

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 13/09/2018.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Leonardo Teixeira Lopes de Medeiros**

**Perfil M1 na Doença de Chagas aguda em camundongo  
BALB/c**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Cilmery Suemi Kurokawa

**Botucatu**

Leonardo Teixeira Lopes de Medeiros

Perfil M1 na Doença de Chagas aguda em  
camundongo BALB/c

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Câmpus de Botucatu, para obtenção  
do título de Doutor em Doenças  
Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Cilmery Suemi Kurokawa

Botucatu

- 2016 -

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Medeiros, Leonardo Teixeira Lopes de.  
Perfil M1 na Doença de Chagas aguda em camundongo  
BALB/c / Leonardo Teixeira Lopes de Medeiros. - Botucatu,  
2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de  
Botucatu

Orientador: Cilmary Suemi Kurokawa  
Capes: 21104000

1. Chagas, Doença de. 2. Citocinas. 3. Macrófagos.  
4. Trypanosoma cruzi. 5. Camundongo como animal de  
laboratório.

Palavras-chave: Citocinas; Doença de Chagas; Macrófagos;  
Trypanosoma cruzi.

**Trabalho realizado nos laboratórios do Departamento de Doenças  
Tropicais e Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp.**

## **Dedicatória**

A Deus, que sempre me fortalece em todos os meus momentos de fraqueza, tornando-me capaz de enfrentar todo e qualquer obstáculo. Agradeço ao meu Senhor que me ampara diante de minhas dificuldades e que sempre está presente em minha vida, guiando os meus passos e abençoando os meus caminhos. A Deus, que jamais me abandona nos meus momentos de trevas, dando-me consolo e proteção.

À minha família que, apesar da distância física, sempre esteve presente em telefonemas diários, dando-me muita força e incentivo em meu doutorado. Palavras não são suficientes para descrever o amor imenso que tenho pelos meus pais, Milton e Sônia, e pela minha irmã Lívia, os quais foram fundamentais para minha formação. Eu nada seria sem a participação ativa deles ao longo da minha vida, que tanto amor e atenção me dedicam, que tamanha confiança depositam em mim.

Aos meus avós João e Maria José que, juntamente com meus pais, foram essenciais para minha educação, nas quais através de suas experiências de longa vivência me mostram o sentido e a beleza da vida a cada dia que passa.

À minha esposa Janaína pelo total apoio que me dá em todas as horas da minha vida, pela compreensão e paciência que teve comigo ao me acompanhar constantemente na execução de todo este trabalho, mostrando o quão forte é o amor que sentimos um pelo outro, o quanto o destino foi generoso quando nossos caminhos se cruzaram para a plena felicidade.

## **Agradecimentos**

Agradeço os amigos e colegas do Laboratório de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Sou grato a toda equipe de técnicos e alunos de aprimoramento que se mostraram sempre prontos a me ajudar de maneira eficaz. Sou grato ao curso de Pós-Graduação que fez o possível para a execução deste trabalho, possibilitando o esclarecimento de diversos aspectos dentro desta pesquisa.

Agradeço a Pós-doutoranda Graziela Gorete Romagnoli e Professor Ramon Kaneno pela execução das análises por citometria de fluxo.

## SUMÁRIO

<b>ARTIGO DE REVISÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUÇÃO: a polarização de macrófagos</b> .....	<b>10</b>
<i>Trypanossoma cruzi</i> e macrófagos M1 e M2.....	<b>15</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>20</b>
<b>ARTIGO ORIGINAL</b> .....	<b>25</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>25</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>26</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
2.1. Objetivo geral.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
3.1. Animais.....	34
3.2. Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e manutenção.....	34
3.3. Infecção e definição dos tempos.....	34
3.3.1. Avaliação do perfil M1 na fase inicial da infecção pela cepa Y.....	35
3.3.2. Avaliação do perfil M1 entre cepas.....	35
3.4. Eutanásia e coleta de material biológico.....	35
3.5. Obtenção de macrófagos peritoneais para determinação do perfil M1.....	36
3.6. Determinação dos receptores de superfície.....	36
3.7. Quantificação de receptores de superfície por PCR em tempo real.....	36
3.7.1 - Extração de RNA total.....	36
3.7.2. Purificação do RNA por centrifugação.....	37
3.7.3 . Obtenção do cDNA.....	38
3.7.4. PCR em tempo real.....	38
3.8. Histologia do tecido cardíaco.....	38
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
4.1. Parâmetros indicativos de eficácia da infecção.....	39
4.2. Avaliação de marcadores de superfície para M1 entre os tempos da Infecção.....	42
4.2. 1. Quantificação de mRNA para os marcadores, TLR2, TLR4 e CD64.....	43
4.2.2. Determinação dos marcadores TLR2, TLR4 e CD64 por citometria de	



fluxo.....	45
4.3. Expressão de marcadores de superfície para M1 entre as cepas Y e JLP.....	54
4.3.1. Quantificação de mRNA para os marcadores, TLR2, TLR4 e CD64.....	54
4.3.2. Determinação dos marcadores TLR2, TLR4 e CD64 por citometria de fluxo em macrófagos CD14+.....	56
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO 1 - Citometria de Fluxo.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO 2 – Comprovantes de submissão de trabalho para publicação.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO 3 - Aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB.....</b>	<b>74</b>

*ARTIGO DE REVISÃO*

## Macrófagos M1 e M2 na infecção por *Trypanosoma cruzi*

Leonardo Teixeira Lopes de Medeiros<sup>1,2</sup>, Cilmary Suemi Kurokawa<sup>1,2</sup>, Maria Rita Parise Fortes<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), São Paulo, Brasil. <sup>2</sup>Programa em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), São Paulo, Brasil. <sup>3</sup>Departamento de Dermatologia e Radioterapia, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), São Paulo, Brasil.

### RESUMO

Compreender a função dos macrófagos na fisiopatologia da Doença de Chagas é ainda um desafio. Os macrófagos, células da resposta imune inata, são importantes no controle da Doença de Chagas (DC). Estas células apresentam a capacidade de alternar o seu fenótipo para perfil inflamatório e anti-inflamatório dependendo do microambiente e da interação com o parasita ou microrganismo, resultando na secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Muitas destes mediadores são descritos na fase aguda e crônica da tripanossomíase; porém poucos relatos atribuem ou associam sua produção às subpopulações de macrófagos M1 e M2 na tripanossomíase e poucos estudos abordam o papel destas células na Doença de Chagas. Assim, esta revisão abordará alguns aspectos do papel dos macrófagos M1 e M2 na DC.

Descritores: Macrófagos, Doença de Chagas, citocina, *Trypanosoma cruzi*, Tripanossomíase americana.

### ABSTRACT

Understanding the function of macrophages in the pathophysiology of Chagas disease is still a challenge. The macrophage, cells of innate immune response are crucial for the control Chagas Disease (CD). These cells have the ability to switch their phenotype to inflammatory and anti-inflammatory profile depending on the microenvironment and interaction with the parasite or microorganism, resulting in secretion of pro and anti-inflammatory cytokines. Many of these mediators are described in acute and chronic trypanosomiasis; but few reports attribute or associate their production to

subpopulations of macrophages M1 and M2 in trypanosomiasis and few studies address the role of these cells in Chagas Disease. So this review will address some aspects of the role of M1 and M2 macrophages in CD

Keywords: Macrophages, Chagas Disease, cytokine, *Trypanosoma cruzi*, American trypanosomiasis

## INTRODUÇÃO

### A polarização de macrófagos

Macrófagos e suas citocinas são frequentemente citados em mecanismos de eliminação do *Trypanosoma cruzi*. Compreender sua função na fisiopatologia da Doença de Chagas ainda é um desafio. O fato destas células possuírem capacidade para apresentar perfis distintos com manifestação durante a interação parasita-hospedeiro e microambiente às deixam em evidência<sup>1</sup>. Estes perfis podem ser divididos em duas grandes subpopulações de macrófagos: macrófagos classicamente ativados ou M1 e macrófagos alternativamente ativados ou M2<sup>2</sup>. Os macrófagos M1 e M2 foram assim chamados por serem gerados através dos efeitos das citocinas do perfil Th1 ou Th2<sup>3</sup>. Os achados associados ao perfil M2 descrevem presença de receptores de manose após tratamento com interleucinas-4 (IL-4) e IL-13, concretizando o fenótipo de ativação alternativa<sup>4,5</sup>. Esta classificação corresponde a tipos distintos de estimulação, sendo a ativação com Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) correspondente aos macrófagos inflamatórios enquanto que macrófagos estimulados com IL-10 referem-se aos macrófagos alternativamente ativados<sup>6</sup>. O efeito da IL-13 na definição de ativação alternativa foi um dos últimos acréscimos no conceito, sua similaridade com o receptor para a IL-4 e indução de efeitos similares em macrófagos foram importantes para sua inclusão na definição<sup>7</sup>. A produção de IL-4/IL-13 pelo perfil Th2 pode estimular a diferenciação de macrófagos M2 residentes em tecido ou derivados de monócitos<sup>8</sup>.

Atualmente este conceito de subpopulações de macrófagos é empregado nas relações parasita hospedeiro, resposta imune a tumores e mecanismos de agressão sépticos ou assépticos<sup>9</sup>. Uma resposta pró-inflamatória, observada nas infecções contra parasitas e dependente de IFN-gama e macrófagos M1/M2 é essencial para o controle

da parasitemia, especialmente durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Estes achados são relatados em outras infecções por parasitas como, *Leishmania*, *Toxoplasma* e *Plasmodium*<sup>9,10</sup>.

À estas subpopulações de macrófagos são atribuídas a capacidade de adaptação ou plasticidade e aparentemente eliminação do microrganismo e regulação de situações de agressão ao hospedeiro. Esta plasticidade em assumir um perfil M1 ou M2 é influenciada de acordo com o microambiente no qual se encontram<sup>4,6</sup>. Por exemplo, produtos microbianos, como Lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas e IFN-gama geram um microambiente inflamatório capaz de polarizar os macrófagos para o perfil M1, os quais produzem altos níveis de fator de necrose tumoral (TNF), reativos intermediários de oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI) e óxido nítrico sintase-2 (NOS-2)<sup>2</sup>. Este perfil apresenta maior atividade microbicida e maior eficiência na apresentação de antígenos, devido a maior expressão de MHC classe II<sup>11</sup>. O aumento da atividade microbicida tem um importante papel na proteção contra patógenos intracelulares através do “burst” oxidativo. Esta ativação e aumento de mediadores oxidativos ocorrem através da liberação de óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$ , CXCL1-3, 5 e 8-10, CXCL16 e CX3CL1<sup>12</sup>. Além desta função microbicida direta, os macrófagos M1 reprimem a expressão do gene para ferroportina e indução da ferritina H, propiciando efeitos bacteriostáticos adicionais<sup>13</sup>.

Na vigência de um processo inflamatório ocorre também produção de citocinas anti-inflamatórias. O equilíbrio ou modulação de fatores anti-inflamatórios pelo hospedeiro decorre da necessidade de uma resposta reguladora para conter a inflamação, de modo a não gerar danos ao organismo<sup>14</sup>. Dessa maneira, o sistema imunológico controla a infecção e lesão tecidual sem gerar danos pelo excesso de mediadores inflamatórios. Esta inflamação excessiva é em parte contida através da inibição destes macrófagos M1 por citocinas do perfil Th2, favorecendo a polarização para M2 via IL-4, IL-10 e IL-13<sup>15</sup>.

Durante esta polarização dos macrófagos, mecanismos intracelulares são envolvidos, controlando as vias de produção de citocinas. Neste contexto estão as proteínas SOCS, atuantes no controle/supressão de produção de citocinas de perfil pró e anti-inflamatórias. As SOCS são ativadas por uma variedade de estímulos que causam supressão de M1 ou M2, incluindo as vias de produção de citocinas produzidas via NFkB, TLR e angiotensina II. Wilson (2014) descreve em sua revisão que “a via de

*sinalização mais estudada envolvendo SOCS é a ativação JAK/STAT."*  Oito membros de proteínas sinalizadoras de supressão de citocinas são descritas na literatura, CIS e SOCS-1 a 7, dentre estas as mais estudadas em macrófagos M1 e M2 são as proteínas SOCS 1 e SOCS 3. O perfil M1 expressa alta quantidade de SOCS3 e relação SOCS3/SOCS1 elevada, enquanto que o perfil M2 apresenta um alta expressão de SOCS1 em relação à SOCS3 ou seja baixa razão SOCS3/SOCS1. A proteína SOCS1 é responsável pela inibição da ativação dos macrófagos M1 pela inibição da via JAK2/STAT1 induzida por IFN-gama e inibição da via de sinalização de NF-kB via TLR(Wilson 2014). A SOCS1 controla a enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), aumentando sua atividade e conseqüentemente a produção de arginase I, expressa em macrófagos M2. Camundongos deficientes de SOCS1 apresentam níveis aumentados de IL-6, IL-12, MHC de classe II e óxido nítrico. De maneira similar, a SOCS2 limita a polarização para M1, descrito em camundongos *knockout* para SOCS2 que também exibe uma produção aumentada de IFN-gama, IL-1- beta e TNF- $\alpha$  em resposta ao LPS. Outros estudos têm descrito a SOCS2 como um inibidor de ativação de células dendríticas via TLR, reforçando o papel deste mediador na inibição de vias de ativação e produção de citocinas<sup>16,17</sup>.

Em contrapartida, o aumento da proteína SOCS3 polariza para o perfil M1 suprimindo o perfil M2. A maioria dos macrófagos ativados *in vivo* mostram forte regulação positiva de SOCS3 e a ausência desta proteína, tanto em macrófagos humanos como de roedores resulta em redução da capacidade pró-inflamatória de macrófagos, apresentando, ao invés disso, características imunorregulatórias, possivelmente com produção de citocinas e mediadores supressores ou ativação da via da ornitina para reparo tecidual.

Em estudos experimentais com *Toxoplasma gondii* demonstram que macrófagos e neutrófilos de camundongos deficientes de SOCS3 apresentaram diminuição da produção de IL-12 e menor tempo de sobrevivência. A SOCS3 regula positivamente TLR4 e ativação de macrófagos M1; possivelmente a SOCS3 bloqueia a enzima PI3K - inibidora de resposta pró-inflamatória via TLR<sup>16</sup>.

O fator transcricional STAT 6 é também fundamental para a polarização para o perfil M2. Este fator é ativado mediante as citocinas IL-4 e IL-13, favorecedoras da ativação do receptor nuclear PPAR $\gamma$  e PPAR $\delta$ , o qual tem sido demonstrado como potencializador da formação de macrófagos de perfil M2 a partir de monócitos de sangue periférico. Estas células alternativamente ativadas apresentam aumento da

expressão e atividade do gene Arginase-1, o qual converte L-arginina em L-ornitina que, por sua vez, favorece a síntese de prolina, promotora de reparo tecidual. Esta polarização M2 também é caracterizada por uma regulação positiva de lectina tipo C, receptor de manose, proteínas da família quitinase, moléculas semelhantes à resistina, todas contribuindo para a função imunorreguladora<sup>18,19</sup> destes macrófagos M2, os quais expressam várias moléculas de superfície, incluindo a Dectina-1, receptor de manose (MRC1/CD206), receptor “scavenger” A (CD204), receptor “scavenger” B-1, CD163, CCR2, CXCR1 e CXCR2. Macrófagos M2 também produzem citocinas e quimiocinas anti-inflamatórias, como IL-10, CCL1, CCL2, CCL17, CCL18, CCL22, CCL24 e IL-1Ra<sup>12</sup>.

O controle mais importante na regulação da polarização de macrófagos está em nível transcricional e vários mecanismos são considerados alvos de interesse de pesquisas nos últimos anos. Neste contexto o *Kruppel like factor 6* (KLF6) é sugerido como um controlador de polarização. A expressão de KLF6 é induzida por estímulo pró-inflamatório para polarização M1 (como LPS e IFN-gama) e suprimida por estímulo para a polarização M2 (como IL-4 e IL-13) em macrófagos humanos e murinos. Estudos sugerem ainda que KLF6 é necessário para otimizar a expressão de genes para perfil pró-inflamatório, agindo em um mecanismo sinérgico com NF- $\kappa$ B. Estas observações identificam o KLF6 como sendo um novo fator regulador transcricional de polarização de macrófagos, sendo que outros fatores desta família também são importantes; o KLF2 é um repressor de atividade pro-inflamatória e o KLF4, essencial na polarização de macrófagos M2 *in vitro* e *in vivo*<sup>20,21</sup>. Os KLFs participam na resolução inflamatória, apresentando funções imunorreguladoras e remodelação tecidual através da modelação da matriz extracelular associado com a expressão de proteína de matriz, como fibronectina,  $\beta$ IGH3 e uma alta expressão de arginase I<sup>5</sup>, de modo que os macrófagos ao mesmo tempo em que reparam processos lesivos também agem eficientemente nas respostas contra infecções<sup>22</sup>.

Outra subpopulação de linfócitos que pode afetar a funcionalidade dos macrófagos são os linfócitos T reguladores CD4+CD25+Foxp3+ (Treg). Estudos realizados em monócitos humanos cultivados na presença de células Tregs passaram a diferenciar estas células para macrófagos M2. Esta diferenciação foi associada com a produção de IL-10 por T reg com regulação positiva de STAT3 e SOCS3, um inibidor da via de sinalização de citocinas. Em camundongos imunodeficientes, a transferência de células Tregs singênicas na cavidade peritoneal polariza os macrófagos residentes

para o perfil M2<sup>11</sup>. Em humanos, estes macrófagos são caracterizados pela alta expressão dos receptores CD163, CD206, CCL18 e aumento da capacidade fagocítica, mas baixa expressão de HLA-DR e citocinas inflamatórias induzidas por LPS, como TNF- $\alpha$ , IL-1-beta, IL-6 e CCL3.

Macrófagos M2 podem ser ainda divididos em subtipos de acordo com seus perfis de quimiocinas. Os macrófagos M2a são estimulados pela IL-4 e IL-13, além de produzir CCL24, CCL22, CCL17 e CCL18, reconhecidos pelas CCR3, CCR4 e CCR8 e promovem recrutamento de eosinófilos e basófilos; os macrófagos M2b resultam da ativação com complexos imunes e agonistas de TLR, como LPS, produzindo CCL1. Os macrófagos M2c são polarizados pela citocina IL-10 produzindo CCL16 e 18, as quais recrutam eosinófilos e células T “naive”, respectivamente<sup>12</sup>(figura 1).

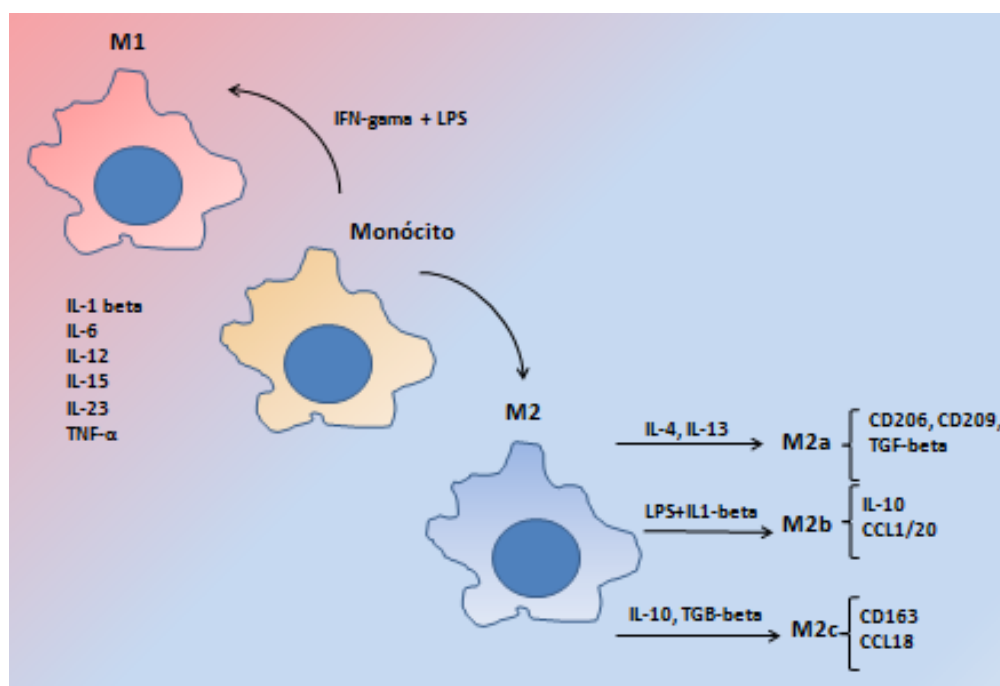


Figura1. Macrófagos M1 e subtipos de macrófagos M2<sup>23</sup>



Tabela 1. Subpopulações de macrófagos M1 e M2: marcadores de superfície, fatores de transcrição e estímulos.

Macrófago	Citocinas e mediadores	Marcador de Superfície	Fatores transcricionais	Estímulos
<b>M1</b>	IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$ , CXCL1-3, CXCL-5, CXCL-8-11, CXCL16 e CX3CL1, CCL2-5	CD86, TLR2, TLR4, CD16, CD32, CD36, CD38, CD64, CD69, CD97	JAK1, JAK2, STAT1, STAT2, NF-kB, AP-1, IRF1, IRF5 IRF8, EGR	Agonistas de TLR, IFN- $\gamma$ , LPS, GM-CSF
<b>M2</b>	IL-21, TGF- $\beta$ , CCL1,2,17,18,22,24, CXCL13, CCR2, CXCR1,2,4	Dectina-1, MRC1/CD206, CD204, CD16, receptor "scavenger" B-1, CD163, CD11c, Ym1, FIZZ1, proteínas MGL	STAT3, STAT6, IRF4, JAK1, JAK3, STAT6, KLF4, CISH, SOCS1	IL-4, IL-10, IL-13, M-CSF, vitamina D3, glicocorticóides

(Noel et al., 2004; Biswas et al., 2010; Martinez, 2014; Labonte et al., 2014; Gordon, 2010)

### Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

A transmissão de *T.cruzi* dá-se por contaminação das mucosas ou da pele com dejeções de triatomíneos infectados. A mucosa pode estar íntegra, mas a pele deve apresentar solução de continuidade, constituída muitas vezes pelo orifício da picada do inseto ou pela escarificação causada pelo próprio indivíduo ao coçar-se para que ocorra a penetração dos tripomastigotas, os quais penetram pelo local da picada e interagem com células do sistema mononuclear fagocitário da pele ou mucosa. A forma tripomastigota ao penetrar nos tecidos formam ninhos, compostos de grande quantidade da forma amastigota do parasito, os quais se multiplicam por divisão binária, promovendo doença principalmente no coração, intestino grosso e esôfago. Em seguida, ocorre diferenciação das formas amastigotas em tripomastigotas, liberados da célula hospedeira, caindo na corrente sanguínea. Os triatomíneos vetores se infectam ao ingerir as formas tripomastigotas presentes na corrente circulatória do hospedeiro vertebrado durante o hematofagismo. No estômago do inseto ocorre a transformação em formas arredondadas e epimastigotas; no intestino médio, as formas epimastigotas se multiplicam por divisão binária e no reto, as formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas infectantes para os vertebrados, eliminados nas fezes e urina dos triatomíneos vetores durante o repasto sanguíneo.

Transmissões excepcionais têm se tornado mais importante atualmente, como a transmissão congênita, por meio de transfusão de sangue ou doação de órgãos, ingestão de alimentos contaminados, como a cana-de-açúcar, acidentes laboratoriais e aleitamento materno, com presença de *T.cruzi* no leite. Outro mecanismo de transmissão refere-se ao transplante de órgãos, principalmente quando se considera o emprego de corticoides e outros medicamentos imunossupressores<sup>24,25</sup>.

### ***Trypanossoma cruzi* e macrófagos M1 e M2**

No início da Doença de Chagas, o *Trypanosoma cruzi* induz uma intensa resposta inflamatória, iniciando, em macrófagos, a produção de diversas citocinas, dentre elas a IL-12. Esta citocina é capaz de ativar células NK e induzir a produção de IFN-gama, essencial para fagocitose e *killig*. No início da infecção pelo *T. cruzi* ocorre um predomínio do perfil M1 e caminha no decorrer da infecção para o perfil M2. O IFN-gama produzido estimula os macrófagos resultando num feedback positivo para a produção de IL-12 e concomitante produção de TNF- $\alpha$  e NO, contribuindo para a eliminação do parasita. Após a fase aguda o perfil M1 parece decair e há predominância na síntese de citocinas regulatórias pelos macrófagos, como IL-10 e IL-4 oriunda do perfil Th2, alterando o microambiente para um perfil para macrófagos M2. A presença de M2 deve contribuir para a redução dos efeitos nocivos associados com a estimulação excessiva do sistema imunológico e inflamação no microambiente propiciada pelo perfil M1 durante a interação entre macrófagos e *T.cruzi*<sup>26</sup>.

A estimulação dos perfis depende da composição dos parasitas e diferentes cepas do *T.cruzi* apresentam padrões distintos de componentes de membrana. O glicosilfosfatidilinositol ancorado à mucina derivado de membrana celular da forma tripomastigota (tGPI) e derivado de epimastigota (eGPI) e um outro membro desta mesma molécula, o glicoinositolfosfolipídio GIPL atuam como agonistas de TLR. O tGPI é um dos principais componentes do *T.cruzi* e considerado como PAMPs, sendo encontrado na superfície da membrana celular do *T.cruzi* e identificado como um potente ativador de TLR2, molécula associada ao perfil M1. Outros membros da família GPI purificados da forma epimastigota, denominado de eGIPL é capaz de induzir a ativação via NF- $\kappa$ B e ligação com TLR4. De um modo geral, as estruturas das GIPLs apresentada pelo tripomastigota metacíclico e pela forma epimastigota são semelhantes; ambas contém a mesma sequência Man4-GlcN glicano e o mio-inositol fosfato-lipídio,

predominantemente formado pelo inositol-fosfoceramidas. Apesar desta semelhança na constituição destes GIPLs, estas estruturas podem mudar dependendo da cepa do *T.cruzi*. Algumas cepas podem apresentar ceramida em sua GIPL, enquanto que outras podem apresentar uma mistura de diidroceramida e alquilacilglicerol. Estas alterações propiciam padrões distintos de ativação e possivelmente maior ou menor eficiência na ativação de macrófagos M1 e morte do parasita<sup>26,27</sup>.

A composição lipídica variável dos diferentes GPIs determinam se o reconhecimento será mediado por TLR2 ou TLR4 (figura 2). Alguns estudos têm mostrado um aumento da funcionalidade do fagossomo em múltiplas etapas, incluindo o aumento da acidificação do vacúolo quando ocorre a ativação de TLR via MyD88 e produção de óxido nítrico, havendo dessa maneira um *killing* eficiente do parasita<sup>22,26</sup>.

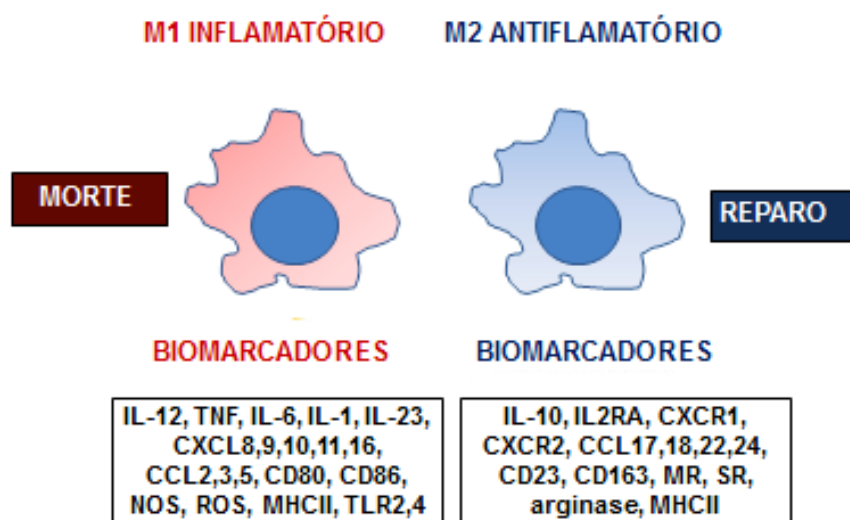


Figura 2. Macrófagos M1 e M2 e seus respectivos biomarcadores<sup>28</sup>

Outros componentes do *T.cruzi*, como DNA, podem interagir com TLR9 em macrófagos e células dendríticas, contribuindo com a produção e secreção de quimiocinas, responsáveis pela quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos para o local<sup>24</sup>. O DNA genômico do *T.cruzi*, rico em CpG desmetilado e RNA total, podem atuar como PAMP, promovendo ativação de células do hospedeiro via TLR9 e TLR7, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias associadas ao M1<sup>29</sup>.

Outras citocinas inflamatórias, como IL-18 e 12 também produzidas por M1 auxiliam na produção de IFN-gama. A deleção do gene da IL-18 em camundongos C57BL/6 knockout (IL-18 KO) sugere que a IL-18 associa-se à gravidade da cardiopatia

chagásica, ou seja, o comprometimento do coração na Doença de Chagas<sup>30</sup>. Quando o coração está comprometido, geralmente se apresenta aumentado de volume, em grau bastante variável, à custa de dilatação e hipertrofia<sup>25</sup>. Camundongos IL-18 KO infectados com a cepa Colombiana e Y apresentam maior sobrevida. Porém, a diminuição da expressão de iNOs e maior expressão de mRNA para TGF-beta em tecido cardíaco de camundongos, IL-18 KO foram observadas somente na infecção com a cepa colombiana<sup>30</sup>. A neutralização da IL-12 leva ao agravamento da infecção, acompanhada da redução de IFN-gama e NO por células do baço de camundongos infectados, mostrando a importância desta citocina no controle da infecção por *T.cruzi*, favorecendo a proliferação de células NK e de linfócitos T citotóxicos<sup>31</sup>.

Semelhantemente à IL-18 e membro da mesma família, a IL-1 é considerada um proeminente mediador inflamatório associado ao perfil M1. Esta citocina desempenha um importante papel na resistência do hospedeiro contra patógenos intracelulares. Apesar do perfil M1 ser importante na resistência do hospedeiro à infecção chagásica, ele também sustenta um processo inflamatório que pode gerar a lesão associada com a cardiopatia chagásica. Alguns genes relacionados à IL-1-beta têm demonstrado associação com esta lesão. O genótipo GG na posição +5810 do gene de IL-1-beta é mais frequente em indivíduos sintomáticos em comparação aos não sintomáticos<sup>32,33</sup>.

A IL-23 produzida pelo perfil M1 de macrófagos pode ter participação em infecções por patógenos extracelulares. Porém, alguns estudos têm demonstrado sua importância na Doença de Chagas, induzindo produção de IL-17 por linfócito Th17. Dados complementares do estudo *in vitro* revelaram que IL-17 prolonga a permanência do parasita no compartimento endossomal, levando à morte do mesmo<sup>34</sup>. Dessa maneira, a capacidade da IL-23 em induzir IL-17 pode ser um dos mecanismos utilizados para a eliminação do *T.cruzi*, reforçando a importância de macrófagos M1 na Doença de Chagas.

Entretanto, é essencial o equilíbrio destas citocinas pró-inflamatórias de perfil M1 com citocinas anti-inflamatórias do perfil M2. A IL-10, uma citocina inibidora da resposta inflamatória e produzida por M2, tem a capacidade de desativar ou suprimir monócitos e vários mediadores pró-inflamatórios de modo a inibir resultados adversos que resultam em lesão cardíaca, por exemplo<sup>17</sup>.

Outra citocina pertencente ao perfil M2 é o TGF-beta-1, a qual compõe um grupo de citocinas envolvidas na regulação e remodelação de tecidos, crescimento celular, diferenciação, angiogênese, regulação imune e fibrose. Todavia, diferentemente

da IL-10, TGF-beta-1 pode influenciar o desenvolvimento de doença cardíaca por promover a sobrevivência e invasão do parasita neste tecido. Além disso, o TGF-beta-1 é uma molécula capaz de gerar danos ao coração através da fibrose, hipertrofia do cardiomiócito e comprometimento do débito cardíaco no paciente chagásico<sup>35,36</sup>.

As citocinas pertencentes ao perfil M1 e M2 de macrófagos participam na progressão da Doença de Chagas e dos mecanismos de lesão cardíaca induzidos pelo *T. cruzi*. Apesar do melhor entendimento, avanço tecnológico e tratamento observado na monitoração de pacientes com DC, as morbidades permanecem elevadas, reforçando a necessidade de identificação de novos biomarcadores de lesão cardíaca (e outras) e suas gravidades, bem como esclarecer quais antígenos e moléculas do parasita se associam diretamente à patogênese da DC. Compreender as vias envolvidas na ativação e produção das citocinas inflamatórias envolvidas no início da infecção e inflamação cardíaca ou citocinas do perfil M2 associada à fibrose podem propiciar novas maneiras de tratamento e monitorização da Doença de Chagas (figura 3).

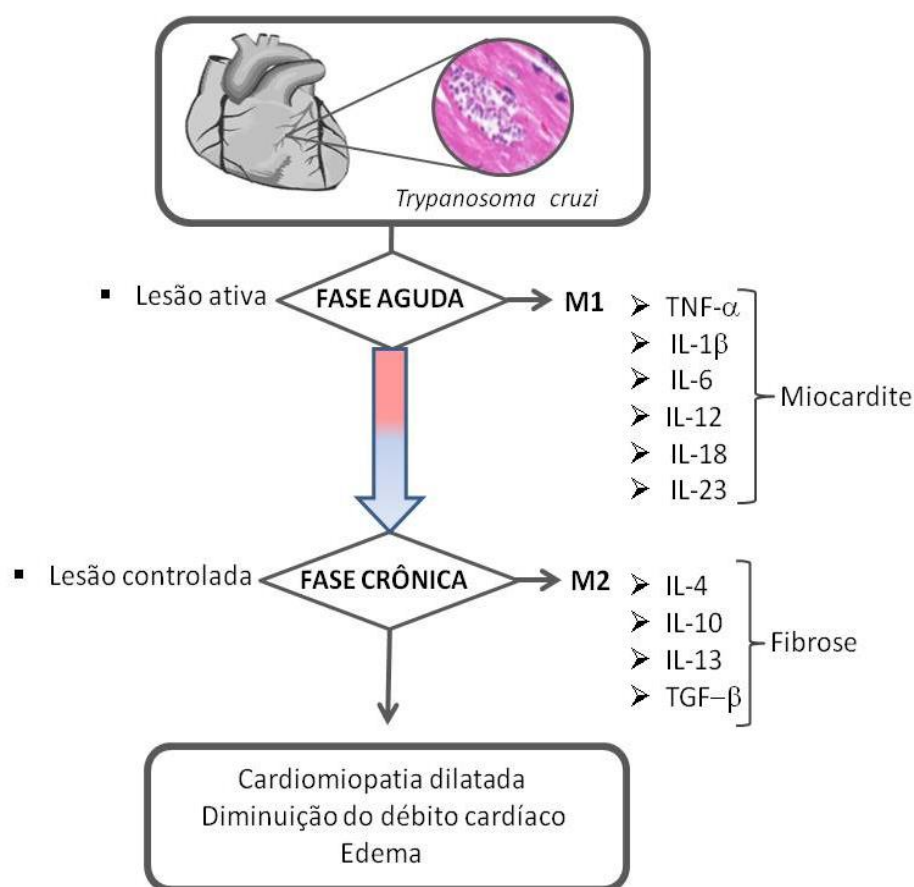


Figura 3. Perfil de macrófagos durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*

Embora muitos trabalhos abordem os macrófagos classicamente e alternativamente ativados nas parasitoses, estas subpopulações são pouco abordadas na Doença de Chagas. A compreensão dos mecanismos responsáveis pela eliminação do parasita frente a um processo inflamatório desencadeado por macrófagos M1 gera danos ao hospedeiro em razão da ausência no controle deste processo de eliminação do agente etiológico. O controle da inflamação da fase aguda ocorre pela polarização destes macrófagos de perfil M1 para o perfil M2 anti-inflamatório.

Embora mais estudos sejam necessários para a melhor compreensão desta polarização de macrófagos na Tripanossomíase Americana, esta revisão mostra alguns aspectos da função dos macrófagos e suas subpopulações no controle da Doença de Chagas.

## REFERÊNCIAS

1. Varin A, Gordon S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology*. 2009;214:630-41.
2. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013;229:176-85.
3. Liao W-T, You H-L, Li C, Chang J-G, Chang S-J, Chen C-J. Cyclic GMP-dependent protein kinase II is necessary for macrophage M1 polarization and phagocytosis via toll-like receptor 2. *J Mol Med (Berl)*. 2015;93:523-33.
4. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Primer Rep*. 2014;3:6:13. doi: 10.12703/P6-13. eCollection 2014.
5. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41:14-20.
6. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32:593-604.
7. Varin A, Mukhopadhyay S, Herbein G, Gordon S. Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. *Blood*. 2015;115:353-63.

8. Gundra UM, Girgis NM, Ruckerl D, Jenkins S, Ward LN, Kurtz ZD, et al. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood*. 2014;123: 110-23.
9. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496:445-55.
10. Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, et al. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite leishmania major. *Infect Immun*. 2004;72:1920-8.
11. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science*. 2011;327(5966):656-61.
12. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010;11:889-96.
13. Labonte AC, Hahn YS. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. *Mol Cells*. 2014;37:275-85.
14. Recalcati S, Locati M, Marini A, Santambrogio P, Zaninotto F, De Pizzol M, et al. Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *Eur J Immunol*. 2010;40:824-35.
15. Raes G, Beschin A, Ghassabeh GH, De Baetselier P. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Curr Opin Immunol*. 2007;19:454-9.
16. Wilson HM. SOCS proteins in macrophage polarization and function. *Front Immunol*. 2014 Jul 28;5:357.
17. Hovsepian E, Penas F, Siffo S, Mirkin G, Goren NB. IL-10 inhibits the NF- $\kappa$ B and ERK/MAPK-mediated production of pro-inflammatory mediators by up-regulation of SOCS-3 in Trypanosomacruzi-infected cardiomyocytes. *PloS One*. 2013;8(11):e79445.
18. White GE, Cotterill A, Addley MR, Soilleux EJ, Greaves DR. Suppressor of cytokine signalling protein SOCS3 expression is increased at sites of acute and chronic inflammation. *J Mol Histol*. 2011;42:137-51.
19. Byles V, Covarrubias AJ, Ben-Sahra I, Lamming DW, Sabatini DM, Manning BD, et al. The TSC mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nat Commun*. 2013;4:2834.
20. Penas F, Mirkin GA, Vera M, Cevey Á, González CD, Gómez MI, et al. Treatment in vitro with PPAR  $\alpha$  and PPAR  $\gamma$  ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from T . cruzi -infected mice. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852:893-904.

21. Date D, Das R, Narla G, Simon DI, Jain MK, Mahabeleshwar GH. Kruppel-like transcription factor 6 regulates inflammatory macrophage polarization. *J Biol Chem.* 2014;289:10318-29.
22. Mills CD, Ley K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. *J Innate Immun.* 2014;6:716-26.
23. Macrophage polarization: M1 vs M2; 2011 – [citado em 2016 julho 13]. Disponível em: <http://www.biologend.com/NewsLegend/022311/index.htm>
24. Neves DP, Melo AL, Linard PM, Vitor RWA. *Parasitologia humana*. 11ª edição. São Paulo: Atheneu; 2005.
25. Neto VA, Gryscek CB, Amato VS, Tuon FF. *Parasitologia: uma abordagem clínica*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
26. Blander JM, Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science.* 2004;304(5673):1014-8.
27. Oliveira AC, de Alencar BC, Tzelepis F, Klezewsky W, da Silva RN, Neves FS, et al. Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against Trypanosomacruzi in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice. *PLoS Pathog.* 2010;6:1000870.
28. Ka MB, Daumas A, Textoris J, Mege JL. Phenotypic diversity and emerging new tools to study macrophage activation in bacterial infectious diseases. *Front Immunol.* 2014 Oct 10;5:500.
29. Basso B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World J Exp Med.* 2013;3:1-10.
30. Esper L, Utsch L, Soriani FM, Brant F, Esteves Arantes RM, Campos CF, et al. Regulatory effects of IL-18 on cytokine profiles and development of myocarditis during Trypanosomacruzi infection. *Microbes Infect.* 2014;16:481-90.
31. Abel LCJ, Ferreira LRP, Cunha Navarro I, Baron MA, Kalil J, Gazzinelli RT, et al. Induction of IL-12 production in human peripheral monocytes by trypanosomacruzi is mediated by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins and potentiated by ifn-  $\gamma$  and cd40-cd40l interactions. *Mediators Inflamm.* 2014:345659. doi: 10.1155/2014/345659.
32. Silva APG, Abrahamsohn IM. Interleukin-12 stimulation of lymphoproliferative responses in Trypanosomacruzi infection. *Immunology.* 2001;104:349-54.



33. Flórez O, Zafra G, Morillo C, Martín J, González CI. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in chagas disease in a Colombian case-control study. *Hum Immunol.* 2006;67:741-8.
34. León B, Lund FE. IL-17-producing B cells combat parasites. *Nat Immunol.* 2013;14:419-21.
35. Ferrão PM, de Oliveira FL, Degrave WM, Araujo-Jorge TC, Mendonça-Lima L, Waghabi MC. A phosphoproteomic approach to wards the understanding of the role of TGF- $\beta$  in *Trypanosomacruzi* biology. *Plos One.* 2012;7:38736.
36. Saraiva RM, C, Waghabi MC, Vilela MF, Madeira FS, da Silva GMS, Xavier SS, et al. Predictive value of transforming growth factor- b 1 in Chagas disease : towards a biomarker surrogate of clinical outcome. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107:518-25.