também suas funções e ontogenia.

Dessa forma, neste trabalho utilizamos as definições e classificações de DCs que estão estabelecidas e caracterizadas e que, até o momento, são aceitas pela comunidade científica, considerando que as cDCs são subdivididas em cDC1 e cDC2. Além disso, também consideramos que as cDCs são os principais subtipos que promovem a resposta de células T virgens e, por isso, focaremos nosso estudo nesses dois subtipos de DC. Análises transcricionais indicam que as cDC1s e as cDC2s possuem identidades transcricionais diferentes, destacando que podem ter repertórios gênicos específicos e utilizar diferentes vias de sinalização celular para controlar e regular as suas funções (LEYLEK *et al.*, 2020; SEE *et al.*, 2017). Além disso, as cDC1s e as cDC2s diferem entre si pela sua capacidade de reconhecer diferentes antígenos por meio de sua expressão diferencial de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). As cDC1 e cDC2s esplênicas de camundongos expressam diferentes receptores semelhantes a toll (TLR): TLR3 é principalmente expresso em cDC1s e TLR5 e TLR7 são preferencialmente expressos em cDC2s (EDWARDS *et al.*, 2003). Além disso, as cDC1 e as cDC2s esplênicas também expressam diferentes receptores endocíticos, como DEC205, DCIR2 e CLEC9A, que são expressos por cDCs distintas

(CHAPPELL *et al.*, 2012; DUDZIAK *et al.*, 2007). Com isso, as cDC1s e cDC2s podem possuir diferentes especializações para promover diferentes respostas de células T, em especial de células T auxiliares (células T $CD4^+$). Nas seções a seguir, discutiremos as diferentes funções e especializações de cDC1s e cDC2s no baço de camundongos em promover respostas de células T auxiliares.

1.2.1 Células Dendríticas Convencionais do Tipo 1 do Baço de Camundongo

As cDC1s do baço de camundongos são classicamente caracterizadas pela expressão da cadeia alfa da molécula CD8, do receptor endocítico DEC205 (CD205) e, mais recentemente, do receptor de quimiocina XCR1 (DUDZIAK *et al.*, 2007; GUILLIAMS *et al.*, 2016). Em termos funcionais, as cDC1s são especializadas na apresentação cruzada de antígenos às células T $CD8^+$, importante para a promoção de respostas a infecções virais e antitumorais (ALLAN *et al.*, 2003; IYODA *et al.*, 2002). As cDC1s possuem uma maquinaria completa que engloba desde a captura de células mortas ao processamento de antígenos em diferentes vias para que estes sejam apresentados em MHC de classe I (EMBGENBROICH; BURGDORF, 2018).

No baço, as cDC1s estão estrategicamente localizadas para capturar antígenos do sangue e instruir a resposta de células T (EISENBARTH, 2019). O baço é um órgão linfoide secundário estruturado para filtrar o sangue e promover respostas imunes a antígenos nele presentes. Em termos estruturais, o baço de camundongos pode ser dividido em polpa vermelha e polpa branca. A polpa vermelha é o local por onde o sangue circula e onde as células do sistema imune capturam os antígenos. Por outro lado, a polpa branca é onde as respostas adaptativas são majoritariamente iniciadas, nas zonas de células T e B. Entre a polpa vermelha e a polpa branca há uma região, chamada de zona marginal, que controla a passagem de antígenos e células da polpa vermelha para a polpa branca (Figura 2A) (MEBIUS; KRAAL, 2005). As cDC1s esplênicas se localizam tanto na polpa vermelha (cDC1s migratórias) quanto na polpa branca (cDC1s residentes) do baço (Figura 2B). Recentemente, a migração intraesplênica de cDC1s foi melhor caracterizada. Quando maduras por algum estímulo inflamatório, as cDC1s da polpa vermelha migram para a polpa branca, mais especificamente para a região central da zona de células T(Figura 2C) (CALABRO; GALLMAN*; et al.*, 2016; CALABRO; LIU*; et al.*, 2016; EISENBARTH, 2019).

A zona de células T é formada por um microambiente especializado para favorecer interações entre DCs e células T. Porém, mais do que isso, a zona de células T promove várias interações entre células NK, pDCs, células T e DCs. Aparentemente, citocinas produzidas pelas células NK e pDCs, principalmente interferons do tipo I, acabam auxiliando na ativação de cDC1s esplênicas para que elas sejam eficientemente ativadas para promover as respostas de células T (ARDOUIN *et al.*, 2016; BOTTCHER *et al.*, 2018; BREWITZ *et al.*, 2017; LONGHI *et al.*, 2009). Além disso, as células T $CD8^+$ são capazes de estimular o recrutamento de cDC1s para a área central da zona de células T devido à expressão da quimiocina XCL1 (BOTTCHER *et al.*, 2018; BREWITZ *et al.*, 2017). Nesse sentido, aparentemente a capacidade de cDC1s promoverem respostas de células T $CD4^+$ pode estar relacionada, pelo menos em parte, com a sua capacidade de apresentação cruzada de antígenos e sua localização.

1.2.2 Células Dendríticas Convencionais do Tipo 2 do Baço de Camundongo

As cDC2s esplênicas são tipicamente identificadas pela expressão de CD11b ou por não expressarem a cadeia alfa da molécula CD8. Elas também expressam o receptor endocítico DCIR2 e, nos últimos anos, vem sendo também identificadas por expressarem CD172a, também conhecido como SIRPα. Ao contrário dos cDC1s, as cDC2s expressam altos níveis de fator de transcrição IRF4 e baixos níveis de IRF8 (GUILLIAMS *et al.*, 2016). Considerando o papel das cDC2s para promover respostas de células T, as cDC2s têm sido principalmente relacionadas com sua capacidade de apresentar antígenos em MHC de classe II para células T $CD4^+$ virgens (DUDZIAK *et al.*, 2007).

As cDC2s se localizam na zona marginal do baço murino, entre a polpa vermelha e a polpa branca (Figura 2B). Na polpa branca, as cDC2s estão próximas tanto da zona de células B como da zona de células T (EISENBARTH, 2019; SHIN *et al.*, 2016). Da mesma forma, os cDC2s migratórias do baço migram para a área mais externa da zona de células T, uma região de maior proximidade com a zona de células B (Figura 2 C) (CALABRO; LIU*; et al.*, 2016; EISENBARTH, 2019). Curiosamente, as cDC1s influenciam a localização das cDC2s. Enquanto as cDC2s expressam o receptor EBI2, um receptor para o colesterol 7α,25-di-hidroxilado que é produzido na

zona das células B, as cDC1s secretam a enzima que metaboliza o oxisterol e cliva o colesterol 7α,25-di-hidroxilado, diminuindo sua concentração no centro da zona de células T, conduzindo as cDC2s para a área externa da zona de células T e para a zona marginal de células B, de acordo com o gradiente de concentração (LU *et al.*, 2017). Além disso, as cDC2s expressam menos CCR7 e mais CXCR5 do que cDC1s (LEON *et al.*, 2012). O CXCR5 é o receptor da quimiocina CXC13 secretada na zona de células B, e responsável pelo posicionamento das células B na zona de células B, enquanto o CCR7 é o receptor das quimiocinas CXCL19 e CCL21 que estimulam o posicionamento de cDCs na zona de células T (ANSEL *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2019).

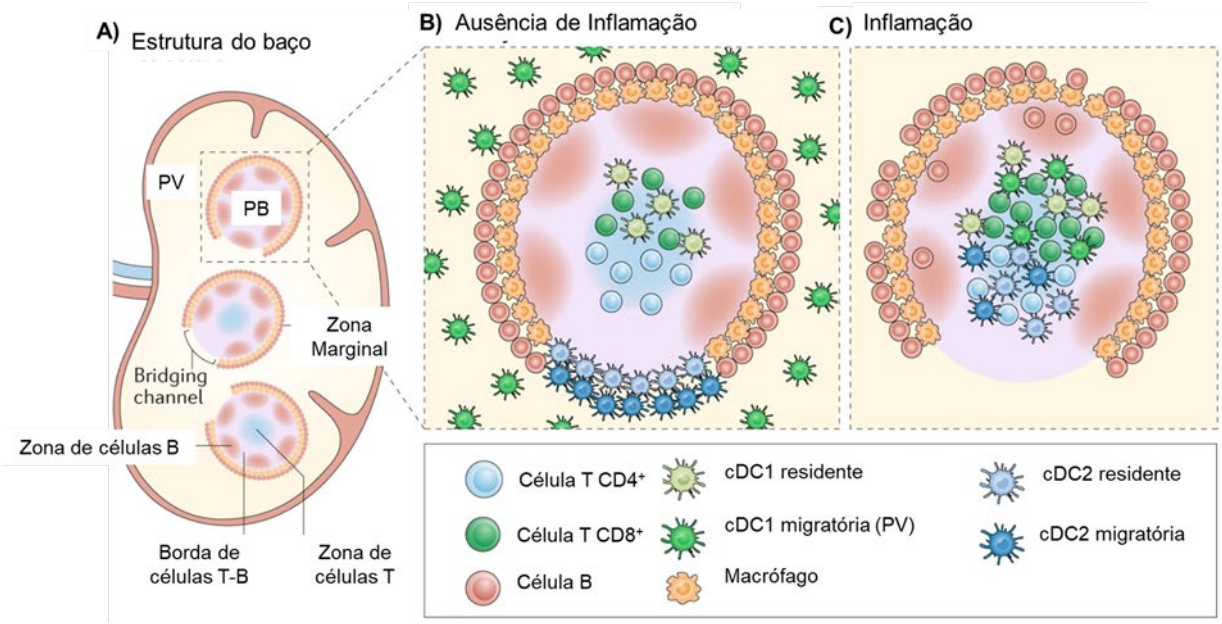

Figura 2 – cDCs esplênicas. Esquema estrutural do baço e as localizações de cDCs residentes e migratórias. A) Estrutura do baço de camundongos dividido em polpa vermelha (PV) e polpa branca (PB). A zona marginal limita a PV e PB e o *bridging channel* permite a passagem de células entre a PV e A PB. B) Localização de cDC1s e cDC2s na ausência de inflamação. C) Localização de cDC1 e cDC2s na presença de inflamação. Fonte: (EISENBARTH, 2019) (adaptada).

Assim como a localização das cDC1s, o local onde as cDC2s se encontram no baço acaba influenciando a sua função. A zona marginal, entre a zona de células T e a zona de células B, onde as cDC2s estrategicamente se localizam, acaba favorecendo a interação de cDC2s com células T e também com células B, criando um microambiente propício para a promoção de respostas de células B-T dependentes (EISENBARTH, 2019). Pouco ainda se conhece sobre os mecanismos que influenciam as interações entre essas três células.

1.3 Respostas de células T auxiliares

A resposta de células T auxiliares exerce um papel fundamental no sistema imune, pois são os diferentes perfis da resposta das células T $CD4^+$ que geram respostas imunes apropriadas a diferentes contextos e antígenos, garantindo proteção contra uma grande variedade de patógenos. Por serem APCs profissionais, as DCs são as células responsáveis por promoverem a instrução da resposta de células T $CD4^+$ (HILLIGAN; RONCHESE, 2020). As DCs, em especial as cDCs, interagem fisicamente com as células T, durante o processo de apresentação de antígeno, em estruturas conhecidas como sinapse imunológica. Nesse processo, as cDCs secretam citocinas e expressam moléculas coestimulatórias que fornecem os sinais de ativação para células T e influenciam a instrução de diferentes perfis da resposta de células T $CD4^+$ (STEINMAN, 2007). A figura 3 indica as principais polarizações da reposta de células T auxiliares e as citocinas relacionadas com a promoção de cada uma dessas respostas.

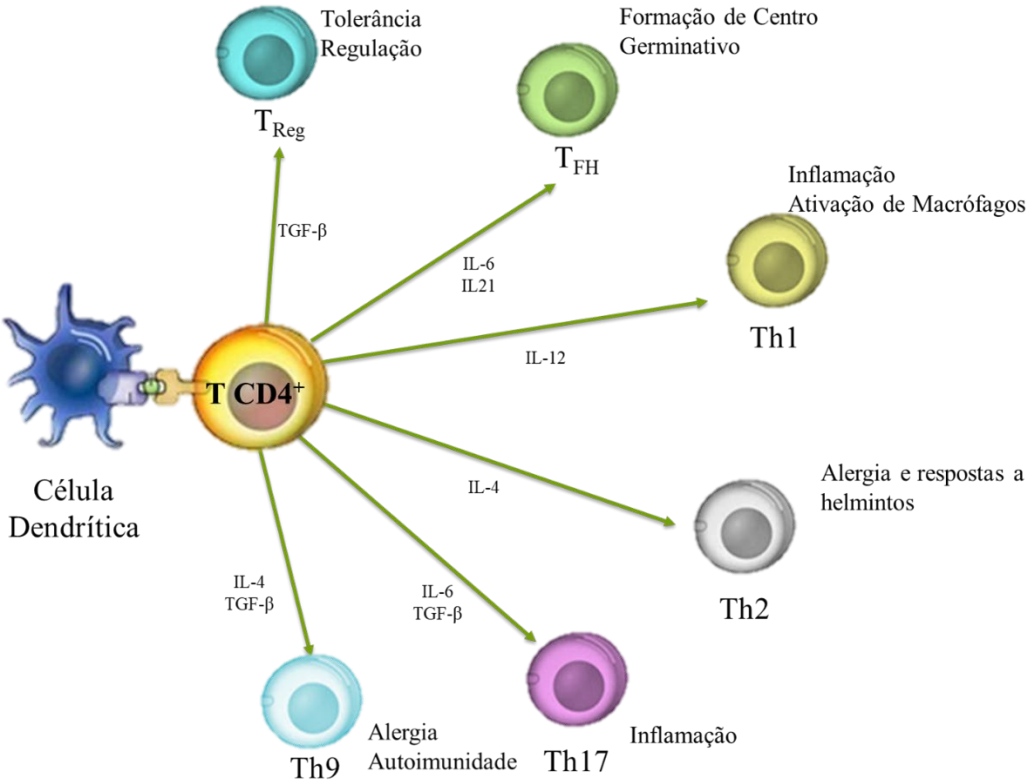

Figura 3 - Polarização da resposta de células T auxiliares. Diferentes polarizações da resposta de células T auxiliares. As células T virgens, durante o processo de apresentação de antígeno, recebem sinais das DCs para a promoção de diferentes tipos de respostas: Th1 (IL-12, IL-18 IFN-γ), Th2 (IL-4, IL-2), Th17 (IL-6, TGF-β), Th22 (IL-6, TNF-α), T_{Reg} (TGF-β), T_{FH} (IL-6 e IL21) e Th9 (TGF-β).

Classicamente, acreditava-se que as DCs são capazes de identificar os diferentes sinais presentes no tecido, devido a seu amplo repertório de receptores de reconhecimento de padrão, sendo capazes de apresentar antígenos próprios e não próprios as células T e ainda fornecer sinais que sinergicamente orquestram a promoção de diferentes respostas de células T $CD4^+$. A produção de IL-12 por DCs auxilia a polarização de células Th1, já a expressão de ICOSL favorece a promoção de respostas de células T foliculares auxiliares, por exemplo (ATHIE-MORALES *et al.*, 2004; CHOI *et al.*, 2011). Contudo, nos últimos anos vem sendo estudada também a especialização de cada subtipo de DC em promover diferentes respostas de células T $CD4^+$ (YIN *et al.*, 2021). Atualmente, sabe-se da especialização de cDC1s em induzirem respostas de células Th1 ou células T_{Reg}, e preferência de cDC2s em promoverem respostas de células T_{FH} e células Th17 (SCHLITZER *et al.*, 2013; SHIN *et al.*, 2016; SHIN *et al.*, 2015; SULCZEWSKI *et al.*, 2020). No entanto, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos que cada um desses subtipos utiliza para montar as

diferentes respostas de células T auxiliares. Uma das estratégias mais utilizadas para o estudo *in vivo* das funções da cDC1s e cDC2s do baço é o direcionamento de antígenos para cada um desses subtipos.

1.4 cDC1s esplênicas e a promoção de respostas de células T auxiliares

Nas últimas décadas, muitos estudos foram realizados para avaliar a especialização de cDC1s em promover diferentes respostas de células T $CD4^+$. Uma estratégia eficiente para acessar a função e a biologia de cDC1s *in vivo* é entregar antígenos diretamente a esse subtipo de DC. As cDC1s esplênicas murinas expressam o receptor endocítico DEC205 (CD205). O anticorpo monoclonal αDEC205 tem sido amplamente utilizado para direcionar antígenos para cDC1s via receptor DEC205 (ANTONIALLI *et al.*, 2017; APOSTOLICO *et al.*, 2019; BONIFAZ *et al.*, 2002; BONIFAZ *et al.*, 2004; BOSCARDIN *et al.*, 2006; DO *et al.*, 2010; LONGHI *et al.*, 2009; SHIN *et al.*, 2016; SHIN *et al.*, 2015; SULCZEWSKI *et al.*, 2020; TRUMPFHELLER *et al.*, 2008). A estratégia de direcionamento de antígenos para DCs utilizando o anticorpo αDEC205 e foi inicialmente desenvolvida no laboratório do Dr. Ralph Steinman (The Rockefeller University) (STEINMAN, 2012). Os primeiros estudos que utilizaram o anticorpo αDEC205 fusionado a antígenos para imunização de camundongos mostraram que as respostas promovidas foram respostas de células T_{Reg} que induziram a tolerância aos antígenos direcionados. Nesses estudos, a imunização dos camundongos, pela via intraperitoneal, foi realizada sem a utilização de estímulos inflamatórios (BONIFAZ *et al.*, 2002; HAWIGER *et al.*, 2001). Mais tarde surgiram as primeiras evidências de que a imunização de camundongos com αDEC205 fusionado ovalbumina utilizando adjuvantes, principalmente Poly (I:C) e αDC40, induziam a promoção de uma robusta resposta de células T $CD4^+$ e elevada produção de anticorpos específicos aos antígenos direcionados (BONIFAZ *et al.*, 2004; BOSCARDIN *et al.*, 2006; TRUMPFHELLER *et al.*, 2008).

Com isso, o direcionamento de antígenos para cDC1s via o receptor endocítico DEC205 passou a ser largamente utilizado para o desenvolvimento de estratégias vacinais a antígenos de relevância clínica, mas também como forma de estudar as funções das cDC1s. Este grande corpo de evidências indica que as cDC1s são especializadas em promover respostas de células T $CD4^+$ com um perfil Th1 ou

T_{Reg} em diferentes contextos (ANTONIALLI *et al.*, 2017; APOSTOLICO *et al.*, 2019; BONIFAZ *et al.*, 2002; BONIFAZ *et al.*, 2004; BOSCARDIN *et al.*, 2006; DO *et al.*, 2010; LONGHI *et al.*, 2009; SULCZEWSKI *et al.*, 2020; TRUMPFHELLER *et al.*, 2008). Além disso, mostramos recentemente que o direcionamento de antígenos para as cDC1s via o receptor DEC205 induz o aumento de células T auxiliares foliculares após uma segunda dose do anticorpo αDEC205 (SULCZEWSKI *et al.*, 2020).

Interessantemente, as cDC1s murinas instruem células T $CD4^+$ Th1 quando o antígeno é direcionado através do receptor DEC205, independente do adjuvante usado durante a imunização (ANTONIALLI *et al.*, 2017; TRUMPFHELLER *et al.*, 2008). Além disso, as cDC1s também estão associados à promoção de respostas Th1 e respostas regulatórias em outros contextos, como câncer e infecções virais ou parasitárias (BOTTCHER *et al.*, 2018; HARPUR *et al.*, 2019; MARTINEZ-LOPEZ *et al.*, 2015).

Considerando os sinais envolvidos na instrução de respostas imunes de células T $CD4^+$ Th1, a IL-12 é a principal citocina responsável por promover a fosforilação de STAT4 em células T, consequentemente, a regulação positiva da expressão de T-bet (fator de transcrição de células Th1) em células T $CD4^+$ virgens (THIEU *et al.*, 2008). As cDC1s em camundongos e humanos são a principal fonte de IL-12, evidenciando seu papel proeminente nas respostas Th1 (MARTINEZ-LOPEZ *et al.*, 2015). Mais do que isso, as cDC1s também promovem respostas de células Th1, regulando positivamente o CD70 de maneira independente de IL-12 (SOARES *et al.*, 2007). Além disso, quando cDC1s esplênicas de camundongos são estimuladas com Poly (I:C) e/ou anti-CD40 *in vitro* e co-cultivadas com células T $CD4^+$ específicas ao antígeno, células T $CD4^+$ regulam positivamente T-bet alguns dias após o estímulo com antígeno (SHIN *et al.*, 2015). De alguma forma, as cDC1s preferencialmente fosforilam JNK (quinase c-Jun N terminal) e p38, que são componentes da via de sinalização canônica de NF-kB, quando estimuladas com Poly (I:C) ou anti-CD40 *in vitro* (SHIN *et al.*, 2016; SHIN *et al.*, 2015). Da mesma forma, elas também expressam CD80 e CD40 24 horas após a injeção de Poly (I:C) em camundongos (SULCZEWSKI *et al.*, 2020).

Aparentemente, os genes reguladores do interferons são importantes fatores de transcrição que modulam a função de cDC1s em instruir células T $CD4^+$ Th1. Essencialmente, as cDC1s alteram a expressão de inúmeros genes quando elas passam pelo processo de maturação. Uma elegante pesquisa de Ardouin e

colaboradores (2016) evidenciou que as cDC1s são capazes de maturar em dois cenários diferentes: a maturação homeostática para promover tolerância ou a maturação imunogênica para induzir imunidade. Em ambos os casos, elas regulam positivamente ou negativamente centenas de genes. Durante o processo de maturação imunogênica, as cDC1s expressam genes relacionados com a via de sinalização de interferons (ARDOUIN *et al.*, 2016). Consequentemente, os interferons do tipo I, provavelmente derivados de células NK e pDCs, podem modular o papel das cDC1s em promover respostas Th1 (DE GIOVANNI *et al.*, 2020; LONGHI *et al.*, 2009). No entanto, o conhecimento de outros mecanismos e vias de sinalização que controlam a capacidade de cDC1s em promover respostas de células Th1 é ainda bastante limitado, pincipalmente se considerarmos os mecanismos em que diferentes citocinas podem modular as funções de diferentes subtipos de DCs.

1.5 cDC2s esplênicas e a promoção de respostas de células T auxiliares

Diferentemente das cDC1s, há estudos recentes sugerindo que as cDC2s são especializas em promover respostas de células T_{FH} (BRISENO *et al.*, 2018; CHAPPELL *et al.*, 2012; KRISHNASWAMY *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2016; SHIN *et al.*, 2016; SHIN *et al.*, 2015; SULCZEWSKI *et al.*, 2020). Novamente, o direcionamento de antígenos para esse subtipo de cDC foi utilizado como estratégia para avaliar a função de cDC2s (DUDZIAK *et al.*, 2007; SHIN *et al.*, 2016; SHIN *et al.*, 2015; SULCZEWSKI *et al.*, 2020). Como as cDC2s murinas de tecidos linfoides expressam o receptor endocítico DCIR2, o anticorpo monoclonal αDCIR2 é capaz de direcionar antígenos para cDC2s murinas (IDOYAGA *et al.*, 2011). A utilização do anticorpo αDCIR2 para levar antígenos a cDC2s foi incialmente proposta no laboratório do Dr. Michel Nussenzweig (The Rockefeller University), quando ainda não se conhecia o alvo do anticorpo monoclonal 33D1, mais tarde chamado de αDCIR2 (NUSSENZWEIG *et al.*, 1982).

As primeiras análises da resposta imune promovida pela imunização de camundongos com o anticorpo αDCIR2 novamente mostravam a necessidade da utilização de um estímulo inflamatório para que o direcionamento de antígenos via DCIR2 para cDC2s induzisse uma resposta de células T $CD4^+$. Nesse caso, os

estudos iniciais mostraram que a imunização com αDCIR2 sozinho induz a proliferação de células T auxiliares (CHAPPELL *et al.*, 2012; FINKELMAN *et al.*, 1996). Contudo, essa resposta é de curta duração, sendo também necessário o uso de um adjuvante para que o direcionamento de antígenos para cDC2s possa induzir células T $CD4^+$ efetoras (DUDZIAK *et al.*, 2007).

Quando os antígenos foram especificamente entregues às cDC2s *in vivo*, usando a estratégia a direcionamento via receptor DCIR2 e Poly (I:C), anti-CD40 ou LPS como adjuvante, houve um aumento de células T auxiliares foliculares (T_{FH}) 4 ou 5 dias depois das imunizações (CHAPPELL *et al.*, 2012; SHIN *et al.*, 2016; SHIN *et al.*, 2015; SULCZEWSKI *et al.*, 2020). Esses resultados mostram que as cDC2s são especializadas na promoção de respostas de células T_{FH}. As células T_{FH} são células T $CD4^+$ especializadas em promover a formação de centros germinativo (CG) que levam a produção de anticorpos com alta afinidade ao antígeno. As cDC2s instruem células T_{FH} de uma maneira independente do adjuvante e até mesmo na ausência de qualquer estímulo de maturação (CHAPPELL *et al.*, 2012; EISENBARTH, 2019; SHIN *et al.*, 2015). Da mesma forma, os cDC2s do baço ativaram células T_{FH} após infecção de camundongos com *Listeria monocytogenes* ou quando glóbulos vermelhos de ovelha (SRBCs) foram administrados pela via intravenosa (BRISENO *et al.*, 2018).

Com isso, buscou-se entender os mecanismos envolvidos na instrução de células T_{FH} por cDC2s. As cDC2s interagem com células T $CD4^+$ previamente ativadas que aumentaram a expressão de EBI2 e são guiadas para a área externa da zona de células T (LI *et al.*, 2016). As cDC2s expressam menores níveis de CD80 e CD40 em comparação com as cDC1s e mais ICOSL e OX40L após a administração de Poly (I:C) *in vivo* (SHIN *et al.*, 2016; SULCZEWSKI *et al.*, 2020). Além disso, quando cDC2s esplênicas murinas são estimuladas com Poly (I:C) ou anti-CD40 *in vitro*, elas principalmente fosforilam os componentes da via de sinalização não canônica de NF-Kb que está relacionada com a regulação positiva das moléculas coestimulatórias ICOSL e OX40L. ICOSL e OX40L se ligam em ICOS e OX40 em células T desencadeando a fosforilação de STAT3 que estimula a expressão de Bcl-6, o fator de transcrição responsável por promover o destino das células T_{FH} (SHIN *et al.*, 2015). Além disso, as cDC2s esplênicas são capazes de secretar uma forma solúvel de CD25 que sequestra a IL-2 disponível no microambiente, diminuindo a fosforilação de STAT5 que regula negativamente a expressão de Blimp-1, um antagonista de Bcl-6 (LI *et al.*, 2016).

Apesar dos recentes achados referentes aos mecanismos de instrução de células T_{FH} pelas cDC2s, ainda não conhecemos quais são os estímulos que estas células requerem para promover esse tipo de resposta. Tão pouco conhecemos quais são as citocinas e vias de sinalização que regulam a função das cDC2s.

1.6 Via de sinalização de JAK-STAT

As proteínas STATs (Transdutores de sinal e ativadores de transcrição) são proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição que atuam na sinalização de receptores de citocinas e alguns fatores de crescimento. Nas células do sistema imunológico, as proteínas STAT participam de uma via de sinalização *downstream* às proteínas conhecidas como JAK (do inglês "*Janus associated Kinase*") ou Tyk2 (do inglês "*Tyrosine Kinase 2*") (RAWLINGS *et al.*, 2004). JAK1, JAK2, JAK3 ou Tyk2 são seletivamente fosforiladas por receptores (R) de citocinas, como o INF-α/βR, INF-γR, IL-2R, IL-6R, IL-4R, IL-12R, entre outros. As proteínas JAKs fosforiladas possuem atividade quinase e fosforilam as STATs que regulam a transcrição de genes envolvidos com a ativação celular (MURRAY, 2007). Os sete membros da família STAT recebem números de 1 a 6 (considerando as duas isoformas de STAT5, STAT5a e STAT5b) e estão envolvidos na transdução de sinal de diferentes receptores de citocinas (O'SHEA; PLENGE, 2012). A figura 4 mostra um esquema representativo da via de sinalização de JAK/STAT.

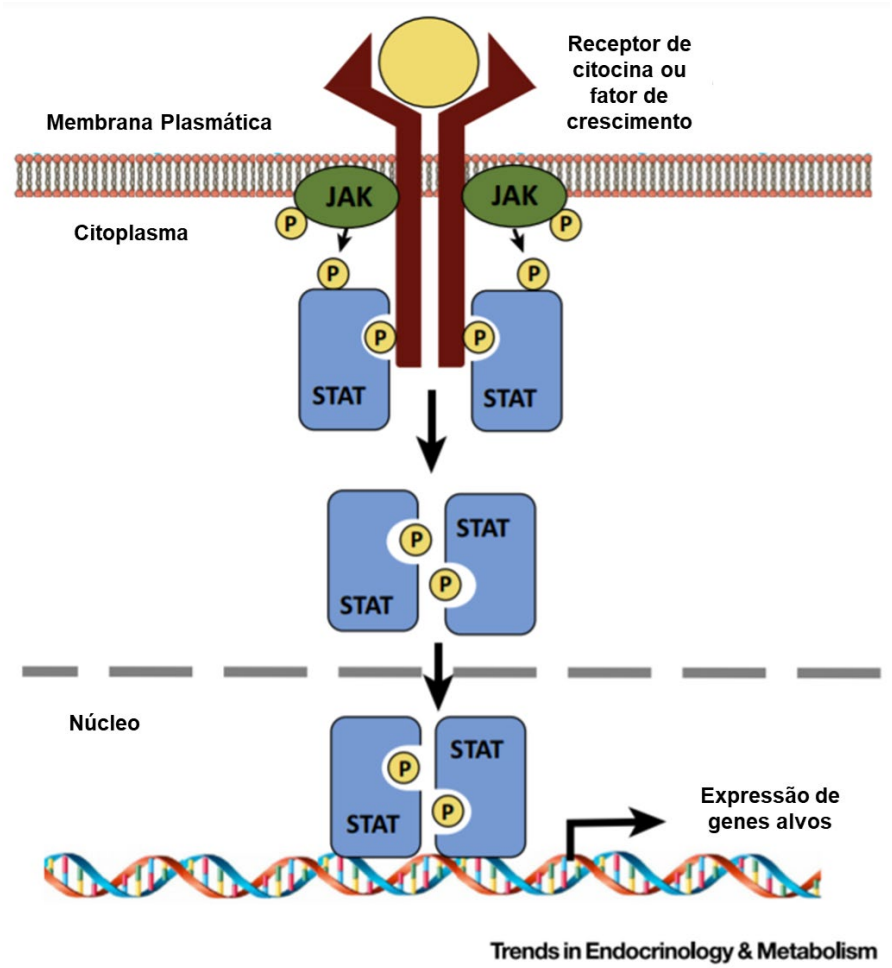

Figura 4– Via de sinalização JAK/STAT. Esquema representativo da via de sinalização de JAK/STAT. A via é ativada quando uma citocina ou um fator de crescimento liga em seu receptor, normalmente ancorado na membrana plasmática. Essa ligação promove a ativação das proteínas JAKs que estão ancoradas na porção intracitoplasmática do receptor. Quando as proteínas JAKs se ativam, elas fosforilam proteínas STAT que, quando fosforiladas, dimerizam, migram para o núcleo e agem como um fator de transcrição para regular a expressão dos genes alvos. Fonte: (DODINGTON *et al.*, 2018) (adaptado)

A via de sinalização de JAK-STAT é uma das vias mais simples e mais bem conservadas entre os metazoários, e pode influenciar funções celulares importantes como proliferação, diferenciação, migração, apoptose e sobrevivência celular, dependendo do sinal, do tecido e do tipo celular envolvido (HARRISON, 2012). Nesse sentido, a sinalização de JAK-STAT pode estar envolvida em vários processos de desenvolvimento e homeostasia, inclusive desenvolvimento de células imunológicas e regulação de suas funções (GHORESCHI *et al.*, 2009). Dessa forma, neste estudo vamos focar nas vias de sinalização de STAT3 e STAT6 e em suas diferentes funções em DCs.

1.6.1 A Via de Sinalização de STAT3 em cDCs

Os primeiros estudos descrevendo a via de sinalização de STAT3 foram publicados em 1994 mostrando que a proteína STAT3 está envolvida no complexo de sinalização da IL-6 que exerce um papel fundamental na ativação de células do sistema imune (LUTTICKEN *et al.*, 1994; STANDKE *et al.*, 1994; ZHONG *et al.*, 1994). Posteriormente, foi possível verificar que o STAT3 possui um domínio de ligação ao DNA correspondente ao domínio de resposta a Interferons dos membros anteriores da família STAT (STAT1 e STAT2) (WEGENKA *et al.*, 1994). Atualmente, sabe-se que o STAT3 está envolvido na sinalização não somente da IL-6, mas também das citocinas IL-10, IL-11, IL-21 e do fator de crescimento GM-CSF (HILLMER *et al.*, 2016). Dessa forma, no sistema imunológico, o STAT3 possui funções que envolvem a ativação de células, a polarização de respostas de células T $CD4^+$, a sinalização de mediadores inflamatórios e ativação celular, bem como a diferenciação celular, dependendo de qual for a citocina ou fator de crescimento que promove a ativação da via de sinalização de STAT3 (HILLMER *et al.*, 2016).

A via de sinalização de JAK-STAT3 está envolvida com a transdução de sinais principalmente do meio extracelular para o meio intracelular por meio da ação de um receptor normalmente ancorado na membrana celular. Quando o ligante, como citocinas e fatores de crescimento, liga-se ao receptor, são as proteínas JAK que fosforilam STAT3, normalmente na tirosina 705 ou na serina 727. Há evidências que a fosforilação da serina 727 do STAT3 aumenta a sua ação como fator de transcrição (HUANG *et al.*, 2014). Uma vez fosforiladas, duas proteínas STAT3 (pSTAT3) dimerizam através de interações recíprocas do domínio SH2-fosfotirosina dos 2 monômeros. O dímero de STAT3 interage pela região central com domínios de ligação ao DNA e na porção C-terminal com outras proteínas (HILLMER *et al.*, 2016). A ação do STAT3 como fator de transcrição ainda está sendo alvo de estudos em diferentes tipos celulares.

A via de sinalização de STAT3 pode ser inibida por ação do supressor da sinalização de citocina 3 (SOCS3). Na ausência de SOCS3, a fosforilação de STAT3 é significativamente maior quando macrófagos são estimulados com IL-6 (YASUKAWA *et al.*, 2003). Interessantemente, a expressão de SOCS3 é estimulada pela ação de membros da família STAT, como STAT1 e pelo próprio STAT3 quando

fosforilado pela via da IL-10 (KREBS; HILTON, 2001). Assim, a via de sinalização de STAT3 é regulada pela ação de citocinas que possem efeitos divergentes no mesmo subtipo celular. Contudo, há evidências de que o STAT3 pode, mesmo não fosforilado, ligar-se ao DNA. Porém, o STAT3 não fosforilado requer o auxílio de outros fatores de transição, principalmente do NF-KB (YANG; STARK, 2008).

O STAT3 também apresenta algumas funções biológicas relevantes que não dependem da sua atividade como fator de transcrição. Há dados mostrando que o STAT3 pode participar dos processos de respiração celular, regulando a cadeia de transporte de elétrons, bem como a fosforilação glicolítica e oxidativa em células tumorais (GOUGH *et al.*, 2009). Além disso, também há evidências que mostram o STAT3 interagindo com outras vias de sinalização, como a via de fosfoinositol 3-quinase tipo III (PI3K), do fator de iniciação da tradução eucariótica 2a (eIF2a) e da quinase 2/proteína quinase R (EIF2AK2/PKR) (BOUSOIK; MONTAZERI ALIABADI, 2018; HILLMER *et al.*, 2016; NISO-SANTANO *et al.*, 2013; SHEN *et al.*, 2012). Há evidências ainda que o STAT3 não fosforilado participa também da manutenção da estabilidade de microtúbulos, contribuindo para mecanismos de migração e motilidade celular (NG *et al.*, 2006).

Em DCs, a influência da via de sinalização de STAT3 em sua função ainda não é completamente elucidada. A fosforilação de STAT3 é fundamental para que os precursores mieloides da medula óssea se diferenciem em cDCs. Uma das principais citocinas que controlam a ontogenia de DCs é o Flt3L que se liga ao receptor de Tirosino-quinase 3 relacionada a Fms (Flt3) e exerce um papel fundamental na ontogenia das DCs, em especial das cDCs. Flt3L estimula a diferenciação do precursor mieloide de DCs e monócitos (MDP) no precursor comum de DC (CDP), o primeiro percursor exclusivo de DCs na medula óssea (EISENBARTH, 2019; SHORTMAN; NAIK, 2007). A sinalização de Flt3 é principalmente mediada pela fosforilação de STAT3 e, consequentemente, a deleção de STAT3 impede a diferenciação de cDCs (LAOUAR *et al.*, 2003; MCKENNA *et al.*, 2000). No entanto, até o momento não sabemos exatamente quais genes são efetivamente regulados por STAT3 nessa etapa da diferenciação das DCs.

Além disso, há modelos experimentais de DCs geradas *in vitro* que utilizam GM-CSF para estimular a diferenciação das células da medula óssea em células que se assemelham a DCs. Por isso, considerou-se o GM-CSF um fator de crescimento fundamental para o desenvolvimento das DCs (INABA *et al.*, 1992). A sinalização de

GM-CSF é principalmente mediada pela fosforilação de STAT5 e de STAT3 em uma menor escala(KIMURA *et al.*, 2009). Contudo, o diferenciação das células da medula óssea nessas células semelhantes a DCs ocorre normalmente em células deficientes de STAT3, mesmo que (BELL *et al.*, 2013; LAOUAR *et al.*, 2003).

Em relação à função das DCs, inicialmente os estudos mostravam que a via de sinalização de STAT3 modula negativamente a ativação dessas células, suprimindo sua maturação. Em outras palavras, STAT3 estimula as DCs a se diferenciarem em DCs tolerogênicas (CHENG *et al.*, 2003; KITAMURA *et al.*, 2005; LUNZ *et al.*, 2007; NEFEDOVA; CHENG*; et al.*, 2005; NEFEDOVA *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2004). Contudo, a maioria desses estudos utiliza como modelo uma linhagem de DC ou células que foram diferenciadas a partir de precursores de medula óssea *in vitro* que, na verdade, não representam a biologia das cDCs encontradas *in vivo* (HELFT *et al.*, 2015). Ainda, há estudos que analisam as DCs em ambientes tumorais em que o próprio tumor pode secretar moléculas para modular suas funções (NEFEDOVA; NAGARAJ*; et al.*, 2005; WANG, T. *et al.*, 2004). Existem inclusive estudos mais recentes mostrando que em câncer de pulmão há uma diminuição da fosforilação de STAT3 e de NF-kB (LI *et al.*, 2017).

Há dados recentes que avaliam o papel da via de sinalização de STAT3 em DCs em condições homeostáticas (na ausência de inflamação). Esse estudo utiliza um modelo de deleção condicional de STAT3 (STAT3 cKO) em células que expressam CD11c (principal marcador de DCs). Os resultados mostram que os camundongos STAT3 cKO desenvolvem colite, uma doença autoimune caracterizada por uma intensa inflamação da mucosa intestinal (MELILLO *et al.*, 2010). Esses dados publicados neste último artigo confirmam estudos anteriores mostrando que a ausência de STAT3 em DCs faz com que essas células percam a capacidade de tolerância, porém não avalia os diferentes subtipos de DCs. Por outro lado, há evidências que mostram que a via de sinalização de STAT3 está associada com a maturação de cDC1s induzida pelo estímulo dessas células com Poly (I:C), um ligante de TLR3, que promove a maturação de cDC1s pela via de INF do tipo I. Esse estudo indica que a via de sinalização de STAT3 também pode estimular cDC1s a promoverem respostas inflamatórias (ARDOUIN *et al.*, 2016).

Há poucos dados sobre a influência da via de sinalização de STAT3 em cDC2s. A capacidade das DC2s para promover respostas de células T_{FH} está relacionada com a sua migração intraesplênica, uma vez que estas células estão localizadas perto da

zona de células B, na polpa branca do baço (EISENBARTH, 2019). Recentemente, Calabro e colaboradores identificaram que a migração de cDC2s é abolida em camundongos deficientes em DOCK8 (dedicador 8 de citocinese). O DOCK8 é um fator atípico de troca de nucleotídeos, expresso em células hematopoiéticas, que ativa as Rho GTPases que influenciam processos celulares essenciais, como migração, fagocitose e adesão (KEARNEY *et al.*, 2017; MELLER *et al.*, 2005). A falta de migração de cDC2s reduz a proliferação de células T $CD4^+$ e a resposta de anticorpos a hemácias halogênicas (CALABRO; GALLMAN*; et al.*, 2016; CALABRO; LIU*; et al.*, 2016). Assim, DOCK8 está de alguma forma regulando especificamente a migração de cDC2s para a zona de células T. Além disso, há evidências sugerindo que DOCK8 promove a fosforilação de STAT3 que tem sido associada à translocação eficiente de STAT3 para o núcleo para promover o destino das células Th17, amplificando a via de sinalização de STAT3 (KELES *et al.*, 2016). Nesse sentido, a via de sinalização de STAT3 pode inibir a promoção de respostas de células T por cDC2s.

1.6.2 A Via de Sinalização de STAT6 em cDCs

Assim como para o STAT3, os primeiros estudos indicando a função do STAT6 foram publicados em 1994. O STAT6 é normalmente expresso em vários tecidos, mas a sua principal função é a sinalização intracelular ativada pela IL-4 (HOU *et al.*, 1994). Mais tarde, mostrou-se que a via de sinalização de STAT6 é também ativada pela sinalização de IL-13, que utiliza uma das cadeias do receptor da IL-4 (LIN *et al.*, 1995). A IL-4 e a IL-13 são citocinas que estão principalmente relacionadas com a polarização da resposta de células T $CD4^+$ para um perfil Th2 (KISSELEVA *et al.*, 2002; RYAN *et al.*, 1996).

A via de sinalização de STAT6 se inicia com a ligação das citocinas (principalmente IL-4 e IL-13) em seus receptores. Na porção citoplasmática, normalmente JAK1 e JAK3 estão associadas ao receptor e promovem a fosforilação de STAT6. O STAT6 fosforilado (pSTAT6) forma homodímeros assim como o STAT3 (WITTHUHN *et al.*, 1994). Aparentemente, a fosforilação da serina 756 ativa sua atividade como fator de transcrição, porém há relatos de que outros aminoácidos também podem ser fosforilados (SHIRAKAWA *et al.*, 2011; WANG, Y. *et al.*, 2004) . O STAT6 dimérico atua como fator de transcrição, migrando para o núcleo das células,

regulando inclusive a expressão da IL-4 e inibindo a expressão de IgG1 em células B, por exemplo (SIEMASKO *et al.*, 1998). Além disso, outros alvos do STAT6 foram identificados, sendo que há dados que sugerem que o STAT6 está envolvido com o aumento da expressão dos componentes p50/RelB do fator de transcrição de NF-kB e do CD86 em células B (GOENKA; KAPLAN, 2011).

A via de sinalização de STAT6 pode ser inibida pela expressão de SOCS1 que inibe a fosforilação desta molécula por JAK1 e JAK3, evitando a ativação da via e a migração de STAT6 para o núcleo das células. Assim, SOCS1 inibe também a expressão de genes cuja expressão é estimulada por STAT6. A expressão de SOCS1 é estimulada principalmente pelas vias de sinalização de STAT1 e STAT6. Dessa forma, a própria sinalização de STAT6 acaba autorregulando a sua ativação (DICKENSHEETS *et al.*, 2007; SATO *et al.*, 2004).

A papel da via de sinalização de STAT6 foi majoritariamente caracterizado em células B e em células T $CD4^+$ (GOENKA; KAPLAN, 2011). Apesar de não haver dados referentesà influência de STAT6 na diferenciação de DCs *in vivo*, há estudos mostrando que nos protocolos de diferenciação de DCs *in vitro,* a via de sinalização de STAT6 influencia a diferenciação de DCs. Ativada pela IL-4, STAT6 é responsável por induzir modificações epigenéticas no DNA das células diferenciadas a partir de precursores de medula óssea para que essas células se assemelhem a DCs (VENTO-TORMO *et al.*, 2016). Da mesma forma, a sinalização por STAT6 parece influenciar a expressão de receptores que controlam a metabolismo lipídico nessas células, estimulando respostas inflamatórias *in vitro* (SZANTO *et al.*, 2010).

Em relação a influência da via de sinalização de STAT6 na função de cDCs, há dados que mostram que STAT6 modula algumas funções importantes das DCs, como a ativação e a migração dessas células em alguns contextos específicos. A inibição da fosforilação de STAT6 pela via nasal diminui a migração *in vivo* de cDC2s em quadros de alergia, porém não sabemos se é um efeito direto da via de STAT6 em DCs ou um efeito secundário causado pela inibição de STAT6 em outras células (LEE *et al.*, 2019).

Além disso, há evidências de que a ativação da via de sinalização de STAT6 promove a progressão tumoral no pulmão porque estimula o aumento de células mieloides $CD11b^+$ (incluindo macrófagos e DCs) com um perfil regulador ou de macrófagos M2 (FU *et al.*, 2019). Nesse mesmo sentido, a via de sinalização de STAT6 em cDCs estimula essas células a se diferenciarem em DCs imunoreguladoras

(mregDCs) que diminuem a sua capacidade de instruir respostas de células T produtoras de INF-γ. O bloqueio sistêmico da IL-4 aumenta a resposta antitumoral e promove a diminuição de um tumor de pulmão (MAIER *et al.*, 2020). Por outro lado, estudos anteriores mostram que o estímulo de DCs com IL-4 diminui a produção de IL-10 e aumenta a secreção de IL-12 em células diferenciadas a partir de precursores da medula óssea que se assemelham a DCs. O aumento de IL-12 está associado com o aumento da promoção de respostas Th1 *in vitro* (YAO *et al.*, 2005). Esses resultados indicam que a sinalização de STAT6 pode estimular DCs a promoverem respostas de células T $CD4^+$ com um perfil Th1.

Ainda, existem evidências na literatura indicando que a via de sinalização de STAT6 influencia as respostas imunes promovidas pelas cDC2s *in vivo*. Como citado anteriormente, as cDC2s são especializadas em promover respostas de células T_{FH}. Mas para isso, a interação entre cDC2s e/ou células T e B é necessária para a indução de células T_{FH}, bem como para o inicio e expansão dos centros germinativos (CROTTY, 2011). Curiosamente, essas interações ocorrem na zona marginal das zonas de células T e B e dentro dos centros germinativos (CGs), que são áreas que podem ter um nicho específico para suportar tais interações (EISENBARTH, 2019). Há evidências que indicam que as citocinas IL4/IL13 e a via de sinalização de STAT6 limitam a expansão de CGs quando camundongos são infectados com *Nippostrongylus brasiliensis*, um modelo de infecção Th2 (KAPLAN *et al.*, 1996; MINTY *et al.*, 1993; TURQUETI-NEVES *et al.*, 2014). Além disso, a imunização subcutânea com NP-ovalbumina reduziu a formação de CGs em camundongos sem IL-4 (GONZALEZ *et al.*, 2018) (Gonzalez et al., 2018).

1.7 Estudo da influência das vias de sinalização de STAT3 e STAT6 na capacidade de cDCs esplênicas promoverem respostas de células T auxiliares

Considerando os estudos descritos acima que avaliam a influência das vias de sinalização de STAT3 e STAT6 em DCs, podemos considerar que os papeis dessas vias de sinalização ainda não são completamente compreendidos. As evidências do papel da via de sinalização de STAT3 na função de cDCs, especialmente nos subtipos de cDC1 e cDC2s esplênicas, ainda são divergentes, apesar de haver um consenso que a deleção de STAT3 diminui a capacidade tolerogênica das DCs (MELILLO *et al.*,

2010). Os dados mostram que a o STAT3 pode ainda modular outras funções das DCs, como a maturação imunogênica (ARDOUIN *et al.*, 2016). Em relação à via de STAT6, há evidência que esta via de sinalização também exerce um papel regulador, inibindo principalmente DCs a promoverem respostas inflamatórias (MAIER *et al.*, 2020). No entanto, camundongos deficientes de STAT6 apresentaram respostas promovidas por cDC2s deficientes (TURQUETI-NEVES *et al.*, 2014). Dessa forma, novos estudos são necessários para melhor entendermos a modulação de STAT3 e STAT6 nas funções de diferentes subtipos de cDCs. Além disso, não há estudos que avaliam a influência das vias de sinalização de STAT3 e STAT6 nas repostas induzidas pelo direcionamento de antígenos para cDC1s e cDC2s via os receptores DEC205 e DCIR2, respectivamente.

Desta forma, neste estudo avaliamos o papel das vias de sinalização de STAT3 e STAT6 em cDC1s e/ou cDC2s usando a estratégia de direcionamento de antígenos para cDC1s e para cDC2s via os receptores DEC205 e DCIR2 *in vivo*. Essa estratégia vem sendo amplamente utilizada no Laboratório de Direcionamento de Antígenos para Células Dendríticas para o desenvolvimento de vacinas ou para estudar as funções de cDCs (AMORIM, K. N. *et al.*, 2016; ANTONIALLI *et al.*, 2017; APOSTOLICO *et al.*, 2019; BOSCARDIN *et al.*, 2006; HENRIQUES *et al.*, 2013; RAMPAZO *et al.*, 2015; SULCZEWSKI *et al.*, 2020).

Para estudar a influência da via de STAT3 utilizamos um modelo de direcionamento de um antígeno híbrido formado por um fragmento de 19 kDa da proteína 1 de superfície de merozoito ($MSP1_{19}$) derivada do *Plasmodium vivax* conjugada ao epítopo sintético PADRE (do inglês “Pan allelic DR epitope”) (ROSA *et al.*, 2004). A porção desse antígeno formada pela proteína $MSP1_{19}$ é um forte alvo da resposta humoral contra o parasito e tem sido utilizada no desenvolvimento de vacinas (WILSON *et al.*, 2011). O epítopo PADRE, por outro lado, foi desenvolvido para ligar-se a moléculas de MHC II humanas mais frequentes na população e é também reconhecido pelo haplótipo I-A/I-E^b de camundongos C57BL/6, e assim induz uma forte resposta de células T $CD4^+$ (DEL GUERCIO *et al.*, 1997). Assim, o antígeno é capaz de gerar robusta resposta de células T $CD4^+$ e também promover a produção de altos títulos de anticorpos (ROSA *et al.*, 2004). Então, para direcionar antígenos para cDCs, os anticorpos monoclonais quiméricos αDEC-$MSP1_{19}$PADRE e αDCIR2-

MSP1$_{19}$PADRE que foram previamente caracterizados (ANTONIALLI *et al.*, 2017; SULCZEWSKI *et al.*, 2020).

Resultados prévios do modelo que utilizamos mostram que a imunização de camundongos com αDEC-MSP1$_{19}$PADRE, quando o antígeno é direcionado para cDC1s, promove uma resposta de células T CD4$^+$ Th1 e de células T_{FH} principalmente 4 dias depois de uma segunda dose da imunização. Por outro lado, a imunização de camundongos com αDEC-MSP1$_{19}$PADRE promoveu uma robusta resposta de células T_{FH} 5 dias depois da primeira imunização. Além disso, os camundongos imunizados com αDCIR-MSP1$_{19}$PADRE promoveram uma robusta resposta humoral com produção de altos títulos de anticorpos, formação de CGs e diferenciação de plasmócitos [ver figura 5 (SULCZEWSKI *et al.*, 2020). Analisamos se a deleção de STAT3 em células CD11c positivas altera a resposta promovida pelas cDC1s ou pelas cDC2s, após o direcionamento do antígeno para cada um desses subtipos de cDCs.

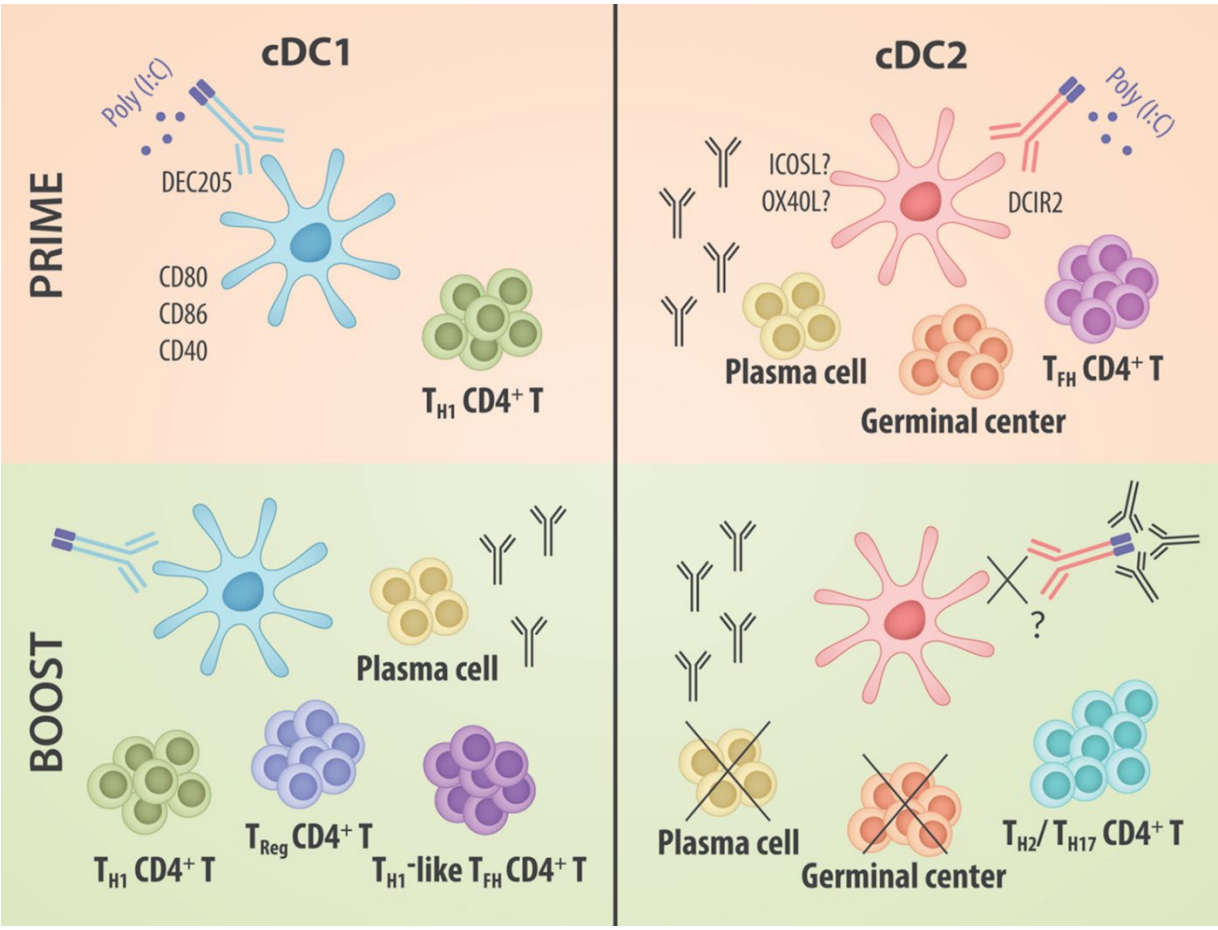

Figura 5 - Respostas imunes promovidas pelo direcionamento de antígenos a cDCs. Esquema representando as respostas imunes induzidas pelo direcionamento de antígenos para cDC1 (esquerda) e cDC2s (direita) depois da primeira dose (superior) e depois da segunda dose (inferior). cDC1 induzem respostas de células T auxiliares com um perfil de respostas Th1 após a primeira imunização. Após a segunda dose, as cDC1s promovem respostas Th1, respostas de células T_{FH} semelhantes a células Th1 e de células T reguladoras. Por outro lado, cDC2s promovem respostas de células T_{FH} que estimulam a formação de CGs e a diferenciação de plasmócitos e, consequentemente, a produção de anticorpos. Após a segunda dose, os altos títulos de anticorpos induzidos na primeira imunização inibem a formação de CGs ou o direcionamento de antígenos para cDC2s. Fonte: (SULCZEWSKI *et al.*, 2020) (adaptado).

Para analisar a influência da via de sinalização de STAT6, estudamos a modulação de STAT6 na reposta induzida por cDC2s, pois ainda não conhecemos todos os sinais necessários para a promoção de células T_{FH} no baço, considerando as interações entre as células DC2s, T e B na zona marginal no baço. Para isso, utilizamos o modelo de direcionamento de antígenos com os anticorpos αDEC-Ovalbumina e α αDCIR2-Ovalbumina para direcionar antígenos para as cDC1s e cDC2s, respectivamente. Nesse protocolo, a reposta promovida é semelhante à resposta induzida pelo direcionamento do antígeno $MSP1_{19}$PADRE (SHIN *et al.*, 2016; SHIN *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a influência das vias de sinalização de STAT3 e STAT6 na especialização de cDC1s e cDC2s esplênicas em promover respostas de células T auxiliares.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a fosforilação de STAT3 e STAT6 em cDCs esplênicas;
- Estudar a influência das vias de sinalização de STAT3 e STAT6 na diferenciação e na maturação de cDC1s e cDC2s esplênicas;
- Analisar a resposta de células T $CD4^+$ induzida pelo direcionamento antígenos para as cDC1s e cDC2s deficientes na expressão de STAT3 e STAT6 *in vivo*.

3. CONCLUSÕES

Com os resultados desse estudo podemos concluir que a via de sinalização de STAT3 possui um duplo papel no controle e na regulação da capacidade de cDC1s promoverem respostas de células T auxiliares. Primeiramente, os resultados mostraram que a via de STAT3 não influencia a diferenciação de cDCs esplênicas a partir do momento que os precursores de cDCs expressam CD11c. Os dados acima apresentados indicam que a via de sinalização de STAT3 não controla a capacidade de cDC2s em promover respostas de células T_{FH}. Porém, STAT3 estimula cDC1s a promoverem respostas de células Th1 e T_{FH}.

Referente à via de sinalização de STAT6 podemos concluir que a diferenciação de cDCs esplênicas ocorre por mecanismos independentes de STAT6. Além disso, os resultados mostraram que a via de sinalização de STAT6 estimula a promoção de respostas de células T_{FH} e a formação de CG em repostas promovidas por cDC2s, em especial após o direcionamento de antígenos para cDC2s via receptor DCIR2. Contudo, a deleção de STAT6 não altera a capacidade de cDC2s promoverem a proliferação de células T $CD4^+$ *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS*

ALCANTARA-HERNANDEZ, M.; LEYLEK, R.; WAGAR, L. E.; ENGLEMAN, E. G. *et al.* High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. **Immunity**, 47, n. 6, p. 1037-1050 e1036, Dec 19 2017.

ALLAN, R. S.; SMITH, C. M.; BELZ, G. T.; VAN LINT, A. L. *et al.* Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. **Science**, 301, n. 5641, p. 1925-1928, Sep 26 2003.

AMORIM, K. N.; RAMPAZO, E. V.; ANTONIALLI, R.; YAMAMOTO, M. M. *et al.* The presence of T cell epitopes is important for induction of antibody responses against antigens directed to DEC205(+) dendritic cells. **Sci Rep**, 6, p. 39250, Dec 21 2016.

AMORIM, K. N. S.; CHAGAS, D. C. G.; SULCZEWSKI, F. B.; BOSCARDIN, S. B. Dendritic Cells and Their Multiple Roles during Malaria Infection. **Journal of Immunology Research**, 2016, p. 2926436, 2016/03/24 2016.

ANDERSON, D. A., 3rd; DUTERTRE, C. A.; GINHOUX, F.; MURPHY, K. M. Genetic models of human and mouse dendritic cell development and function. **Nat Rev Immunol**, Sep 9 2020.

ANSEL, K. M.; NGO, V. N.; HYMAN, P. L.; LUTHER, S. A. *et al.* A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. **Nature**, 406, n. 6793, p. 309-314, Jul 20 2000.

ANTONIALLI, R.; SULCZEWSKI, F. B.; AMORIM, K.; ALMEIDA, B. D. S. *et al.* CpG Oligodeoxinucleotides and Flagellin Modulate the Immune Response to Antigens Targeted to CD8alpha(+) and CD8alpha(-) Conventional Dendritic Cell Subsets. **Front Immunol**, 8, p. 1727, 2017.

APOSTOLICO, J. S.; LUNARDELLI, V. A. S.; YAMAMOTO, M. M.; CUNHA-NETO, E. *et al.* Poly(I:C) Potentiates T Cell Immunity to a Dendritic Cell Targeted HIV-Multiepitope Vaccine. **Front Immunol**, 10, p. 843, 2019.

ARDOUIN, L.; LUCHE, H.; CHELBI, R.; CARPENTIER, S. *et al.* Broad and Largely Concordant Molecular Changes Characterize Tolerogenic and Immunogenic Dendritic Cell Maturation in Thymus and Periphery. **Immunity**, 45, n. 2, p. 305-318, Aug 16 2016.

ATHIE-MORALES, V.; SMITS, H. H.; CANTRELL, D. A.; HILKENS, C. M. Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. **J Immunol**, 172, n. 1, p. 61-69, Jan 01 2004.

BELL, B. D.; KITAJIMA, M.; LARSON, R. P.; STOKLASEK, T. A. *et al.* The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses. **Nat Immunol**, 14, n. 4, p. 364-371, Apr 2013.

BONIFAZ, L.; BONNYAY, D.; MAHNKE, K.; RIVERA, M. *et al.* Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. **J Exp Med**, 196, n. 12, p. 1627-1638, Dec 16 2002.

BONIFAZ, L. C.; BONNYAY, D. P.; CHARALAMBOUS, A.; DARGUSTE, D. I. *et al.* In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. **J Exp Med**, 199, n. 6, p. 815-824, Mar 15 2004.

BOSCARDIN, S. B.; HAFALLA, J. C.; MASILAMANI, R. F.; KAMPHORST, A. O. *et al.* Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. **J Exp Med**, 203, n. 3, p. 599-606, Mar 20 2006.

BOSTEELS, C.; NEYT, K.; VANHEERSWYNGHELS, M.; VAN HELDEN, M. J. *et al.* Inflammatory Type 2 cDCs Acquire Features of cDC1s and Macrophages to Orchestrate Immunity to Respiratory Virus Infection. **Immunity**, 52, n. 6, p. 1039-1056 e1039, Jun 16 2020.

BOTTCHER, J. P.; BONAVITA, E.; CHAKRAVARTY, P.; BLEES, H. *et al.* NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. **Cell**, 172, n. 5, p. 1022-1037 e1014, Feb 22 2018.

BOURDELY, P.; ANSELMI, G.; VAIVODE, K.; RAMOS, R. N. *et al.* Transcriptional and Functional Analysis of CD1c(+) Human Dendritic Cells Identifies a CD163(+) Subset Priming CD8(+)CD103(+) T Cells. **Immunity**, Jun 30 2020.

BOUSOIK, E.; MONTAZERI ALIABADI, H. "Do We Know Jack" About JAK? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway. **Front Oncol**, 8, p. 287, 2018.

BREWITZ, A.; EICKHOFF, S.; DAHLING, S.; QUAST, T. *et al.* CD8(+) T Cells Orchestrate pDC-XCR1(+) Dendritic Cell Spatial and Functional Cooperativity to Optimize Priming. **Immunity**, 46, n. 2, p. 205-219, Feb 21 2017.

BRISENO, C. G.; SATPATHY, A. T.; DAVIDSON, J. T. t.; FERRIS, S. T. *et al.* Notch2-dependent DC2s mediate splenic germinal center responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 115, n. 42, p. 10726-10731, Oct 16 2018.

BROWN, C. C.; GUDJONSON, H.; PRITYKIN, Y.; DEEP, D. *et al.* Transcriptional Basis of Mouse and Human Dendritic Cell Heterogeneity. **Cell**, 179, n. 4, p. 846-863 e824, Oct 31 2019.

CABEZA-CABRERIZO, M.; CARDOSO, A.; MINUTTI, C. M.; PEREIRA DA COSTA, M. *et al.* Dendritic Cells Revisited. **Annu Rev Immunol**, Jan 22 2021.

CABEZA-CABRERIZO, M.; VAN BLIJSWIJK, J.; WIENERT, S.; HEIM, D. *et al.* Tissue clonality of dendritic cell subsets and emergency DCpoiesis revealed by multicolor fate mapping of DC progenitors. **Sci Immunol**, 4, n. 33, Mar 1 2019.

CALABRO, S.; GALLMAN, A.; GOWTHAMAN, U.; LIU, D. *et al.* Bridging channel dendritic cells induce immunity to transfused red blood cells. **J Exp Med**, 213, n. 6, p. 887-896, May 30 2016.

CALABRO, S.; LIU, D.; GALLMAN, A.; NASCIMENTO, M. S. *et al.* Differential Intrasplenic Migration of Dendritic Cell Subsets Tailors Adaptive Immunity. **Cell Rep**, 16, n. 9, p. 2472-2485, Aug 30 2016.

CARPENTIER, S.; VU MANH, T. P.; CHELBI, R.; HENRI, S. *et al.* Comparative genomics analysis of mononuclear phagocyte subsets confirms homology between lymphoid tissue-resident and dermal XCR1(+) DCs in mouse and human and distinguishes them from Langerhans cells. **J Immunol Methods**, 432, p. 35-49, May 2016.

CHAPPELL, C. P.; DRAVES, K. E.; GILTIAY, N. V.; CLARK, E. A. Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell-dependent antibody responses. **J Exp Med**, 209, n. 10, p. 1825-1840, Sep 24 2012.

CHENG, F.; WANG, H. W.; CUENCA, A.; HUANG, M. *et al.* A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. **Immunity**, 19, n. 3, p. 425-436, Sep 2003.

CHOI, Y. S.; KAGEYAMA, R.; ETO, D.; ESCOBAR, T. C. *et al.* ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. **Immunity**, 34, n. 6, p. 932-946, Jun 24 2011.

CROTTY, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). **Annu Rev Immunol**, 29, p. 621-663, 2011.

DE GIOVANNI, M.; CUTILLO, V.; GILADI, A.; SALA, E. *et al.* Spatiotemporal regulation of type I interferon expression determines the antiviral polarization of CD4(+) T cells. **Nat Immunol**, 21, n. 3, p. 321-330, Mar 2020.

DEL GUERCIO, M. F.; ALEXANDER, J.; KUBO, R. T.; ARRHENIUS, T. *et al.* Potent immunogenic short linear peptide constructs composed of B cell epitopes and Pan DR T helper epitopes (PADRE) for antibody responses in vivo. **Vaccine**, 15, n. 4, p. 441-448, Mar 1997.

DICKENSHEETS, H.; VAZQUEZ, N.; SHEIKH, F.; GINGRAS, S. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-1 is an IL-4-inducible gene in macrophages and feedback inhibits IL-4 signaling. **Genes Immun**, 8, n. 1, p. 21-27, Jan 2007.

DO, Y.; KOH, H.; PARK, C. G.; DUDZIAK, D. *et al.* Targeting of LcrV virulence protein from Yersinia pestis to dendritic cells protects mice against pneumonic plague. **Eur J Immunol**, 40, n. 10, p. 2791-2796, Oct 2010.

DODINGTON, D. W.; DESAI, H. R.; WOO, M. JAK/STAT - Emerging Players in Metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, 29, n. 1, p. 55-65, Jan 2018.

DUDZIAK, D.; KAMPHORST, A. O.; HEIDKAMP, G. F.; BUCHHOLZ, V. R. *et al.* Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. **Science**, 315, n. 5808, p. 107-111, Jan 5 2007.

DUTERTRE, C. A.; BECHT, E.; IRAC, S. E.; KHALILNEZHAD, A. *et al.* Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. **Immunity**, 51, n. 3, p. 573-589 e578, Sep 17 2019.

EDWARDS, A. D.; DIEBOLD, S. S.; SLACK, E. M.; TOMIZAWA, H. *et al.* Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. **Eur J Immunol**, 33, n. 4, p. 827-833, Apr 2003.

EISENBARTH, S. C. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. **Nat Rev Immunol**, 19, n. 2, p. 89-103, Feb 2019.

EMBGENBROICH, M.; BURGDORF, S. Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. **Front Immunol**, 9, p. 1643, 2018.

FINKELMAN, F. D.; LEES, A.; BIRNBAUM, R.; GAUSE, W. C. *et al.* Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. **J Immunol**, 157, n. 4, p. 1406-1414, Aug 15 1996.

FOGG, D. K.; SIBON, C.; MILED, C.; JUNG, S. *et al.* A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. **Science**, 311, n. 5757, p. 83-87, Jan 6 2006.

FU, C.; JIANG, L.; HAO, S.; LIU, Z. *et al.* Activation of the IL-4/STAT6 Signaling Pathway Promotes Lung Cancer Progression by Increasing M2 Myeloid Cells. **Front Immunol**, 10, p. 2638, 2019.

GHORESCHI, K.; LAURENCE, A.; O'SHEA, J. J. Janus kinases in immune cell signaling. **Immunol Rev**, 228, n. 1, p. 273-287, Mar 2009.

GOENKA, S.; KAPLAN, M. H. Transcriptional regulation by STAT6. **Immunol Res**, 50, n. 1, p. 87-96, May 2011.

GONZALEZ, D. G.; COTE, C. M.; PATEL, J. R.; SMITH, C. B. *et al.* Nonredundant Roles of IL-21 and IL-4 in the Phased Initiation of Germinal Center B Cells and Subsequent Self-Renewal Transitions. **J Immunol**, 201, n. 12, p. 3569-3579, Dec 15 2018.

GOUGH, D. J.; CORLETT, A.; SCHLESSINGER, K.; WEGRZYN, J. *et al.* Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. **Science**, 324, n. 5935, p. 1713-1716, Jun 26 2009.

GRETER, M.; HELFT, J.; CHOW, A.; HASHIMOTO, D. *et al.* GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. **Immunity**, 36, n. 6, p. 1031-1046, Jun 29 2012.

GUILLIAMS, M.; DUTERTRE, C. A.; SCOTT, C. L.; MCGOVERN, N. *et al.* Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. **Immunity**, 45, n. 3, p. 669-684, Sep 20 2016.

GUILLIAMS, M.; GINHOUX, F.; JAKUBZICK, C.; NAIK, S. H. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. **Nat Rev Immunol**, 14, n. 8, p. 571-578, Aug 2014.

HARPUR, C. M.; KATO, Y.; DEWI, S. T.; STANKOVIC, S. *et al.* Classical Type 1 Dendritic Cells Dominate Priming of Th1 Responses to Herpes Simplex Virus Type 1 Skin Infection. **J Immunol**, 202, n. 3, p. 653-663, Feb 1 2019.

HARRISON, D. A. The Jak/STAT pathway. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 4, n. 3, Mar 1 2012.

HAWIGER, D.; INABA, K.; DORSETT, Y.; GUO, M. *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. **J Exp Med**, 194, n. 6, p. 769-779, Sep 17 2001.

HEIDKAMP, G. F.; SANDER, J.; LEHMANN, C. H. K.; HEGER, L. *et al.* Human lymphoid organ dendritic cell identity is predominantly dictated by ontogeny, not tissue microenvironment. **Sci Immunol**, 1, n. 6, Dec 16 2016.

HELFT, J.; BOTTCHER, J.; CHAKRAVARTY, P.; ZELENAY, S. *et al.* GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. **Immunity**, 42, n. 6, p. 1197-1211, Jun 16 2015.

HENRIQUES, H. R.; RAMPAZO, E. V.; GONCALVES, A. J.; VICENTIN, E. C. *et al.* Targeting the non-structural protein 1 from dengue virus to a dendritic cell population confers protective immunity to lethal virus challenge. **PLoS Negl Trop Dis**, 7, n. 7, p. e2330, 2013.

HETTINGER, J.; RICHARDS, D. M.; HANSSON, J.; BARRA, M. M. *et al.* Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. **Nat Immunol**, 14, n. 8, p. 821-830, Aug 2013.

HILDNER, K.; EDELSON, B. T.; PURTHA, W. E.; DIAMOND, M. *et al.* Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. **Science**, 322, n. 5904, p. 1097-1100, Nov 14 2008.

HILLIGAN, K. L.; RONCHESE, F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. **Cell Mol Immunol**, 17, n. 6, p. 587-599, Jun 2020.

HILLMER, E. J.; ZHANG, H.; LI, H. S.; WATOWICH, S. S. STAT3 signaling in immunity. **Cytokine Growth Factor Rev**, 31, p. 1-15, Oct 2016.

HOU, J.; SCHINDLER, U.; HENZEL, W. J.; HO, T. C. *et al.* An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. **Science**, 265, n. 5179, p. 1701-1706, Sep 16 1994.

HUANG, G.; YAN, H.; YE, S.; TONG, C. *et al.* STAT3 phosphorylation at tyrosine 705 and serine 727 differentially regulates mouse ESC fates. **Stem Cells**, 32, n. 5, p. 1149-1160, May 2014.

IDOYAGA, J.; LUBKIN, A.; FIORESE, C.; LAHOUD, M. H. *et al.* Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 6, p. 2384-2389, Feb 8 2011.

INABA, K.; INABA, M.; ROMANI, N.; AYA, H. *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **J Exp Med**, 176, n. 6, p. 1693-1702, Dec 1 1992.

IYODA, T.; SHIMOYAMA, S.; LIU, K.; OMATSU, Y. *et al.* The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. **J Exp Med**, 195, n. 10, p. 1289-1302, May 20 2002.

KAPLAN, M. H.; SCHINDLER, U.; SMILEY, S. T.; GRUSBY, M. J. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. **Immunity**, 4, n. 3, p. 313-319, Mar 1996.

KASHIWADA, M.; PHAM, N. L.; PEWE, L. L.; HARTY, J. T. *et al.* NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8alpha(+) dendritic cell development. **Blood**, 117, n. 23, p. 6193-6197, Jun 9 2011.

KEARNEY, C. J.; RANDALL, K. L.; OLIARO, J. DOCK8 regulates signal transduction events to control immunity. **Cell Mol Immunol**, 14, n. 5, p. 406-411, May 2017.

KELES, S.; CHARBONNIER, L. M.; KABALEESWARAN, V.; REISLI, I. *et al.* Dedicator of cytokinesis 8 regulates signal transducer and activator of transcription 3 activation and promotes TH17 cell differentiation. **J Allergy Clin Immunol**, 138, n. 5, p. 1384-1394 e1382, Nov 2016.

KIMURA, A.; RIEGER, M. A.; SIMONE, J. M.; CHEN, W. *et al.* The transcription factors STAT5A/B regulate GM-CSF-mediated granulopoiesis. **Blood**, 114, n. 21, p. 4721-4728, Nov 19 2009.

KISSELEVA, T.; BHATTACHARYA, S.; BRAUNSTEIN, J.; SCHINDLER, C. W. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. **Gene**, 285, n. 1-2, p. 1-24, Feb 20 2002.

KITAMURA, H.; KAMON, H.; SAWA, S.; PARK, S. J. *et al.* IL-6-STAT3 controls intracellular MHC class II alphabeta dimer level through cathepsin S activity in dendritic cells. **Immunity**, 23, n. 5, p. 491-502, Nov 2005.

KREBS, D. L.; HILTON, D. J. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. **Stem Cells**, 19, n. 5, p. 378-387, 2001.

KRISHNASWAMY, J. K.; GOWTHAMAN, U.; ZHANG, B.; MATTSSON, J. *et al.* Migratory CD11b(+) conventional dendritic cells induce T follicular helper cell-dependent antibody responses. **Sci Immunol**, 2, n. 18, Dec 1 2017.

LAOUAR, Y.; WELTE, T.; FU, X. Y.; FLAVELL, R. A. STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. **Immunity**, 19, n. 6, p. 903-912, Dec 2003.

LEE, S.; SHAN, J.; ALDOSSARY, H.; GAUDREAULT, V. *et al.* STAT6 inhibitory peptide reduces dendritic cell migration to the lymph nodes to control Th2 adaptive immunity in the mouse lung. **Eur J Immunol**, 49, n. 1, p. 157-169, Jan 2019.

LEON, B.; BALLESTEROS-TATO, A.; BROWNING, J. L.; DUNN, R. *et al.* Regulation of T(H)2 development by CXCR5+ dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells. **Nat Immunol**, 13, n. 7, p. 681-690, May 27 2012.

LEWIS, K. L.; CATON, M. L.; BOGUNOVIC, M.; GRETER, M. *et al.* Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. **Immunity**, 35, n. 5, p. 780-791, Nov 23 2011.

LEWIS, S. M.; WILLIAMS, A.; EISENBARTH, S. C. Structure and function of the immune system in the spleen. **Sci Immunol**, 4, n. 33, Mar 1 2019.

LEYLEK, R.; ALCANTARA-HERNANDEZ, M.; GRANJA, J. M.; CHAVEZ, M. *et al.* Chromatin Landscape Underpinning Human Dendritic Cell Heterogeneity. **Cell Rep**, 32, n. 12, p. 108180, Sep 22 2020.

LEYLEK, R.; ALCANTARA-HERNANDEZ, M.; LANZAR, Z.; LUDTKE, A. *et al.* Integrated Cross-Species Analysis Identifies a Conserved Transitional Dendritic Cell Population. **Cell Rep**, 29, n. 11, p. 3736-3750 e3738, Dec 10 2019.

LEYLEK, R.; IDOYAGA, J. The versatile plasmacytoid dendritic cell: Function, heterogeneity, and plasticity. **Int Rev Cell Mol Biol**, 349, p. 177-211, 2019.

LI, J.; LU, E.; YI, T.; CYSTER, J. G. EBI2 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2-quenching dendritic cells. **Nature**, 533, n. 7601, p. 110-114, May 5 2016.

LI, R.; FANG, F.; JIANG, M.; WANG, C. *et al.* STAT3 and NF-kappaB are Simultaneously Suppressed in Dendritic Cells in Lung Cancer. **Sci Rep**, 7, p. 45395, Mar 28 2017.

LIN, J. X.; MIGONE, T. S.; TSANG, M.; FRIEDMANN, M. *et al.* The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. **Immunity**, 2, n. 4, p. 331-339, Apr 1995.

LIU, J.; ZHANG, X.; CHEN, K.; CHENG, Y. *et al.* CCR7 Chemokine Receptor-Inducible lnc-Dpf3 Restrains Dendritic Cell Migration by Inhibiting HIF-1alpha-Mediated Glycolysis. **Immunity**, 50, n. 3, p. 600-615 e615, Mar 19 2019.

LIU, K.; VICTORA, G. D.; SCHWICKERT, T. A.; GUERMONPREZ, P. *et al.* In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. **Science**, 324, n. 5925, p. 392-397, Apr 17 2009.

LONGHI, M. P.; TRUMPFHELLER, C.; IDOYAGA, J.; CASKEY, M. *et al.* Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. **J Exp Med**, 206, n. 7, p. 1589-1602, Jul 6 2009.

LU, E.; DANG, E. V.; MCDONALD, J. G.; CYSTER, J. G. Distinct oxysterol requirements for positioning naive and activated dendritic cells in the spleen. **Sci Immunol**, 2, n. 10, Apr 7 2017.

LUNZ, J. G., 3rd; SPECHT, S. M.; MURASE, N.; ISSE, K. *et al.* Gut-derived commensal bacterial products inhibit liver dendritic cell maturation by stimulating hepatic interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 activity. **Hepatology**, 46, n. 6, p. 1946-1959, Dec 2007.

LUTTICKEN, C.; WEGENKA, U. M.; YUAN, J.; BUSCHMANN, J. *et al.* Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. **Science**, 263, n. 5143, p. 89-92, Jan 7 1994.

MAIER, B.; LEADER, A. M.; CHEN, S. T.; TUNG, N. *et al.* A conserved dendritic-cell regulatory program limits antitumour immunity. **Nature**, 580, n. 7802, p. 257-262, Apr 2020.

MARTINEZ-LOPEZ, M.; IBORRA, S.; CONDE-GARROSA, R.; SANCHO, D. Batf3-dependent CD103+ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against Leishmania major infection in mice. **Eur J Immunol**, 45, n. 1, p. 119-129, Jan 2015.

MCKENNA, H. J.; STOCKING, K. L.; MILLER, R. E.; BRASEL, K. *et al.* Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. **Blood**, 95, n. 11, p. 3489-3497, Jun 1 2000.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nat Rev Immunol**, 5, n. 8, p. 606-616, Aug 2005.

MELILLO, J. A.; SONG, L.; BHAGAT, G.; BLAZQUEZ, A. B. *et al.* Dendritic cell (DC)-specific targeting reveals Stat3 as a negative regulator of DC function. **J Immunol**, 184, n. 5, p. 2638-2645, Mar 1 2010.

MELLER, N.; MERLOT, S.; GUDA, C. CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. **J Cell Sci**, 118, n. Pt 21, p. 4937-4946, Nov 1 2005.

MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, 106, n. 3, p. 255-258, Aug 10 2001.

MERAD, M.; SATHE, P.; HELFT, J.; MILLER, J. *et al.* The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. **Annu Rev Immunol**, 31, p. 563-604, 2013.

MINTY, A.; CHALON, P.; DEROCQ, J. M.; DUMONT, X. *et al.* Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. **Nature**, 362, n. 6417, p. 248-250, Mar 18 1993.

MURRAY, P. J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. **J Immunol**, 178, n. 5, p. 2623-2629, Mar 01 2007.

MUSUMECI, A.; LUTZ, K.; WINHEIM, E.; KRUG, A. B. What Makes a pDC: Recent Advances in Understanding Plasmacytoid DC Development and Heterogeneity. **Front Immunol**, 10, p. 1222, 2019.

NAIK, S. H.; SATHE, P.; PARK, H. Y.; METCALF, D. *et al.* Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. **Nat Immunol**, 8, n. 11, p. 1217-1226, Nov 2007.

NEFEDOVA, Y.; CHENG, P.; GILKES, D.; BLASKOVICH, M. *et al.* Activation of dendritic cells via inhibition of Jak2/STAT3 signaling. **J Immunol**, 175, n. 7, p. 4338-4346, Oct 1 2005.

NEFEDOVA, Y.; HUANG, M.; KUSMARTSEV, S.; BHATTACHARYA, R. *et al.* Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. **J Immunol**, 172, n. 1, p. 464-474, Jan 1 2004.

NEFEDOVA, Y.; NAGARAJ, S.; ROSENBAUER, A.; MURO-CACHO, C. *et al.* Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. **Cancer Res**, 65, n. 20, p. 9525-9535, Oct 15 2005.

NG, D. C.; LIN, B. H.; LIM, C. P.; HUANG, G. *et al.* Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin. **J Cell Biol**, 172, n. 2, p. 245-257, Jan 16 2006.

NISO-SANTANO, M.; SHEN, S.; ADJEMIAN, S.; MALIK, S. A. *et al.* Direct interaction between STAT3 and EIF2AK2 controls fatty acid-induced autophagy. **Autophagy**, 9, n. 3, p. 415-417, Mar 2013.

NUSSENZWEIG, M. C.; STEINMAN, R. M.; GUTCHINOV, B.; COHN, Z. A. Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. **J Exp Med**, 152, n. 4, p. 1070-1084, Oct 1 1980.

NUSSENZWEIG, M. C.; STEINMAN, R. M.; WITMER, M. D.; GUTCHINOV, B. A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 79, n. 1, p. 161-165, Jan 1982.

O'SHEA, J. J.; PLENGE, R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. **Immunity**, 36, n. 4, p. 542-550, Apr 20 2012.

ONAI, N.; OBATA-ONAI, A.; SCHMID, M. A.; OHTEKI, T. *et al.* Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. **Nat Immunol**, 8, n. 11, p. 1207-1216, Nov 2007.

PARK, S. J.; NAKAGAWA, T.; KITAMURA, H.; ATSUMI, T. *et al.* IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. **J Immunol**, 173, n. 6, p. 3844-3854, Sep 15 2004.

PATENTE, T. A.; PINHO, M. P.; OLIVEIRA, A. A.; EVANGELISTA, G. C. M. *et al.* Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. **Front Immunol**, 9, p. 3176, 2018.

PERSSON, E. K.; URONEN-HANSSON, H.; SEMMRICH, M.; RIVOLLIER, A. *et al.* IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. **Immunity**, 38, n. 5, p. 958-969, May 23 2013.

RAMPAZO, E. V.; AMORIM, K. N.; YAMAMOTO, M. M.; PANATIERI, R. H. *et al.* Antigen targeting to dendritic cells allows the identification of a CD4 T-cell epitope within an immunodominant Trypanosoma cruzi antigen. **PLoS One**, 10, n. 2, p. e0117778, 2015.

RAWLINGS, J. S.; ROSLER, K. M.; HARRISON, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. **J Cell Sci**, 117, n. Pt 8, p. 1281-1283, Mar 15 2004.

ROSA, D. S.; TZELEPIS, F.; CUNHA, M. G.; SOARES, I. S. *et al.* The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. **Immunol Lett**, 92, n. 3, p. 259-268, Apr 15 2004.

RYAN, J. J.; MCREYNOLDS, L. J.; KEEGAN, A.; WANG, L. H. *et al.* Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor. **Immunity**, 4, n. 2, p. 123-132, Feb 1996.

SATHE, P.; METCALF, D.; VREMEC, D.; NAIK, S. H. *et al.* Lymphoid tissue and plasmacytoid dendritic cells and macrophages do not share a common macrophage-dendritic cell-restricted progenitor. **Immunity**, 41, n. 1, p. 104-115, Jul 17 2014.

SATO, T.; SAITO, R.; JINUSHI, T.; TSUJI, T. *et al.* IFN-gamma-induced SOCS-1 regulates STAT6-dependent eotaxin production triggered by IL-4 and TNF-alpha. **Biochem Biophys Res Commun**, 314, n. 2, p. 468-475, Feb 6 2004.

SCHLITZER, A.; MCGOVERN, N.; TEO, P.; ZELANTE, T. *et al.* IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. **Immunity**, 38, n. 5, p. 970-983, May 23 2013.

SCHLITZER, A.; SIVAKAMASUNDARI, V.; CHEN, J.; SUMATOH, H. R. *et al.* Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. **Nat Immunol**, 16, n. 7, p. 718-728, Jul 2015.

SEE, P.; DUTERTRE, C. A.; CHEN, J.; GUNTHER, P. *et al.* Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. **Science**, 356, n. 6342, Jun 9 2017.

SHEN, S.; NISO-SANTANO, M.; ADJEMIAN, S.; TAKEHARA, T. *et al.* Cytoplasmic STAT3 represses autophagy by inhibiting PKR activity. **Mol Cell**, 48, n. 5, p. 667-680, Dec 14 2012.

SHIN, C.; HAN, J. A.; CHOI, B.; CHO, Y. K. *et al.* Intrinsic features of the CD8alpha(-) dendritic cell subset in inducing functional T follicular helper cells. **Immunol Lett**, 172, p. 21-28, Apr 2016.

SHIN, C.; HAN, J. A.; KOH, H.; CHOI, B. *et al.* CD8alpha(-) Dendritic Cells Induce Antigen-Specific T Follicular Helper Cells Generating Efficient Humoral Immune Responses. **Cell Rep**, 11, n. 12, p. 1929-1940, Jun 30 2015.

SHIRAKAWA, T.; KAWAZOE, Y.; TSUJIKAWA, T.; JUNG, D. *et al.* Deactivation of STAT6 through serine 707 phosphorylation by JNK. **J Biol Chem**, 286, n. 5, p. 4003-4010, Feb 4 2011.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat Rev Immunol**, 2, n. 3, p. 151-161, Mar 2002.

SHORTMAN, K.; NAIK, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. **Nat Rev Immunol**, 7, n. 1, p. 19-30, Jan 2007.

SICHIEN, D.; SCOTT, C. L.; MARTENS, L.; VANDERKERKEN, M. *et al.* IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively. **Immunity**, 45, n. 3, p. 626-640, Sep 20 2016.

SIEMASKO, K.; CHONG, A. S.; JACK, H. M.; GONG, H. *et al.* Inhibition of JAK3 and STAT6 tyrosine phosphorylation by the immunosuppressive drug leflunomide leads to a block in IgG1 production. **J Immunol**, 160, n. 4, p. 1581-1588, Feb 15 1998.

SOARES, H.; WAECHTER, H.; GLAICHENHAUS, N.; MOUGNEAU, E. *et al.* A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. **J Exp Med**, 204, n. 5, p. 1095-1106, May 14 2007.

STANDKE, G. J.; MEIER, V. S.; GRONER, B. Mammary gland factor activated by prolactin on mammary epithelial cells and acute-phase response factor activated by interleukin-6 in liver cells share DNA binding and transactivation potential. **Mol Endocrinol**, 8, n. 4, p. 469-477, Apr 1994.

STEINMAN, R. M. Dendritic cells: understanding immunogenicity. **Eur J Immunol**, 37 Suppl 1, p. S53-60, Nov 2007.

STEINMAN, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **Annu Rev Immunol**, 30, p. 1-22, 2012.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J Exp Med**, 137, n. 5, p. 1142-1162, May 1 1973.

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**, 75, n. 10, p. 5132-5136, Oct 1978.

STRIOGA, M.; SCHIJNS, V.; POWELL, D. J., Jr.; PASUKONIENE, V. *et al.* Dendritic cells and their role in tumor immunosurveillance. **Innate Immun**, 19, n. 1, p. 98-111, Feb 2013.

SULCZEWSKI, F. B.; MARTINO, L. A.; ALMEIDA, B. D. S.; ZANETI, A. B. *et al.* Conventional type 1 dendritic cells induce TH 1, TH 1-like follicular helper T cells and regulatory T cells after antigen boost via DEC205 receptor. **Eur J Immunol**, Jul 16 2020.

SZANTO, A.; BALINT, B. L.; NAGY, Z. S.; BARTA, E. *et al.* STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPARgamma-regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. **Immunity**, 33, n. 5, p. 699-712, Nov 24 2010.

THIEU, V. T.; YU, Q.; CHANG, H. C.; YEH, N. *et al.* Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. **Immunity**, 29, n. 5, p. 679-690, Nov 14 2008.

TRUMPFHELLER, C.; CASKEY, M.; NCHINDA, G.; LONGHI, M. P. *et al.* The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 7, p. 2574-2579, Feb 19 2008.

TURQUETI-NEVES, A.; OTTE, M.; PRAZERES DA COSTA, O.; HOPKEN, U. E. *et al.* B-cell-intrinsic STAT6 signaling controls germinal center formation. **Eur J Immunol**, 44, n. 7, p. 2130-2138, Jul 2014.

TUSSIWAND, R.; EVERTS, B.; GRAJALES-REYES, G. E.; KRETZER, N. M. *et al.* Klf4 expression in conventional dendritic cells is required for T helper 2 cell responses. **Immunity**, 42, n. 5, p. 916-928, May 19 2015.

VENTO-TORMO, R.; COMPANY, C.; RODRIGUEZ-UBREVA, J.; DE LA RICA, L. *et al.* IL-4 orchestrates STAT6-mediated DNA demethylation leading to dendritic cell differentiation. **Genome Biol**, 17, p. 4, Jan 13 2016.

VILLANI, A. C.; SATIJA, R.; REYNOLDS, G.; SARKIZOVA, S. *et al.* Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. **Science**, 356, n. 6335, Apr 21 2017.

WANG, T.; NIU, G.; KORTYLEWSKI, M.; BURDELYA, L. *et al.* Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. **Nat Med**, 10, n. 1, p. 48-54, Jan 2004.

WANG, Y.; MALABARBA, M. G.; NAGY, Z. S.; KIRKEN, R. A. Interleukin 4 regulates phosphorylation of serine 756 in the transactivation domain of Stat6. Roles for multiple phosphorylation sites and Stat6 function. **J Biol Chem**, 279, n. 24, p. 25196-25203, Jun 11 2004.

WEGENKA, U. M.; LUTTICKEN, C.; BUSCHMANN, J.; YUAN, J. *et al.* The interleukin-6-activated acute-phase response factor is antigenically and functionally related to members of the signal transducer and activator of transcription (STAT) family. **Mol Cell Biol**, 14, n. 5, p. 3186-3196, May 1994.

WILSON, D. W.; FOWKES, F. J.; GILSON, P. R.; ELLIOTT, S. R. *et al.* Quantifying the importance of MSP1-19 as a target of growth-inhibitory and protective antibodies against Plasmodium falciparum in humans. **PLoS One**, 6, n. 11, p. e27705, 2011.

WITTHUHN, B. A.; SILVENNOINEN, O.; MIURA, O.; LAI, K. S. *et al.* Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. **Nature**, 370, n. 6485, p. 153-157, Jul 14 1994.

YANG, J.; STARK, G. R. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. **Cell Res**, 18, n. 4, p. 443-451, Apr 2008.

YAO, Y.; LI, W.; KAPLAN, M. H.; CHANG, C. H. Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. **J Exp Med**, 201, n. 12, p. 1899-1903, Jun 20 2005.

YASUKAWA, H.; OHISHI, M.; MORI, H.; MURAKAMI, M. *et al.* IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. **Nat Immunol**, 4, n. 6, p. 551-556, Jun 2003.

YIN, X.; CHEN, S.; EISENBARTH, S. C. Dendritic Cell Regulation of T Helper Cells. **Annu Rev Immunol**, Mar 12 2021.

ZHONG, Z.; WEN, Z.; DARNELL, J. E., Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. **Science**, 264, n. 5155, p. 95-98, Apr 1 1994.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.