



**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. Cilmary 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. Cilmary 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: Cilmerly 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

ARTIGO DE REVISÃO.....	9
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO: a polarização de macrófagos.....	10
<i>Trypanossoma cruzi</i> e macrófagos M1 e M2.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
ARTIGO ORIGINAL.....	25
RESUMO.....	25
ABSTRACT.....	26
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. Objetivo geral.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
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
4. RESULTADOS.....	39
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
5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÃO.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ANEXO 1 - Citometria de Fluxo.....	71
ANEXO 2 – Comprovantes de submissão de trabalho para publicação.....	73
ANEXO 3 - Aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB.....	74

ARTIGO DE REVISÃO

Macrófagos M1 e M2 na infecção por *Trypanosoma cruzi*

Leonardo Teixeira Lopes de Medeiros^{1,2}, Cilmary Suemi Kurokawa^{1,2}, Maria Rita Parise Fortes³.

¹*Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), São Paulo, Brasil.* ²*Programa em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), São Paulo, Brasil.* ³*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 evidência¹. Estes perfis podem ser divididos em duas grandes subpopulações de macrófagos: macrófagos classicamente ativados ou M1 e macrófagos alternativamente ativados ou M2². Os macrófagos M1 e M2 foram assim chamados por serem gerados através dos efeitos das citocinas do perfil Th1 ou Th2³. 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^{4,5}. Esta classificação corresponde a tipos distintos de estimulação, sendo a ativação com Interferon-gama (IFN- γ) correspondente aos macrófagos inflamatórios enquanto que macrófagos estimulados com IL-10 referem-se aos macrófagos alternativamente ativados⁶. 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 definição⁷. A produção de IL-4/IL-13 pelo perfil Th2 pode estimular a diferenciação de macrófagos M2 residentes em tecido ou derivados de monócitos⁸.

Atualmente este conceito de subpopulações de macrófagos é empregado nas relações parasita hospedeiro, resposta imune a tumores e mecanismos de agressão sépticos ou assépticos⁹. 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*^{9,10}.

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^{4,6}. 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)². Este perfil apresenta maior atividade microbicida e maior eficiência na apresentação de antígenos, devido a maior expressão de MHC classe II¹¹. 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- α , CXCL1-3, 5 e 8-10, CXCL16 e CX3CL1¹². Além desta função microbicida direta, os macrófagos M1 reprimem a expressão do gene para ferroportina e indução da ferritina H, propiciando efeitos bacteriostáticos adicionais¹³.

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 organismo¹⁴. 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-13¹⁵.

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 consequentemente 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- α 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^{16,17}.

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 TLR¹⁶.

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 γ e PPAR δ , 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^{18,19} 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-1Ra¹².

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- γ) 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- κ 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*^{20,21}. 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, β IGH3 e uma alta expressão de arginase I⁵, de modo que os macrófagos ao mesmo tempo em que reparam processos lesivos também agem eficientemente nas respostas contra infecções²².

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 M2¹¹. 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- α , 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”, respectivamente¹²(figura 1).

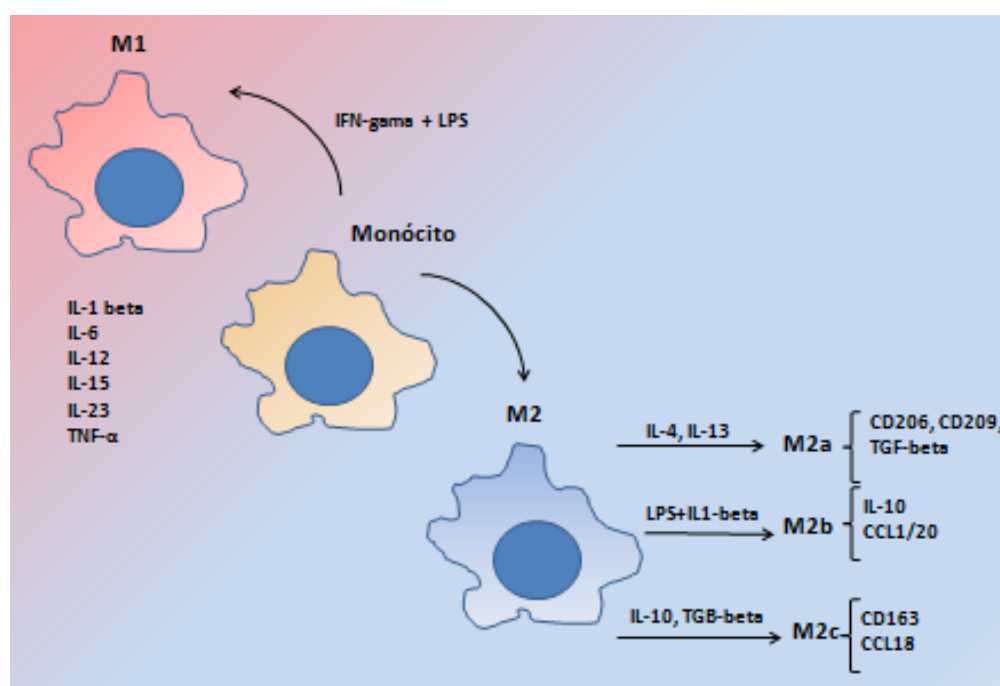


Figura1. Macrófagos M1 e subtipos de macrófagos M2²³

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
M1	IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, TNF- α , 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- γ , LPS, GM-CSF
M2	IL-21, TGF- β , 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^{24,25}.

***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 *killing*. 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- α 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*²⁶.

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- κ B e ligação com TLR4. De um modo geral, as estruturas das GIPLs apresentada pelo tripomastigota metacíclico e pela forma epimastigota são semelhantes; ambas contêm 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^{26,27}.

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^{22,26}.

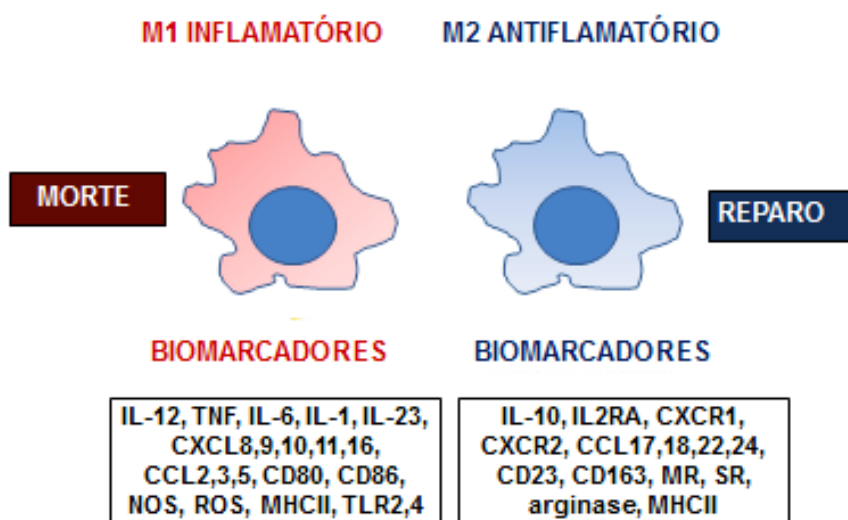


Figura 2. Macrófagos M1 e M2 e seus respectivos biomarcadores²⁸

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 local²⁴. 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 M1²⁹.

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 Chagas³⁰. Quando o coração está comprometido, geralmente se apresenta aumentado de volume, em grau bastante variável, à custa de dilatação e hipertrofia²⁵. 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 colombiana³⁰. 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 citotóxicos³¹.

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^{32,33}.

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 mesmo³⁴. 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 exemplo¹⁷.

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^{35,36}.

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).

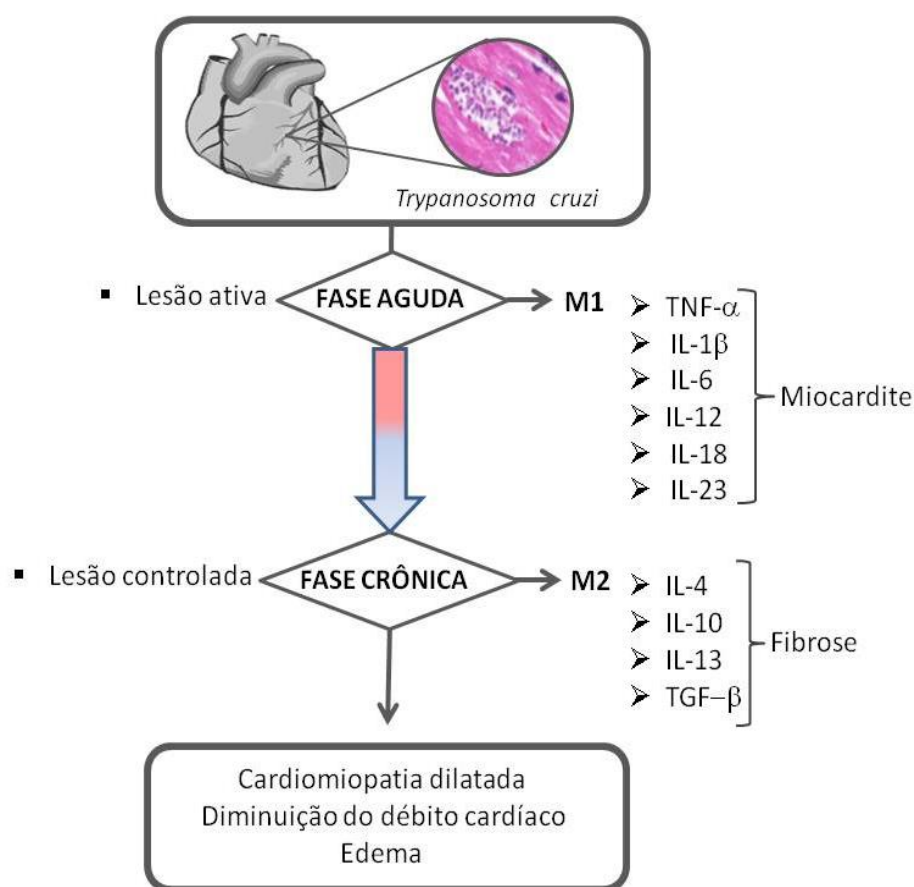


Figura 3. Perfil de macrófagos durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*

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, Goerdt 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- κ 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 α and PPAR γ 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.biolegend.com/NewsLegend/022311/index.htm>
24. Neves DP, Melo AL, Linard PM, Vitor RWA. *Parasitologia humana*. 11^a 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- γ 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, Degraive WM, Araujo-Jorge TC, Mendonça-Lima L, Waghabi MC. A phosphoproteomic approach towards the understanding of the role of TGF- β 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- β 1 in Chagas disease : towards a biomarker surrogate of clinical outcome. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107:518-25.

ARTIGO ORIGINAL

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

Leonardo Teixeira Lopes de Medeiros^{1,2}, Graziela Gorete Romagnoli², Ana Laura Denzen¹, Cilmary Suemi Kurokawa^{1,2}.

¹*Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), São Paulo, Brasil.* ²*Programa em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), São Paulo, Brasil.*

RESUMO

Macrófagos do perfil M1 são células que apresentam suscetibilidade na Doença de Chagas ocorrendo na fase aguda da infecção. O objetivo do presente trabalho foi determinar a presença de macrófagos com perfil M1 em camundongos Balb/c infectados com duas cepas de *Trypanosoma cruzi*, uma com alta (cepa Y) e outra com baixa virulência (cepa JLP). Para isso, camundongos BALB/c machos foram infectados com 10^4 tripomastigotas e avaliados em 2 tempos da fase aguda (T1 e T2). A expressão de CD64, TLR2 e TLR4 foi avaliada em macrófagos peritoneais por citometria de fluxo e no baço por PCR em tempo real. A confirmação da infecção foi realizada pela presença de *T. cruzi* em sangue e tecido cardíaco. Os camundongos desenvolveram a infecção para ambas as cepas, porém com diferenças no pico de parasitemia: 5 dias para a cepa Y e 12 dias para JLP. Os resultados obtidos por citometria não demonstraram aumento nos marcadores de superfície nos dois tempos da infecção para ambas as cepas. Entretanto a avaliação do mRNA demonstrou aumento de TLR2 no T1 para a cepa JLP e aumento de CD64 no T1 para a cepa Y. Os resultados sugerem uma expressão transitória ou baixa de marcadores de superfície, tanto em peritônio como em baço, sugerindo presença de perfil misto de macrófagos. Assim, os marcadores de superfície associados aos macrófagos do perfil M1 são pouco expressos na fase aguda da DC experimental. Há somente elevação de TLR2 e CD64 em pontos específicos da fase aguda.

Palavras chave: Macrófagos, Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Tripanossomíase americana

ABSTRACT

M1 profile macrophages are cells which present susceptibility in Chagas disease occurring in the acute phase of the infection. The current study objective was to determine the presence of macrophages with M1 profile in BALB/c mice infected with two strains of *Trypanosoma cruzi*, with high (strain Y) and other with low virulence (strain JLP). Thus, male BALB/c mice were infected with 10^4 trypomastigotes and evaluated in two times in the acute phase (T1 and T2). The expression of CD64, TLR4 and TLR2 was evaluated in peritoneal macrophages by flow cytometry and spleen by real-time PCR. The confirmation of the infection was confirmed by the presence of *T.cruzi* in both blood and cardiac tissue. Mice developed the infection for both strains, however with differences in the peaks of parasitaemia: five days for strain Y and twelve for JLP. The results obtained by citometry did not demonstrate an increase in the surface markers in the two times of infection for both strains. However mRNA evaluation demonstrated a TLR2 increase in the T 1 for strain JLP and a CD64 increase in the T 1 for strain Y. The results suggest a transitional expression or a surface markers lowering associated to M1 profile, as in peritoneum as in spleen. This way, the surface markers associated to the M1 macrophage profiles are little expressed in the experimental DC acute phase. There is only an elevation of TLR4 and CD64 in specific points of the acute phase.

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

1. INTRODUÇÃO

A Tripanosomíase americana ou Doença de Chagas (DC) é causada pelo parasita *Tripanosoma cruzi*. Endemicamente é encontrada em 21 países da América latina e afeta entre 8 a 10 milhões de pessoas no mundo^{1,2}. Estima-se que só no Brasil três milhões de indivíduos estejam infectados, apesar do grande esforço realizado para a redução da DC³. Além da questão da saúde, a Doença de Chagas também é um problema que traz consequências negativas para a economia do país⁴. Os países com taxa de imigração elevada têm demonstrado aumento na detecção da DC, entre eles estão os Estados Unidos e recentemente países do continente europeu². Assim, atualmente, os Estados Unidos não podem ser classificados como uma área não-endêmica, bem como países do continente europeu e Japão. Assim, muitos dos indivíduos infectados pelo *T.cruzi* nos Estados Unidos são imigrantes de áreas endêmicas da América Latina. Apesar disso, uma faixa do sul dos Estados Unidos, entre a Geórgia e a Califórnia apresenta várias espécies de vetores e mamíferos hospedeiros que podem completar o ciclo endozoonótico. Onze espécies de insetos triatomíneos foram reportadas nos Estados Unidos: *Triatoma gerstaeckeri*, *T. incrassata*, *T. indictiva*, *T. lecticularia*, *T. neotomae*, *T. protracta*, *T. recurva*, *T. rubida*, *T. rubrofasciata*, *T. sanguisuga* e *Paratriatoma hirsuta*. Os triatomíneos estão distribuídos ao longo do centro-sul do país, da costa do Pacífico ao Atlântico e uma espécie (*T. rubrofasciata*) é encontrada no Havaí¹.

Estima-se que, entre 1999 e 2009, o número de pessoas infectadas com o *T.cruzi* na Europa passou dos 80000 casos, entre os quais mais de 4000 foram confirmados laboratorialmente. Os países mais afetados foram a Espanha, com um número de casos estimados entre 40000 a 65000 (com 3617 casos confirmados), Reino Unido: 14000 casos (28 confirmados), Itália: 5500 a 7000 (114 confirmados), Suíça: 3000 (180 confirmados), França: 2166 (111 confirmados), Bélgica: 1982 (19 confirmados), Suécia: 1118 (1 caso confirmado), Alemanha: 935 (2 confirmados), Portugal: 85 (8 confirmados) e Holanda: 480 (7 confirmados). Muitos casos de infecção congênita pelo *T.cruzi* têm sido notificados na Espanha e atenção crescente e medidas de prevenção e detecção para transmissão congênita do parasita neste país foram preconizadas. Acredita-se que muitos casos observados na América do Norte e países da Europa são oriundos de imigrantes da América Latina e uma atenção tem sido dirigida para as transmissões verticais entre mãe e feto⁵. Assim, apesar de eficientes programas de

controle de vetor e rastreamento em banco de sangue na América do Sul, sua patogênese, fisiopatologia e disseminação continuam sendo um assunto desafiador⁶.

Os parasitas são geralmente transmitidos por espécies hematofágicas de insetos triatomíneos da família Reduviidae. Embora em torno de 140 espécies de triatomíneos tenham sido identificadas, apenas poucos são vetores competentes para *T.cruzi*⁷. 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 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^{8,9}.

Em junho de 2006, o Brasil declarou formalmente que estava livre da transmissão de Doença de Chagas pelo principal vetor *Triatoma infestans*. Apesar desta declaração, outros mecanismos de transmissão continuam, incluindo transfusão sanguínea, transmissão congênita, transplante de órgãos, alimentos contaminados e acidentes laboratoriais⁶.

A Doença de Chagas é caracterizada por duas fases distintas: a fase aguda e crônica. A fase aguda apresenta duração de 2 a 4 meses com detecção de parasitas na corrente sanguínea e no tecido do hospedeiro. Mostra geralmente sintomas não específicos durante um curto período de tempo ou pode prosseguir para uma eventual miocardite de gravidade variada¹⁰. Atualmente, apenas os casos da forma aguda são de notificação compulsória no Brasil¹¹. Os sintomas da fase aguda ocorrem entre 8 a 10 dias depois da invasão pelo parasita. Na fase crônica, denominada forma indeterminada,

ocorre uma redução nos níveis de parasitemia e o diagnóstico é baseado apenas na positividade de testes sorológicos específicos e inicia-se de 2 a 3 meses após a infecção inicial. Cerca de 60 a 70% destes pacientes terão a forma indeterminada da fase crônica da DC, ou seja, não apresentarão sintomas clínicos^{12,13}. Uma das complicações mais relevantes desta infecção são as manifestações cardíacas, tal como cardiopatia dilatada crônica. Quando o coração está comprometido, geralmente se apresenta aumentado de volume, em grau bastante variável, à custa de dilatação e hipertrofia. Adquire forma globosa e mostra-se flácido. Outras alterações também podem ocorrer, como alteração gastrointestinal - megacólon e megaesôfago. O sistema retículo endotelial, fígado, baço e medula óssea também podem ser afetados^{6,9}.

A identificação dos mecanismos que permitem o parasita evadir da resposta imune do hospedeiro e sobreviver dentro das células-alvo é crucial para compreender a patogênese da doença, tendo os macrófagos importante participação, os quais têm sido associados a mecanismos de resistência e suscetibilidade. Estes fagócitos podem ser classificados em pelo menos duas subpopulações com distintos fenótipos, ou seja, classicamente ativados (M1) e alternativamente ativados (M2) de acordo com suas funções^{14,15}.

Segundo Mantovani et al. (2004), a classificação M1 e M2 refere-se a dois extremos de um espectro de ativação de macrófagos. Esses perfis diferem entre si pela expressão de receptores, produção de citocinas e funções efetoras. Os macrófagos se diferenciam para um perfil M1 quando são estimulados por IFN- γ , TNF- α ou LPS, expressando em sua superfície receptores opsonínicos do tipo Fc- γ RI, RII ou RIII (CD16, CD32, CD64), receptores TLR2 e TLR4 e produzindo citocinas inflamatórias, como, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-23, além de reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio¹⁷. Os receptores TLR2 e TLR4 de macrófagos têm sido descritos em alguns trabalhos sobre o reconhecimento do *T. cruzi* na fase inicial da infecção, sugerindo que a resposta pró-inflamatória ou perfil M1 possa contribuir com a eliminação da doença¹⁸. Existem relatos na literatura de que geralmente *in vivo* ocorre uma cooperação entre os TLRs, induzindo funções sinérgicas. Por exemplo, o sinergismo entre TLR2, TLR4 e TLR9 para a indução de citocinas esplênicas e quimiocinas são dependentes de MyD88 em modelos microbianos. Em outros estudos, Bahn e colaboradores apresentaram dados sugerindo que a indução máxima de IL-23 e IL-17 requerem a ativação de TLR4 e TLR9 na resposta inata pulmonar durante a pneumonia causada por bactérias gram-negativas, confirmando a importância da cooperação entre os TLRs¹⁹. Em relação a

infecção por *T.cruzi*, existe uma forte evidência de que componentes do parasita, GPI e CpG, podem ligar-se ao TLR2 e TLR9, respectivamente, e estimular macrófagos e células dendríticas, resultando na produção de TNF- α , IL-12 e NO²⁰. A capacidade do hospedeiro em controlar a infecção pode ditar o balanço que existe entre o curso da doença inflamatória e a resposta imune regulatória típica. Recentemente, terapêuticas cardiovasculares desenvolvidas têm mostrado redução da resposta inflamatória e de citocinas inflamatórias circulantes, como IFN-beta, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23 e de quimionas inflamatórias, como CXCL9, CXCL8, CCL4, CXCL10, CCL2, CCL5, CXCL11 e CCL3 e melhora da função ventricular de rendimento cardíaco em estudos clínicos e experimentais²¹. Estudos têm mostrado a relação que existe entre a produção de TNF- α e danos cardíacos em pacientes, mostrando o papel lesivo desta citocina em condições de constante produção²². A interação parasita-hospedeiro é dinâmica e resulta de muitos fatores relacionados ao parasita (cepa, virulência e inóculo), ao hospedeiro humano (idade, sexo, via de infecção e perfil genético) e ao ambiente²³.

Na Doença de Chagas, uma resposta efetora do tipo Th1 é essencial para uma eficiente eliminação do parasita²⁴. As citocinas IL-12, IFN-gama e TNF- α de Th1 agem em conjunto para ativar macrófagos e eliminar os parasitas através da produção de óxido nítrico e radicais livres do nitrogênio e oxigênio. O TNF- α é associado à resistência à infecção pelo *T.cruzi*^{25,26} devido sua atuação no controle dos parasitas por ativação das células fagocitárias²⁷. A IL-12 e IFN-gama participam na indução do perfil Th1 e redução da carga parasitária na fase crônica da infecção associado ao perfil Th1. Por outro lado, a IL-4 e a IL-10 induzem o perfil Th2, responsável pela resposta imune humoral contra o *T.cruzi*²⁸. O aumento de secreção de IL-10 durante a fase crônica pode também ser associado à proteção do hospedeiro contra a resposta inflamatória intensa, induzida pelo perfil Th1. Esta citocina é produzida pelos macrófagos e regula a expressão ou função de IL-12 e IFN-gama^{29,30}. Outras citocinas regulatórias também podem ocorrer na Doença de Chagas. Entre elas está o TGF-beta associado a fibrose e supressão da resposta imune inflamatória³¹.

Devido ao papel das citocinas TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-23 na polarização e manutenção de respostas imunes, elas estão diretamente associadas com as patologias resultantes de infecções. Na Doença de Chagas, dados da literatura demonstram que citocinas inflamatórias são essenciais durante a fase aguda da infecção, mas que são produzidas em níveis elevados também na fase crônica da Doença de Chagas. Estas

citocinas inflamatórias são descritas na forma cardíaca da DC e associada à piores prognósticos pela exposição crônica ao parasita^{32,33,34}.

Alguns componentes do *T.cruzi*, capazes de ativar os receptores TLRs em células dendríticas e em macrófagos já foram descritos em infecções realizadas em camundongos C57BL/6. A GPI ancorada a glicoproteínas semelhante a mucina (tGPI-mucin) da membrana do parasita inicia a resposta inflamatória através da ativação de TLR2. Outros TLRs, como TLR4 e TLR7 estão envolvidos na resposta imune durante os primeiros estágios da infecção. Em relação ao TLR9 na Doença de Chagas, este mostrou um papel crucial no controle da parasitemia e na sobrevivência do camundongo infectado, enquanto o TLR2 foi definido como imunorregulador, controlando a produção de IL-12/IL-23 p40 por células dendríticas e, ao mesmo tempo, promovendo a produção de TNF- α por macrófagos¹⁹.

Macrófagos polarizam-se para o perfil M1 em resposta à presença de IFN-gama e produtos microbianos, como lipopolissacarídeo (LPS); os macrófagos polarizados para o perfil M1 apresentam então capacidade de elevada produção de TNF, NO e IL-12 p40, demonstrado através de um modelo experimental, no qual foi utilizado camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*. Antígenos parasitários, como VSG-GPI e CpG DNA podem fornecer fortes sinais de ativação M1 em conjunto com IFN-gama do hospedeiro. O resultado da ativação de macrófagos M1 pró-inflamatórios fornece condições do controle da infecção pelo parasita durante a infecção aguda³⁵.

Patil e colaboradores (2014) demonstraram a coexistência de ativação de macrófagos M1 e M2 em camundongos C57BL/6 em resposta à presença de *Toxoplasma gondii*, concluindo que os macrófagos podem responder a diversos estímulos do ambiente e simultaneamente expressar os fenótipos M1 e M2. A indução da ativação do macrófago M2 permitiria uma autorregulação da resposta pró-inflamatória durante a progressão da resposta imune ao *Toxoplasma gondii*.

A fase aguda da infecção com *T.cruzi* apresenta uma forte atividade pró-inflamatória, com a produção abundante destas citocinas que podem polarizar a resposta imune adquirida para o perfil Th1, as quais apresentam papel na eliminação do parasita e sobrevivência do hospedeiro. Esta resposta pró-inflamatória produzida pela resposta imune inata é denominada de perfil M1 em algumas infecções devido à sua capacidade em promover o perfil Th1 em linfócitos. Cunha Neto et al (2011) relataram associação das citocinas pró-inflamatórias, com aumento de IFN-gama, TNF- α e quimiocinas, reforçando o papel destas citocinas do perfil M1 no controle da infecção aguda.

A produção de IFN-gama na Doença de Chagas tem sido associada à resistência do hospedeiro durante a fase aguda da infecção, inibindo a replicação do parasita *in vivo* e *in vitro*, através da indução da síntese de NO em macrófagos³⁰. O TNF- α age sinergicamente com IFN-gama controlando o crescimento do parasita³⁸. Entretanto, citocinas supressoras, incluindo IL-10 e TGF-beta, são associadas à suscetibilidade à infecção pelo *T.cruzi*^{39,40} pela inibição de ativação de macrófagos mediada por IFN-gama.

Durante a infecção experimental pelo *T.cruzi*, a produção de IFN-gama e TNF- α é induzida por IL-12, levando a uma resposta imune protetora mediada por células⁴¹. A IL-12 durante a infecção aguda experimental com *T.cruzi* (14 dias de infecção) promove uma resposta imune efetiva através da produção de IFN-gama e perfil Th1 protetor⁴².

Assim, nosso objetivo foi investigar e quantificar a presença de M1 nas fases iniciais da infecção utilizando 2 cepas de *T.cruzi*. Estes achados permitirão uma melhor compreensão das citocinas produzidas pelo perfil M1, na Doença de Chagas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar a presença de macrófagos de perfil M1 na infecção por *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda.

2.2. Objetivos específicos

Verificar e quantificar a presença de macrófagos com perfil M1 retirados da cavidade peritoneal, utilizando os marcadores de superfície CD14, TLR2, TLR4 e CD64 em dois momentos da fase aguda da infecção com cepas de alta e baixa virulência de *T. cruzi*;

Quantificar os níveis de mRNA para TLR2, TLR4 e CD64 em baço de camundongos infectados com *T. cruzi* em dois momentos da fase aguda da infecção com cepas de alta e baixa virulência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, machos, com idade de 8 a 12 semanas de vida e peso aproximado de 30g. Os animais foram criados e mantidos à temperatura de 25 - 27°C, 12 horas de ciclo claro/escuro em condições de alimentação *ad libitum*. Todos os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, da Faculdade de Medicina de Botucatu.

3.2. Cepas de *Trypanosoma cruzi* e manutenção

Foram utilizadas duas cepas de *T. cruzi*: Y como cepa de alta virulência e JLP como cepa de baixa virulência. Ambas as cepas foram isolada de paciente chagásico com a forma crônica. Os parasitas foram mantidos por passagens intraperitoneais seriadas em camundongos BALB/c, no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

3.3. Infecção e definição dos tempos avaliados

A infecção dos camundongos BALB/c foi feita pela inoculação intraperitoneal de 1×10^4 tripanosomas/animal, obtidos por punção cardíaca de animais previamente infectados. A confirmação da infecção dos animais foi realizada por exame direto de sangue periférico e câmara de Neubauer após a eutanásia.

Os tempos foram definidos pelo pico de parasitemia conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Tempo (T) para as cepas Y e JLP de *T. cruzi*

Tempos (dias)	T0	T1	T2
Cepa Y	Pré infecção	3 dias	5 dias
Cepa JLP	--	--	12 dias

T = tempo de infecção; 6 animais por T . T1= fase inicial do pico de parasitemia, T2= pico da parasitemia.

3.3.1. Avaliação do perfil M1 na fase inicial da infecção pela cepa Y

A avaliação do perfil M1 entre os momentos da infecção foi realizada para a cepa de maior virulência nos tempos T0, T1 e T2. Foram avaliados a expressão de CD64, TLR2 e TLR4 por citometria e PCR em tempo real. Os grupo foram definidos conforme citado no texto.

T0: 6 camundongos não infectados;

T1: 6 camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*;

T2: 6 camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*.

3.3.2. Avaliação do perfil M1 entre cepas

A comparação entre as cepas foi realizada somente no período T2 - pico da parasitemia. Esta avaliação foi realizada em baço utilizando PCR em tempo real para quantificar o mRNA das moléculas CD64, TLR2 e TLR4. Os grupos foram definidos como:

T0: 6 camundongos não infectados,

T2-Y: 6 camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*;

T2-JLP: 6 camundongos infectados com a cepa JLP de *T. cruzi*.

3.4. Eutanásia e coleta de material biológico

Os camundongos foram submetidos à eutanásia por injeção de Pentobarbital 60mg/kg por via intraperitoneal. Após a eutanásia dos animais, foi realizada a punção cardíaca para contagem de parasitas, coleta dos macrófagos peritoneais para citometria, remoção do coração para determinação de parasitas no tecido por Hematoxilina e Eosina (HE) e remoção do baço para quantificação da expressão de mRNA para as moléculas CD64, TLR2, TLR4 e beta-actina.

3.5. Obtenção de macrófagos peritoneais para determinação do perfil M1

Os macrófagos peritoneais foram obtidos através de lavagem da cavidade peritoneal com salina a 5°C e recuperados por aspiração. Para a remoção dos macrófagos foram realizadas massagens sucessivas por 1 minuto no abdômen dos animais após a infusão da salina e posteriormente, o líquido foi aspirado.

3.6. Determinação dos receptores de superfície

Após a obtenção das células (item 3.5), os macrófagos peritoneais foram marcados com anticorpo anti-TLR4 marcado com *Phycoerythrin* ou PE (Biolegend, Inc, San Diego, CA, USA), com anti-TLR2 marcado com *Fluorescein isothiocyanate* ou FITC, anti-CD64 marcado com *Allophycocyanin* ou APC (BioLegend) e anti-CD14 marcado com *Peridinin Chlorophyll-protein Cyanine 5.5* ou PerCP Cy5.5 (BioLegend), durante 20 minutos. O tubo teste e controle foram incubados com o anticorpo isotópico marcado com o respectivo fluorocromo teste. Todas as células foram lavadas e suspensas em 300µL de ISOTON II (Becton Dickinson), fixado com formaldeído 0,5% (Becton Dickinson Labware). A análise foi feita em citômetro de fluxo FACS CANTO™ (Becton Dickinson) utilizando o *Cell Quest software* (Becton Dickson). O número de eventos analisados foi de 20000 eventos para cada amostra, sendo otimizada a população de interesse, estabelecendo-se *gate* ou janela com base em parâmetros de tamanho (*Forward Scatter* ou FSC) e granulosidade (*Side Scatter* ou SSC) ou fluorescência (FL). A partir desse *gate*, foram selecionados monócitos positivos para CD14 e avaliada a média de intensidade de fluorescência (MIF) da expressão de TLR2, TLR4 e CD64.

3.7. Quantificação de receptores de superfície por PCR em tempo real

A determinação da concentração de TLR2, TLR4 e CD64 foi realizada por PCR em tempo real no baço.

3.7.1 - Extração de RNA total

Fragmentos do baço foram armazenados em microtubos *DNase* e *RNAse free* com capacidade de 1,5mL contendo *RNA lather* e submetidos posteriormente à extração de RNA total. As amostras foram processadas utilizando o sistema SV de extração de RNA total da Promega®. As amostras do baço com peso aproximado de 100mg foram fragmentados em homogeneizador *Tekmar Tissuemizer* e 1mL de tampão de lise para RNA conforme a recomendação do fabricante. Todo o processo foi feito o mais breve possível em gelo para uma boa recuperação do RNA total. Um volume de 175µL de lisado de tecido foi transferido para tubos tipo *eppendorfes* de 1,5mL e adicionado um volume de 350µL de *RNA dilution buffer*. Após a mistura, as amostras foram aquecidas por 3 minutos a 70°C em termociclador, centrifugadas por 10 minutos a 12000-14000 *g* e purificadas utilizando-se coluna *RNAse free* de fase sólida para extração e purificação do RNA total.

3.7.2. Purificação do RNA por centrifugação

Após centrifugação, um volume de 500µL do sobrenadante do lisado de células centrifugadas foi transferido para outro microtubo de 1,5mLm e adicionado 200µL de etanol 95%, a mistura foi homogeneizada três vezes com a própria pipeta e transferido para a cesta de centrifugação, contendo a coluna de separação. Posteriormente, o material foi centrifugado a 12000 – 14000 *g* por 1 minuto e a coluna lavada com mais 600µL de tampão de lavagem adicionado de etanol, conforme recomendação do fabricante. Após este passo, o RNA extraído e contido na coluna foi tratado com *DNase I* preparada conforme o protocolo do *kit*.

Após a digestão do DNA genômico, a coluna contendo o RNA foi lavada para a eliminação da *DNase* e o RNA foi eluído com 100µL de água livre de *DNase* e *RNase*.

3.7.3 . Obtenção do cDNA

As amostras com concentração de RNA entre 0,02 a 0,2µg/ml foram submetidas à transcrição reversa para obtenção do cDNA utilizando-se a *Improm-II Reverse Transcriptase*, seguindo as instruções e condições de reação do fabricante. O cDNA foi quantificado e estocado a -70°C para quantificação por *PCR real time*.

3.7.4. PCR em tempo real

As amostras de cDNA obtidas foram amplificadas por PCR em tempo real seguindo-se o protocolo da *GoTaq® qPCR Master Mix* - Promega® e utilizando o aparelho *Step One Plus*. O volume final de reação foi de 20µL e contendo 2µl de cDNA das amostras. As reações foram feitas em triplicatas para melhor avaliação dos resultados. A quantificação dos níveis de expressão de TLR2, TLR4 e CD64 foram feitas por quantidade de expressão relativa utilizando o gene beta-actina como controle endógeno.

A sequência dos genes para a beta-actina e dos marcadores foram:

Beta-actina

Forward: AGCTGCGTTTTACACCCT

Reverse: AAGCCATGCCAATGTTGTCT

TLR4

Forward: TCTCCACAGCCACCAGATTCT

Reverse: TGACAGGAAACCCTATCCAGAGTT

TLR2

Forward: TTCGATGGAATCGATGATGTT

Reverse: TGTCTCCACAAGCGGGACTT

CD64

Forward: GCAAGTTAGAAGCGATGGCG

Reverse: GTCCACAGTCACCCACTGAG

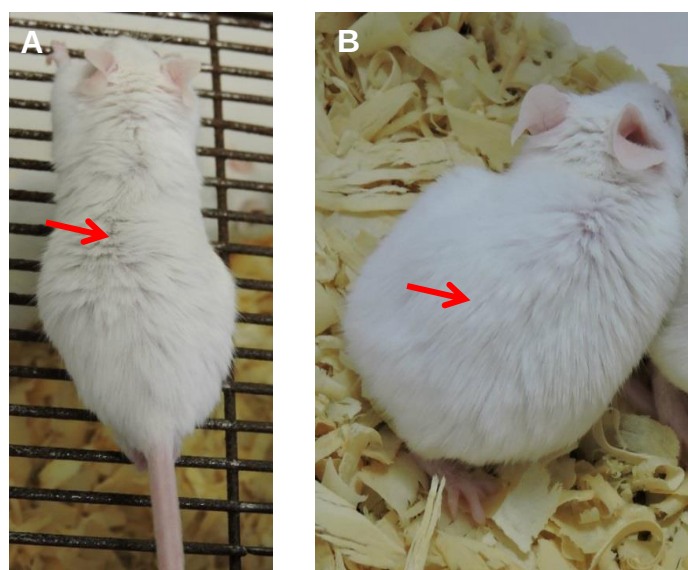
3.8. Histologia do tecido cardíaco

O coração de cada animal foi fixado em solução de 10% de formol tamponado e posteriormente corado com hematoxilina e eosina para a determinação da lesão cardíaca, infiltrado inflamatório e confirmação da infecção.

4. RESULTADOS

4.1. Parâmetros indicativos de eficácia da infecção

Os dados referentes ao peso dos animais, peso do coração, peso do baço e parasitemia para cada momento e respectivas cepas, encontram-se na tabela 2. Os animais não apresentaram redução do peso total após a infecção. Apesar disto foi possível verificar diferenças no comportamento após a infecção. Houve redução da atividade de exploração do ambiente, astenia e prostração que se acentuou no decorrer da infecção. O eriçamento dos pelos também foi verificado no 3º ao 5º dias dia para cepa Y (figuras 1A e B), assim como a presença de lesão ocular (figura 2). O eriçamento dos pelos também foi observado nos animais infectados pela cepa JLP, no 12º dia de infecção (figuras 3A e B).



Figuras 1. Camundongos BALB/c infectados com 1×10^4 tripomastigotas (cepa Y). Setas demonstram eriçamento do pelo no quinto dia de infecção (A e B).



Figura 2. Camundongo BALB/c infectados com 1×10^4 tripomastigotas (cepa Y). Seta demonstram lesão ocular no quinto dia de



Figuras 3. Camundongo BALB/c infectados com 1×10^4 tripomastigotas (cepa JLP). Setas demonstram eriçamento do pelo no décimo segundo dia de infecção (A e B).

A presença de parasitas no sangue foi verificada após 3 e 5 dias de infecção para cepa Y e 12 dias para JLP. O peso do coração não variou nos tempos da infecção, apesar de ser possível verificar a presença de ninho de amastigotas entre as fibras cardíacas (figuras 4A e B).

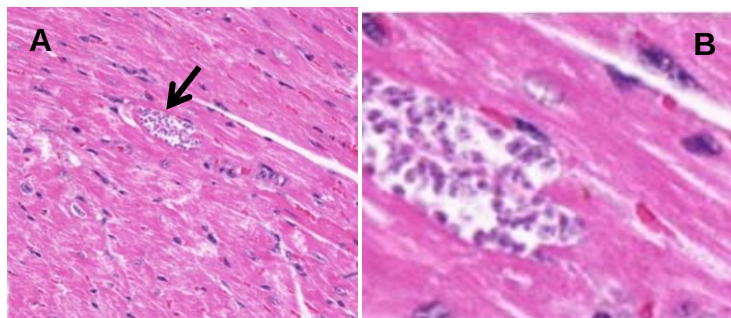


Figura 4. Fotomicrografia do ventrículo esquerdo contendo presença de formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) entre os miócitos (seta). Aumento digital de 10x (A) e 50x (B).

O baço apresentou aumento expressivo em seu tamanho nos dois tempos avaliados (figura 5 e tabela 2) e para as duas cepas.

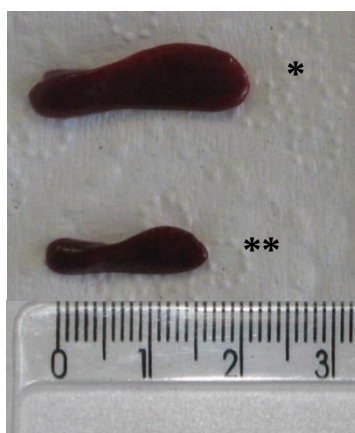


Figura 5. Baço aumentado do camundongo infectado pela cepa JLP (*) de *Trypanosoma.cruzi* e baço de camundongo não-infectado (**).

Tabela 2. Peso dos camundongos, órgãos e quantidade de tripomastigotas no sangue periférico após tempo 1 (T1) e tempo 2 (T2) de infecção.

	Tempos	Peso animal (g)	Peso coração (g)	Peso baço (g)	Parasitemia Trip.mL ⁻¹ . 10 ⁴
CepaY	T 0	29,90 ± 1,62	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,01 &	---
	T 1	28,52 ± 2,00	0,16 ± 0,10	0,17 ± 0,04	4,5 ± 1,60
	T 2	28,42 ± 1,62	0,14 ± 0,01	0,33 ± 0,06	3,9 ± 1,45
Cepa JLP	T 1	27,43 ± 2,23 [#]	0,14 ± 0,01	0,20 ± 0,05	3,4 ± 1,06
	T 2	30,71 ± 2,01 [#]	0,15 ± 0,02	0,28 ± 0,05 &	3,0 ± 0,00

&Tt0 vs T2-JLP, p<0,05; Anova.

T1-JLP vs T2-JLP, P = 0,009; Anova

Trip = formas tripomastigotas

4.2. Avaliação de marcadores de superfície para M1 entre o tempos da infecção

A avaliação de marcadores associados ao perfil M1 de macrófagos foi realizado em baço e em macrófagos peritoneais, utilizando a quantificação do mRNA através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real. As curvas de *Melt* foram obtidas inicialmente para os genes β -actina, TLR2, TLR4 e CD64 (figuras 6 A, B, C, D) com o intuito de testar os *primers* e certificar ausência de anelamento entre si ou amplificação de fragmentos menores ao desejado para não comprometer a análise.

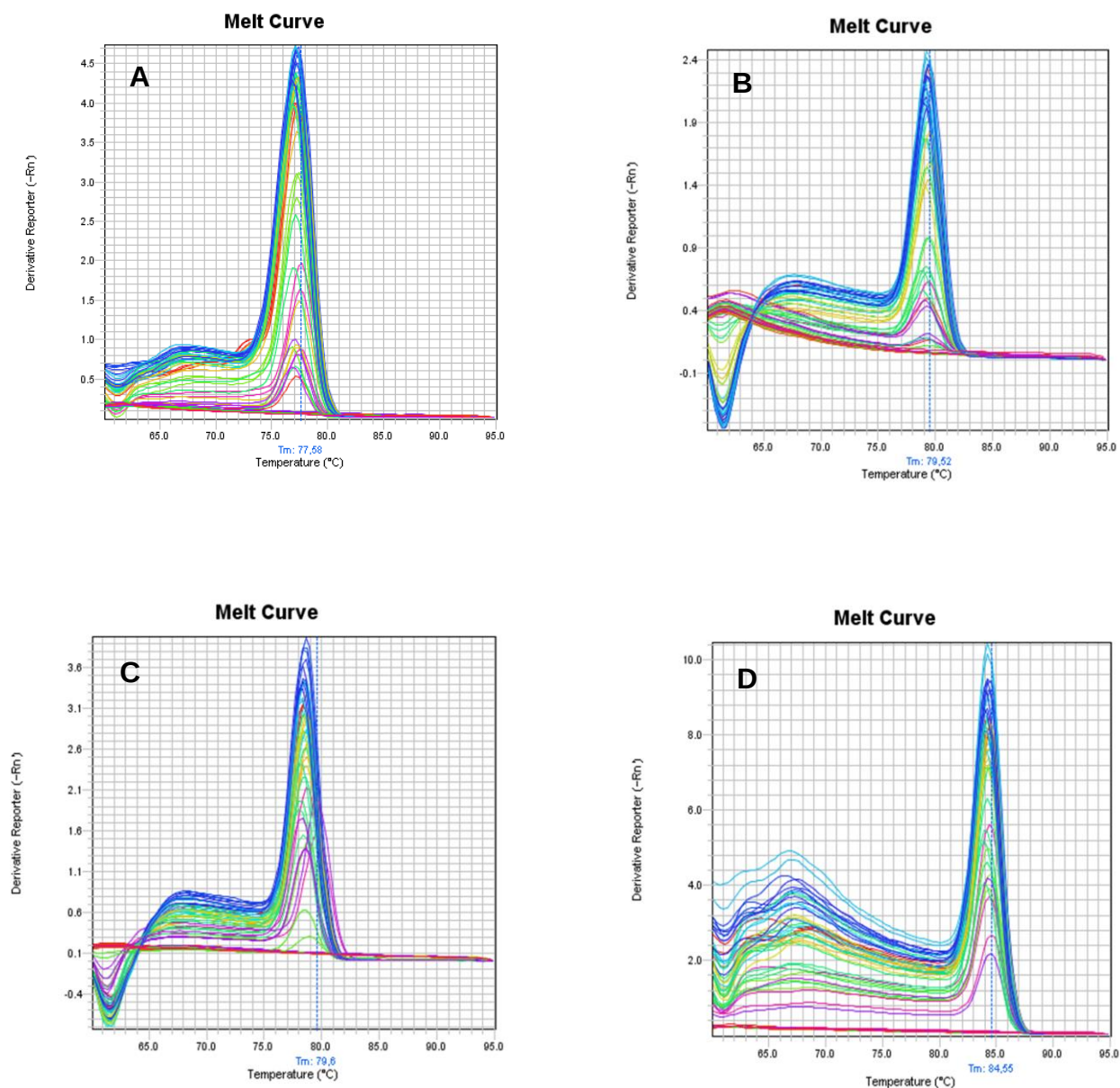


Figura 6. Curva de *melt* para o gene β -actina (A), gene TLR2 (B), gene TLR4 (C) e gene CD64 (D). Observar a presença de apenas um pico que corresponde ao fragmento do gene alvo.

4.2.1. Quantificação de mRNA para TLR2, TLR4 e CD64

A expressão gênica de TLR2 em macrófagos do baço por PCR em tempo real não mostrou diferença significativa entre o tempo 0 (T0) e o tempo 1 (T1) e 2 (T2) da infecção pela cepa Y (figura 7).

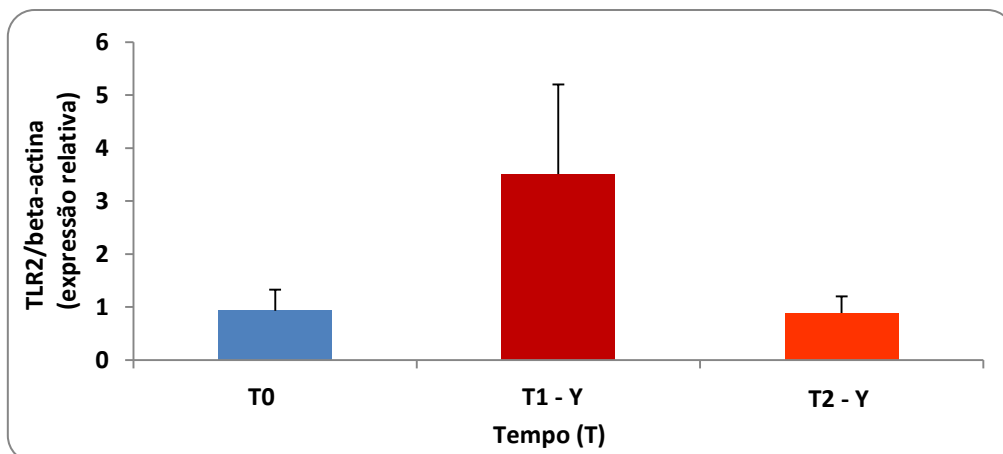


Figura 7. Expressão de TLR2 em baço nos tempos (T) 0, 1 e 2 da infecção pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. T0 vs T1-Y, $p = 0,456$; T0 vs T2-Y, $p = 0,91$. Anova.

A expressão gênica de TLR4 do baço no T1-Y não diferiu do T0. Não houve também diferença quando o grupo dos animais não infectados quando comparado com o T2-Y (figura 8).

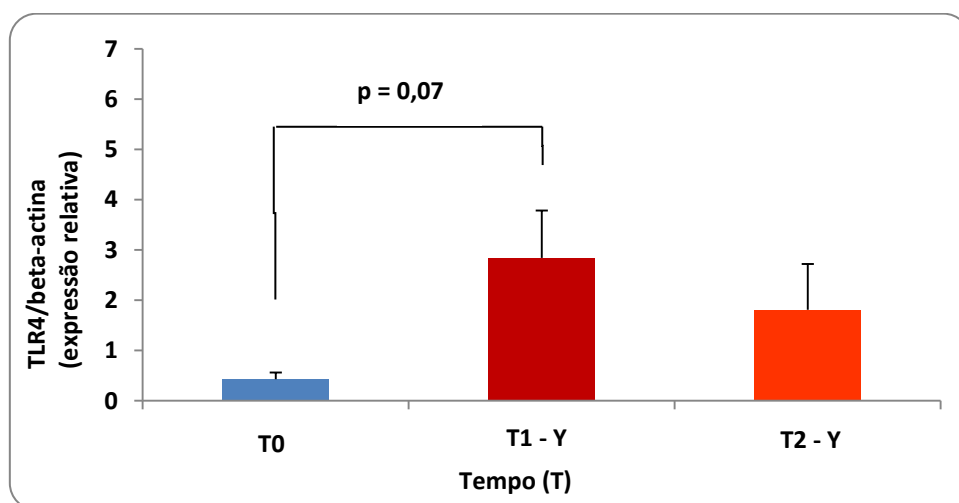


Figura 8. Expressão de TLR4 em baço de camundongos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* nos tempos 0, 1 e 2 da infecção. T0 vs T1-Y, $p = 0,07$; T0 vs T2-Y, $p = 0,225$. Anova.

A expressão gênica de CD64 no baço foi aumentada no T1-Y em relação ao T0. Não houve diferença de expressão deste receptor na comparação T0 *versus* T2 (figura 9).

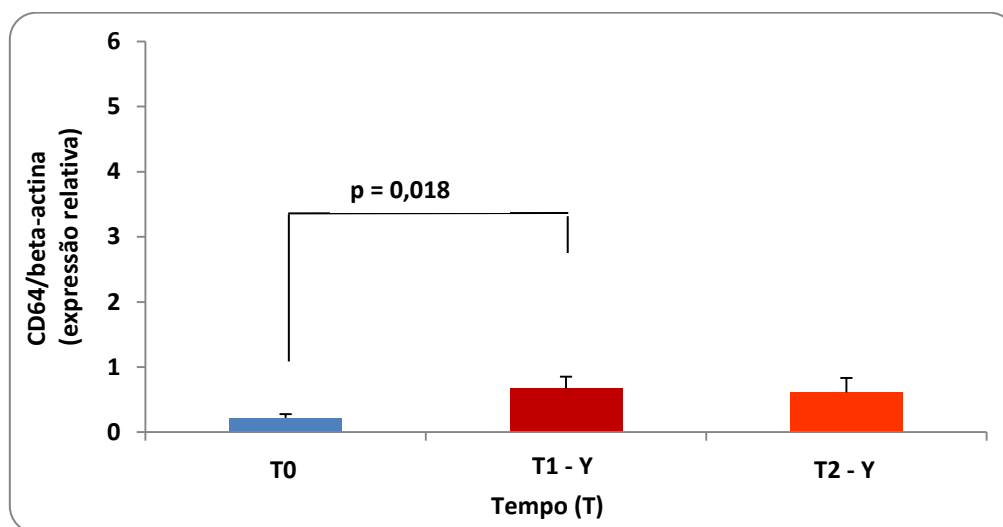


Figura 9. Expressão de CD64 no baço de camundongo infectado pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* nos tempos 0, 1 e 2 da infecção. * T0 vs T1-Y, $p = 0,018$; T0 vs T2-Y, $p = 0,118$. Anova.

4.2.2. Determinação de TLR2, TLR4 e CD64 por Citometria de Fluxo

A expressão dos marcadores de superfície TLR2, TLR4 e CD64 foram determinadas na população de macrófagos peritoneais que apresentava CD14⁺. Os controles isotípicos não foram possíveis de serem utilizados, pois os anticorpos isotípicos de cada marcador apresentaram valores próximos aos anticorpos usados nos testes (anexo 1). Assim, foi utilizada uma outra estratégia para verificar a especificidade de cada anticorpo para a população de células estudadas; esta forma de verificação e confirmação da marcação foi a mesma utilizada por Ghosn e colaboradores (2010), denominada de “*Fluorescence minus one control*” (FMO control). O controle FMO contém todos os fluorocromos, exceto aquele que está sendo analisado.

As figuras 10, 11, 12 e 13 mostram a padronização dos controles FMO para os marcadores CD14, TLR2, TLR4 e CD64.

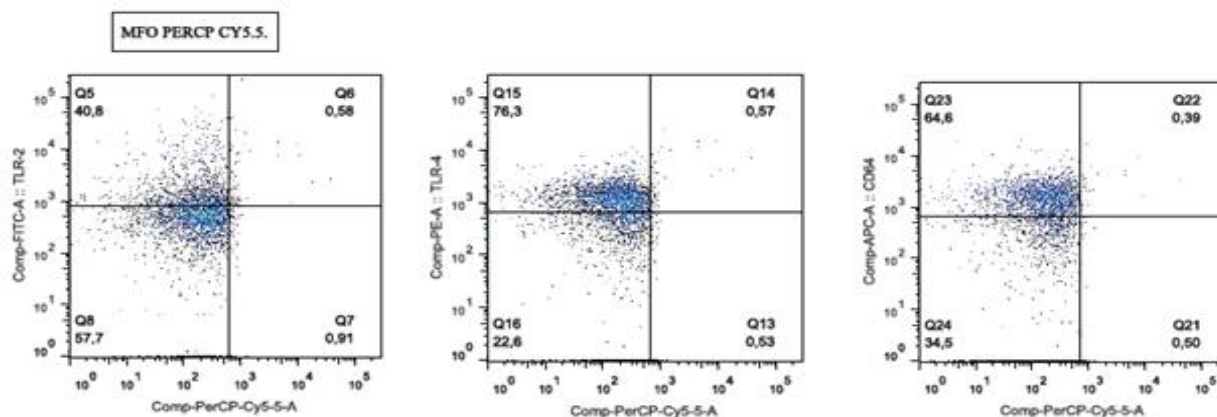


Figura 10. O *dotplot* à esquerda mostra o marcador CD14 sem positividade para o canal do FITC (Q6); o *dotplot* ao centro mostra o marcador CD14 sem expressão no canal para PE (Q14), o *dotplot* à direita mostra o marcador CD14 sem expressão no canal para APC (Q22).

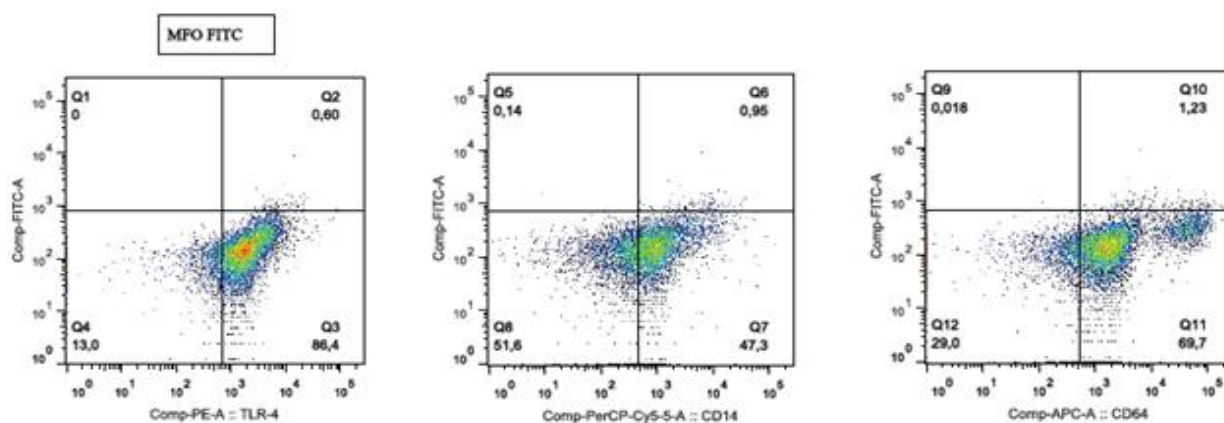


Figura 11. O *dotplot* à esquerda mostra o marcador TLR2 sem positividade para o canal do PE (Q2); o *dotplot* ao centro mostra o marcador TLR2 sem positividade para o canal do PerCP-Cy5.5 (Q6);, o *dotplot* à direita mostra o marcador TLR2 sem positividade para o canal do APC (Q10).

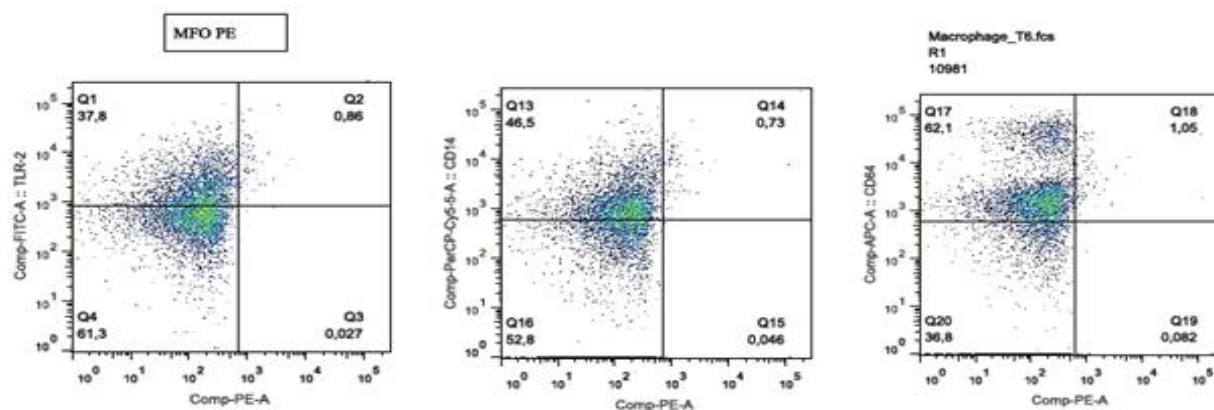


Figura 12. O *dotplot* à esquerda mostra o marcador TLR4 sem positividade para o canal do FITC (Q2); o *dotplot* ao centro mostra o marcador TLR4 sem positividade para o canal do PerCP-Cy5.5 (Q14); o *dotplot* à direita mostra o marcador TLR4 sem positividade para o canal do APC (Q18).

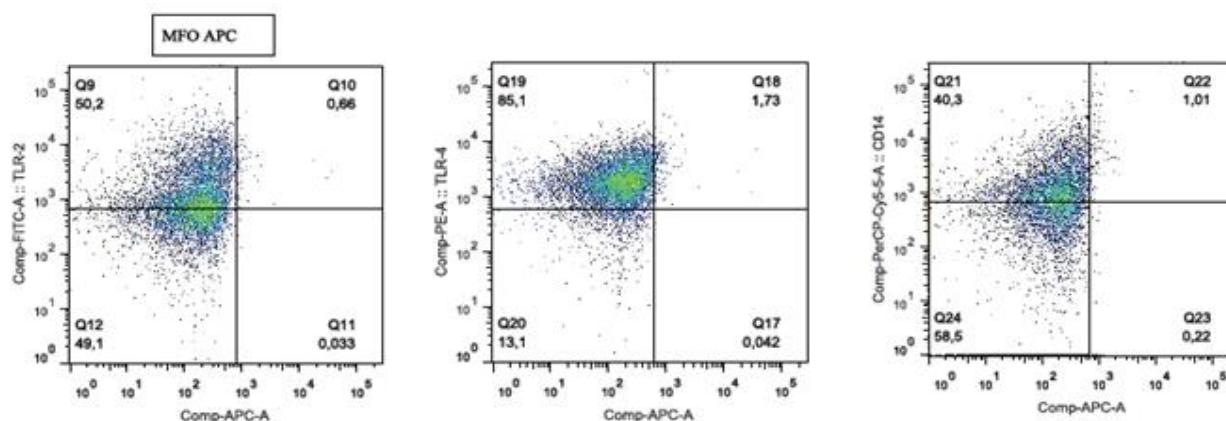


Figura 13. O *dotplot* à esquerda mostra o marcador CD64 sem positividade para o canal do FITC(Q10); o *dotplot* ao centro mostra o marcador CD64 sem positividade para o canal do PE (Q18); o *dotplot* à direita mostra o marcador CD64 sem positividade para o canal do PerCP-Cy5.5 (Q22).

A expressão da média de intensidade de fluorescência (MFI) e a percentagem de macrófagos peritoneais CD14⁺ que expressam o receptor TLR2 não apresentaram diferença entre o T0 e o T1-Y, assim como não houve diferença entre o T0 *versus* T2-Y (figuras 14 e 15).

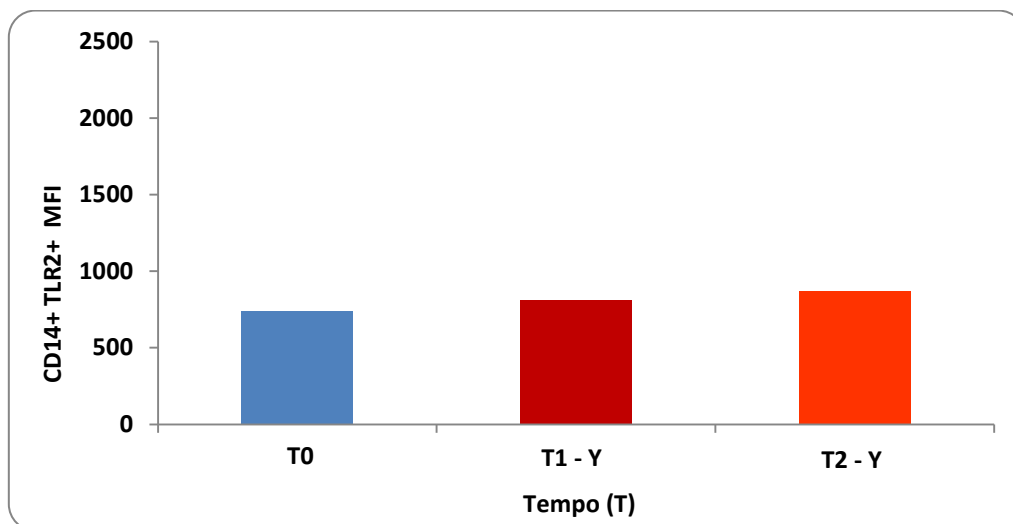


Figura 14. Expressão da média de intensidade de fluorescência de TLR2 em macrófagos peritoneais CD14⁺ nos tempos 0, 1 e 2 da infecção pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. T0 vs T1-Y, $p = 0,511$; T0 vs T2-Y, $p = 0,775$. Anova.

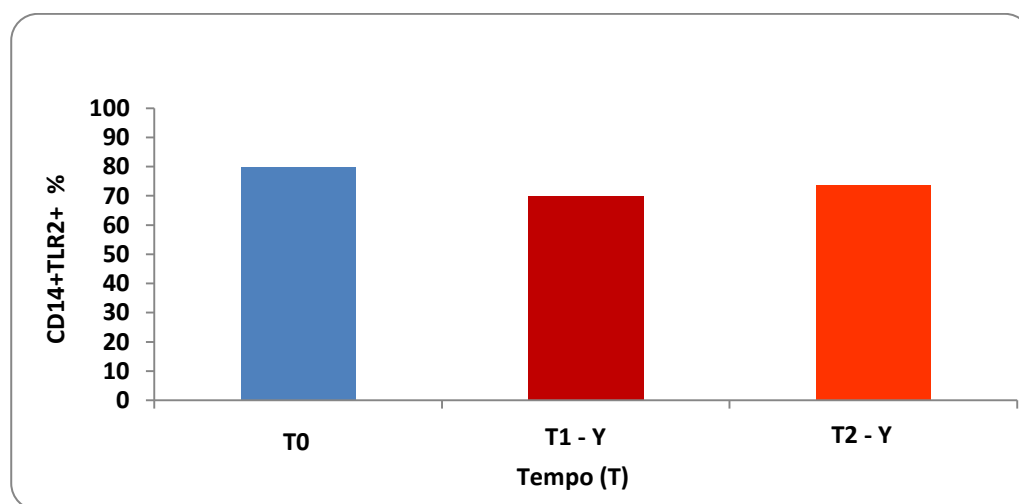


Figura 15. Percentagem de macrófagos peritoneais CD14⁺ que expressam TLR2 nos tempos 0, 1 e 2 da infecção cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. T0 vs T1-Y, $p = 0,672$; T0 vs T2-Y, $p = 0,328$. Anova.

A expressão da média de intensidade de fluorescência (MFI) e a percentagem de macrófagos peritoneais CD14⁺ que expressam o receptor TLR4 não apresentaram diferença entre o T0 e o T1-Y, assim como não houve diferença entre o T0 *versus* T2-Y (figuras 16 e 17).

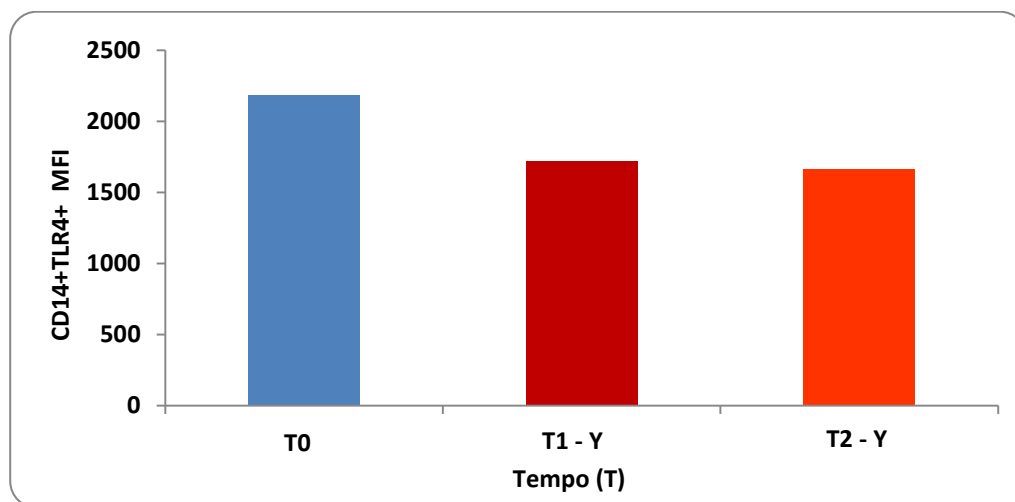


Figura 16. Expressão da média de intensidade de fluorescência em macrófagos peritoneais CD14⁺ para o receptor TLR4 nos tempos 0, 1 e 2 da infecção pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. T0 vs T1-Y, $p = 0,203$; T0 vs T2-Y, $p = 0,897$. Anova.

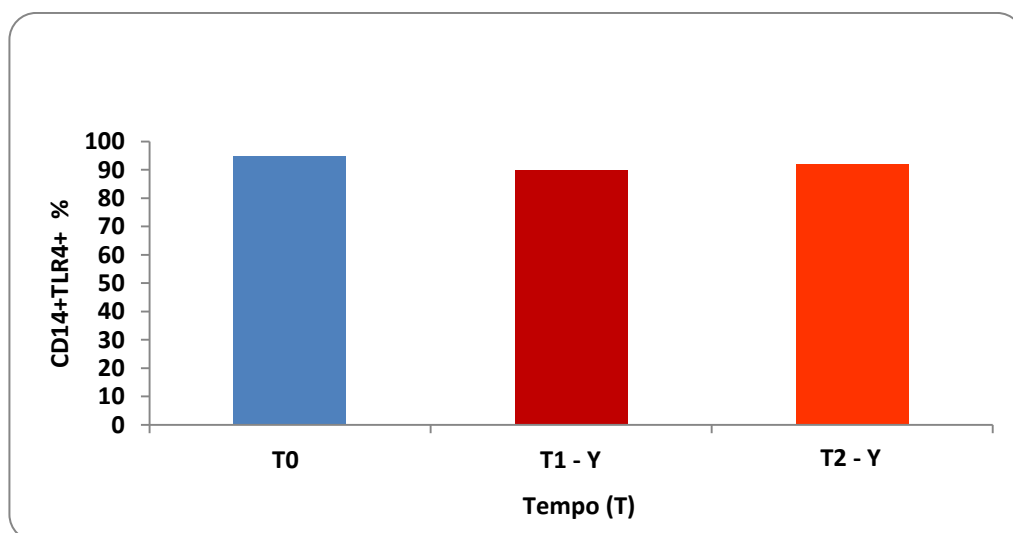


Figura 17. Percentagem de macrófagos peritoneais CD14⁺ que expressam TLR4 em camundongos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* nos tempos 0, 1 e 2. T0 vs T1-Y, $p = 0,627$; T0 vs T2-Y, $p = 0,777$. Anova.

A expressão da média de intensidade de fluorescência (MFI) e a percentagem de macrófagos peritoneais CD14⁺ que expressam o receptor CD64 não apresentaram diferença entre o T0 e o T1-Y, assim como não houve diferença entre o T0 *versus* T2-Y (figuras 18 e 19).

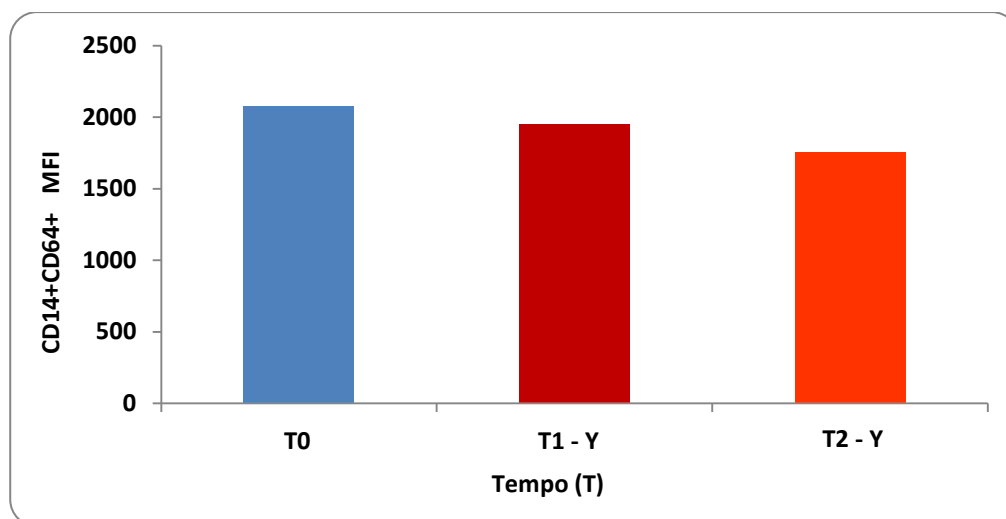


Figura 18. Expressão da MFI de macrófagos peritoneais CD14⁺ para o receptor CD64 nos tempos 0, 1 e 2 da infecção pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. T0 vs T1-Y, $p = 0,527$; T0 vs T2-Y, $p = 0,204$. Anova.

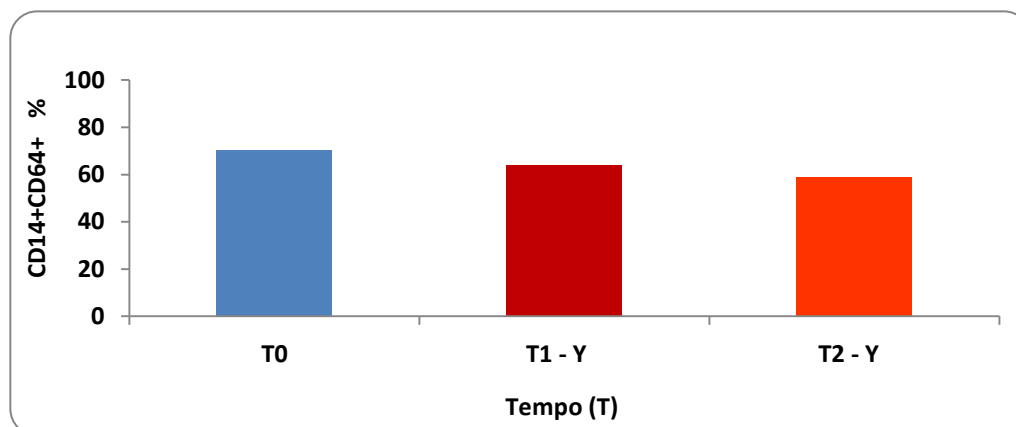


Figura 19. Percentagem de macrófagos peritoneais CD14⁺ que expressam CD64 nos tempos 0, 1 e 2 da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. T0 vs T1-Y, $p = 0,567$; T0 vs T2-Y, $p = 0,988$. Teste Anova.

A expressão dos marcadores de superfície TLR2, TLR4 e CD64 foram também determinadas na população de macrófagos peritoneais que apresentava F4/80+ no momento 2 da infecção pela cepa Y, visando comparar a expressão dos marcadores estudados na população de macrófagos F480+. Dessa maneira, observamos que a expressão da média de intensidade de fluorescência (MFI) e a percentagem de células F4/80+ que expressam o receptor TLR2 não apresentaram diferença significativa entre o T2-Y e o T0 (figuras 20 e 21).

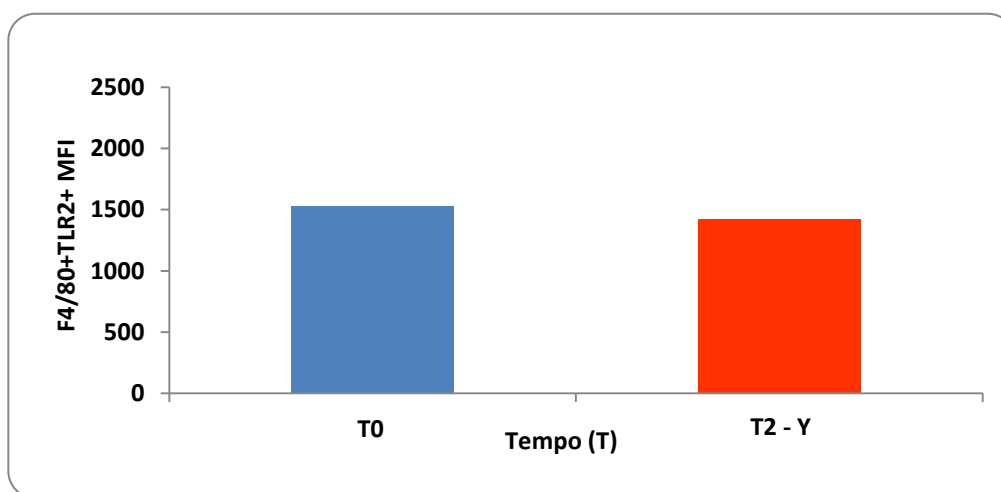


Figura 20. Expressão da média da intensidade de fluorescência de TLR2 em macrófagos peritoneais F4/80+ no tempo 2 da infecção pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. T0 vs T2-Y, $p = 0,489$, Test t de Student.

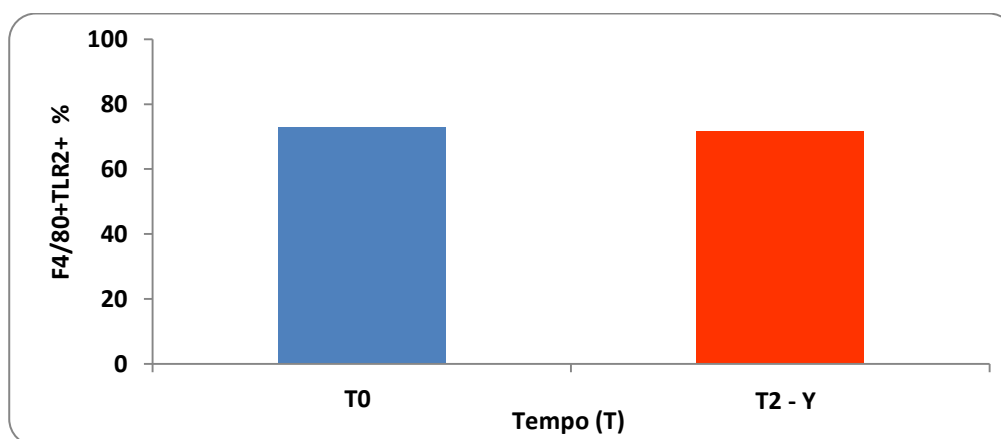


Figura 21. Percentagem de macrófagos peritoneais F4/80+ que expressam TLR2 no tempo 2 da infecção cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. T0 vs T2-Y, $p = 0,824$. Teste t de Student.

A expressão da média de intensidade de fluorescência (MFI) e a percentagem de células F4/80+ que expressam o receptor TLR4 não apresentaram diferença significativa entre o T2-Y e o T0 (figuras 22 e 23)

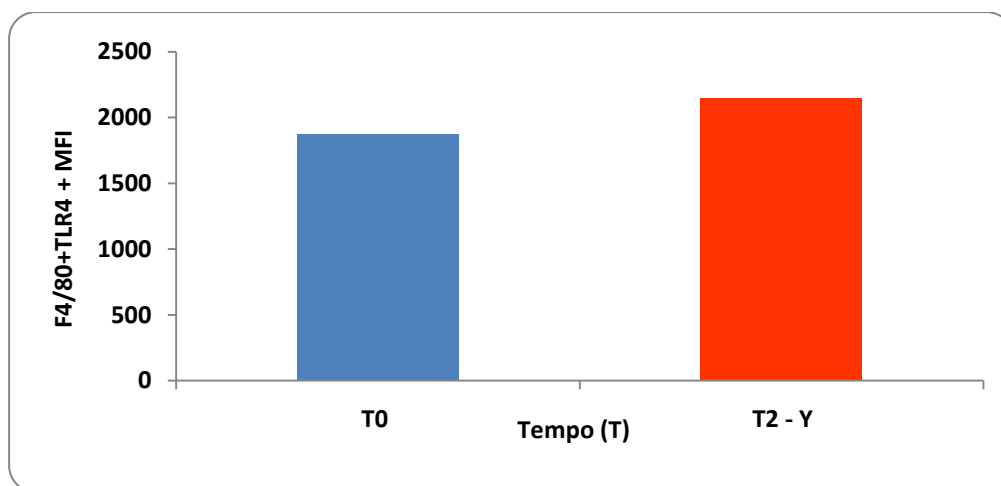


Figura 22. Expressão da média de intensidade de fluorescência em macrófagos peritoneais F4/80+ para o receptor TLR4 no tempo 2 da infecção pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. T0 vs T2-Y, $p = 0,263$. Teste t de Student.

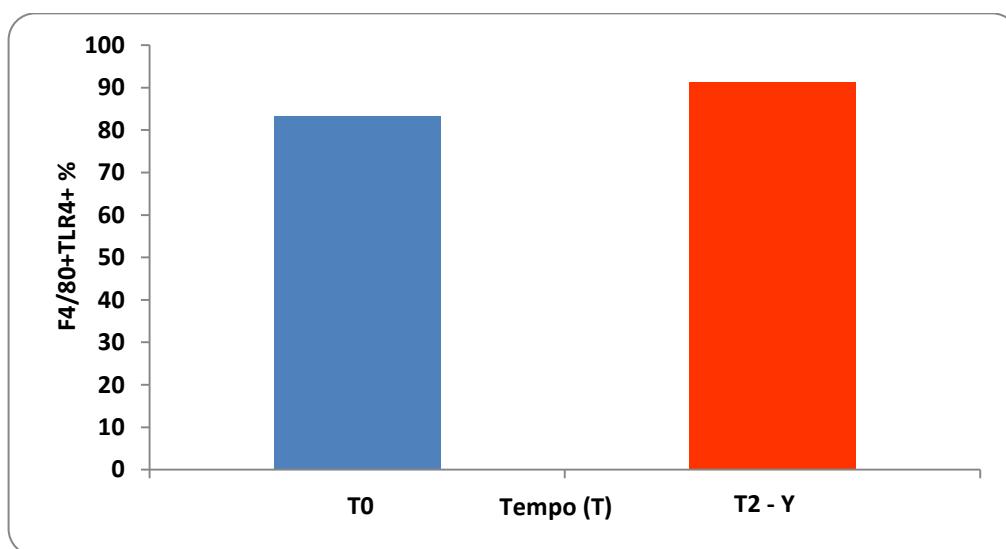


Figura 23. Percentagem de macrófagos peritoneais CD14+ que expressam TLR4 em camundongos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* no tempo 2. T0 vs T2-Y, $p = 0,107$. Teste t de Student.

A expressão da média de intensidade de fluorescência (MFI) e a percentagem de células F4/80+ que expressam o receptor CD64 não apresentaram diferença significativa entre o T2-Y e o T0 (figuras 24 e 25).

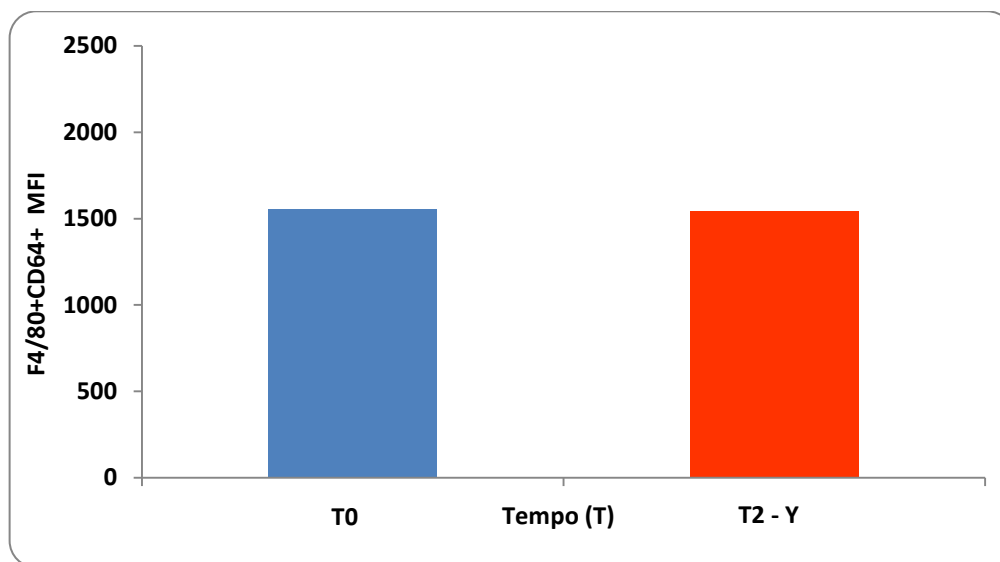


Figura 24. Expressão da MFI de macrófagos peritoneais F4/80+ para o receptor CD64 no tempo 2 da infecção pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Mt0 vs Mt2-Y, $p = 0,951$. Teste t de Student.

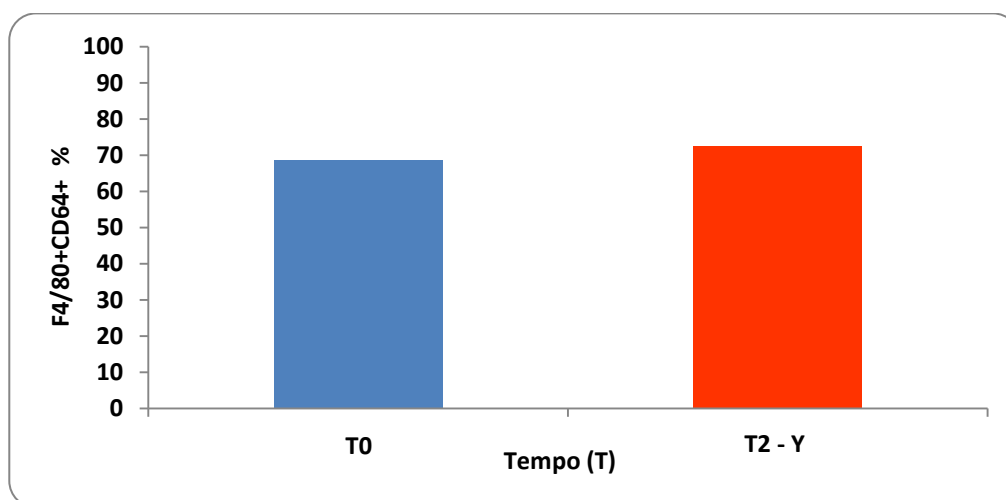


Figura 25. Percentagem de macrófagos peritoneais F4/80+ que expressam CD64 no tempo 2 da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Mt0 vs Mt2-Y, $p = 0,398$. Teste t de Student.

4.3. Expressão de marcadores de superfície para M1 entre as Cepas Y e JLP

4.3.1. Quantificação de mRNA para TLR2, TLR4 e CD64

A quantificação de mRNA dos receptores em baço foi verificada entre cepas somente no tempo 2 ou pico da parasitemia. A expressão de TLR2 no baço dos camundongos não diferiu entre as cepas Y e JLP (figura 26).

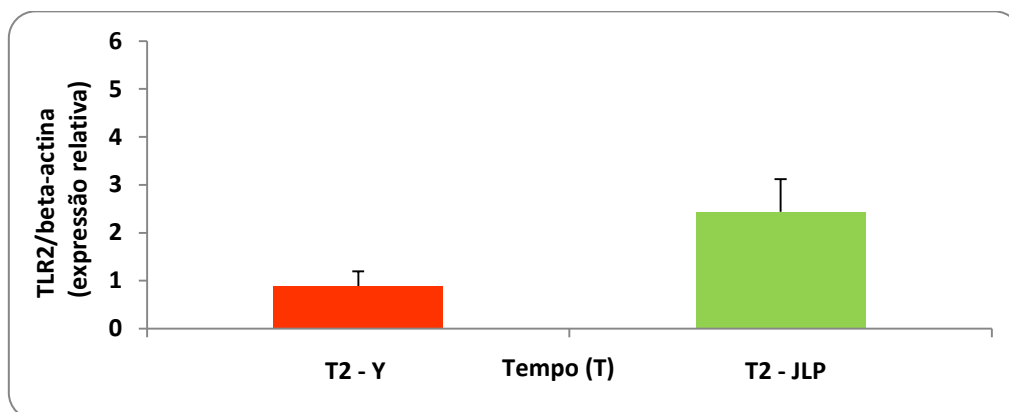


Figura 26. Expressão gênica de TLR2 entre as cepas Y e JLP. T2-Y vs T2-JLP, $p = 0,08$. Teste t de Student.

A expressão gênica de TLR4 no baço dos camundongos não apresentou diferença significativa entre as cepas Y e JLP no tempo 2 (figura 27).

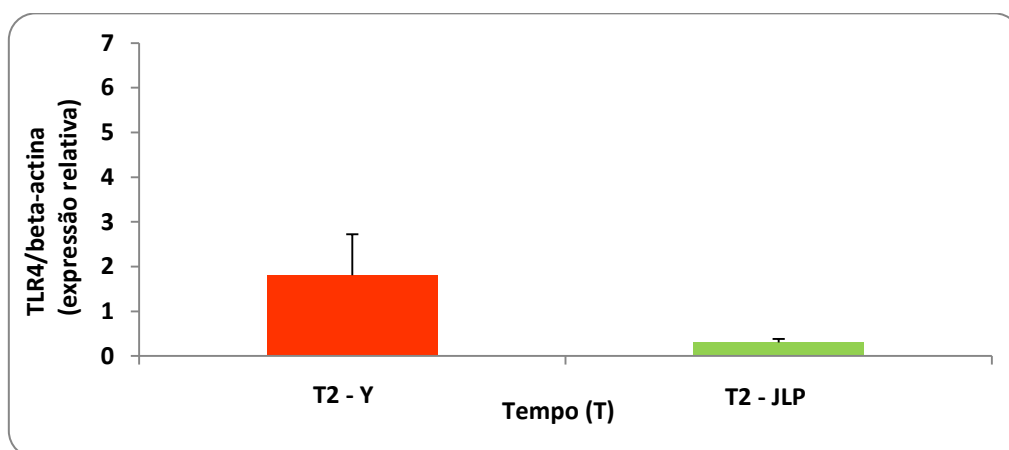


Figura 27. Expressão gênica de TLR4 entre as cepas Y e JLP. T2-Y vs T2-JLP, $p = 0,103$. Teste t de Student.

A quantificação do mRNA gênica de CD64 no baço dos camundongos não apresentou diferença significativa entre as cepas Y e JLP no tempo 2 (figura 28).

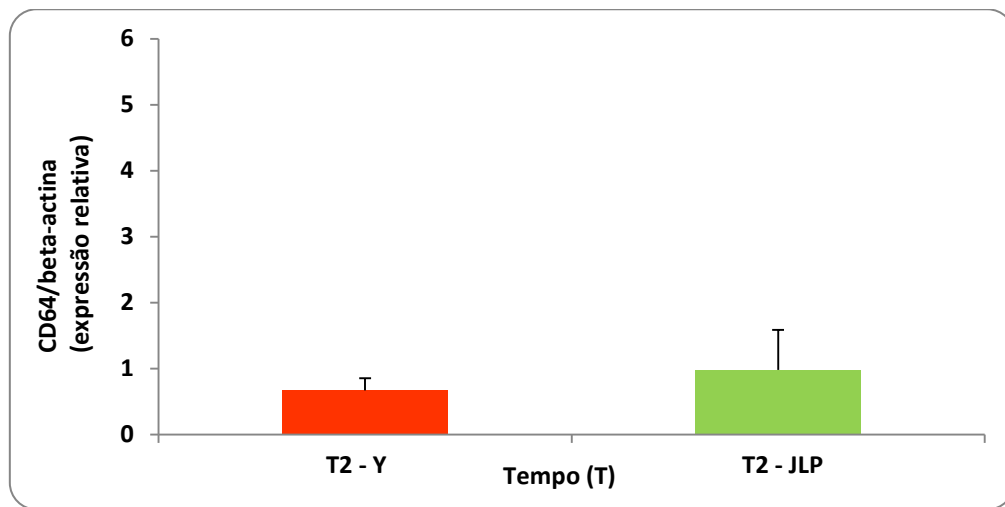


Figura 28. Expressão gênica de CD4 entre as cepas Y e JLP. T2-Y vs T2-JLP, $p = 0,653$. Teste t de Student.

4.3.2. Determinação de TLR2, TLR4 e CD64 por citometria de fluxo em macrófagos CD14+

A expressão da média de intensidade de fluorescência (MFI) e a percentagem de células CD14+ que expressam o receptor TLR2 apresentaram diferença significativa entre as cepas Y e JLP no tempo 2 (figuras 29 e 30).

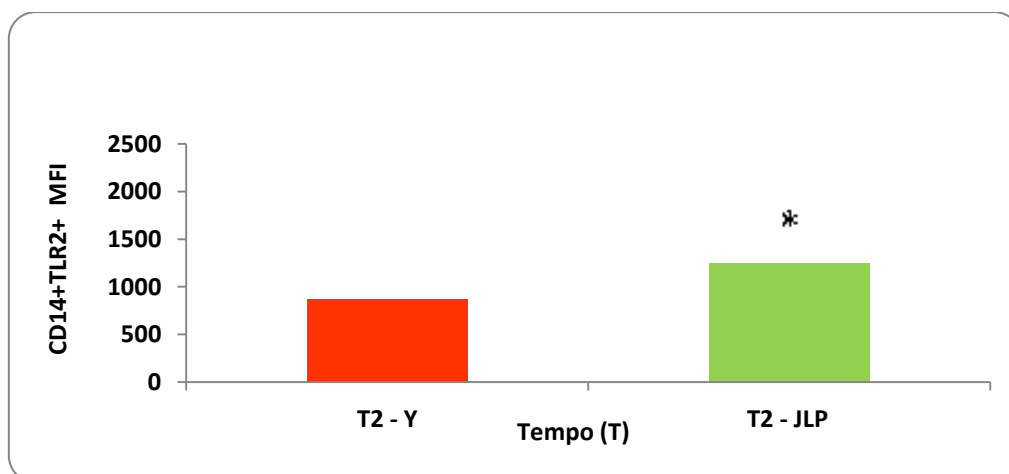


Figura 29. Expressão de média de intensidade de fluorescência de TLR2 entre as cepas Y e JLP. * T2-Y vs T2-JLP, $p = 0,03$. Teste t de Student.

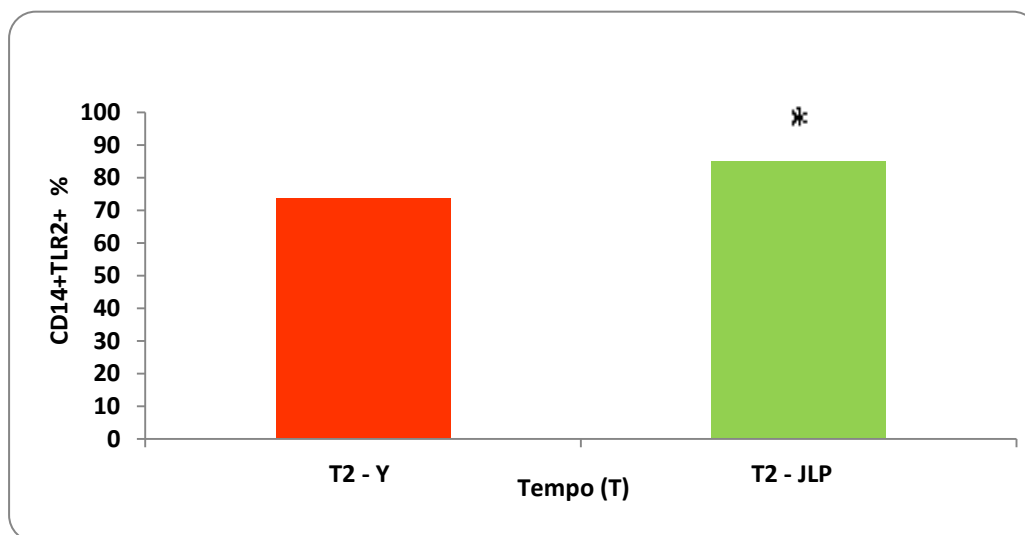


Figura 30. Percentagem de células que expressam TLR2 entre as cepas Y e JLP. * T2-Y vs T2-JLP, $p = 0,033$. Teste t de Student.

A expressão da média de intensidade de fluorescência (MFI) e a percentagem de células CD14⁺ que expressam o receptor TLR4 não diferiram entre as cepas Y e JLP no tempo 2 (figuras 31 e 32).

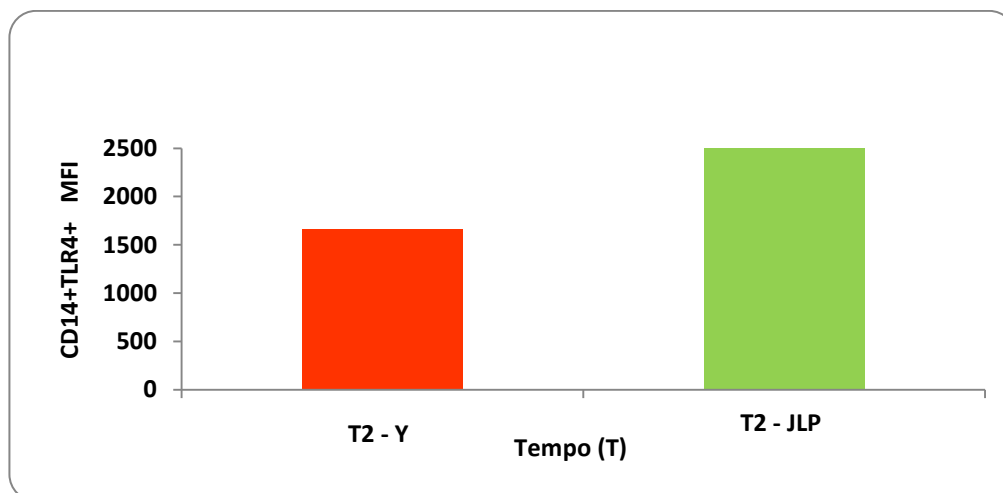


Figura 31. Expressão de média de intensidade de fluorescência de TLR4 entre as cepas Y e JLP. T2-Y vs T2-JLP, $p = 0,388$. Teste t de Student.

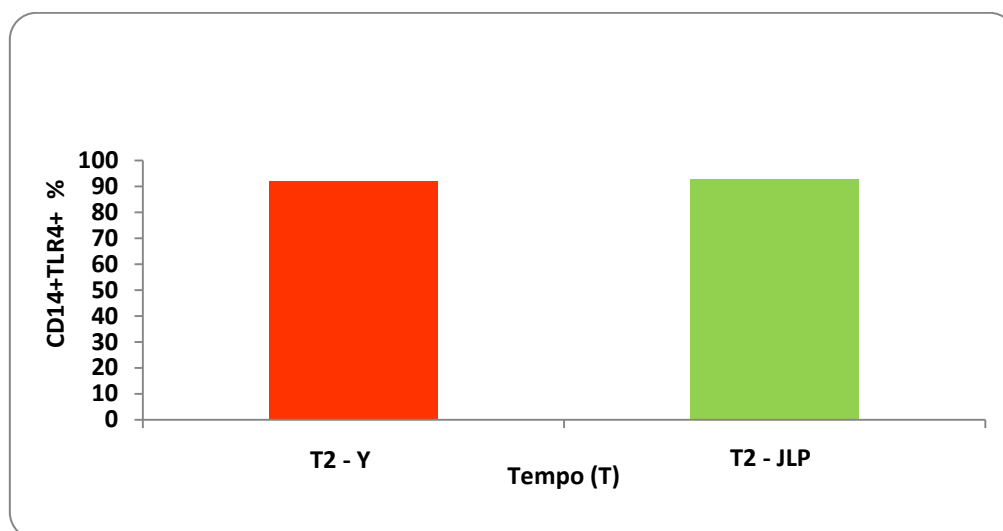


Figura 32. Percentagem de células que expressam TLR4 entre as cepas Y e JLP. Mt2-Y vs Mt2-JLP, $P = 0,388$. Teste t de Student.

A expressão da média de intensidade de fluorescência (MFI) e a percentagem de células CD14+ que expressam o receptor CD64 não diferiram entre as cepas Y e JLP no tempo 2 (figuras 33 e 34).

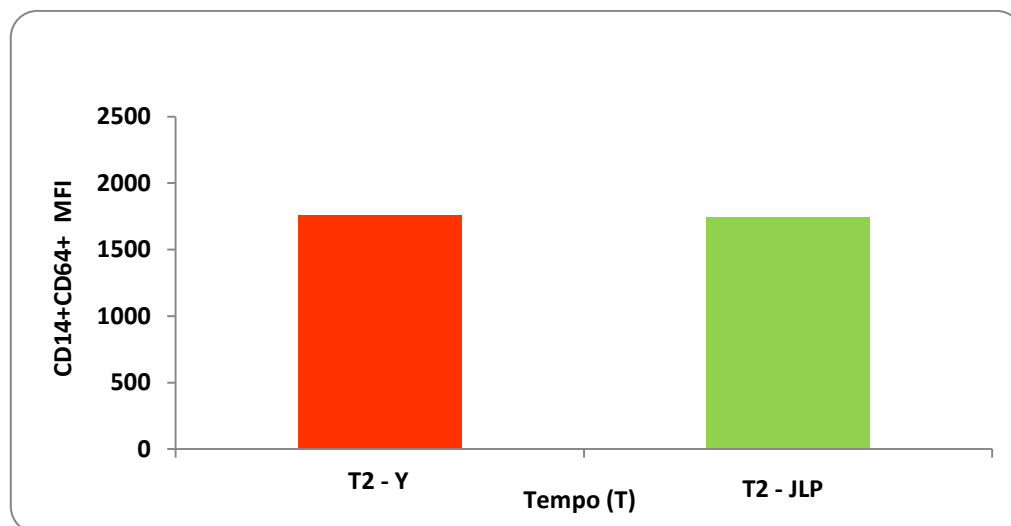


Figura 33. Expressão da média de intensidade de fluorescência de CD64 entre as cepas Y e JLP. T2-Y vs T2-JLP, $p = 0,247$. Teste t de Student.

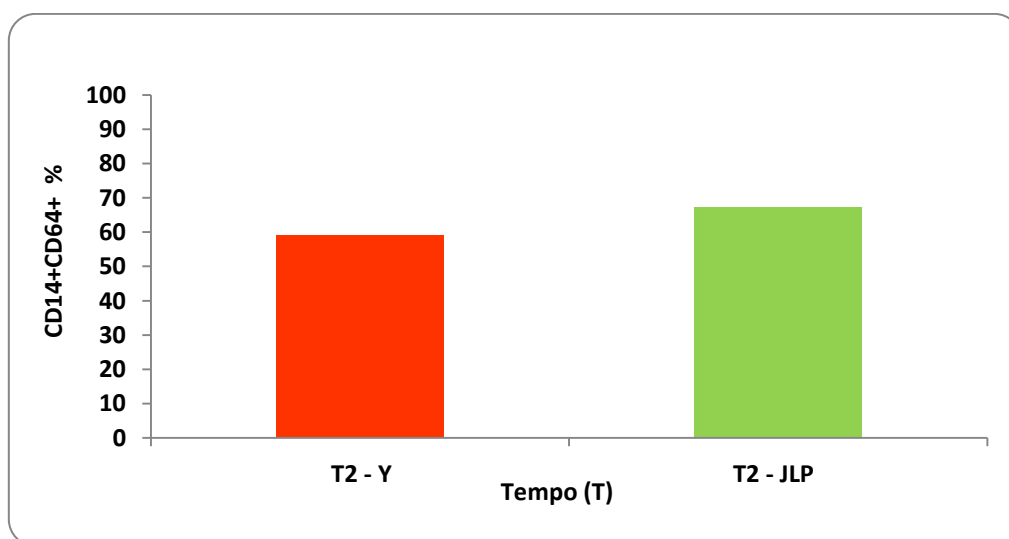


Figura 34. Porcentagem de células que expressam CD64 entre as cepas Y e JLP. T2-Y vs T2-JLP, $P = 0,540$. Teste t de Student.

5. DISCUSSÃO

Os macrófagos são frequentemente citados em mecanismos de eliminação do *Trypanosoma cruzi*. Estas células possuem capacidade para apresentar perfis distintos, M1 ou M2, os quais se manifestam durante a interação parasita-hospedeiro e pelo microambiente no qual se encontram os macrófagos^{44,45}.

O perfil M1 em BALB/c infectados com *Trypanosoma cruzi* foi pouco expresso, porém alguns marcadores foram observados. A baixa expressão destes marcadores do perfil M1 pode ser devido a linhagem de camundongos utilizados no estudo. As linhagens de camundongos frequentemente utilizadas como modelo experimental para infecção pelo *Trypanosoma cruzi* são C57BL/6, BALB/c e C3H/He. O C57BL/6 demonstra maior resistência à infecção⁴⁶ distintamente da linhagem BALB/c que apresenta maior suscetibilidade à infecção por cepas de baixa virulência, demonstrando ser um bom modelo para o estudo da Doença de Chagas. A infecção desenvolvida nesses animais é de aspecto grave e evolução rápida; enquanto que a infecção desenvolvida pela linhagem C57BL/6 necessita de nova estimulação/desafio para avaliação posterior⁴⁷.

Camundongos BALB/c infectados com *T. congolense* evoluem para óbito em um período de oito dias de infecção, enquanto os camundongos C56BL/6 mostram resistência ao parasita e a sobrevivência se estende por um período de cinco meses, sendo possível detectar tripomastigotas no sangue. Na infecção por *T. congolense* é possível detectar precocemente o perfil Th1, com produção de IFN-gama e TNF- α , sugerindo a presença de macrófagos M1 neste momento. Já em estágios tardios da infecção ocorre produção de citocinas de perfil Th2, como IL-4, IL-10 e IL-13 observada em cultura de células de linfonodos, células esplênicas e cultura de monócitos de sangue periférico. Assim, os camundongos BALB/c são suscetíveis ao *T. congolense* e capazes de montar uma resposta inflamatória e perfil Th1 frente aos estímulos do *T. congolense*⁴⁸. Além disso, durante o processo infeccioso, os macrófagos do baço do BALB/c secretam menor quantidade de nitrito em relação ao camundongo C57BL/6. Essa diminuição da produção de óxido nítrico pode contribuir para a persistência do processo infeccioso, reforçando a característica de suscetibilidade dos camundongos BALB/c frente a este agente infeccioso⁴⁹, fazendo com que estes animais sejam utilizados com mais frequência para os estudos que contemplam infecções graves. Assim, é possível que os camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi* apresentem em alguns momentos o perfil

M1 transitório ou com presença de perfil M1 em curto período ou perfil misto de macrófagos M1 e M2 com maior frequência.

Outro ponto que deve ser considerado é a carga de parasitas ou inóculo inicial utilizado na infecção. O inóculo utilizado para a infecção em nosso estudo foi 1×10^4 trypomastigotas por mL, tanto para a cepa Y (pico de parasitemia de 7 dias) como para a JLP (pico de 15 dias). A carga parasitária escolhida dependeu da capacidade de estimulação do parasita para propiciar a expressão de receptores TLR2, TLR4 e CD64 na população de macrófagos CD 14. A parasitemia pós 3 dias de infecção foi de 3 a 4×10^4 tripomastigotas, quantidade superior aos achados de outros estudos, garantindo que os animais desenvolvessem uma infecção aguda e grave.

A sobrevida destes animais foi entre 15 a 18 dias, reforçando a suscetibilidade do BALB/c à infecção e sua capacidade de desenvolver uma resposta aguda e precoce. Entretanto, após este período os animais sucumbiam a doença, o que impossibilitava a avaliação. Outros trabalhos utilizando camundongos de mesma linhagem têm descrito sobrevida de 30 dias com inóculo de infecção de 1×10^3 trypomastigotas da cepa Y^{50,21}. A sobrevida dos animais depende do inóculo, suscetibilidade do hospedeiro e tipo de cepa.

O papel da resposta imune inata no combate ao *Trypanosoma cruzi* inclui mecanismos relacionados à detecção e destruição do parasita por macrófagos e células dendríticas. A ativação destas células é fundamental para a destruição do parasita devido a sua capacidade de produção de metabólitos do oxigênio, nitrogênio e citocinas. Estas células constituem uma ponte entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. As citocinas e seus receptores fazem com que esses tipos celulares tenham papel na apresentação de antígenos para posterior ativação da resposta imune adaptativa⁵¹.

De acordo com Wang et al. (2013), os macrófagos de origem tecidual ou peritoniais apresentam maior plasticidade, respondendo melhor ao estímulo pró-inflamatório produzido pela presença das formas tripomastigotas e seus antígenos no camundongo (Este relato nos estimulou a utilizar macrófagos peritoniais no presente trabalho). Wang et al. (2013) ao comparar o nível de produção de citocinas por macrófagos peritoniais, baço e medula óssea demonstraram que a medula óssea produz maiores níveis de IL-10 e TGF-beta em relação aos peritoniais e de baço; este, por sua vez, produz níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatória, como IL-6, IL-12 e TNF- α em relação aos macrófagos peritoniais e medula óssea. Por esta razão utilizamos

células de baço para detectar a expressão de marcador de superfície de perfil M1 por PCR em tempo real e macrófagos peritoneais para a determinação de moléculas de superfície por citometria de fluxo.

Os macrófagos são as células mais frequentemente encontradas na cavidade peritoneal. Esta fonte celular é frequentemente utilizada em experimentos que contemplam aspectos imunológicos voltados para a resposta de macrófagos. Um ponto favorável para o uso de macrófagos desta cavidade é diminuir as etapas dos processos de purificação de subpopulações celulares, visto que a cavidade peritoneal possui em sua grande maioria macrófagos e linfócitos. Os macrófagos peritoneais estudados nos modelos experimentais de *T.cruzi* são a população de macrófagos F4/80⁴⁷, porém existem poucas abordagens sobre os macrófagos CD14⁺ de peritônio nas infecções por *Trypanosoma*. Os macrófagos CD14⁺ são estudados em infecções por *Listeria monocytogene*; esta molécula trabalha com TLR2 para o controle da infecção por *L. monocytogenes*⁵³; assim, a análise destes macrófagos obtidos da cavidade peritoneal para avaliação de macrófagos CD14⁺ constitui um procedimento bastante interessante a ser adotado. Os macrófagos peritoneais foram utilizados para avaliar os marcadores de superfície TLR2, TLR4 e CD64, apesar de produzirem menor quantidade de citocinas pro e antiinflamatórias, quando comparados com a medula óssea e baço. Por este motivo, estes macrófagos não foram alvo para a avaliação dos níveis de citocinas. Entretanto, o peritônio e seus macrófagos são fontes acessíveis para a obtenção de macrófagos e útil na avaliação da expressão dos marcadores de superfície do perfil M1 por citometria de fluxo⁵².

Entre os diferentes marcadores de superfície de macrófagos estudados, ênfase especial tem sido dada aos TLRs. Os camundongos apresentam 11 tipos de TLRs, os quais são expressos em diversas situações de infecção ou inflamação. Ainda em relação aos marcadores de superfície utilizados, é aceito que os TLRs possuem diferentes agonistas oriundos de patógenos, como LPS, peptidoglicanos, açúcares conjugados à proteínas, etc. *In vitro* foi encontrado que certos TLRs podem agir sinergicamente em resposta aos estímulos infecciosos. Em relação ao *T. cruzi*, foram encontrados diferentes componentes do parasita capazes de ativar os TLRs em células dendríticas e macrófagos. As moléculas de GPI ancoradas com glicoproteínas semelhantes a mucinas, presentes da membrana (tGPI) do *T. cruzi*, iniciam a resposta inflamatória através da ativação de TLR2, bem como o glicoinositolfosfolípido (GIPL) isolado de formas epimastigotas (não infectante) de *T.cruzi*¹⁹. Tarleton (2007) menciona em seu trabalho

que o GIPL das formas epimastigota interage com TLR4, o que poderia reforçar o fato de não ter ocorrido uma expressão significativa deste marcador, visto que a forma utilizada no estudo foi a tripomastigota, e não a epimastigota.

Um estudo utilizando células de ovário de hamster e abordando quantificação da expressão de TLR2 e CD14 revelaram que a GPI derivada de *T.cruzi* induz ativação de NF- κ B, utilizando a via do TLR2. Esta indução de TLR2 está relacionada com a proteína Tc52 liberada pelo *T.cruzi*. Outros achados confirmam o papel fundamental do TLR2 frente aos antígenos do *T.cruzi*, macrófagos deficientes de TLR2 não são estimulados após desafio com as moléculas de GPI do *T.cruzi*, embora haja ativação de TLR2 contra as GPIs de outros parasitas, sugerindo que os TLR2 interagem especificamente com componentes da GPI do *T.cruzi*, e não de outros parasitas. Assim, camundongos "knockout" para TLR2 e TLR9 em outros estudos mostraram maior suscetibilidade à infecção pelo *T.cruzi* com parasitemia aumentada. Por outro lado, em células deficientes de TLR4 houve produção normal de citocinas pro-inflamatória e NO. Estes achados sugerem que o TLR4 não participa com muita efetividade na eliminação deste parasita⁵⁴.

De acordo com Janot et al. (2008), o marcador CD14 age juntamente com TLR2 para aumentar a eficiência da resposta imune contra *Listeria*, bactéria intracelular. Neste estudo, foi discutido que macrófagos deficientes em CD14 tem uma redução na resposta pro-inflamatória e redução na produção de óxido nítrico e camundongos deficientes para CD14 exibem resistência diminuída à infecção por *Listeria*, semelhantemente para animais deficientes apenas para TLR2 ou para TLR2 e TLR4. Este fato ilustra a importância do CD14 na eliminação de patógenos intracelulares, como ocorre na Doença de Chagas. Por este motivo, o marcador CD14 foi escolhido como marcador de macrófagos para este estudo. A utilização do CD14 é feita frequentemente para avaliações de monócitos de sangue periférico, porém os macrófagos peritoneais podem ser alvos para avaliar a atividade de CD14, apesar do marcador F4/80 ser o mais utilizado para mapear macrófagos em peritônio.

No presente trabalho, encontramos aumento da média de intensidade de fluorescência e porcentagem de TLR2 em camundongos infectados pela cepa JLP no tempo 2 (T2) da infecção. A cepa JLP induziu maior expressão de TLR2 quando comparado à cepa Y; isto possivelmente deve ter ocorrido devido a melhor condição imunológica e menor virulência da cepa. A cepa Y é capaz de induzir supressão e propiciar diminuição de vários receptores e possivelmente dos TLRs.

A avaliação de perfil M1 em infecção por *T.cruzi* utilizando os receptores elencados neste estudo não foi capaz de detectar o perfil proposto. Possivelmente o perfil M1 se expressa somente nos primeiros dias de infecção, ou seja, entre o tempo pós-inoculação e o período de 48 horas. Este período de 48 horas não foi avaliado, e o perfil M1 não foi detectado no 3º e 5º dia de infecção pela cepa Y. Estes tempos foram escolhidos conforme a pico de parasitemia de 7 dias que correspondiam aos momentos precoces da infecção e que antecederiam o pico da parasitemia - mesmo assim não detectamos o perfil M1.

Outros aspectos, além da cepa, inóculo, modelo e período de avaliação devem ser considerados na quantificação deste perfil. Um deles é a utilização de ferramentas analíticas capazes de mensurar a expressão dos receptores associados a M1 e suas citocinas. A determinação do perfil também pode sofrer interferência da ferramenta de análise. A PCR em tempo real foi capaz de medir aumento de expressão para CD64 no T1 da cepa Y, momento precoce da infecção e possivelmente com grande quantidade de antígenos e parasitas circulantes. Tamoutounour et al (2012) sugerem que o CD64 é útil para a distinção de populações de macrófagos em reação à população de células dendríticas, demonstrado tanto no intestino de camundongos como de humanos. O CD64 tem sido utilizado no diagnóstico diferencial de sepse de origem bacteriana e revelado sua importância na ativação de macrófagos e formação de "trapping" para larvas de helmintos⁵⁶. A importância deste receptor tem sido descrita em pacientes com malária e quantidades elevadas de imunocomplexos. A razão da expressão de CD64/Fc-gama-RIIB (inibitório) e Fc-gama-IIIa (estimulatório) / Fc-gama-RIIB (inibitório) influencia a magnitude de citocinas produzidas por monócitos ativados por imunocomplexos e consequentemente, os níveis de produção de IgG durante o estágio precoce da malária, sugerindo que o CD64 tenha papel importante na ativação da resposta imune inata e patogênese da malária⁵⁷. Em relação à sepse, Groselj-Grenc et al. (2008) encontraram em seu estudo uma alta expressão de CD64 em neutrófilos de pacientes com síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e sepse em relação aos neutrófilos de pacientes que apresentavam apenas SIRS, reforçando a importância do CD64 nos processos infecciosos e inflamatórios.

Os marcadores e metodologias escolhidas não permitiram caracterizar de forma clara a presença de macrófagos M1 na fase aguda da infecção experimental por *T.cruzi*. Entretanto, os dados observados sugerem que este perfil parece ocorrer de maneira mista com o perfil M2 durante o processo infeccioso.

6. CONCLUSÃO

Os marcadores de superfície associados aos macrófagos do perfil M1 são pouco expressos ou podem apresentar uma expressão transitória na fase aguda da DC experimental. Em relação aos marcadores de superfície, a molécula CD64 foi o melhor marcador de M1 avaliado por PCR em tempo real, enquanto que o TLR2 foi o melhor marcador do perfil M1 avaliado por citometria de fluxo. Assim, há diferenças entre ferramentas para avaliação de perfil M1. O tipo de ferramenta de quantificação deve ser dirigida para o tipo de marcador avaliado. A PCR em tempo real é capaz de detectar moléculas e substâncias de baixa intensidade de expressão ou quantidade e a citometria detecta moléculas de superfície com expressão de média a elevada intensidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bern C, Kjos S, Yabsley MJ. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011;24(4):655–81.
2. Gascon J, Bern C, Pinazo, M.-J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica*. 2010;115(1-2):22–7.
3. Pereira PCM, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. 2013; 19(1):34.
4. Cortez J, Providência R, Ramos E, Valente C, Seixas J, Meruje M, Leitão-Marques A, Vieira A. Emerging and under-recognized Chagas cardiomyopathy in non-endemic countries. *World Journal of Cardiology*. 2012;4(7):234-9.
5. Perez-Molina JA, Perez-Ayala A, Parola P, Jackson Y, Odolini S, Lopez-Velez R. EuroTravNet: imported Chagas disease in nine European countries, 2008 to 2009. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles European Communicable Disease Bulletin*. 2011;16(37): 1–5.
6. Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious disease clinics of North America*. 2012;26(2): 275–91.
7. Batista AM, Aguiar C, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS, Costa SC. Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with megaesophagus. *International Journal of infectious diseases*. 2010;14(11): 974-7.
8. Neves DP, Melo AL, Linard PM, Vitor RWA. *Parasitologia humana*. 11^a edição. São Paulo: Atheneu; 2005.
9. Neto VA, Gryschek CB, Amato VS, Tuon FF. *Parasitologia: uma abordagem clínica*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
10. Ronco MT, Francés DE, Ingaramo PI, Quiroga AD, Alvarez ML, Pisani GB, Revelli SS. Tumor necrosis factor alpha induced by *Trypanosoma cruzi* infection mediates inflammation and cell death in the liver of infected mice. *Cytokine*. 2010; 49(1): 64–72.
11. Martins-Melo FR, Ramos AN, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Acta tropica*. 2013;130: 167–74.
12. Junqueira Junior LF. Challenges for improving quality of life in Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015;48(2):117-20.

13. Ponce NE, Cano RC, Carrera-Silva EA, Lima AP, Gea S, Aoki MP. Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection. *Medical microbiology and immunology*.2012; 201(2):145–55.
14. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Reports*. 2014;6: 13.
15. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*.2010; 32(5):593-604.
16. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004; 25(12):677-686.
17. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol*.2008;18(5):349-55.
18. Weitzel, T., Zulantay, I., Danquah, I., Hamann, L., Schumann, R-R, Apt, W, Mockenhaupt, FP. Mannose-binding lectin and Toll-like receptor polymorphisms and Chagas disease in Chile. *The American journal of tropical medicine and hygiene*.2012; 86(2):229–32.
19. Gravina HD, Antonelli L, Gazzinelli RT, Ropert C. Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*. *PloS one*.2013; 8(5):63100.
20. Almeida IC, Camargo M-M., Silva LS, Proco D-O, Mehlert A, Travassos LR, Ferguson MAJ. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *The EMBO Journal*.2000;19(7):1476–1485.
21. Silva RR, Shrestha-Bajracharya D, Almeida-Leite CM, Leite R, Bahia MT, Talvani A. Short-term therapy with simvastatin reduces inflammatory mediators and heart inflammation during the acute phase of experimental Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.2012;107(4) 513–21.
22. Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* .2009;104 Suppl 1: 246-51.
23. Esperandim VR, da Silva Ferreira D, Sousa Rezende KC, Cunha WR, Saraiva J, Bastos JK, Andrade E, Silva M-L. In vivo infection by *Trypanosoma cruzi*: a

morphometric study of tissue changes in mice. *Parasitology research*.2012;112(1):431-6.

24. Borges DC, Araújo NM, Cardoso C-R, Lazo Chica J-E. Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*.2013;138(2):145–56.

25. Abrahamsohn IA, Coffman R. Cytokine and Nitric Oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*.1995;155: 3955-63.

26. Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferongamma and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*. 2001;158: 1433-40.

27. Abrahamsohn IA. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Bras J Med Biol Res*.1998;31: 117-21.

28. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu Rev Immunol*.1994;12: 635-73.

29. Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*.1997;114:103-10.

30. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James S, Sher A. The microbicidal activity of interferon- γ treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur J Immunol*.1992;22: 2501-6.

31. Guedes PMM, Gutierrez FRS, Maia F-L, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLOS Neglected Trop Dis*.2010;16:4(2):e604.

32. Ribeiro M, Pereira-Chioccola VL, Rénia L, Augusto Fragata Filho A, Schenkman S, Rodrigues MM. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunol*.2000;22(1):49-53.

33. Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun*.2001;17(1): 99-107.

34. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J. Increased plasma levels of tumor necrosis factor- α in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.2003;98(3): 407-11.

35. Stijlemans B, Guillemins M, Raes G, Beschijn A, Magez S, Baetselier P. African trypanosomiasis: from immune escape and immunopathology to immune intervention. *Veterinary parasitology*.2007;148(1): 3–13.
36. Patil V, Zhao Y, Shah S, Fox B- A, Rommereim L M, Bzik D-J, Yap GS. Co-existence of classical and alternative activation programs in macrophages responding to *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*.2014;44(2):161–4.
37. Cunha-Neto E, Teixeira PC, Fonseca S-G, Bilate AM, Kalil J. Myocardial gene and protein expression profiles after autoimmune injury in Chagas' disease cardiomyopathy. *Autoimmunity Reviews*.2011;0(3):163-5.
38. Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *European Journal of Immunology*.1992;22(2):301-7.
39. Silva J-S, Twardzik DR, Reed SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *The journal of experimental medicine*.1991;174(3):539-45.
40. Holscher C, Mohrs M, Dai W-J, Kohler G, Ryffel B, Schaub G-A. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi* infected interleukin 10-deficient mice. *Infection and immunity*.2000;68(7):4075-83.
41. Hunter, CA, Slifer T. Interleukin-12-Mediated Resistance to *Trypanosoma cruzi* Is Dependent on Tumor Necrosis Factor Alpha and Gamma Interferon. *Infection and Immunity*.1996;64(7):2381–238.
42. Graefe SE, Jacobs T, Gaworski I, Klauenberg U, Steeg C, Fleischer B. Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice. *Microbs Infect*.2003;5(10):833-9.
43. Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, Bortoluci KR, Almeida SR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(6):2568-73.
44. Varin A, Gordon S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology*. 2009;214:630-41.
45. 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.

46. Antoine-Moussiaux N, Magez S, Desmecht D. Contributions of experimental mouse models to the understanding of African trypanosomiasis. *Trends in Parasitology*.2008; 24(9):411–8.
47. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G, Sher A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology* 1994;153(6):2533-43.
48. Baetselier PD, Namangala B, Noël W, Brys L, Pays E, Beschin A. Alternative versus classical macrophage activation during experimental African trypanosomiasis. *International Journal for Parasitology*. 2001;31(5-6):575–587.
49. Savino W, Villa-Verde DMS, Mendes-da-Cruz DA, Silva-Monteiro E, Perez AR, Aoki MDP, Gea S. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*.2007;18(1-2): 107–24.
50. Bafica A, Santiago H-C, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli R-T, Sher A. Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Immunology*.2006;177(6): 3515–3519.
51. Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Current Opinion in Immunology*.2007;19(4):430–4.
52. Wang C, Yu X, Cao Q, Wang Y, Zheng G, Tan TK, Harris DC. Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunology* 2013;14(1):6.
53. Janot L, Secher T, Torres D, Maillet I, Pfeilschifter J, Quesniaux VFJ, Erard F. CD14 works with toll-like receptor 2 to contribute to recognition and control of *Listeria monocytogenes* infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008;198(1):115–24.
54. Kayama H, Takeda K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes and Infection*. Institut Pasteur. 2010;12(7):511–7.
55. Tamoutounour S, Henri S, Lelouard H, Bovis B, Haar C, Van der Woude C-J,Guilliams M. CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *European Journal of Immunology*.2012;42(12):3150–66.
56. Esser-von Bieren J, Volpe B, Kulagin M, Sutherland DB, Guiet R, Seitz A, Marsland B-J, Verbeek JS, Harris N-L. Antibody-mediated trapping of helminth larvae requires CD11b and Fc γ receptor I. *Journal of Immunology*.2015;194(3):1154-63.

57. Hirako IC, Gallego-marin C, Ataide M-A, Andrade WA, Gravina H, Rocha BC. DNA-Containing Immunocomplexes Promote Inflammasome Assembly and Release of Pyrogenic Cytokines by CD14⁺ CD16⁺ CD64^{high} CD32^{low} Inflammatory Monocytes from Malaria Patients . MBio.2015; 6(6):1–11.
58. Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. Mediators of Inflammation. 2008;202646.

ANEXO 1 - Citometria de Fluxo

Padronização dos marcadores CD14, TLR2, TLR4 e seus respectivos controles isotipos

As figuras 35, 36, 37 e 38 mostram a padronização para os marcadores CD14, TLR2, TLR4 e CD64 respectivamente, mostrando a sobreposição de fluorescência com o respectivo controle isotipo.

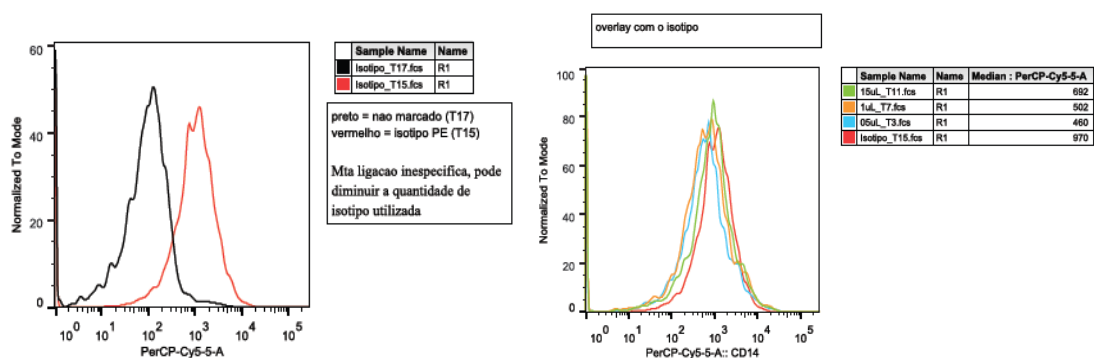


Figura 35. A curva com traçado em cor preta e vermelha (histograma à esquerda) representam respectivamente o controle auto-florescente (ausência de anticorpo anti-CD14) e o controle isotipo do marcador CD14; as curvas com traçados nas cores verde, laranja e azul (histograma à direita) representam a sobreposição das amostras com o controle isotipo.

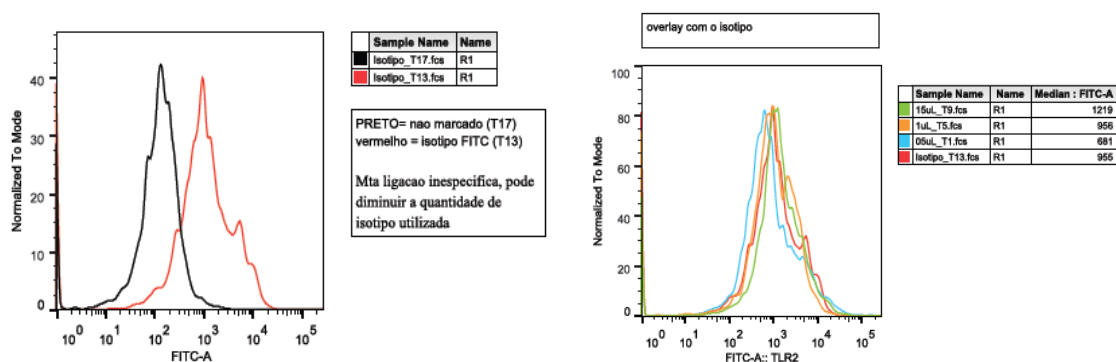


Figura 36. A curva com traçado em cor preta e vermelha (histograma à esquerda) representam respectivamente o controle auto-florescente (ausência de anticorpo anti-TLR2) e o controle isotipo do marcador TLR2; as curvas com traçados nas cores verde, laranja e azul (histograma à direita) representam a sobreposição das amostras com o controle isotipo.

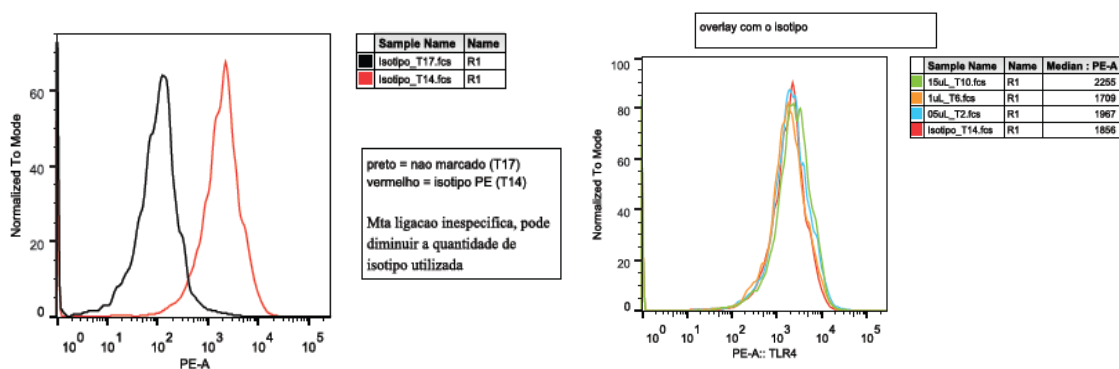


Figura 37. A curva com traço em cor preta e vermelha(histograma à esquerda) representam respectivamente o controle auto-florescente (ausência de anticorpo anti-TLR4) e o controle isotipo do marcador TLR4; as curvas com traçados nas cores verde, laranja e azul (histograma à direita) representam a sobreposição das amostras com o controle isotipo.

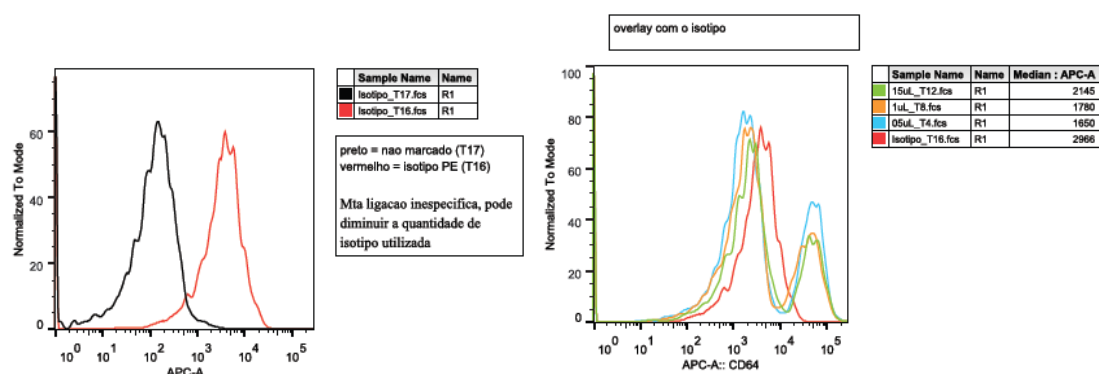


Figura 38. A curva com traço em cor preta e vermelha (histograma à esquerda) representam respectivamente o controle auto-florescente (ausência de anticorpo anti-CD64) e o controle isotipo do marcador CD64; as curvas com traçados nas cores verde, laranja e azul (histograma à direita) representam a sobreposição das amostras com o controle isotipo.

ANEXO 2 – Comprovantes de submissão de trabalho para publicação

The Biological Bulletin
M1 and M2 macrophages in Trypanosoma cruzi infection
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	M1 and M2 macrophages in Trypanosoma cruzi infection
Short Title:	M1 and M2 and T. cruzi infection
Article Type:	Review
Keywords:	Macrophages, Chagas Disease, cytokine, Trypanosoma cruzi, American trypanosomiasis
Corresponding Author:	Leonardo Teixeira Lopes Medeiros, MSc Faculdade Eduvale de Avaré Botucatu, Sao Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Faculdade Eduvale de Avaré
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Leonardo Teixeira Lopes Medeiros, MSc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Leonardo Teixeira Lopes Medeiros, MSc Maria Rita Parise Fortes, PhD Cilmery Suemi Kurokawa, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	The comprehension of the macrophages role in the pathophysiology of Chagas Disease (CD) is a challenge, these cells are crucial for the control of CD. The ability to switch their inflammatory and antiflammatory profile depending on the microenvironment and interaction with the parasite, 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 the pro- and anti-inflammatory cytokines from macrophages with M1 and M2 macrophages profile in the Chagas Disease. So this review will show some aspects of the role of M1 and M2 macrophages.

THE BIOLOGICAL BULLETIN
HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author Username: leonardo

Submissions Being Processed for Author Cilmery Suemi Kurokawa, Ph.D

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		M1 and M2 macrophages in Trypanosoma cruzi infection	Aug 04, 2016	Aug 04, 2016	Received by Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)

**ANEXO 3 - Aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) –
Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB**

unesp	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA		
Comissão de Ética no Uso de Animais			
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012			
Certificado			
CERTIFICAMOS que o (Protocolo CEUA 1015/2013) "Perfil M1 na doença de chagas aguda em camundongos Balb/c", a ser conduzido por Leonardo Teixeira Lopes de Medeiros, orientado pela Profª Drª Cilmary Suemi Kurokawa, com a colaboração de Francilene Capel Tavares, Marjorie de Assis Golim, Sueli Aparecida Calvi e apoio técnico de Carlos Roberto Gonçalves Lima está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "camundongos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.			
Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 25/04/2013			
 Profª. Drª. Noeme Sousa da Rocha Vice-Presidente da CEUA	 Alberto Santos Capelluppi Secretário da CEUA		
Distrito Rubião Júnior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 13.049-900			