



INSTITUTO DE HIGIENE E  
**MEDICINA TROPICAL**  
DESDE 1902

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Estudo da atividade dos macrófagos na resposta imunitária  
inicial à infeção por *Trypanosoma cruzi*

**Sara Beatriz Araújo Shone**

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
PARASITOLOGIA MÉDICA**

Junho, 2022



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Estudo da atividade dos macrófagos na resposta  
imunitária inicial à infeção por *Trypanosoma cruzi*

**Autora:** Sara Beatriz Araújo Shone

**Orientadora:** Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes

**Coorientadora:** Doutora Lis Lobo

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica

Estudo realizado no âmbito do projeto PTDC/CVT-CVT/28908/2017  
financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia I.P.



## **Agradecimentos**

Durante este longo percurso acadêmico de realização do mestrado houveram diversos desafios que fizeram desta jornada um caminho marcante. Caminho esse que não conseguiria percorrer sozinha, e por isso só tenho a agradecer a todos os que para ele contribuíram.

Os agradecimentos dirigem-se primeiramente à minha orientadora, a Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes, pela dedicação, paciência e disponibilidade em me guiar e ensinar muito do que aprendi.

À minha coorientadora, a Doutora Lis Lobo, por me guiar e ajudar a cumprir todos objetivos e pelo acompanhamento no trabalho laboratorial.

À Professora Doutora Graça Alexandre Pires por se disponibilizar em ajudar na realização das fotografias de MEV, que sem a sua ajuda não teria sido possível obter.

À Ana Bolas e à Armanda Rodrigues pela amizade e pela prontidão que demonstraram em ajudar no trabalho experimental sempre que precisei.

A todos os colegas de laboratório pela companhia e apoio que demonstraram.

Às minhas amigas e colegas de turma, Juliana e Inês, pela amizade e companheirismo.

Aos meus pais, ao meu irmão e à minha avó pelo carinho e apoio que sempre demonstraram, por acreditarem em mim e valorizarem a minha educação.

Ao meu namorado por estar sempre ao meu lado em todos os momentos e por me incentivar a dar sempre o meu melhor.

## Resumo

*Trypanosoma cruzi* é um parasita protozoário intracelular causador da doença de Chagas. A doença de Chagas é endêmica da América latina e infeta o homem e outros mamíferos. Esta é uma doença tropical negligenciada segundo a Organização Mundial da Saúde. O crescimento populacional e o aumento dos fluxos migratórios fizeram com que a doença se alastrasse para regiões do mundo não endêmicas, representando atualmente um problema de saúde pública global emergente. A doença de Chagas é transmitida por um inseto hematófago, o triatomíneo que habita nas regiões geográficas endêmicas para a doença. A infecção ocorre quando o inseto após realizar a sua refeição sanguínea, defeca perto do local da picada. O hospedeiro vertebrado fica infectado quando as fezes contaminadas com a forma infecciosa do parasita *T. cruzi* (tripomastigotas) entram no local da ferida pelo ato de coçar ou por contacto com a conjuntiva, narinas ou mucosa bucal. Em regiões onde a doença não é endêmica, as principais formas de transmissão da doença são por transfusão sanguínea, via oral, via congénita, transplante de sangue ou órgãos infectados e acidentes de laboratório.

A fase inicial da doença, que muitas vezes é assintomática, poderá evoluir para a fase crónica que perdura toda a vida e onde as duas principais formas da doença são a forma cardíaca e a forma digestiva. Os sinais mais frequentes são a destruição do músculo cardíaco a distensão maciça do trato intestinal.

Atualmente, apenas estão disponíveis dois medicamentos para a doença de Chagas, o Benznidazole e o Nifurtimox que apresentam eficácia elevada se forem administrados no início da infecção ou fase aguda que muitas vezes é assintomática o que dificulta o diagnóstico precoce da doença. Estes fármacos apresentam diversas limitações por serem tóxicos, levando à ocorrência frequente de efeitos adversos e por apresentarem variação de taxas de cura consoante a estirpe do parasita. Por isso a procura de novas terapias e de profiláticos é de elevada relevância para a doença.

Para compreender melhor a resposta imunitária inata inicial do hospedeiro à infecção por *T. cruzi*, neste estudo foi avaliada a ativação de macrófagos de murganho expostos à forma infetante (tripomastigotas) do parasita em comparação com a forma não infetante (epimastigotas), e antígenos parasitários. Os resultados obtidos sugerem o reconhecimento do parasita pelo macrófago que conduziu a alterações morfológicas com emissão de pseudópodes e uma ativação imunológica pró-inflamatória decorrente da produção de interleucina (IL)-6, IL-12\IL-23p40 e do fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  privilegiando a apresentação antigénica aos linfócitos T *helper* através das moléculas de classe II do complexo major de histocompatibilidade. Para além de promoverem um ambiente pró-inflamatório, a forma infetante de *T. cruzi* induz a produção de óxido nítrico, assim como os antígenos e a forma não infetante, que é benéfico no combate à infecção, conduzindo à morte do parasita.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, *T. cruzi*, macrófagos, epimastigotas, tripomastigotas.

## **Abstract**

*Trypanosoma cruzi* is an intracellular protozoan parasite that causes Chagas disease. This disease is endemic in Latin America and infects humans and other mammals. The World Health Organization considers this parasitic disease a neglected tropical disease. The growth of population and increased migration flows have spread this disease to non-endemic regions. Currently, it represents an emerging global public health problem. The Chagas disease transmits by a hematophagous insect, the triatomine bug. This bug lives in the endemic regions and infection occurs when the insect, after taking a blood meal, defecates near the site of the bite. *T. cruzi* infection is transmitted to vertebrate hosts when feces contaminated with *T. cruzi* infective forms (trypomastigotes) gain access through scratching or contact with conjunctiva, nostrils, mouth mucosa or bite wounds. In non-endemic regions, the main forms of transmission of the disease are blood transfusion, oral route, congenital route, transplantation of infected blood or organs, and laboratory accidents.

The initial phase of the disease, often asymptomatic, may evolve into a chronic phase. This phase lasts a lifetime, and the two main forms of the disease are cardiac form and digestive form. The most frequent signs are the destruction of the heart muscle and massive distension of the intestinal tract.

Currently, only two drugs are available for Chagas disease, Benznidazole and Nifurtimox. These only show high efficacy if administered at the beginning of the infection or in the acute phase. Since clinical initial phase usually is asymptomatic, it makes early diagnosis of the disease difficult. These drugs have several limitations as they are toxic. This leads to frequent adverse effects and varying cure rates according to the strain of the parasite. Thus, the search for new therapies and prophylactics is of high relevance for the control of the disease.

To better understand the initial innate immune response of the host against *T. cruzi* infection, the activation of mouse macrophages was examined after exposure to the infecting form (trypomastigote) of the parasite in comparison with the non-infecting form (epimastigote), and epimastigote and trypomastigote parasite antigens. The results obtained suggest the recognition of the parasite by macrophages, which leads to morphological changes that include pseudopod emission and a proinflammatory immune activation, favoring the production of interleukin (IL)-6, IL-12\IL-23p40 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . Moreover activated macrophages also can present parasite antigens to T helper lymphocytes through major histocompatibility complex class II molecules. In addition to a pro-inflammatory environment, the *T. cruzi* infecting forms as well as antigens and the non-infecting form induce nitric oxide production, which is beneficial to fight the infection, thereby causing parasite death.

**Key-words:** Chagas disease, *T. cruzi*, macrophages, epimastigotes, trypomastigotes.

## Índice

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução .....                                                                                 | 1  |
| 1.1 O Parasita <i>Trypanosoma cruzi</i> .....                                                       | 1  |
| 1.1.1. Distribuição e transmissão .....                                                             | 2  |
| 1.1.2. Ciclo de vida .....                                                                          | 3  |
| 1.1.3 Invasão celular .....                                                                         | 5  |
| 1.1.4 O Hospedeiro invertebrado - vetor .....                                                       | 7  |
| 1.1.5 O Hospedeiro vertebrado .....                                                                 | 8  |
| 1.1.6 A doença de Chagas.....                                                                       | 8  |
| 1.1.7 Diagnóstico .....                                                                             | 11 |
| 1.1.8 Profilaxia.....                                                                               | 18 |
| 1.1.9 Tratamento .....                                                                              | 18 |
| 1.2. Resposta imunitária.....                                                                       | 20 |
| 1.2.1. Macrófagos .....                                                                             | 21 |
| 1.2.2 Resposta imunitária à infecção por <i>T. cruzi</i> .....                                      | 24 |
| 2. Objetivos.....                                                                                   | 26 |
| 3. Materiais e Métodos.....                                                                         | 27 |
| 3.1. Desenho Experimental .....                                                                     | 27 |
| 3.1.1 Normas de segurança no laboratório .....                                                      | 28 |
| 3.2. Linha celular de macrófagos P388D1 .....                                                       | 29 |
| 3.3. Culturas de <i>T. cruzi</i> .....                                                              | 29 |
| 3.3.1. Manutenção de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em cultura.....                               | 29 |
| 3.3.2. Diferenciação <i>in vitro</i> de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> – Metaciclologénese .... | 30 |
| 3.3.3 Manutenção de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> em cultura – infecção de células Vero .....  | 33 |

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4. Preparação de Antígeno solúvel de epimastigotas e tripomastigotas .....                                                        | 34 |
| 3.5. Interações macrófagos – <i>T. cruzi</i> .....                                                                                  | 34 |
| 3.5.1. Citometria de fluxo multiparamétrica .....                                                                                   | 37 |
| 3.5.2. Produção de ureia por macrófagos.....                                                                                        | 38 |
| 3.5.3. Produção de óxido nítrico por macrófagos .....                                                                               | 39 |
| 3.5.4. Microscopia eletrônica de varrimento .....                                                                                   | 40 |
| 3.6. Análise estatística .....                                                                                                      | 41 |
| 4. Resultados.....                                                                                                                  | 42 |
| 4.1. <i>T. cruzi</i> altera a topografia dos macrófagos de murganho .....                                                           | 42 |
| 4.2. As amostras de antígeno solúvel de <i>T. cruzi</i> revelaram considerável concentração proteica.....                           | 45 |
| 4.3. Os tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> favorecem a apresentação antigénica e produção de imunomediadores pró-inflamatórios..... | 45 |
| 4.3.1. As formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> favorecem a expressão de MHC II nos MΦ de murganho.....         | 46 |
| 4.3.2. Os tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> induzem a expressão IL-12\IL-23 p40 e TNF- $\alpha$ pelos MΦ .....                     | 49 |
| 4.4. <i>T. cruzi</i> induz os macrófagos a produzirem ureia <i>de novo</i> .....                                                    | 56 |
| 4.5. <i>T. cruzi</i> induz a produção de óxido nítrico pelos macrófagos .....                                                       | 57 |
| 5. Discussão e Conclusões .....                                                                                                     | 60 |
| 6. Referências bibliográficas.....                                                                                                  | 1  |
| 7. Anexos .....                                                                                                                     | 1  |
| 7.1 Anexo 1.....                                                                                                                    | 1  |
| 7.2 Anexo 2.....                                                                                                                    | 1  |
| 7.3 Anexo 3.....                                                                                                                    | 1  |

## Índice de figuras

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Esquema ilustrativo do ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .                                                                                                             | 3  |
| <b>Figura 2:</b> Testes de laboratoriais de diagnóstico, parasitológicos indiretos, que podem ser utilizados no diagnóstico laboratorial da fase crónica da Doença de Chagas [23].     | 15 |
| <b>Figura 3:</b> Testes de laboratoriais de diagnóstico, serológicos convencionais, que podem ser utilizados no diagnóstico laboratorial da fase crónica da Doença de Chagas [23].     | 16 |
| <b>Figura 4:</b> Testes de laboratoriais de diagnóstico, serológicos não convencionais, que podem ser utilizados no diagnóstico laboratorial da fase crónica da Doença de Chagas [23]. | 17 |
| <b>Figura 5:</b> Esquema ilustrativo do estudo experimental realizado.                                                                                                                 | 28 |
| <b>Figura 6:</b> Esquema representativo das principais características morfológicas de epimastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .                                            | 32 |
| <b>Figura 7:</b> Imagens representativas de topografia de <i>T. cruzi</i> .                                                                                                            | 43 |
| <b>Figura 8:</b> Imagens representativas de topografia de MΦ de murganho expostos ao parasita <i>T. cruzi</i> .                                                                        | 44 |
| <b>Figura 9:</b> Expressão do MHC por MΦ de murganho em repouso e estimulados com PMA.                                                                                                 | 47 |
| <b>Figura 10:</b> Expressão de MHC por MΦ de murganho expostos ao parasita <i>T. cruzi</i> .                                                                                           | 48 |
| <b>Figura 11:</b> Dotplots representativos da expressão de IL-12, IL-6 e TNF-α por MΦ de murganho em repouso e estimulados com PMA                                                     | 51 |
| <b>Figura 12:</b> Expressão intracelular de citocinas por MΦ de murganho em repouso e estimulados com PMA.                                                                             | 52 |
| <b>Figura 13:</b> Dotplots representativos da expressão IL-12 e IL-6 por MΦ de murganho expostos ao parasita <i>T. cruzi</i> .                                                         | 53 |
| <b>Figura 14:</b> Dotplots representativos da expressão TNF-α e IL-6 por MΦ de murganho expostos ao parasita <i>T. cruzi</i> .                                                         | 53 |
| <b>Figura 15:</b> Dotplots representativos da expressão TNF-α e IL-12 por MΦ de murganho expostos ao parasita <i>T. cruzi</i> .                                                        | 54 |
| <b>Figura 16:</b> Expressão intracelular de citocinas por MΦ de murganho expostos ao parasita <i>T. cruzi</i> .                                                                        | 55 |

|                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 17:</b> Heat map da expressão MHCI, MHCII, MHCI e MCHII, de IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12, IL-6 e TNF- $\alpha$ e IL-12 e TNF- $\alpha$ em M $\Phi$ de murganho expostos ao parasita <i>T. cruzi</i> . ..... | 56 |
| <b>Figura 18:</b> Produção de ureia por M $\Phi$ de murganho.....                                                                                                                                                                  | 57 |
| <b>Figura 19:</b> Produção de novo de ureia por M $\Phi$ expostos ao parasita <i>T. cruzi</i> . ....                                                                                                                               | 57 |
| <b>Figura 20:</b> Produção de óxido nítrico por M $\Phi$ de murganho. ....                                                                                                                                                         | 58 |
| <b>Figura 21:</b> Produção de óxido nítrico por M $\Phi$ expostos ao parasita <i>T. cruzi</i> .....                                                                                                                                | 59 |

## Índice de tabelas

|                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Descrição da placa de 96 poços com macrófagos expostos ao parasita <i>T. cruzi</i> e estimulados por antígenos parasitários. .... | 36 |
| <b>Tabela 2:</b> Anticorpos monoclonais específicos de murganho utilizados e os respectivos fluorocromos. ....                                     | 37 |
| <b>Tabela 3:</b> Valores da quantificação proteica de antígenos solúveis de epimastigotas e tripomastigotas.....                                   | 45 |

## **Lista de abreviaturas**

Ac: Anticorpo

Ag: Antígeno

APCs: Células apresentadoras de antígeno

BSA: *Bovin serum albumin*

CF: Fixação do complemento

CN: Controlo negativo

CP: Controlo positivo

DAMP: Padrões moleculares associados a perigo

DO: Densidade ótica

DTUs: Unidades de tipagem discreta

ECG: Eletrocardiograma

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

Epi: Epimastigotas

FBS: *Fetal bovin serum*

FSC: *Forward Scatter*

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

HLA: Antígeno leucocitário humano

Ig: Imunoglobulina

IH: Hemaglutinação indireta

IIF: Imunofluorescência indireta

IL: Interleucina

iNOS: Óxido nítrico induzível

LIT: *Liver Infusion Tryptose*

LPS: Lipopolissacarideo

M1: Macrófago ativado pela via clássica

M2: Macrófago ativado pela via alternativa

MAC: Complexo de ataque à membrana

MEV: Microscópio eletrônico de varrimento

MHC: Complexo major de histocompatibilidade

MΦ: Macrófagos

NK: *Natural killer*

NO: Óxido nítrico

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAMP: Padrões moleculares associados aos patógenos

PBS: Tampão fosfato salino

Pen/Strep: Penicilina-Streptomicina

PMA: Acetato de forbol miristato

PRR: Recetores de reconhecimento de agentes patogénicos

RIPA: Radio-imunoprecipitação

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute culture medium*

SFL: *Side Fluorescence*

SNC: Sistema nervoso central

SSC: *Side Scatter*

TAMs: Macrófagos associados ao tumor

TAU: *Triatomine Artificial Urine*

TGF: Fator de transformação de crescimento

TLR: Recetores *Toll-like*

TNF: Fator de necrose tumoral

Trip: Tripomastigotas

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

## 1. Introdução

### 1.1 O Parasita *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas ou Tripanossomose Americana, que tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*, foi descoberta pelo cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, em 1909 [1]. Atualmente, a doença de Chagas afeta cerca de 7 milhões de pessoas no mundo, sendo que a propagação deste protozoário ocorre maioritariamente na América do Sul, América Central e México, onde representa um problema de saúde pública [1,2]. Porém, o crescimento populacional e o aumento dos fluxos migratórios, fez com que esta doença se alastrasse para outras regiões do mundo, representando um problema de saúde pública global emergente [2,3]. *T. cruzi* é um parasita de importância médica e veterinária, parasitando o homem, animais silvestres e domésticos.

A classificação taxonômica de *T. cruzi*, definida por Levine e colaboradores em 1980 é a seguinte: Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Subordem Trypanosomatina, Família Trypanosomatidae, Género *Trypanosoma* e Espécie *Trypanosoma cruzi* [4].

É possível dividir as diversas espécies descritas de *Trypanosoma* em dois grupos, de acordo com o local de desenvolvimento no intestino do invertebrado e a forma de transmissão aos hospedeiros vertebrados. *T. cruzi* inclui-se na subdivisão Stercoraria, com desenvolvimento no intestino posterior de triatomíneos hematófagos e transmissão por contaminação de membranas mucosas ou pele escarificada, com as fezes do vetor [4].

Este parasita apresenta uma elevada diversidade genética [5]. A determinação dos genes de algumas estirpes de *T. cruzi* tem permitido a caracterização da variabilidade genética. Isto proporciona o progresso no conhecimento da estrutura das populações deste parasita, permitindo compreender a evolução, a epidemiologia, as relações que estabelece com os hospedeiros e vetores, a virulência e resistência a drogas terapêuticas [2]. Relativamente à variabilidade genética, *T. cruzi* é dividido em sete unidades de tipagem discreta (DTUs): TcI-TcVI e Tcbat [6–8]. A classificação em DTUs tem como objetivo criar uma nomenclatura para uniformizar a comunicação na comunidade científica.

### 1.1.1. Distribuição e transmissão

A doença de Chagas é considerada uma doença tropical negligenciada, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). É endêmica da América Latina, onde a transmissão ocorre principalmente através do contacto com fezes e urina de triatomíneos infectados [1,4].

À medida que o homem foi procurando zonas mais rurais para construir casas, ocupou os territórios com triatomíneos, o que proporcionou a sua adaptação a novos ambientes e espécies. Por consequência, formou-se um ciclo doméstico e peridoméstico, onde o triatomíneo passa a alimentar-se em animais domésticos e humanos [4]. A doença era restrita a áreas rurais, sobretudo devido às condições habitacionais nessas áreas, onde os materiais de construção permitiam que o triatomíneo vivesse nas fendas das paredes das casas [9]. Contudo, devido à mobilização da população para as áreas urbanas, e a melhoria das condições das habitações, nas últimas duas décadas, verifica-se que a maioria das pessoas infectadas vive em ambientes urbanos. Devido ao aumento dos fluxos migratórios e à globalização, tem-se detetado a doença um pouco por todo o mundo [1,4,10]. Sendo que em áreas não endêmicas o parasita é transmitido por vias independentes de vetor [9].

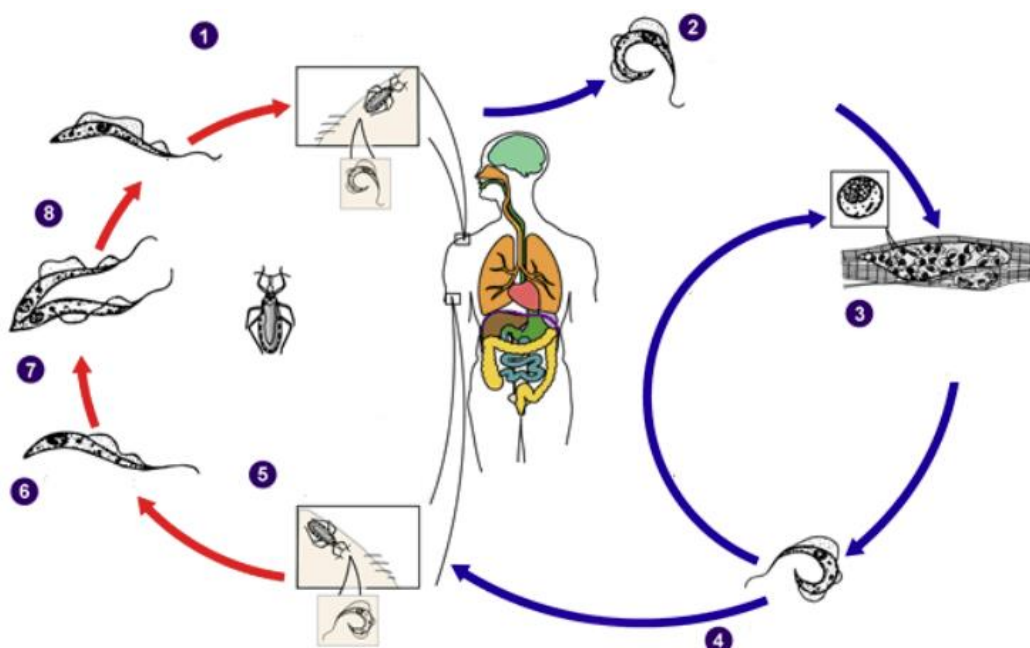
Os principais modos de transmissão do parasita são:

- Pelo vetor triatomíneo. É um inseto hematófago que após realizar a sua refeição sanguínea defeca perto do local da picada. O hospedeiro fica infectado quando as fezes contaminadas entram no local da ferida pelo ato de coçar ou por contacto com a conjuntiva, narinas ou mucosa bucal [11];
- Por transfusão sanguínea, que constitui o segundo mecanismo de transmissão de importância epidemiológica [4];
- Por via congénita, o parasita pode ser transmitido pela placenta, em fase crónica ou aguda da infeção. Pode ocorrer baixo peso à nascença, morte do feto, e mais raramente miocardite e alterações neurológicas do recém-nascido [12];
- Por via oral, por ingestão de alimentos contaminados com fezes e urina de triatomíneo infectados [3];
- Por transplante, através do órgão transplantado infectado, levado a uma infeção aguda grave no recetor que faz terapia imunossupressora [4];
- Por acidentes de laboratório.

Contudo a situação epidemiológica mudou e nos últimos anos os casos de doença aguda, devem-se principalmente à transmissão oral, através da ingestão de alimentos e bebidas contaminadas, transplante de órgãos e acidentes laboratoriais [2]. Sendo a transmissão oral a forma que representa o cenário epidemiológico emergente para a doença de Chagas. Os sumos de frutas, como é o caso de sumos de cana de açúcar ou de açaí, contaminados com fezes de triatomíneos infetados ou secreções de mamíferos infetados, constituem a maior fonte de infecção [2,3,10]. Verificou-se casos de infecções com estirpes silváticas, em centros urbanos, onde o controlo de triatomíneos domésticos e peridomésticos foi eficaz. Indicando que a transmissão oral é um cenário epidemiológico relevante que deve ser vigiado para aplicação de medidas de controlo [2,3].

### 1.1.2. Ciclo de vida

O ciclo de vida de *T. cruzi* é indireto, com transmissão vetorial e heteroxênico, em que o parasita vive alternadamente em hospedeiros vertebrados (homem e outros mamíferos) e no inseto vetor (triatomíneo) [4]. A figura 1 ilustra as etapas do ciclo de vida do parasita *T. cruzi*.



**Figura 1:** Esquema ilustrativo do ciclo de vida de *T. cruzi*.

1- Um triatomíneo infetado realiza uma refeição sanguínea no ser humano e liberta tripomastigotas pelas fezes, perto do local da picada. Os tripomastigotas libertados entram no hospedeiro pela ferida da picada ou através de membranas mucosas intactas. 2- No hospedeiro, os tripomastigotas invadem as células e diferenciam-se em amastigotas intracelulares. 3- Os amastigotas multiplicam-se por fissão binária, e 4- diferenciam-se em tripomastigotas que são libertados para a corrente sanguínea, podendo infectar diversos tecidos. 5- O triatomíneo infeta-se ao realizar uma refeição sanguínea de um hospedeiro com tripomastigotas circulantes. 6- Os tripomastigotas ingeridos transformam-se em epimastigotas no intestino médio do inseto e 7- multiplicam-se por fissão binária. 8- No intestino posterior do inseto, os epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos infetantes. (Adaptado CDC [13]).

O hospedeiro vertebrado fica infetado quando os tripomastigotas metacíclicos infetantes, eliminados pelas fezes e urina do triatomíneo, durante ou logo após a refeição sanguínea, penetram o local da picada ou as mucosas. Na infeção por ingestão oral de sumos e fruta contaminada com insetos infetados a invasão ocorre através do epitélio do estômago. Os tripomastigotas podem invadir células epiteliais junto ao local da infeção ou atingir a corrente sanguínea e ser fagocitados por macrófagos ou células dendríticas. Na célula, os tripomastigotas ficam alojados em vacúolos parasitários, posteriormente invadem o citoplasma e diferenciam-se em amastigotas, processo chamado de amastigogénese. Esta transformação é ativada, em parte pelo baixo pH do conteúdo lisossomal durante a fagocitose. Os amastigotas multiplicam-se por fissão binária formando uma massa de crescimento conhecida como pseudoquisto. A maior parte dos amastigotas transformam-se em tripomastigotas, que se libertam para a corrente sanguínea, quando ocorre a rutura do pseudoquisto. Estes tripomastigotas, a partir da corrente sanguínea, invadem outras células mononucleadas ou tecidos para os quais têm tropismo elevado, como é o caso do coração, esófago, colon, tecido adiposo e tecido nervoso. Assim, dá-se a continuidade a um novo ciclo de multiplicação, caso os parasitas não sejam destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro. A progressão da infeção nos tecidos está diretamente relacionada com as manifestações clínicas da doença de Chagas [4,12–17].

Os tripomastigotas que se encontram na corrente sanguínea, podem ser ingeridos por outro triatomíneo durante a realização da sua refeição sanguínea, dando continuidade ao ciclo biológico no vetor. No intestino médio do inseto, o parasita replica-se e diferencia-se em epimastigotas. Os epimastigotas multiplicam-se por fissão binária, sendo responsáveis por manutenção da infeção no inseto. No intestino posterior, devido ao stress nutricional, transformam-se em tripomastigotas (metaciclogénese), a forma infecciosa de *T. cruzi*, sendo depois excretados pelas fezes. A metaciclogénese envolve múltiplas mudanças no parasita como modificações no núcleo, localização do cinetoplasto, aumento da heterocromatina, alongamento do citoplasma, aumento da bolsa do flagelo no citoplasma e aumento das expressões de proteínas principalmente associadas à virulência. O ciclo do parasita no inseto pode levar 10-15 dias e uma vez infetado assim permanece toda a vida [12–15].

Os tripanossomatídeos, nos seus ciclos biológicos apresentam um pleomorfismo que decorre da adaptação fisiológica ao ambiente específico ou resulta da preparação para a

próxima etapa do ciclo. A denominação dessas formas é determinada pelo formato geral da célula, ponto de exteriorização do flagelo, posição do cinetoplasto relativa ao núcleo e às porções anteriores e posteriores da célula, à existência e extensão de membrana ondulante. A direção do movimento do flagelo é para a frente (anterior), por isso, o ponto de exteriorização do flagelo foi determinado como a extremidade anterior da célula. A nomenclatura das formas, usando o sufixo de origem grega “mastigota” indica flagelo, que se torna livre na porção anterior da célula. O cinetoplasto, presente nas formas de *T. cruzi*, é a região da mitocôndria onde ocorre grande concentração de cromatina. A presença desta região dá nome à classe Kinetoplastida, onde se inserem os tripanossomatídeos [4].

Pode-se descrever a morfologia das formas do parasita da seguinte forma:

- Epimastigotas: forma alongada com cinetoplasto justanuclear, o flagelo exterioriza-se na extremidade anterior, lateralmente, e atravessa o corpo como uma pequena membrana ondulante [12].
- Tripomastigotas: corpo em forma de C, núcleo central e um cinetoplasto situado posteriormente de onde se origina o flagelo, que atravessa todo o corpo como membrana ondulante e liberta-se na extremidade anterior como flagelo livre [12].
- Amastigotas: são formas arredondadas sem flagelo externo, encontradas em células reticuloendoteliais e outros tecidos. É a forma multiplicativa do parasita no mamífero [12].

### **1.1.3 Invasão celular**

A interação entre tripomastigotas e a célula hospedeira, ocorre em três fases: adesão celular, interiorização e formação do vacúolo parasitário e ocorrência de fenômenos intracelulares. Na primeira fase, a adesão celular acontece quando ocorre o contacto membrana a membrana e a célula reconhece os tripomastigotas. Na segunda fase, quando o parasita adere à superfície da célula, leva ao aumento de cálcio no citoplasma e ao recrutamento e fusão de lisossomas que passam a fazer parte da membrana do vacúolo parasitário [4].

Na terceira fase, no meio intracelular, os tripomastigotas sobrevivem resistindo às ações enzimáticas lisossômicas. Estes rompem a membrana do vacúolo parasitário e desenvolvem-se no citoplasma da célula, onde se transformam em amastigotas.

Os amastigotas multiplicam-se por fissão binária durante nove gerações e diferenciam-se em tripomastigotas. Posteriormente, ocorre a lise da célula hospedeira sendo os parasitas libertados para o espaço intercelular. O tempo aproximado para *T. cruzi* cumprir este ciclo em células fagocíticas é de cerca de 48-72h e em células não fagocíticas demora 4-5 dias aproximadamente [4].

*T. cruzi* apresenta um denso revestimento de fatores de virulência em âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Os tripomastigotas metacíclicos apresentam uma glicoproteína de superfície GP82 que é o principal fator de virulência envolvido na adesão e invasão da célula hospedeira [18]. A ligação de GP82 a células de mamífero, desencadeia respostas, necessárias para a entrada do parasita na célula, como sinalização de cálcio e mobilização de lisossomas. Os estudos demonstraram que GP82 é necessária para a ligação de tripomastigotas metacíclicos à mucina gástrica, em casos de infecção oral. Foi ainda possível verificar que a imunização de camundongos com a proteína recombinante funcional GP82 confere proteção contra infecção aguda [18].

Para sucesso do parasita, a invasão celular deve ser eficaz. Como parasita intracelular obrigatório, houve uma evolução juntamente com os humanos, na complexidade de interações moleculares entre o parasita e a célula hospedeira. Essas interações foram necessárias para invadir as células do hospedeiro e assim migrar para vários tecidos, escapando do sistema imunológico e permitindo replicações intracelulares. A migração e invasão são cruciais para a conclusão do ciclo de vida do parasita [13]. *T. cruzi* é capaz de invadir e multiplicar-se em células não fagocíticas. A invasão de células fagocíticas e não fagocíticas ocorre em simultâneo [13]. O processo de invasão é complexo e dinâmico, envolvendo interações de múltiplos fatores do parasita e do hospedeiro.

### **Invasão de células não fagocíticas**

A infecção inicia-se com a interação do parasita com a membrana da superfície da célula, através de vários ligantes de proteína na superfície da membrana do parasita. São vários os membros da superfamília GP85/trans-sialidase que estão envolvidos no início da infecção. GP82 e GP30 são proteínas de superfície dos tripomastigotas metacíclicos, que medeiam a liberação de cálcio no parasita e na célula. A trans-sialidase da membrana de superfície do parasita promove a invasão. A ligação do parasita a proteínas da matriz extracelular e proteoglicanos também está implicada na invasão. A ligação e invasão de

células hospedeiras por parasitas, desencadeia várias vias de entrada diferentes e sobrepostas. Isto demonstra como *T. cruzi* é bem-sucedido em infectar vários tipos de células [13].

### **Invasão de células fagocíticas**

As células fagocíticas são alvo da infecção parasitária, principalmente no início da infecção, quando os tripomastigotas são depositados no tecido pelo inseto. Os amastigotas libertados por células infectadas são também internalizados por macrófagos (MΦ), através da fagocitose. Inicialmente, os parasitas ficam alojados em vacúolos parasitários, onde podem ser eliminados pela geração de óxido nítrico (NO) e do anião peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). A maturação dos vacúolos em fagolisossomas é essencial para a sobrevivência do parasita e para promover a passagem dos parasitas para o citoplasma da célula, onde se diferenciam e replicam [13].

#### **1.1.4 O Hospedeiro invertebrado - vetor**

*T. cruzi* é transmitido por inúmeras espécies de triatomíneos e sustentado por mais de 70 géneros de hospedeiros maníferos [2]. Os triatomíneos são insetos hematófagos, conhecidos popularmente como “barbeiros” ou “chupões” por realizarem a sua refeição sanguínea na face do hospedeiro [19]. Estes insetos vivem nas fendas das paredes ou do telhado de casas com condições de construção mais rudimentares, assim como áreas peri-domiciliares, áreas rurais e suburbanas. Têm atividade noturna e geralmente alimentam-se quando os seres humanos estão a dormir [11,20]. Estes insetos vivem em contacto direto com o hospedeiro humano, assim como com animais domésticos e silvestres. A transmissão do ciclo silvático envolve a interação entre os triatomíneos e os mamíferos reservatórios, que incluem gambás, tatus e roedores. A transmissão no ciclo doméstico ocorre pelo contacto próximo entre seres humanos e o vetor, que coloniza áreas domésticas e peri-domésticas [2].

A Classificação Taxonómica dos triatomíneos vetores de *T. cruzi* é a seguinte: Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Hemiptera, Família Reduviidae, Género *Triatoma*, *Panstrongylus* ou *Rhodnius* [14].

Existem mais de 130 espécies de triatomíneos que são potenciais vetores de *T. cruzi*, onde se destacam as seguintes espécies, pela sua adaptação ao Homem e ao ambiente doméstico: *Triatoma brasiliensis*, *T. infestans*, *T. pseudomaculata*, *T. dimidiata*, *T.*

*sórdida*, *T. maculata*, *T. phyllosoma*, *Panstrongylus megistus*, *P. lutzi*, *Rhodnius palelescense* e *R. prolixus* [21].

#### **1.1.5 O Hospedeiro vertebrado**

Nos hospedeiros vertebrados, o parasita é encontrado na forma de amastigotas intracelulares, e na forma de tripomastigota na corrente sanguínea. Estas formas são também infetantes para células *in vitro* [4].

Para além do Homem, o parasita infeta animais domésticos e silvestres, que são considerados reservatórios do parasita [11,19]. Os ciclos de transmissão envolvem habitats silvestres, domésticos e peri-domésticos. Onde se consideram como principais reservatórios silvestres gambás, tatus e roedores, e domésticos e peri-domésticos os cães, gatos e roedores sinantrópicos comensais [22].

#### **1.1.6 A doença de Chagas**

A infeção causada por *T. cruzi* é uma antropozoonose, que nos humanos é causadora da doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana [5,19].

No vertebrado, a fase aguda da doença corresponde à fase inicial, onde a parasitémia é mais elevada. Pode ser assintomática, que é a forma mais frequente, ou sintomática. Este facto está relacionado com a competência imunológica do hospedeiro. Se o hospedeiro é capaz de desenvolver uma resposta imune eficaz contra o parasita, a parasitémia diminui e a infeção tende a evoluir para fase crónica [4].

Na fase aguda, se ocorrer manifestação de sintomas estes surgem alguns dias após a entrada do parasita no organismo. O período de incubação é de 7-15 dias para a transmissão vetorial, para a transmissão oral o tempo de incubação pode ainda ser inferior que a transmissão vetorial, e 30-40 dias para a transmissão por transfusão sanguínea [9]. Os parasitas multiplicam-se exponencialmente até haver o estabelecimento da resposta humoral. Esta libertação de anticorpos, faz com que o número de parasitas comece a diminuir [23].

Quando ocorre transmissão por vetor, a fase aguda tem início quando o parasita libertado pelas fezes do vetor, na forma tripomastigota, penetra na conjuntiva (originando o sinal de Romanã), ou na pele (originando o chagoma de inoculação). Estas lesões ocorrem em apenas 50% dos casos em fase aguda. O sinal de Romanã caracteriza-se por edema

pálpebra, congestão conjuntival, linfadenite dos linfonodos pré-auriculares, submandibulares e outros. O chagoma, é um nódulo subcutâneo eritematoso, resultante da inflamação aguda no local da derme e hipoderme onde o parasita foi inoculado [4,12,17,19].

As manifestações clínicas nesta fase da doença são essencialmente febre, inflamação no local de inoculação, linfadenopatia generalizada, edema dos membros inferiores e hepatoesplenomegalia. Pode ocorrer sintomas como miocardite aguda e sinais neurológicos (como meningoencefalite), sendo estes mais frequentes em crianças, jovens ou em indivíduos imunossuprimidos. A meningoencefalite e mais raramente a falência cardíaca, devido miocardite aguda, pode provocar a morte a cerca de 10% das crianças, na primeira infância [4,12,19].

A infecção por via oral pode provocar uma sintomatologia mais severa, relacionado com a quantidade de parasitas ingeridos, que geralmente é superior comparando com a transmissão vetorial. E as manifestações são principalmente digestivas, devido à penetração e multiplicação dos parasitas na mucosa gástrica [10,23].

A partir do local de inoculação, *T. cruzi*, pode parasitar qualquer célula, sendo as mais frequentes os macrófagos, células de Schwann, microglia, fibroblastos, células musculares lisas e estriadas. A reação inflamatória aguda focal favorece o estabelecimento da resposta imunitária mediada por anticorpos, já na segunda semana de infecção. Contudo, os parasitas íntegros não são detidos pelo sistema imunitário e parasitam outros órgãos, como o coração, provocando a miocardite [4].

A evolução natural conduz à cura aparente, em cerca de 4-8 semanas, com supressão dos sintomas, passando à fase indeterminada ou de latência (sem sintomas ou sinais). Nesta fase, o indivíduo infetado pode permanecer assintomático 10-20 anos, ou toda a vida. Os indivíduos infetados na fase aguda inicial assintomática, que representam cerca de 95%, progridem também para cronicidade, usualmente para a forma indeterminada que dura toda a vida [9,12,19].

O desenvolvimento das diversas fases clínicas da doença ocorre lentamente, durante anos ou décadas após a infecção inicial. Depois de vários anos assintomáticos, cerca de 30% dos doentes infetados progride para a fase crónica apresentando sintomatologia devido à

multiplicação dos parasitas, causando danos em um ou mais órgão. Os locais anatómicos mais afetados são o músculo esquelético, músculo cardíaco, trato gastrointestinal e sistema nervoso. A sintomatologia começa quando ocorre reativação intensa do processo inflamatório, causando alterações nestes órgãos [4,9,12].

Na fase crônica as duas principais formas da doença de Chagas são a forma cardíaca, relacionada com o sistema cardiovascular, e a forma digestiva relacionada com o sistema digestivo. Os sinais mais frequentes relacionados com a severidade e progressão são a distensão maciça do trato intestinal (esôfago e cólon) e destruição do músculo cardíaco [20].

A forma cardíaca é caracterizada pela cardiomiopatia chagásica crônica sintomática, em que o quadro clínico principal é a insuficiência cardíaca congestiva. A persistência de amastigotas no miocárdio causa distúrbios que podem levar à falência cardíaca, fenômenos tromboembolíticos e à morte súbita. A forma cardíaca está associada à embolia sistêmica, originando enfartes em vários órgãos, especialmente eventos cerebrovasculares, que podem levar à morte súbita. Quando os mecanismos de compensação cardíacos já não são suficientes para superar as deficiências relacionadas com a falta de força de contração (insuficiência cardíaca congestiva) tem por consequência a dispneia de esforço, insônia, congestão visceral e edema dos membros inferiores que evolui para dispneia contínua, anasarca e morte. A causa habitual de morte, na forma cardíaca da doença, é insuficiência cardíaca irreduzível ou morte súbita por embolia ou fibrilação [4,9,19].

A forma digestiva é menos frequente que a cardíaca. Nesta forma, ocorre comprometimento intestinal, característico da forma digestiva da doença. As alterações digestivas são causadas pela desnervação dos plexos autônomos do trato digestivo, que levam a distúrbios na absorção, motilidade e secreção, acompanhado de descoordenação motora e dilatação. Estas alterações morfológicas e funcionais dão origem ao megaesôfago e megacólon característicos desta forma da doença. As megavísceras levam à disfagia, em casos de megaesôfago e à obstipação, em casos de megacólon [4,9,19].

A coinfeção de *T. cruzi* com HIV ou terapêuticas imunossupressoras, pode despoletar a reativação da fase aguda, dando origem a manifestações clínicas não usuais como lesões

cutâneas, envolvimento do sistema nervoso (meningoencefalite) ou lesões cardíacas graves [5,12].

O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) é raro e tem mau prognóstico. Pode resultar em disfunção cognitiva, incluindo demência ou neurite. Este envolvimento do SNC está principalmente relacionado com a reativação da doença, especialmente em pacientes imunossuprimidos. As manifestações clínicas variam em função do tamanho, localização e número de lesões, sendo febre, cefaleia, déficit focal, convulsões e perda sensorial as mais frequentes [9].

São diversos os fatores que atuam direta ou indiretamente no aparecimento de sintomas e lesões causadas por *T. cruzi*. Alguns devem-se ao parasita (como a virulência da estirpe, tropismos celulares, reinfeção, infecções mistas, entre outros) e outros são inerentes ao próprio hospedeiro (como a genética, idade, gênero, nutrição, tipos de células que interagem com o parasita, entre outros). Isto demonstra que os mecanismos pelos quais *T. cruzi* causa as lesões são multifatoriais, onde se inclui ainda fatores culturais e geográficos [4,5].

### **1.1.7 Diagnóstico**

#### **Diagnóstico clínico**

A presença do sinal de Romanã ou chagoma de inoculação, febre irregular, adenopatia, hepatoesplenomegalia, taquicardia, edema dos membros inferiores ou generalizado, são sinais da fase aguda da doença. Alterações cardíacas, sinais de insuficiência cardíaca (por ECG- eletrocardiograma) e alterações digestivas, do esôfago e do colon (detetáveis por raio X) podem fazer suspeitar de um paciente em fase crônica da doença, tendo de ser confirmando por métodos laboratoriais. Em alguns pacientes, apesar da diminuição da parasitemia, do edema e das lesões, não volta a ter um ECG normal, ou seja, continuam com sintomatologia cardíaca. Sinais típicos da doença de Chagas são o bloqueio do ramo direito do feixe de Hiss, verificado no ECG, (consequência do comprometimento do sistema autónomo regulador das contrações cardíacas) e a presença de megaesôfago e megacólon (apesar de só aparecer em menos de 20% dos infetados). Contudo, na maior parte dos casos os indivíduos são assintomáticos e podem ter exames clínicos (como ECG e raio X ao tórax) normais. Nesses casos a suspeita pode surgir do histórico epidemiológico do paciente, como residência em áreas endêmicas do parasita, familiares

com doença de Chagas e trabalho com o parasita em laboratório. Sendo sempre necessários exames laboratoriais para exclusão ou confirmação da doença [4,23].

### **Diagnóstico laboratorial na fase aguda**

Na fase aguda, onde a parasitemia é elevada, podem ser detetados tripomastigotas no sangue periférico. Neste caso, recorre-se a métodos parasitológicos diretos ou métodos de concentração para pesquisa de parasitas vivos. Nos métodos parasitológicos diretos, observa-se ao microscópio ótico sangue fresco entre lâmina e lamela ou um esfregaço sanguíneo corado com Giemsa ou hematoxilina-eosina. Os métodos parasitológicos de concentração são a gota espessa (que por concentrar maior quantidade de sangue apresenta maior probabilidade de encontrar o parasita, porém é de difícil visualização), o método de Strout e microhematocrito. Nestes métodos o diagnóstico também é feito através do microscópio ótico, onde se observa o produto biológico concentrado [2,23].

Os métodos diretos são os mais utilizados por serem baratos e fáceis de executar, contudo são necessários recursos humanos experientes na pesquisa e diagnóstico de *T. cruzi*. Se o resultado for positivo não é necessário contra-análise e o diagnóstico pode ser enviado ao médico [23].

A resposta de anticorpos, na fase aguda, é possível após 1-2 semanas, principalmente anticorpos IgM. Contudo, nesta fase o diagnóstico é feito por métodos parasitológicos. Os testes serológicos de pesquisa de anticorpos podem ser realizados, caso o exame parasitológico seja negativo e ainda persistam dúvidas no diagnóstico. Os anticorpos podem ser detetados por várias técnicas, sendo as mais comuns a imunofluorescência indireta (IIF) e aglutinação direta. Após resposta IgM, as IgG serão detetadas em titulações pequenas, que irão aumentar progressivamente. A partir do segundo mês após sintomas, a maioria dos indivíduos apresenta IgG detetáveis, que irão permanecer até ao fim da vida a menos que haja intervenção terapêutica [23].

Para complementar o diagnóstico, podem ser utilizadas técnicas moleculares como PCR. Os métodos parasitológicos indiretos, como hemoculturas e xenodiagnóstico, também podem ser utilizados, mas a sua sensibilidade é variável além de serem testes demorados o que dificulta a rápida aplicação da terapêutica [2].

**Diagnóstico laboratorial na fase crónica**

Os exames parasitológicos não devem ser utilizados na fase crónica da doença, pois a maioria irá apresentar resultado negativo. Os parasitas apenas são facilmente detetáveis na fase aguda ou durante reativação na fase crónica, devido a imunossupressão. Na fase crónica, os testes de eleição são serológicos. A partir das 4 semanas, anticorpos IgG são detetáveis, com maior afinidade à medida que o tempo passa, permanecendo o resto da vida [23].

Na fase crónica, com parasitémia intermitente ou muito baixa e presença de anticorpos IgG específicos, recomenda-se a utilização de métodos serológicos (como: IIF, ELISA, hemaglutinação indireta ou fixação do complemento) ou métodos de parasitológicos indiretos (como: xenodiagnóstico, hemocultura ou inoculação em animais de laboratório). Estes últimos são utilizados quando os testes serológicos são duvidosos ou quando se pretende verificar a eficácia do tratamento [2,4].

O diagnóstico, na fase crónica, baseia-se na deteção serológica que evidencia a presença de anticorpos específicos no soro do paciente. Os testes serológicos incluem testes convencionais que usam o antígeno completo do parasita ou os testes não convencionais baseados em antígenos recombinantes. Nos testes convencionais podem ocorrer falsos positivos devido a reações cruzadas com anticorpos de outros parasitas (como *Leishmania* spp. e *Trypanosoma rangeli*) que estão presentes em áreas geográficas endémicas de *T. cruzi* [2,23].

A OMS, recomenda que o diagnóstico serológico seja realizado utilizando sempre dois testes serológicos diferentes. Se os dois métodos apresentarem resultados contraditórios deve realizar-se um terceiro método. Se permanecer a dúvida, realizar um quarto método de imunodiagnóstico e se ainda permanecer a dúvida deve-se realizar um método de diagnóstico não imunológico [24].

A forma indeterminada, com infeção latente, é caracterizada por positividade em exames serológicos e/ou parasitológicos, ausências de sintomas, eletrocardiograma normal, e exame de radiologia com coração, esófago e estômago normais [4].

Os testes serológicos podem ser divididos em convencionais e não convencionais. Os testes convencionais são: fixação do complemento (CF) (encontra-se em desuso), hemaglutinação indireta (IH), aglutinação direta, imunofluorescência indireta (IIF) e teste

imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Os testes não convencionais são: ensaio de radio-imunoprecipitação (RIPA), *Western blot*, ensaios líticos, citometria de fluxo e quimiluminescência [23].

As características, vantagens e desvantagens dos testes de diagnóstico laboratorial, divididos em três categorias (Testes parasitológicos indiretos, Testes serológicos convencionais e Testes serológicos não convencionais) estão listados nas figuras 2, 3 e 4.

| Testes de diagnóstico parasitológicos indiretos |                                                                                                                                                                                                                                     |                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Testes                                          | Características                                                                                                                                                                                                                     | Vantagens                                         | Desvantagens                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Xenodiagnóstico                                 | Hoje em dia dá-se preferência pelo xenodiagnóstico artificial, alimentado os insetos com sangue do paciente através de uma membrana.                                                                                                | Pode ser realizada em campo.                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Teste demorado;</li> <li>• Necessita de um grande número de insetos que têm de ser alimentados e mantidos em condições ótimas.</li> </ul>                                                                                                                                                                                  |
| Hemocultura                                     | Requer a cultura em meio LIT do conteúdo celular do sangue (sem plasma) durante um máximo de 5 meses com observações mensais para isolamento dos parasitas                                                                          | Requer apenas uma colheita de sangue do paciente. | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Teste demorado;</li> <li>• Necessita de técnicos experientes;</li> <li>• Necessita de processar o sangue em vários passos e em condições de esterilidade;</li> <li>• Os reagentes necessários não são comercializados.</li> </ul>                                                                                          |
| Inoculação em animais de laboratório            | É raramente utilizado. Pode ser utilizada em conjunto com o xenodiagnóstico com inoculação das fezes do vetor para posterior isolamento e caracterização do parasita. Os animais de laboratório mais utilizadas são murganhos BALB. | NA                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Necessidade de manutenção de animais de laboratório para realizar a infeção.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                    |
| PCR                                             | Amplificação <i>in vitro</i> de fragmentos de DNA de <i>T. cruzi</i> presentes em amostras de sangue, soro ou tecidos do paciente infetado.                                                                                         | Elevada sensibilidade.                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Não é um teste comercializado;</li> <li>• É dispendioso;</li> <li>• Necessita de recursos humanos qualificados;</li> <li>• Tem sensibilidade variável consoante as características da população, do teste e da fase da doença (na fase crónica a parasitémia é baixa e não permite atingir 100% sensibilidade).</li> </ul> |

**Figura 2:** Testes de laboratoriais de diagnóstico, parasitológicos indiretos, que podem ser utilizados no diagnóstico laboratorial da fase crónica da Doença de Chagas [23].

| Testes de diagnóstico serológicos convencionais |                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Testes                                          | Características                                                                                                                                                                           | Vantagens                                                                                                                                                | Desvantagens                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Hemaglutinação indireta                         | Muito utilizada na fase aguda e crónica. Utiliza hemácias sensibilizadas com antígenos de <i>T. cruzi</i> , na presença de anticorpos no soro do paciente há aglutinação.                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Fácil execução;</li> <li>Baixo custo;</li> <li>Resultados rápidos.</li> </ul>                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>A sensibilidade e especificidade varia entre os kits comerciais.</li> </ul>                                                                                                                                            |
| Aglutinação direta                              | Baseia-se na aglutinação de anticorpos contra <i>T. cruzi</i> , se estiverem presentes. Resultado positivo para títulos superiores a 1/32.                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>Simples;</li> <li>Possibilidade de pesquisar IgM (se processado com e sem 2-ME).</li> </ul>                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Leitura difícil devido à cor clara dos epimastigotas.</li> </ul>                                                                                                                                                       |
| Imunofluorescência indireta                     | Reação de soro do doente com formas epimastigotas do parasita incubado com um conjugado (segundo anticorpo conjugado com molécula fluorescente). Leitura em microscópio de fluorescência. | <ul style="list-style-type: none"> <li>O mesmo conjugado pode ser utilizado no diagnóstico de várias doenças;</li> <li>Elevada sensibilidade.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>A elevada sensibilidade pode também levar a reações cruzadas;</li> <li>A execução é complexa;</li> <li>Requer técnicos experientes;</li> <li>A presença de fator reumatoide pode levar a um falso positivo.</li> </ul> |
| ELISA                                           | Possibilita a identificação de antígenos ou anticorpos específicos no plasma/soro do doente.                                                                                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Elevada sensibilidade;</li> <li>Possibilidade de ser automatizada.</li> </ul>                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Execução morosa com muitos passos;</li> <li>Requer técnicos experientes;</li> <li>Tem especificidade limitada.</li> </ul>                                                                                              |

**Figura 3:** Testes de laboratoriais de diagnóstico, serológicos convencionais, que podem ser utilizados no diagnóstico laboratorial da fase crónica da Doença de Chagas [23].

| Testes de diagnóstico serológicos não convencionais |                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Testes                                              | Características                                                                                                                                                                                                     | Vantagens                                                                                                                                | Desvantagens                                                                                                                                                                                              |
| Radio-<br>imunoprecipitação                         | Imunoprecipitação efetuada com antígeno ou anticorpo marcados com radioisótopo.                                                                                                                                     | <i>Gold standard</i> da serologia.                                                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dispendioso;</li> <li>• Não está amplamente disponível;</li> <li>• Execução morosa;</li> <li>• Utiliza radioisótopos;</li> <li>• Raramente utilizado.</li> </ul> |
| Western blot                                        | Técnica que permite visualizar a ligação entre os anticorpos dos doentes e as frações antigénicas individualizadas do parasita.                                                                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Excelente especificidade e sensibilidade;</li> <li>• Está disponível comercialmente.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dispendioso;</li> <li>• Execução morosa.</li> </ul>                                                                                                              |
| Ensaio lítico                                       | Identifica anticorpos com capacidade de lisar os parasitas.                                                                                                                                                         | Bons resultados quando adaptado à citometria de fluxo.                                                                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Não está disponível comercialmente;</li> <li>• É difícil de ser adaptado na rotina laboratorial.</li> </ul>                                                      |
| Quimiluminescência                                  | Consiste na combinação da amostra do doente com uma molécula quimioluminescente. A quantidade de anticorpos presentes na amostra é proporcional à emissão de luz. É aplicado na avaliação do sucesso do tratamento. | Elevada sensibilidade e especificidade.                                                                                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Não está disponível no mercado;</li> <li>• É difícil de ser adaptado na rotina laboratorial;</li> <li>• Podem ocorrer falsos positivos.</li> </ul>               |

**Figura 4:** Testes de laboratoriais de diagnóstico, serológicos não convencionais, que podem ser utilizados no diagnóstico laboratorial da fase crónica da Doença de Chagas [23].

Os testes rápidos para deteção do parasita também estão disponíveis. Estes, não necessitam de técnicos experientes para a sua realização e podem ser realizados em meios rurais ou em locais sem acesso a equipamento laboratorial, mas que seja necessário realizar um diagnóstico de infeção. Estes testes baseiam-se na pesquisa de anticorpos no sangue [23].

### **1.1.8 Profilaxia**

O controlo do vetor tem mostrado ser o método mais eficaz no controlo da doença, na América Latina. É importante também prevenir a infeção através de transfusões sanguíneas e transplante de órgãos, melhorando a deteção e tratamento das pessoas afetadas. Devemos ainda incluir na prevenção a transmissão oral, responsável por diversos surtos da doença na última década. Este modo de transmissão é evitável desde que se tomem medidas preventivas. É importante instruir a população, principalmente de áreas endémicas, para adotar medidas de higiene e boas práticas na preparação e armazenamento de alimentos. Assim como a educação do viajante, de modo a garantir um consumo alimentar responsável e de qualidade, que envolve o conhecimento da cadeia produtiva, da fonte ao consumo [10].

A OMS recomenda as seguintes abordagens para prevenção e controlo da doença. Em áreas geográficas onde o vetor está presente deve-se: utilizar inseticidas em áreas residenciais, incrementar as condições habitacionais e de limpeza de modo a impedir infestações do inseto vetor, educar as comunidades para adotar medidas de prevenção, alertar para adoção de boas práticas de higiene na preparação, transporte, armazenamento e consumo de alimentos. Mesmo em locais não endémicos deve haver maior vigilância dos doadores de sangue e dos doadores e recetores de órgãos; acesso a diagnóstico e tratamento antiparasitário; monitorização dos filhos de mulheres infetadas e sem tratamento antiparasitário prévio, efetuar diagnóstico precoce e administrar, se necessário, o tratamento [1].

Em 2005 a OMS reconheceu a doença de Chagas como sendo uma doença tropical negligenciada. Em 2020, o roteiro para as doenças tropicais negligenciadas, 2021-2030, incluiu cinco objetivos para a doença de Chagas, sendo eles: a verificação da interrupção da transmissão vetorial domiciliária, a verificação da interrupção da transmissão por transfusão sanguínea, a verificação da interrupção da transmissão por transplantes de órgãos, a eliminação da doença de Chagas congénita e a cobertura de 75% da população elegível para tratamento antiparasitário [1].

### **1.1.9 Tratamento**

O tratamento atual para a doença de Chagas está reduzido a dois fármacos, Benznidazole e Nifurtimox. Sendo bastante eficazes se forem administrados no início da fase aguda da

doença, mas a sua eficácia diminui com o evoluir da infeção. Contudo, o tratamento é também indicado para casos de reativação da infeção e para pacientes em fase crónica inicial, como em casos de mulheres, antes ou após a gravidez, para prevenir infeções congénitas. Adultos infetados, especialmente os que não apresentam sintomas, devem receber tratamento pois pode prevenir ou conter a progressão da infeção [1]. Estudos clínicos comprovaram que ambos os fármacos são eficazes em recém-nascidos (até 99% de cura) e na fase aguda da doença (até 80% de cura). Em crianças até 14 anos, o Benznidazole curou até 60-70% dos indivíduos. Contudo, em adultos em fase crónica da doença, tem sido debatido se devem ser tratados ou não. Isto porque com base nos critérios de cura, confirmando por métodos PCR, cerca de 80% dos doentes não ficam curados [2].

O Benznidazole apenas tem ação contra as formas sanguíneas e o Nifurtimox age contra as formas sanguíneas e parcialmente com as formas teciduais. As limitações destes medicamentos são a ocorrência frequente de efeitos adversos e a variação das taxas de cura nas diferentes fases da doença e em regiões geográficas diversas, devido às características das estirpes infetantes [2]. Existe ainda uma resistência natural ao Benznidazole e ao Nifurtimox, verificada *in vivo* e *in vitro*, que não está relacionada com nenhuma DTUs [2].

Os medicamentos utilizados são tóxicos, mas atualmente não existem outras alternativas terapêuticas. Há cada vez mais estudos a serem feitos para a procura de alternativas terapêuticas para esta doença. Inibidores da cruzipaina, e sobretudo protéase de cisteína de *T. cruzi*, são candidatos promissores a novos fármacos, já que esta protéase é essencial para a viabilidade de todas as formas biológicas de *T. cruzi* e tem um papel importante nas várias etapas cruciais do ciclo de vida, como é o caso da invasão celular, replicação e diferenciação [14].

### **Critérios de cura**

Os critérios clínicos são limitados, especialmente na fase crónica quando o paciente é assintomático ou possui lesões irreversíveis. Neste caso, são os métodos laboratoriais que permitem o seguimento de doentes em tratamento, através de teste serológicos e parasitológicos. A cura é atingida quando os anticorpos IgG específicos para *T. cruzi*

deixam de ser detetados. Exames parasitológicos positivos indicam falha no tratamento [23].

Considera-se curado o paciente que apresente: parasitêmia negativa (hemocultura, xenodiagnóstico e PCR), testes de serologia convencional negativos (ELISA, reação de hemaglutinação indireta e reações de imunofluorescência indireta) e ainda testes negativos de serologia não convencional (lise mediada por complemento e pesquisa de anticorpos anti-tripomastigotas vivos por citometria de fluxo). Existe uma categoria de doentes denominados “dissociados”, com exames parasitológicos negativos, serologia convencional positiva e serologia não convencional negativa. O acompanhamento destes doentes mostrou que apesar de apresentarem serologia convencional positiva, podem também ser considerados curados, pois um resultado negativo em testes de serologia convencional ocorre tardiamente [4].

## **1.2. Resposta imunitária**

Dentro da complexidade do sistema imunitário podem ser distinguidas duas atividades fulcrais, o reconhecimento de substâncias estranhas ao corpo e a remoção dessas substâncias, através de um conjunto de células e moléculas. Os componentes do sistema imunitário inato são ativados quando se detetam padrões moleculares associados aos agentes patogénicos (PAMP) e padrões moleculares associados a perigo (DAMP), quando por exemplo há lesão dos tecidos. As células ativadas libertam quimiocinas, que recrutam mais células imunitárias para o local de inflamação/infeção e citocinas que estimulam a atividade imunitária dessas células. As citocinas são proteínas que possuem um efeito pleiotrópico, permite ativar outras células, induzir a diferenciação e potencializar a atividade microbicida. As quimiocinas são citocinas que funcionam como fatores quimiotáticos que orientam outras células do sistema imune para o foco de infeção ou para tecidos lesados [18].

Quando o sistema imunitário inato deteta PAMP ataca de imediato a estrutura que contem essas moléculas. Os principais intervenientes na resposta imunitária inata são: macrófagos, neutrófilos e proteínas solúveis como os fatores do complemento, lisozima e enzimas proteolíticas. Embora eficaz, a resposta inata muitas vezes não é suficiente para eliminar o agente infeccioso. A resposta imune adaptativa, mediada pelos linfócitos T e B, leva mais tempo para ser totalmente funcional, mas é adaptada especificamente ao agente

infeccioso. As moléculas reconhecidas pelos linfócitos T e B são os antígenos dos agentes patogénicos, que estimulam a proliferação e a diferenciação, aumentando a quantidade de linfócitos capazes de identificar os antígenos. Este reconhecimento específico dos agentes patogénicos induz a diferenciação de linfócitos efetores e de linfócitos de memória. O sistema imune inato e o sistema imune adaptativo atuam em conjunto para identificar e destruir os agentes infecciosos. O sistema inato, sendo mais rápido permite controlar as fases iniciais da infeção até que o sistema adaptativo fique apto a dar uma resposta mais específica [18].

Os neutrófilos e macrófagos são componentes cruciais do sistema imunitário inato, constituindo a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos. Os macrófagos, juntamente com as células dendríticas desempenham um papel fundamental na ativação da resposta adaptativa através da apresentação de antígenos aos linfócitos [25,26].

Uma das formas que o sistema imunitário tem para lidar com intrusos é o sistema do complemento. É um mecanismo constituído por um conjunto de proteínas séricas que se formam progressivamente, constituindo uma cascata e que têm diferentes modos de atuação, promovendo reações inflamatórias. Este sistema pode ser ativado por mecanismos diferentes, dependendo da via de ativação (via clássica, via alternativa e via da lectina). A via clássica é ativada por anticorpos, enquanto a via alternativa é ativada por proteínas, como lipopolissacarídeos, encontradas na superfície do agente patogénico. A via da lectina é ativada pela ligação da proteína MBL (lectina ligante de manose) à manose existente nas superfícies dos agentes patogénicos [18].

### **1.2.1. Macrófagos**

A palavra macrófago deriva do grego *Makros* que significa grande e *Phago* que significa aquele que come (referindo-se à fagocitose) [27]. São células sanguíneas, grandes, com formato irregular, citoplasma abundante, núcleo grande e central e com grande capacidade fagocítica.

Podemos separar os Macrófagos (MΦ) em duas categorias, relativamente à sua formação de origem. Os que se formam a partir da diferenciação de monócitos, que derivam de um precursor mieloide na medula óssea e os MΦ residentes (específicos de determinados tecidos e com capacidade de proliferação independente de monócitos) [25,28,29]. O primeiro grupo, são leucócitos que derivam de monócitos sanguíneos, que quando

migram da corrente sanguínea para os vários tecidos, diferenciam-se em MΦ. Em condições de infecção e inflamação do tecido, são libertadas quimiocinas que levam à ativação e atração dos monócitos sanguíneos para o local onde ocorre a infecção/inflamação. É no tecido que o monócito se diferencia, passando a ser designado de MΦ atuando na defesa imune inata do organismo e estando envolvido na remodelação e reparação dos tecidos [26,29].

Após ativação, os MΦ especializam-se e adaptam-se de acordo com o tecido em que se localizam. Os MΦ residentes, apresentam características fenotípicas e funcionais como é o caso de: microglia (no sistema nervoso central), osteoclastos (no osso), macrófagos alveolares (no pulmão), histiócitos (no baço e tecido conjuntivo intersticial) e células de Kupffer (no fígado) [25,30].

Sendo células com grande plasticidade, o fenótipo e as funções exercidas pelos MΦ são regulados pelo meio envolvente através de estímulos e sinais emanados pelos tecidos/órgãos onde se encontram [30]. De acordo com o tipo de ativação, estas células podem apresentar polarização: os MΦ ativados pela via clássica ou M1, e os MΦ ativados pela via alternativa ou M2 [31]. Os M1 são pró-inflamatórios e polarizados por antigénios bacterianos, como é o caso do lipopolissacárido (LPS) e citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  [25]. Macrófagos M1 produzem citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- $\alpha$ ) assim como óxido nítrico (NO) [30]. Os macrófagos M2 são anti-inflamatórios, imunorreguladores e polarizados por citocinas anti-inflamatórias, como é o caso de IL-4 e IL-13, produzindo citocinas também anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) [25,30]. A existência dos dois fenótipos, M1 e M2, é referido como a polarização dos macrófagos, no entanto estádios intermédios podem existir [30].

Os MΦ conseguem destruir agentes patogénicos, reparar o dano tecidual decorrente da inflamação ou do agente patogénico, mantendo a homeostasia que depende do equilíbrio entre M1 e M2 [31].

Os MΦ M2 podem ainda ser divididos em subclasses: M2a, M2b, M2c, M2d. IL-4 e IL-13 induzem a ativação de MΦ M2a que expressam níveis elevados de CD206 (recetor de manose). Tem ação anti-inflamatória e reparadora de tecido. MΦ M2b pode ser induzido por complexos imunes e agonistas de recetores Toll-like (TLR) ou recetores de IL-1. Esta

subclasse produz citocinas anti e pró-inflamatórias (IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ). Sendo as suas funções a ativação de células Th2 e imunoregulação. M $\Phi$  M2c são induzidos por glicocorticoides, IL-10 e TGF- $\beta$ , fagocitando células apoptóticas, M $\Phi$  M2d é induzido por agonistas de TRL através do recetor de adenosina. A ativação do recetor de adenosina leva à supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias, induz a produção de citocinas anti-inflamatórias e ainda fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) que no caso de macrófagos associados ao tumor (TAMs) promove a angiogénese e a progressão tumoral [30].

A ativação dos M $\Phi$  é um processo de grande relevância em doenças infecciosas e doenças crónicas. As funções dos M $\Phi$  incluem: fagocitose de agentes patogénicos, detritos e células mortas; apresentação antigénica associada ao complexo maior de histocompatibilidade (MHC); produção de citocinas e de radicais oxidativos [26,30].

Os monócitos e os M $\Phi$  migram para os locais de inflamação, processo iniciado pelos PAMPs libertados pelos agentes patogénicos, e pelos DAMPs libertados pelas células danificadas e mortas, com o intuito de eliminar os sinais inflamatórios e conduzir à reparação do tecido. Também as células T ativadas, incitam o recrutamento de M $\Phi$  através das quimiocinas e ativação através das citocinas [30].

As células dendríticas e macrófagos atuam como células apresentadoras de antígeno (APCs) e estão no centro da iniciação e desenvolvimento da imunidade. Células dendríticas, monócitos/macrófagos estão implicados ativamente na modulação da resposta imunitária adaptativa ao parasita *T. cruzi* [32]. As APCs, principalmente os M $\Phi$ , iniciam e regulam a resposta imune. Os M $\Phi$  residem em órgãos periféricos onde podem monitorizar o tecido e protegê-lo contra agentes patogénicos, processa os antígenos dos agentes infecciosos fagocitados e apresenta-os na superfície celular em fragmentos peptídicos complexados com as moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHCI e MHCII) que nos humanos é designado antígeno leucocitário humano (HLA), alertando a imunidade adaptativa. Uma vez ativados, os M $\Phi$  também expressam à superfície elevados níveis de moléculas co-estimuladoras (como CD80, CD86) que ajudam a estabilizar a ligação aos linfócitos T durante a apresentação antigénica [30].

Parasitas obrigatórios como é o caso do protozoário *T. cruzi*, induzem a polarização de M1 dos M $\Phi$ , que restringem o parasita e controlam a doença. Posteriormente, ocorre

mudança parcial de M1 para M2, o que limita os danos no tecido, mas suporta a inflamação crónica. É o equilíbrio entre M1 e M2 que controla os resultados da doença [30].

### 1.2.2 Resposta imunitária à infeção por *T. cruzi*

A infeção por *T. cruzi* desencadeia diversos mecanismos da resposta imunitária inata e adaptativa do hospedeiro, mas usualmente não elimina por completo o parasita, persistindo o parasitismo tecidual. Quando atinge a corrente sanguínea, o parasita torna-se alvo do sistema do complemento. O sistema do complemento é composto por proteínas solúveis que interagem com o agente patogénico, ativando a cascata de proteases que podem eliminar microrganismos invasores. As três vias do complemento convergem para produzir C3 convertase e C5 convertase, que levam à formação do complexo de ataque à membrana (MAC) e à lise de agentes infecciosos. Nos mamíferos, os tripomastigotas de *T. cruzi* conseguem bloquear a via do complemento, evitando a eliminação e promovendo a sua sobrevivência e a continuação do ciclo de vida [4,9].

O MΦ é importante na iniciação da resposta imune, atuando como sentinela para agentes infecciosos, através de um conjunto de recetores de reconhecimento padrão (PRR) de agentes patogénicos. Após o reconhecimento de antígenos de agentes patogénicos, o macrófago torna-se ativo e consegue fagocitar e destruir os microrganismos. Seguidamente, o MΦ começa a segregar citocinas e quimiocinas que ao atuar nas células endoteliais adjacentes, dos capilares sanguíneos, torna-os mais permeáveis, permitindo que os neutrófilos participem na resposta imunitária [18].

A ativação clássica dos MΦ é induzida pelo interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) seguida de estimulação com um ligante de *Toll Like Receptor* (TLR), como lipopolissacarídeo (LPS). Isto induz uma resposta inflamatória robusta, caracterizada por elevados níveis de segregação de citocinas pró-inflamatórias, ativação de alterações metabólicas e transcricionais, envolvidas na defesa do hospedeiro. Ocorre a produção principalmente de interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que induzem a síntese de IFN- $\gamma$  por outras células do sistema imunitário e a consequente produção de NO e espécies reativas de oxigénio necessárias à destruição dos microrganismos fagocitados [25]. A indução da produção de IL-12 por células dendríticas também poderá conduzir ao desenvolvimento de uma resposta de perfil Th1 e produção de IFN- $\gamma$ , propiciando o estabelecimento da

imunidade mediada por células, bem como a produção de anticorpos, eventos geralmente necessários para o estabelecimento de uma imunidade protetora. Os imunomediadores, IL-12, TNF- $\alpha$  assim como o NO estimulados pelo DNA do parasita e moléculas GPI (Glicosilfosfatidilinositol) através do seu reconhecimento por PRR, contribuem para o controlo da infeção. Estudos indicam que respostas imunes do tipo Th1, que envolvem IL-12, TNF- $\alpha$  e NO, são protetoras na tripanossomíase [33].

A imunidade humoral e celular estão envolvidas na luta contra o parasita [12]. Em todas as formas clínicas da infeção por *T. cruzi*, a imunidade mediada por células tem grande importância. Produção de anticorpos específicos e ativação de células fagocitárias pelo IFN- $\gamma$  são os principais elementos da resposta imune do hospedeiro infetado. Durante a fase aguda precoce há um aumento na produção de IL-12 e atividade das células *natural killer* (NK). Na fase aguda, a ativação policlonal de células B e T é inibida por processos de imunossupressão, mediados pela infeção parasitária. A diminuição da resposta das células T com concomitante diminuição de IL-2 e IFN- $\gamma$ , permite aos parasitas escapar à vigilância imunológica. O controlo precoce da carga parasitária deve-se à resposta Th1 e os níveis aumentados de IL-2 e IFN- $\gamma$  estão relacionados com o início do dano tecidual na fase crónica [9,17]. A imunidade humoral tem também um papel fundamental no controlo da infeção. O parasita promove a ativação inespecífica de M $\Phi$  e células NK acompanhada de ativação de linfócitos T (imunidade celular) e B, resultando na produção de imunoglobulinas (imunidade humoral) [4,9,17].

## 2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral o estudo da atividade dos MΦ na infecção por *T. cruzi*. Para alcançar esse objetivo foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- 1) Manutenção de culturas de macrófagos de murganho (linha celular P388D1), de culturas de epimastigotas e tripomastigota (através de um processo de diferenciação dos epimastigotas) de *T. cruzi*;
- 2) Preparação de antígeno das duas formas morfológicas do parasita *T. cruzi*, epimastigotas e tripomastigota;
- 3) Expor (*in vitro*) MΦ de murganho (linha celular P388D1) às formas morfológicas de *T. cruzi* e aos antígenos das formas morfológicas, e assim avaliar o estado de ativação dos MΦ através da análise:
  - a. da morfologia de MØ expostos aos parasitas através de microscopia eletrônica de varrimento;
  - b. da expressão do MHC I e MHCII e das citocinas, IL-6, IL-12\IL-23 p40 e TNF- $\alpha$  por citometria de fluxo;
  - c. da produção de óxido nítrico e ureia por métodos colorimétricos.

### 3. Materiais e Métodos

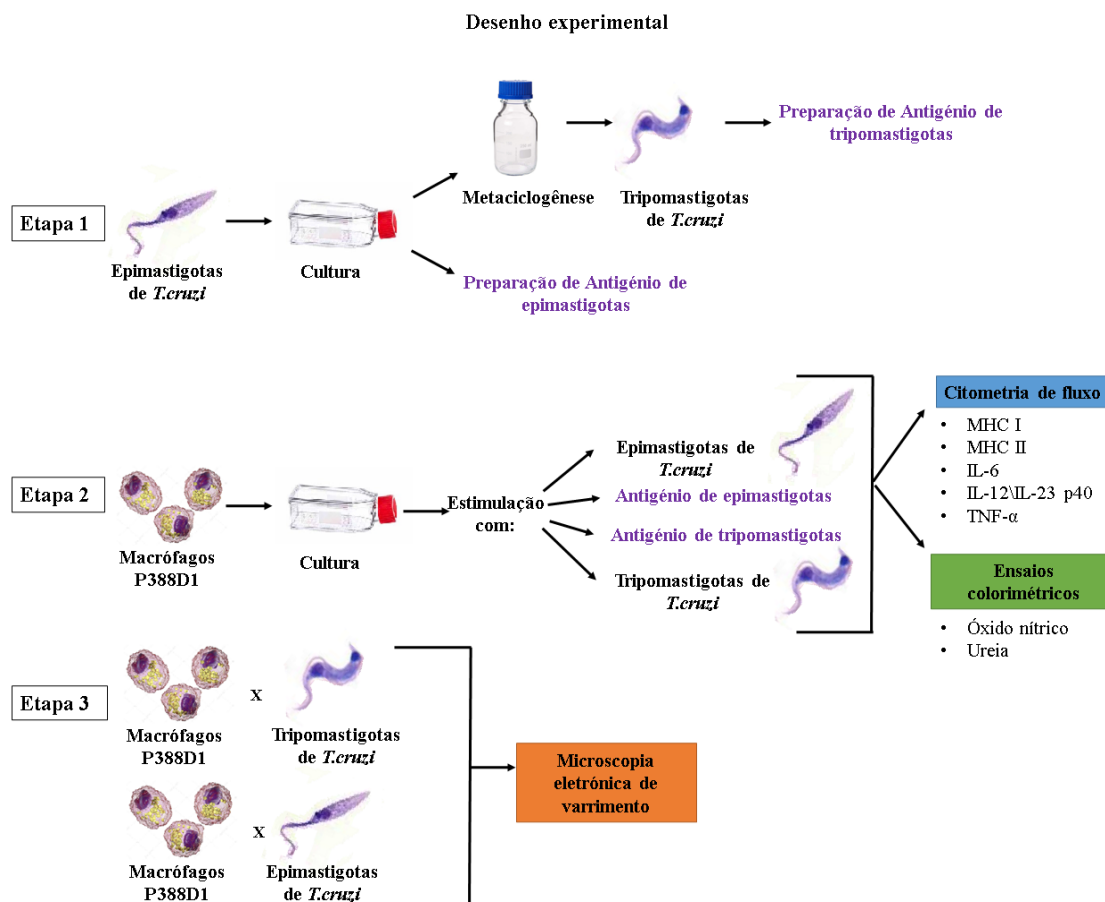
#### 3.1. Desenho Experimental

Este estudo experimental foi realizado em três etapas, tal como ilustrado na figura 5.

Na primeira etapa, foi efetuada a diferenciação *in vitro* de tripomastigotas (metaciclogénese), a partir da cultura de epimastigotas de *T. cruzi*. E a partir das culturas foram preparados os antigénios solúveis de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Os parasitas e os antigénios foram utilizados na segunda etapa deste estudo.

Na segunda etapa, macrófagos da linha celular P388D1, foram expostos às duas formas do parasita (epimastigotas e tripomastigotas), e estimulados com os respetivos antigénios. A partir desta interação, foi analisada a expressão de MHC I e MHC II, e das citocinas IL-6, IL-12\IL-23 p40 e TNF- $\alpha$  através da citometria de fluxo multiparamétrica. Foi ainda avaliada a via de ativação dos macrófagos (via clássica ou via alternativa) pela deteção do óxido nítrico e ureia, recorrendo a testes colorimétricos. Todos os ensaios foram realizados três vezes de forma independente e com amostras em triplicado.

A terceira etapa correspondeu à preparação de lâminas de microscopia, com macrófagos e as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, para análise por microscopia eletrónica de varrimento da interação parasita - macrófago.



**Figura 5:** Esquema ilustrativo do estudo experimental realizado.

A etapa 1 descreve o processo de metaciclização e a preparação de antígeno solúvel de epimastigotas e de tripomastigotas de *T. cruzi*, a partir das culturas. A etapa 2 descreve o estudo da ativação dos macrófagos por citometria de fluxo e ensaios colorimétricos, após exposição aos epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e com os seus respectivos antígenos. Na etapa 3 foram preparadas lâminas com macrófagos expostos às duas formas morfológicas do parasita *T. cruzi* (tripomastigotas e epimastigotas) para microscopia eletrônica de varrimento.

### 3.1.1 Normas de segurança no laboratório

A segurança no laboratório é um elemento vital. Quando se manuseia agentes patogênicos como *T. cruzi*, devem ser tomadas medidas de segurança para evitar infecções acidentais no laboratório. A forma infetante de *T. cruzi*, os tripomastigotas, causam infecção por contacto com membranas mucosas e feridas. Por isso, o seu manuseamento, torna necessário o cumprimento de regras de segurança no laboratório [34].

Os princípios básicos que se deve aplicar num laboratório de biossegurança nível 3 são: limitar o acesso a áreas de trabalho; utilização de equipamento de proteção individual como bata, luvas e proteção facial enquanto se manuseia os produtos biológicos; lavar as mãos sempre após o manuseio dos produtos biológicos; evitar o uso de material cortante

ou perfurante, como por exemplo agulhas; descontaminar as superfícies e os materiais de trabalho, antes e após a utilização, com soluções de limpeza [35].

Todo o material utilizado para manusear o agente biológico tem de ser descartado para o contentor de resíduos de risco biológico grupo III. Neste grupo estão incluídos resíduos contaminados ou suspeitos de contaminação, que são suscetíveis a incineração ou outro pré-tratamento que permita posterior eliminação como resíduo urbano [36].

Durante a realização deste trabalho laboratorial, foram cumpridas todas as normas de segurança e higiene.

### **3.2. Linha celular de macrófagos P388D1**

Foram mantidos em cultura, macrófagos (MΦ) de murganho da linha celular P388D1. Esta linha celular macrófagos-like foi isolada de linfoma de murganho DBA/2, demonstrando possuir características típicas de macrófago [37].

As células foram mantidas em suspensão de meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Culture Medium*) com 2 mM L-glutamina, (solução comercial da Biowest®) suplementado com 10% de FBS (*Fetal Bovin Serum*) inativado pelo calor (FBS foi previamente inativado por incubação a 56°C durante 30 minutos) e com 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Sigma-Aldrich®). A linha celular foi cultivada em frascos de cultura ventilados, mantidos a 37°C em atmosfera húmida de 5% CO<sub>2</sub>.

Foi adicionado meio fresco a cada dois a três dias, de modo a manter uma concentração celular de cerca de  $2 \times 10^6$  células/mL.

### **3.3. Culturas de *T. cruzi***

Para a realização dos ensaios do presente estudo manteve-se em cultura epimastigotas de *T. cruzi* estirpe Y e foram diferenciados em tripomastigotas.

#### **3.3.1. Manutenção de epimastigotas de *T. cruzi* em cultura**

Os epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidos em suspensão em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) com 10% FBS inativado, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina e incubados em frascos de cultura não ventilados a 24°C, em estufa refrigerada. Apesar do

frasco de cultura não ser ventilado é necessário a presença de ar, idealmente na proporção 5:1. O Protocolo da preparação do meio LIT encontra-se no anexo 1.

Foram também mantidos epimastigotas de *T. cruzi* em meio de cultura *Schneider's Drosophila* (Biowest®) suplementado com 10% de FBS inativado, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina.

Para qualquer um dos meios usados, de modo a manter a cultura de parasitas em replicação ativa, os epimastigotas em fase logarítmica de crescimento foram diluídos em meio novo, semanalmente.

### **3.3.2. Diferenciação *in vitro* de tripomastigotas de *T. cruzi* – Metaciclologénese**

Em meio de cultura axénico, *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida idêntico ao descrito no vetor, apresentando formas epimastigotas que se multiplicam por fissão binária e posteriormente se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos [4].

O processo de metaciclologénese, em que os epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos, ocorre por stress nutricional, que advém das condições físico-químicas do trato digestivo do inseto [38]. Este processo pode ser simulado *in vitro* recorrendo a meios de cultura indicados para o efeito. Isto possibilita a obtenção *in vitro* de tripomastigotas metacíclicos com características biológicas semelhantes às formas derivadas do inseto vetor, facilitando desde modo o estudo do parasita e evitando o uso de animais de laboratório [39,40].

Durante a metaciclologénese o parasita adquire formas que são resultado das mudanças na expressão génica, que leva a alterações fenotípicas, nomeadamente mudanças morfológicas, ultra-estruturais, metabólicas e físicas. As principais mudanças fenotípicas que ocorrem são: remodelação da cromatina, aumento do cinetoplasto, de corpos lipídicos e rearranjo do DNA mitocondrial [38]. Adicionalmente, a metaciclologénese implica renovação de proteínas e estruturas celulares que irão desempenhar um papel importante na infeção do hospedeiro por parte dos tripomastigotas [41].

### **Metaciclologénese de parasitas em meio LIT suplementado com Tc100**

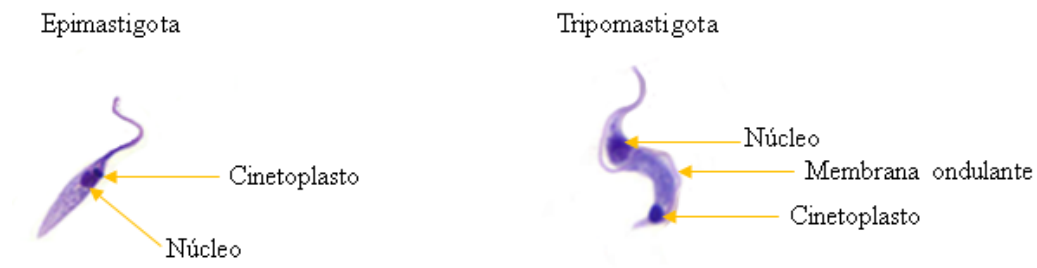
De modo a induzir a metaciclologénese, os epimastigotas em cultura de meio LIT suplementado com 10% FBS inativado, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, foram colocados num novo meio de cultura constituído por partes iguais

de LIT com 10% FBS inativado, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, e Tc100. Os frascos de cultura permaneceram a 28°C durante 3 semanas (protocolo adaptado de Rossi e colaboradores) [42].

Tc100 é um meio rico em aminoácidos e contém triptose como fonte adicional de açúcar [43]. É composto: pelos aminoácidos glicina, L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido aspártico, L- cisteína, L-glutamina, ácido glutâmico, L-histidina, L-isoleucina, L- leucina, cloridrato de lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L- prolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L- tirosina e L- valina; pelas vitaminas biotina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, niacina, ácido para-aminobenzoico, cloridrato de piridoxina, riboflavina, cloridrato de tiamina, B-12 e i-inositol ; pelos sais inorgânicos cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, sulfato de magnésio, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio e fosfato de sódio dibásico; e pelas fontes de açúcar de D-glucose (dextrose) e triptose [43].

A mudança dos epimastigotas para um novo meio e a sua permanência nesse meio teve por objetivo provocar stress nutricional nos parasitas, de modo a induzir, a metaciclogénese. Para verificar se a metaciclogénese tinha ocorrido, isto é, se tinha ocorrido a diferenciação de formas tripomastigotas, foi efetuada a observação direta da morfologia das formas parasitárias da cultura. Findo o tempo de incubação, os parasitas foram colocados em lâmina de microscopia, fixados com metanol, corados com Giemsa (protocolo de coloração presente no anexo 2), e a morfologia dos parasitas foi analisada por microscopia ótica.

A distinção entre epimastigotas e tripomastigotas é baseada nas características morfológicas, principalmente pela posição do cinetoplasto. Os epimastigotas possuem formas alongadas com o comprimento de 20-40µm, com flagelo livre e anterior ao núcleo, o núcleo é esférico e o cinetoplasto (em forma de barra) tem localização anterior ao núcleo [39,44]. Os tripomastigotas são também formas alongadas, com cerca de 25 µm de comprimento, mas com cinetoplasto (grande e esférico) posterior ao núcleo. Nestas formas o flagelo atravessa toda a extensão da célula aderindo à membrana celular e constituindo a membrana ondulante. O flagelo liberta-se na região anterior do parasita [39,44] (Fig. 6).



**Figura 6:** Esquema representativo das principais características morfológicas de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*.

As setas amarelas indicam a localização do núcleo, do cinetoplasto e da membrana ondulante (Adaptado CDC [1]).

Os tripomastigotas obtidos através deste método de diferenciação foram utilizados para preparar antígeno, que foi usado na estimulação dos macrófagos.

### Metaciclogênese em meio TAU

O meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*) procura mimetizar a composição e pH da urina do vetor triatomíneo [38]. Quando este meio é suplementado com aminoácidos (prolina, aspartato e glutamato), designado de meio TAU3AAG, induz a diferenciação dos epimastigotas de *T. cruzi* em tripomastigotas metacíclicos.

Contreras e colaboradores estudaram o papel individual de vários aminoácidos na metaciclogênese, com o objetivo de determinar a composição mínima necessária do meio de cultura. Foi demonstrado em meio TAU, que apenas a prolina permite a diferenciação de *T. cruzi*, sem que haja dano celular [40]. Assim, a prolina revelou ser um aminoácido essencial no processo de metaciclogênese [45].

No triatomíneo os parasitas são expostos a stress osmótico, pois as condições osmóticas no intestino e no reto, onde ocorre a diferenciação dos tripomastigotas metacíclicos, são diferentes das condições osmóticas do estômago, onde a osmolaridade é menor [38]. Este aumento de osmolaridade ao longo do trato digestivo do triatomíneo, designado por stress osmótico, também se verifica *in vitro* quando os parasitas são transferidos para o meio TAU, sugerindo que o stress hiperosmótico também faz parte do processo de diferenciação [38].

Para induzir a metaciclogênese em meio TAU, epimastigotas de *T. cruzi* numa concentração de  $5 \times 10^8$  parasitas/ml em meio de cultura *Schneider's Drosophila* suplementado com 10% de FBS inativado, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL

estreptomicina, foram centrifugados a 2000 ×g durante 15 minutos. O sedimento foi ressuspenso, em 10 ml de meio TAU (composição do meio TAU presente em anexo 3) e incubado 2 horas a 28°C. De seguida, após centrifugação a 2000 ×g durante 15 minutos, os parasitas foram colocados em 10ml de meio TAU3AAG (composição do meio TAU3AAG presente em anexo 3) em frascos de cultura. Os frascos permaneceram na posição horizontal a 28°C e sem agitação por quatro dias. Ao quarto dia de incubação, os frascos são lentamente e cuidadosamente colocados na posição vertical e os parasitas que se encontram na camada inferior do meio foram recolhidos. Os parasitas recolhidos são centrifugados a 11200 ×g a 5°C, durante 15 minutos e o sedimento, que contém os parasitas, é ressuspenso em meio de cultura. O protocolo descrito foi adaptado de Contreras *et al.* [39].

Os tripomastigotas obtidos, utilizando o meio TAU e TAU3AAG, foram usados para estimular macrófagos, para estudo da sua atividade relativamente à expressão de MHCI, MHCII, IL-6, IL-12\IL-23 p40 e TNF- $\alpha$ .

### **3.3.3 Manutenção de tripomastigotas de *T. cruzi* em cultura – infecção de células Vero**

De modo a propagar tripomastigotas de *T. cruzi in vitro* foi efetuado a infecção de células Vero.

As células Vero são uma linha celular, usada amplamente em estudos laboratoriais, como é o caso de estudos de propagação de parasitas intracelulares. Estas células derivam do rim do macaco verde africano e são uma linhagem de células aderentes [46].

As células Vero crescerem em meio RPMI 1640 com 2 mM L-glutamina, (solução comercial da Biowest®) suplementado com 10% de FBS inativado e com 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, em frascos de cultura ventilados, mantidos a 37°C em atmosfera húmida de 5% CO<sub>2</sub>. O meio da cultura foi substituído a cada 3-4 dias. Quando a cultura atinge a confluência em monocamada celular superior a 90%, é necessário realizar subculturas, de modo a manter a cultura saudável e em crescimento [46].

Numa cultura de células Vero em monocamada, foi colocada uma suspensão de tripomastigotas de *T. cruzi*. A cultura infetada permaneceu a 37°C em atmosfera húmida de 5% CO<sub>2</sub>. Após 24 horas o meio de cultura foi substituído por meio fresco. Quatro a

cinco dias após a infecção, o meio de cultura com tripomastigotas extracelulares, foi centrifugado a 800 ×g durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e incubado a 37°C durante 1 hora. Terminada a incubação, os parasitas foram recolhidos e concentrados por centrifugação a 2000 ×g durante 10 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em novo meio de cultura RPMI 1640.

Estes tripomastigotas propagados em cultura de células Vero foram utilizados para preparar lâminas para microscopia eletrônica de varrimento.

### **3.4. Preparação de Antígeno solúvel de epimastigotas e tripomastigotas**

Foram preparadas duas soluções de antígenos solúveis de *T. cruzi*, uma a partir das culturas de epimastigotas e outra a partir das culturas de tripomastigotas.

A cultura de epimastigotas em fase logarítmica foi centrifugada a 5000 ×g durante 15 minutos à temperatura ambiente. O *pellet* de parasitas foi lavado três vezes com PBS 1× sendo depois ressuspensionado em tampão lise com inibidores de protease. Para lise celular foram efetuados três ciclos de congelamento e descongelamento. De seguida, os parasitas lisados foram centrifugados a 105000 ×g durante uma hora a 4°C e o sobrenadante, contendo os antígenos solúveis de *T. cruzi*, foi transferido para um novo tubo. Foi medida a quantidade de proteína total na amostra de antígeno solúvel de *T. cruzi*, por espectrofotometria no equipamento NanoDrop 1000® (Thermo Scientific) a 280nm. Foram realizadas três leituras de cada amostra e calculado o valor da média. Os antígenos solúveis foram armazenados a -80°C.

O procedimento para a preparação de antígeno (Ag) de tripomastigotas foi igual ao descrito para o antígeno de epimastigotas.

### **3.5. Interações macrófagos – *T. cruzi***

Os macrófagos (MΦ) foram expostos a epimastigotas e tripomastigotas e estimulados com antígenos solúveis de epimastigotas e tripomastigotas do parasita *T. cruzi*, em placas de 96 poços (VWR®).

Primeiramente foi analisada a viabilidade de MΦ da linhagem P388D1 utilizando a coloração de azul tripano (1:10) e realizada a contagem na câmara de Neubauer, por observação ao microscópio ótico. Apenas as células viáveis (células não coradas) foram contabilizadas. O azul tripano é um corante vital e permite verificar a viabilidade celular.

As células viáveis apresentam a sua membrana celular íntegra, pelo que são capazes de excluir o corante, enquanto que as células não viáveis permitem a entrada do corante, ficando coradas de azul. Para a realização do ensaio foram utilizados macrófagos na concentração  $1 \times 10^6$  células/mL.

A contagem de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* realizou-se sem coloração, também na câmara de Neubauer. Apenas os parasitas viáveis (aqueles que apresentavam mobilidade) foram contabilizados. Para a realização do ensaio usou-se epimastigotas e tripomastigotas na concentração três vezes superior ao número de macrófagos ( $3 \times 10^6$  parasitas/mL).

O antígeno de epimastigotas e o antígeno de tripomastigotas de *T. cruzi* foram usados na concentração de 40 µg/mL.

Como controlo positivo foi utilizado 0.2 µg/mL de PMA (acetato de forbol miristato), para estimulação imunitária dos macrófagos. E como controlo negativo foram utilizados macrófagos em RPMI suplementado com 10% FBS (macrófagos em repouso ou não estimulados).

Na placa de 96 poços, foram incubados os macrófagos com as diferentes condições do ensaio, em triplicados (tabela 1), a 37°C e em atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub>. Após 24h de incubação, as células foram recolhidas e lavadas com 200µL de PBS 1× a 600 ×g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado 100 µL de tampão PBS com 2% FBS.

Às amostras que iriam ser marcadas com as citocinas intracelulares, IL-6, IL-12\IL-23 p40 e TNF-α, foram adicionados 100 µL de tampão PBS 2% BSA e 0,5% tween para induzir a permeabilização da membrana celular.

De seguida as amostras foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-murganho diretamente conjugadas com fluorocromos. Os anticorpos utilizados e as suas respetivas características encontram-se descritos na tabela 2.

As amostras foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-MHCI e MHCII anti-murganho. E as mesmas amostras foram também marcadas, com anticorpos monoclonais anti- IL-6, IL-12\IL-23 p40 e TNF-α anti-murganho. Os ensaios foram realizados três vezes de forma independente, com amostras em triplicado. Após a marcação, as amostras

ficaram em gelo e ao abrigo da luz durante 30 minutos. Após essa incubação foram lavadas com PBS 1× a 600 ×g durante 5 minutos para remover os anticorpos que não se ligaram. O sobrenadante foi descartado e foi efetuada a fixação das células com 2% paraformaldeído em gelo e ao abrigo da luz. Após 20 minutos de incubação, as amostras foram centrifugadas a 400 ×g durante 10 minutos e o sedimento foi ressuspensionado em 250 µL de PBS 2%FBS. As amostras foram mantidas a 4°C ao abrigo da luz até realização da citometria de fluxo multiparamétrica.

**Tabela 1:** Descrição da placa de 96 poços com macrófagos expostos ao parasita *T. cruzi* e estimulados por antígenos parasitários.

Os macrófagos foram expostos a epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e estimulados com antígeno solúvel de epimastigotas e de tripomastigotas. Em paralelo foram também plaqueados macrófagos em repouso (não estimulados) (controlo negativo) e macrófagos estimulados com PMA (controlo positivo). Os macrófagos foram utilizados para o estudo da expressão de MHC I e MHC II na superfície celular e da produção intracelular de IL-6, IL-12/IL-23 p40 e TNF-α.

|   | 1                                                | 2                                                | 3                                                | 4                                             | 5                                             | 6                                             |
|---|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| A | Controlo positivo<br>(MHC I e II)                | Controlo positivo<br>(MHC I e II)                | Controlo positivo<br>(MHC I e II)                | MΦ + epimastigotas<br>(MHC I e II)            | MΦ + epimastigotas<br>(MHC I e II)            | MΦ + epimastigotas<br>(MHC I e II)            |
|   | Controlo positivo<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α)       | Controlo positivo<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α)       | Controlo positivo<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α)       | MΦ + epimastigotas<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α)   | MΦ + epimastigotas<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α)   | MΦ + epimastigotas<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α)   |
| C | Controlo negativo<br>(MHC I e II)                | Controlo negativo<br>(MHC I e II)                | Controlo negativo<br>(MHC I e II)                | MΦ + tripomastigotas<br>(MHC I e II)          | MΦ + tripomastigotas<br>(MHC I e II)          | MΦ + tripomastigotas<br>(MHC I e II)          |
|   | Controlo negativo<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α)       | Controlo negativo<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α)       | Controlo negativo<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α)       | MΦ + tripomastigotas<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α) | MΦ + tripomastigotas<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α) | MΦ + tripomastigotas<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α) |
| E | MΦ + Ag epimastigotas<br>(MHC I e II)            | MΦ + Ag epimastigotas<br>(MHC I e II)            | MΦ + Ag epimastigotas<br>(MHC I e II)            |                                               |                                               |                                               |
|   | MΦ + Ag epimastigotas<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α)   | MΦ + Ag epimastigotas<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α)   | MΦ + Ag epimastigotas<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α)   |                                               |                                               |                                               |
| G | MΦ + Ag tripomastigotas<br>(MHC I e II)          | MΦ + Ag tripomastigotas<br>(MHC I e II)          | MΦ + Ag tripomastigotas<br>(MHC I e II)          |                                               |                                               |                                               |
|   | MΦ + Ag tripomastigotas<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α) | MΦ + Ag tripomastigotas<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α) | MΦ + Ag tripomastigotas<br>(IL-6, IL-12 e TNF-α) |                                               |                                               |                                               |

**Tabela 2:** Anticorpos monoclonais específicos de murganho utilizados e os respectivos fluorocromos.

|                           | Anticorpos monoclonais anti-murganho conjugados com moléculas fluorescentes |                 |               |                 |               |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
|                           | MHC I                                                                       | MHC II          | IL-6          | IL-12\IL-23 p40 | TNF- $\alpha$ |
| <b>Fluorocromo</b>        | <b>FITC</b>                                                                 | <b>PE</b>       | <b>FITC</b>   | <b>PE</b>       | <b>APC</b>    |
| <b>Fluorescência</b>      | Verde                                                                       | Amarelo-laranja | Verde         | Amarelo-laranja | Vermelho      |
| <b>Diluição</b>           | 0.5 mg/mL                                                                   | 0.2 mg/mL       | 0.125µg/mL    | 0.125µg/mL      | 0.2 mg/mL     |
| <b>Laser</b>              | 488 nm                                                                      | 488 nm          | 488 nm        | 488 nm          | 640 nm        |
| <b>Filtros de emissão</b> | 525/40                                                                      | 585/42          | 525/40        | 585/42          | 660/20        |
| <b>Clone</b>              | 34-1-2S                                                                     | M5/114.15.2     | MP5-20F3      | C17.8           | MP6-XT22      |
| <b>Referência</b>         | 11-5998-82                                                                  | 12-5321-82      | 11-7061-41    | 12-7123-41      | 17-7321-82    |
| <b>Lote</b>               | 2312016                                                                     | 2213777         | 2197082       | 2284207         | 2114124       |
| <b>Casa comercial</b>     | Thermo Fisher                                                               | Thermo Fisher   | Thermo Fisher | Thermo Fisher   | Thermo Fisher |

### 3.5.1. Citometria de fluxo multiparamétrica

A citometria de fluxo é uma tecnologia que permite analisar células ou partículas expostas a um laser com um determinado comprimento de onda. Quando é utilizada luz visível pode ser analisado o tamanho das partículas (do inglês *Forward Scatter* ou FSC) ou a complexidade ou granularidade da célula (do inglês *Side Scatter* ou SSC) [47]. Esta tecnologia permite ainda estimar a proporção de células fluorescentes e quantificar o nível de fluorescência (do inglês *Side Fluorescence* ou SFL) emitida pelas células, em amostras marcadas com anticorpos conjugados com fluorocromos [47]. É assim, uma tecnologia versátil que permite a caracterização de amostras com várias populações celulares [47].

As amostras marcadas e fixadas foram analisadas no citómetro CytoFlex Beckman Coulter. O gate FSC-H vs SSC-H foi utilizado para remover detritos e células picnóticas do quadrante inferior esquerdo, bem como os grandes detritos (fora de escala) encontrados no quadrante superior direito. Foi estabelecido um gate FSC-H vs FSC-A de células livres, eliminando os *doublets*. Cada ensaio decorreu na presença de um controlo negativo e de um controlo positivo. Os resultados só serão válidos se ambos os controlos apresentarem os valores expectáveis, indicando que o ensaio decorreu conforme esperado.

A análise por citometria de fluxo multiparamétrica estimou a frequência de macrófagos de murganho que expressavam MHC I e MHC II na superfície celular e expressavam intracelularmente IL-6, IL-12\IL-23 p40 e TNF- $\alpha$ .

Os resultados obtidos foram analisados com o programa Flowjo V10 (Tree Star Inc., USA).

### 3.5.2. Produção de ureia por macrófagos

A arginina é um aminoácido que modula a resposta imune celular do macrófago durante a infecção. A conversão deste aminoácido em ornitina e ureia, pela via da arginase, suporta o crescimento do parasita [48]. Assim, a produção de ureia indica a atividade da arginase e o tipo de ativação dos macrófagos.

Para determinar a produção de ureia nos sobrenadantes de culturas de macrófagos, foi utilizado o *kit* da BioChain, *Urea Assay Kit* (Z5030016) [49]. Neste *kit* a medição da ureia realiza-se através de um método colorimétrico quantitativo.

Foram utilizados os sobrenadantes das culturas de macrófagos incubados com epimastigotas, tripomastigotas e antigénios de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, durante 24 horas. Como controlo positivo foi usado sobrenadante de culturas de macrófagos estimulados com PMA e como controlo negativo sobrenadante de culturas de macrófagos em repouso.

Neste método colorimétrico, a intensidade da cor, que se forma através do reagente cromogénico que origina um complexo colorido quando ligado à ureia, é medida a 430 nm. Sendo que, a intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de ureia presente na amostra [49].

Numa placa de 96 poços, foram transferidos, em triplicado, 50 µL de amostra (sobrenadante das culturas de macrófagos), 50 µL da solução padrão (5mg de ureia/dL) e 50 µL de água destilada, utilizada como branco. Posteriormente é adicionado 200 µL do reagente de trabalho, constituído por partes iguais do reagente A (contém <0.4% o-ftalaldeído, e 10% ácido sulfúrico) e do reagente B (contém <0.8% ácido bórico e 22% ácido sulfúrico), às amostras, ao padrão e ao branco. Após homogeneização a placa foi incubada durante 50 minutos à temperatura ambiente e de seguida foi efetuada a leitura da densidade ótica (DO) a 430 nm, no espectrofotómetro de placas (TRIADTM 1065, DYNEX Technologies, EUA).

A concentração de ureia presente nas amostras foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$[\text{Ureia}] \text{ (mg/dL)} = \frac{\text{DO amostra} - \text{DO branco}}{\text{DO padrão} - \text{DO branco}} \times n \times \text{padrão}$$

Onde  $n$  corresponde ao fator de diluição. Como neste caso as amostras não foram diluídas foi utilizado  $n=1$ . De acordo com o recomendado para a medição de amostras com baixa concentração de ureia, foi considerado o padrão=5 mg/dL.

### 3.5.3. Produção de óxido nítrico por macrófagos

A conversão da arginina, através da sintetase induzida de óxido nítrico (iNOS), em óxido nítrico e citrulina, permite uma resposta imune eficiente capaz de eliminar o agente patogénico invasor [48]. A produção de óxido nítrico (NO) indica a atividade da iNOS, na conversão da arginina. Contrariamente à produção de ureia, o NO é prejudicial à sobrevivência dos parasitas. NO é uma espécie reativa do azoto e a sua produção conduz à resolução da infeção, pois contribui para a eliminação do parasita [48]. Deste modo, a avaliação da produção de NO pelos macrófagos, indica-nos o tipo de ativação dos mesmos.

A produção de óxido nítrico em sobrenadante de cultura de macrófagos foi medida recorrendo ao *kit* de ensaio colorimétrico da Cayman Chemical - *Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit* (780001) [50]. Este *kit* permite a medição do óxido nítrico (nitratos + nitritos) através de um método colorimétrico quantitativo.

Tal como na medição de ureia, foram utilizados os sobrenadantes das culturas de macrófagos (P388D1) incubados com epimastigotas, tripomastigotas, antigénios de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, durante 24 horas. Como controlo positivo foram utilizados sobrenadantes de culturas de macrófagos estimulados com PMA e como controlo negativo culturas de macrófagos em repouso.

De acordo com as instruções do fabricante foi efetuada uma curva padrão com concentrações de  $\text{NO}_3^-$  entre 0 e 35  $\mu\text{M}$ . Na mesma placa de 96 poços foram adicionadas as amostras. Foi adicionado em cada poço, 200  $\mu\text{L}$  de tampão fornecido pelo *kit* e 80  $\mu\text{L}$  da amostra (sobrenadante da cultura). De seguida foi adicionado a cada poço 10  $\mu\text{L}$  de cofator e 10  $\mu\text{L}$  de nitrato redutase. A placa foi incubada à temperatura ambiente durante 2 horas. Após esta incubação, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de reagente de Griess R1 e 50  $\mu\text{L}$  de reagente de Griess R2, seguido por uma nova incubação de 10 minutos à temperatura

ambiente. No fim desta incubação foi lida a absorvância a 550 nm no espectrofotômetro de placas.

A partir das leituras obtidas, foi construída a curva padrão e aplicando a seguinte fórmula, foi possível calcular a concentração de NO em cada amostra:

$$[\text{Nitrato} + \text{Nitrito}] (\mu\text{M}) = \left( \frac{\text{Absorvância a } 550\text{nm} - a}{b} \right) \times \left( \frac{200\mu\text{L}}{\text{volume da amostra } \mu\text{L}} \right) \times \text{diluição}$$

Onde  $a$  é o ponto de interceção com o eixo  $y$  (coeficiente linear) e  $b$  é a inclinação da reta (coeficiente angular). O volume da amostra utilizado foi de 80  $\mu\text{L}$ . E o fator de diluição=1, pois as amostras não foram diluídas.

#### 3.5.4. Microscopia eletrônica de varrimento

O microscópio eletrônico de varrimento (MEV) é uma ferramenta útil que nos possibilita a visualização com alta resolução de imagens da topografia das células [51]. Neste microscópio, em vez de um feixe de luz como é utilizado no microscópio ótico, é aplicado um feixe de elétrons [52]. A qualidade e a resolução da imagem variam consoante a voltagem da fonte de elétrons, o diâmetro do feixe, o tamanho da abertura usada, a altura entre a amostra e as lentes de focagem e a velocidade de “varredura” [52]. As imagens obtidas permite observar e desenvolver teorias acerca de relações entre células [51].

Através da MEV foram analisadas amostras de macrófagos expostos a epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. As amostras foram dispostas em lamelas redondas de 22 mm, colocadas em poços de placas de 24 poços. Como os macrófagos não são células aderentes, as lamelas foram previamente tratadas com Poli-D-lisina, um químico que facilita a adesão celular a superfícies de vidro, como é o caso das lamelas. Para isso, as lamelas foram emersas em cerca de 300  $\mu\text{L}$  de Poli-D-lisina, quantidade suficiente para cobrir toda a lamela, durante 30 minutos à temperatura ambiente. De seguida, as lamelas foram retiradas e deixadas a secar.

As amostras a analisar foram colocadas nas lamelas tratadas com Poli-D-lisina: macrófagos em repouso, macrófagos com epimastigotas e macrófagos com tripomastigotas, na proporção de 3:1. As amostras incubaram 4 horas a 37°C. De seguida foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,4), durante 2 horas a 4°C. Foi efetuada a lavagem das lamelas com tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,4), de forma a remover o glutaraldeído. Foram realizadas duas

lavagens, de 15 minutos imersas no tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,4). As amostras foram desidratadas à temperatura ambiente, em concentrações crescentes de etanol: 15 minutos em etanol 70%, 15 minutos em etanol a 90%, 15 minutos em etanol a 95% e 3 passagens em etanol a 100% com duração de 15 minutos cada.

Os passos seguintes, ponto crítico de secagem e metalização, até à visualização das lamelas ao microscópio eletrónico de varrimento, foram gentilmente realizados pela Professora Doutora Graça Alexandra Pires na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

### **3.6. Análise estatística**

Os ensaios foram realizados com amostras em triplicado e foram efetuadas três experiências independentes. Assim, foram obtidos nove resultados para cada condição analisada. Os resultados foram apresentados graficamente com recurso à estatística descritiva (médias e desvios padrão nos gráficos de barras e mediana, quartis e limites inferiores e superiores nos diagramas de caixa).

Em todos os ensaios (a expressão de MHCI, MHCII, IL-6, IL-12\IL-23 p40 e TNF $\alpha$ , e a produção de ureia e NO) foram analisadas as diferenças entre o controlo positivo (CP) e o controlo negativo (CN) e ainda as diferenças entre as amostras e o controlo negativo.

Para análise estatística dos dados foi utilizado o teste não paramétrico Wilcoxon signed-rank para amostras dependentes. Diferenças com os valores de  $p$  inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram consideradas estatisticamente significativas.

Para a análise estatística e para as representações gráficas, foi utilizado o programa *GraphPad Prism* (San Diego, CA, USA).

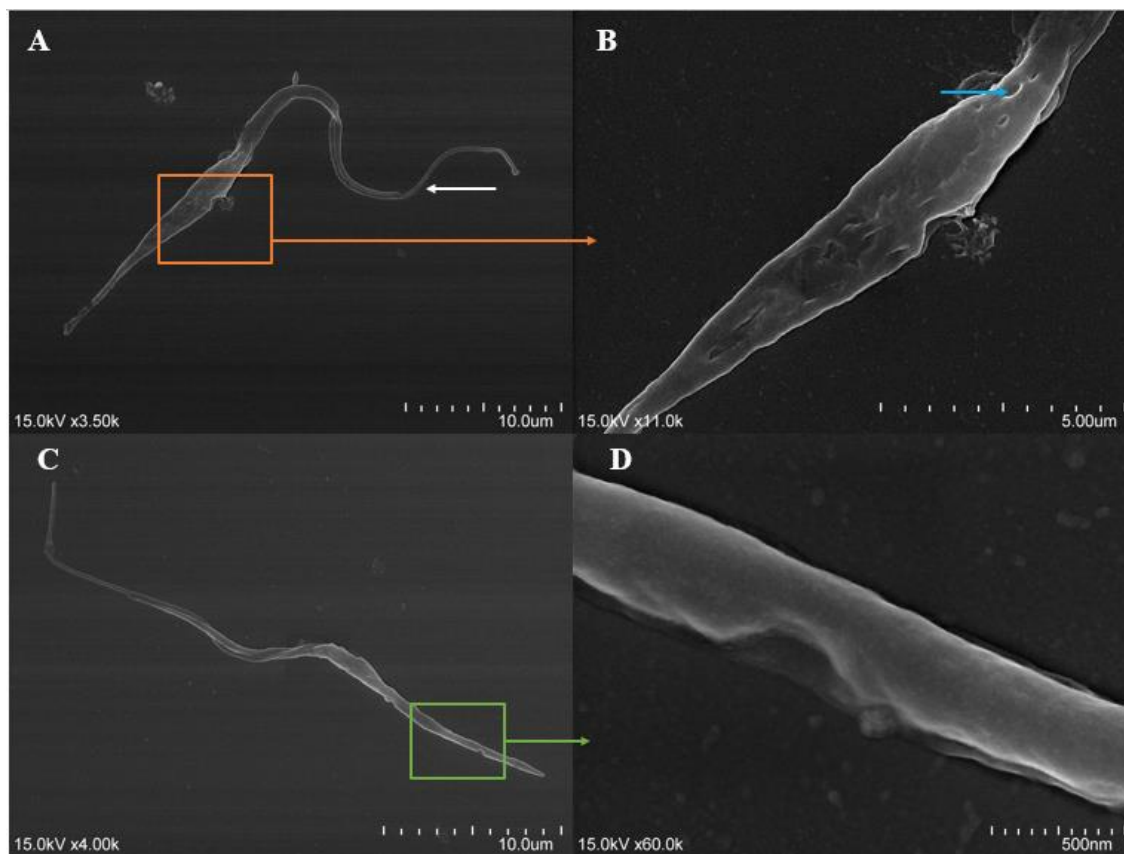
## 4. Resultados

### 4.1. *T. cruzi* altera a topografia dos macrófagos de murganho

Foram preparadas amostras de MΦ em repouso, MΦ expostos a epimastigotas e MΦ expostos a tripomastigotas, para obtenção de imagens de microscopia eletrónica de varrimento. Os macrófagos estiveram em contacto com os parasitas durante 4 horas.

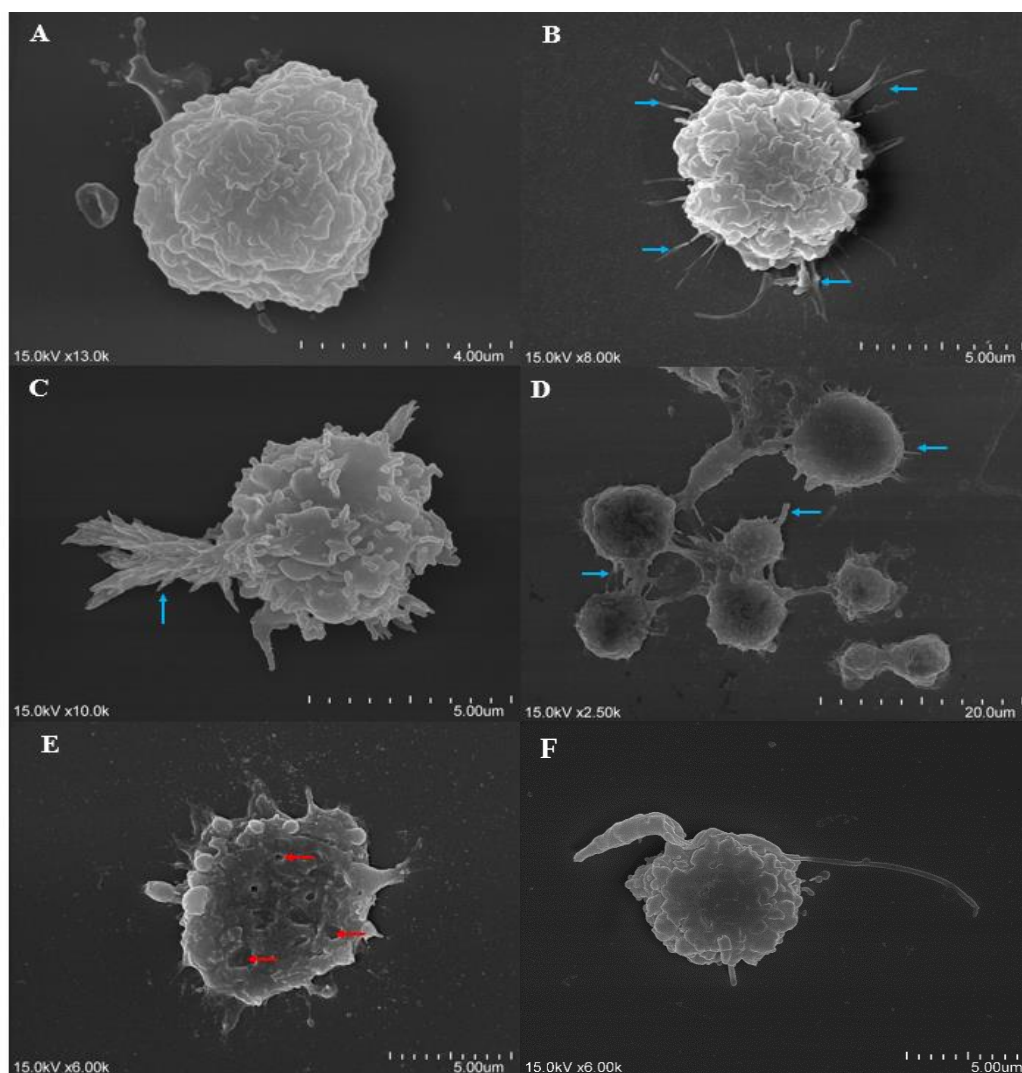
Os epimastigotas de cultura evidenciam uma forma alongada com flagelo livre e citostomo (Fig. 7B). Para além disso, é também observado uma evaginação na zona mais larga de corpo do parasita (Fig. 7A e B). Os tripomastigotas diferenciados *in vitro* apresentam forma delgada e comprida (*slender*) com flagelo livre na região anterior. Na zona posterior terminal observa-se uma invaginação (Fig. 7C e D).

Após contacto com as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, os MΦ de murganho apresentam alteração morfológicas quando comparado com os MΦ em repouso (Fig. 8A). A emissão de pseudópodes pelos MΦ (Fig. 8B e C) individualizados e pelos agregados de MΦ (Fig. 8D) indicam que a exposição aos parasitas conduziu à ativação destas células que possuem grande capacidade fagocítica. Contudo, a exposição aos parasitas também parece induzir a degradação dos MΦ. MΦ provavelmente parasitado evidencia alterações importantes na membrana celular que possivelmente colocam em risco a integridade da membrana (Fig. 8E).



**Figura 7:** Imagens representativas de topografia de *T. cruzi*.

Epimastigotas de cultura (A e B) e tripomastigotas diferenciados *in vitro* (C e D) foram observados por microscopia eletrônica de varrimento. Nas imagens B e D visualiza-se em detalhe a invaginação membranar. A seta branca (A) indica o flagelo e a seta azul (B) indica o citostomo.



**Figura 8:** Imagens representativas de topografia de MΦ de murganho expostos ao parasita *T. cruzi*.

Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varrimento. MΦ de murganho expostos a epimastigotas ou tripomastigotas foram observados individualizados (B, C, E e F) ou em aglomerados (D). Em paralelo, a topografia de MΦ em repouso foi também analisada (A). As setas azuis (B, C e D) indicam a emissão de pseudópodes pelos MΦ ativados e as setas vermelhas (E) apontam a degradação da membrana celular de MΦ provavelmente infectados.

#### 4.2. As amostras de antígeno solúvel de *T. cruzi* revelaram considerável concentração proteica

A quantificação por espectrofotometria das proteínas de amostras de antígeno preparadas a partir de tripomastigotas e epimastigotas de cultura revelaram leituras consistentes, com variação diminuta, e concentração proteica superior a 1mg/ml (tabela 3).

**Tabela 3:** Valores da quantificação proteica de antígenos solúveis de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Medido por espectrofotometria a 280 nm.

|            | Quantificação proteica da amostra de antígeno solúvel de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> | Quantificação proteica da amostra de antígeno solúvel de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1º leitura | 1,59 mg/ml                                                                                | 1,30 mg/ml                                                                                  |
| 2º leitura | 1,63 mg/ml                                                                                | 1,45 mg/ml                                                                                  |
| 3º leitura | 1,61 mg/ml                                                                                | 1,43 mg/ml                                                                                  |
| Média      | 1,61 mg/ml                                                                                | 1,39 mg/ml                                                                                  |

#### 4.3. Os tripomastigotas de *T. cruzi* favorecem a apresentação antigénica e produção de imunomediadores pró-inflamatórios

De forma a analisar o efeito de epimastigotas (Epi) e tripomastigotas (Trip) de *T. cruzi*, antígenos solúveis de epimastigotas (AgEpi) e antígenos solúveis de tripomastigotas (AgTrip) na ativação de macrófagos (MΦ) foi analisada a expressão de MHC I e MHC II na membrana celular, assim como a expressão intracelular das citocinas IL-6, IL-12\IL-23 p40 e TNF- $\alpha$  em amostras marcadas com anticorpos monoclonais conjugados com moléculas fluorescentes. As amostras marcadas foram analisadas por citometria de fluxo multiparamétrica. Em paralelo foram ainda analisados macrófagos em repouso e macrófagos estimulados com PMA, como controlo negativo (CN) e controlo positivo (CP), respetivamente.

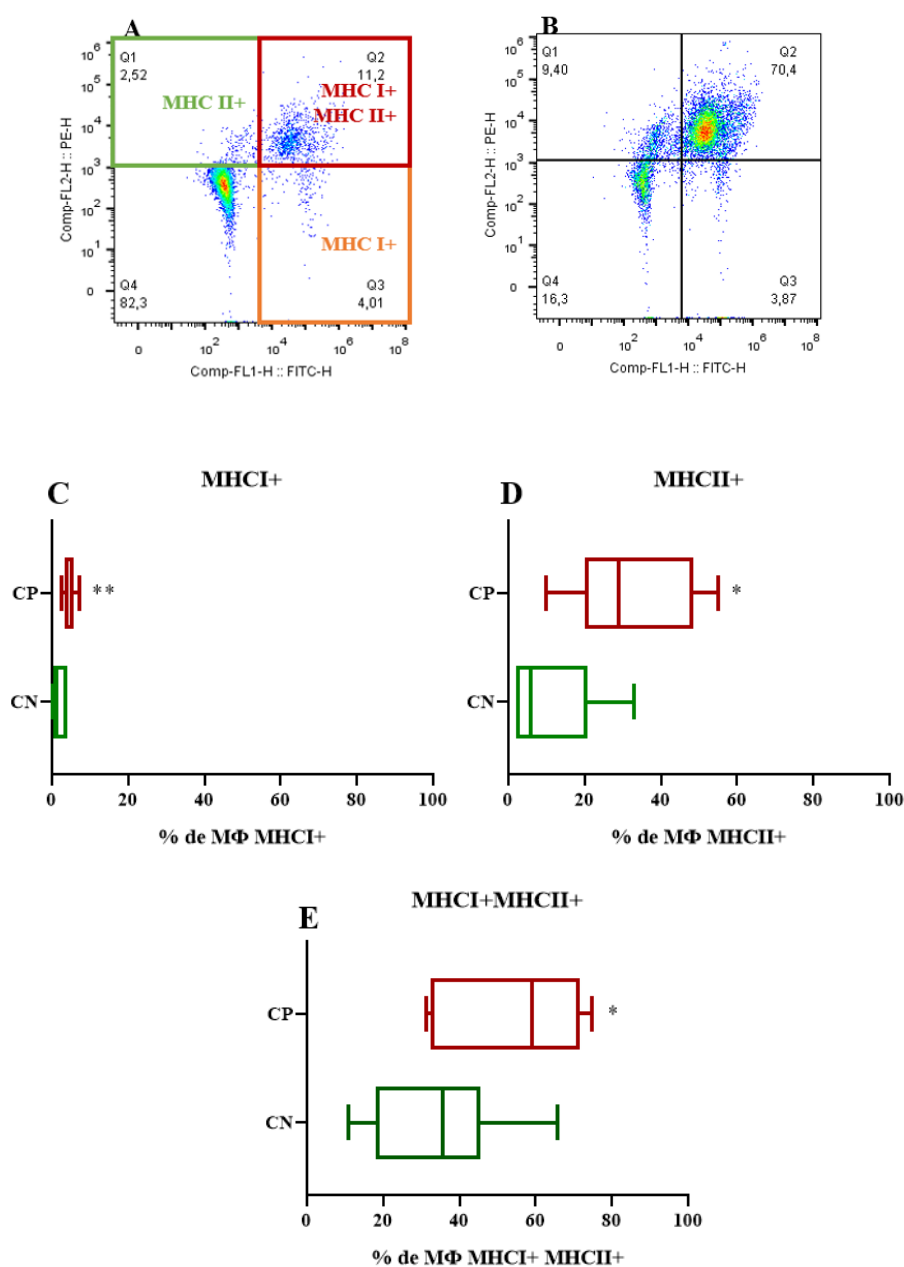
A incubação com as formas tripomastigotas do parasita permitiu mimetizar a infeção natural, enquanto a incubação com epimastigotas e antígenos solúveis do parasita serviu como controlo imunogénico.

#### 4.3.1. As formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* favorecem a expressão de MHC II nos MΦ de murganho

O controlo positivo (CP) de inflamação (MΦ + PMA) levou a um aumento significativo da frequência de MΦ MHC I<sup>+</sup> ( $p=0,0078$ ), MΦ MHC II<sup>+</sup> ( $p=0,0039$ ) e MΦ MHC I<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> (MΦ duplos positivos) ( $p=0,0391$ ) (Fig. 9) quando comparado com o controlo negativo (CN). Estes resultados indicam que os MΦ estavam viáveis e imunologicamente funcionais.

A expressão MHC I não apresentou diferenças significativas nos MΦ estimulados com AgEpi e AgTrip ou expostos a epimastigotas e tripomastigotas, quando comparado com o controlo negativo. Porém, a expressão do MHC II (Fig. 10) apresentou aumento significativos nos MΦ expostos a epimastigotas e tripomastigotas ( $p=0,0039$ ). Quanto aos macrófagos duplos positivos (MHC I<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup>), apenas MΦ estimulados com AgEpi (Fig. 10) evidenciaram aumento significativo na frequência de MΦ MHC I<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> ( $p=0,0078$ ).

No conjunto, estes resultados indicam que a forma morfológica de *T. cruzi* responsável pela fase aguda da doença de Chagas (tripomastigota) induz os MΦ de murganho a expressarem MHC II. Curiosamente, a forma morfológica de *T. cruzi* presente no intestino do vetor e que naturalmente não estabelece contacto com o mamífero também estimula os MΦ a expressar MHC II. Ao contrário do AgTrip que não parece causar alteração na frequência de MΦ MHC I<sup>+</sup> e MΦ MHC II<sup>+</sup>, o AgEpi promove a dupla expressão de MHC I<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> nos MΦ.

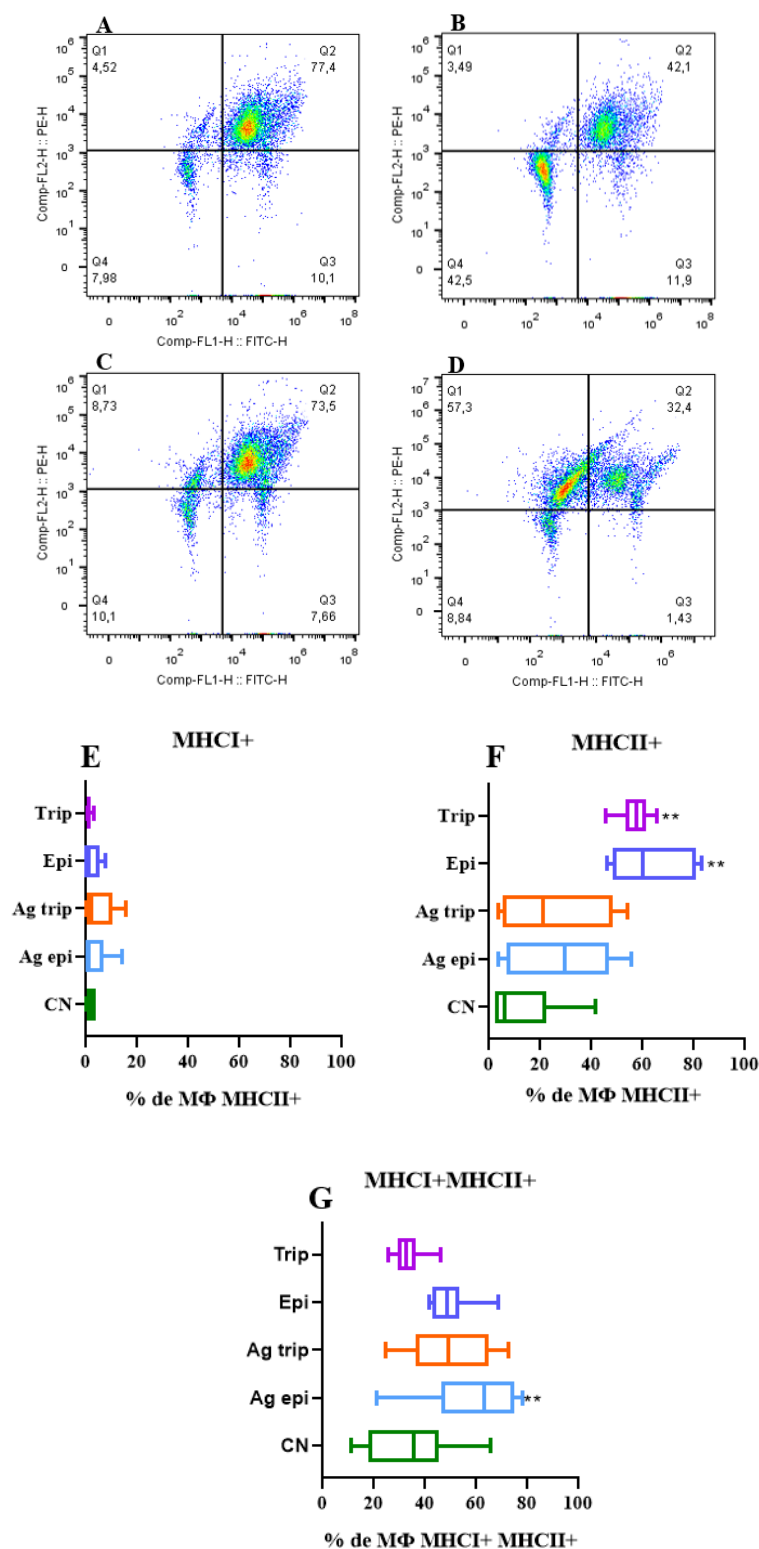


**Figura 9:** Expressão do MHC por MΦ de murganho em repouso e estimulados com PMA.

Nos Dotplots representativos da expressão das moléculas de MHC em MΦ de murganho em repouso (A) e estimulados com PMA (B), o fluoróforo FITC marca macrófagos MHC I<sup>+</sup> e o fluoróforo PE marca macrófagos MHC II<sup>+</sup> analisados por citometria de fluxo multiparamétrica.

Resultados de três experiências independentes e três replicas por amostra estão representados por diagramas de caixa com indicação da mediana, 1º e 3º quartil, limites mínimos e máximos. MΦ em repouso/não estimulados (CN) e estimulados com PMA (CP) marcados com anticorpos monoclonais anti-MHCI (C) e anti-MHCII (D). A frequência de MΦ MHC I<sup>+</sup>MHC II<sup>+</sup> está representado no gráfico E.

O teste Wilcoxon foi utilizado na análise dos resultados, (\*) indica diferença significativa entre MΦ em repouso (CN) e MΦ estimulados por PMA (CP), (\*)  $p < 0,05$  e (\*\*)  $p < 0,01$ .



**Figura 10:** Expressão de MHC por MΦ de murganho expostos ao parasita *T. cruzi*.

Dotplots representativos de MΦ estimulados com AgEpi (A) e AgTrip (B) expostos a epimastigotas (Epi) (C) e tripomastigotas (Trip) (D) marcados com anticorpos monoclonais anti-MHCI e anti-MHCII analisados por citometria de fluxo multiparamétrica. Em paralelo MΦ em repouso (CN) foram também avaliados. Resultados de três experiências independentes e três replicas por amostra de MΦ MHCII<sup>+</sup> (E), MΦ MHCII<sup>-</sup> (F) e MΦ MHCII<sup>+</sup>MHCII<sup>-</sup> (G) estão representados por diagramas de caixa com indicação da mediana, 1º e 3º quartil, limites mínimos e máximos. O teste Wilcoxon foi utilizado na análise dos resultados (\*\*) indica diferença significativa entre as amostras e o CN,  $p < 0,01$ .

### 4.3.2. Os tripomastigotas de *T. cruzi* induzem a expressão IL-12\IL-23 p40 e TNF- $\alpha$ pelos M $\Phi$

As citocinas são um grande grupo de proteínas produzidas por células do sistema imunitário, sendo capazes de modular a resposta imunitária [18].

IL-12 é uma citocina imunorreguladora produzida por macrófagos e células dendríticas, em resposta por exemplo a LPS, IFN- $\gamma$  e antígenos parasitários. A IL-12 é uma proteína composta por duas subunidades a p35 (35 kDa) e a p40 (40 kDa). Enquanto que a subunidade p35 é expressa constitutivamente, a subunidade p40 só é produzida após ativação do macrófago [53]. Neste estudo foi analisado a expressão da subunidade p40. Esta subunidade é comum à IL-12 e à IL-23 p40.

Para o efeito do presente estudo a menção a IL-12 refere-se a IL-12\IL-23 p40.

IL-6 é uma citocina multifuncional que atua tanto como pró-inflamatória, como anti-inflamatória em humanos. Provoca reações de fase aguda mas também leva ao desenvolvimento de respostas imunes celulares e humorais [54]. IL-6 participa ativamente na inflamação, é libertada em reações de fase aguda e desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro. Em infeções ou lesões teciduais, a IL-6 é produzida por monócitos e macrófagos e contribui para a remoção dos agentes infecciosos e reparação de tecidos danificados [55].

TNF- $\alpha$  é uma citocina com atividade de necrose tumoral. É produzida por diversas células incluindo os macrófagos. Para além de ter diversas funções esta citocina possui atividade imunomoduladora da resposta inflamatória. Desempenha um papel importante na resposta inflamatória pois medeia várias atividades imunológicas [18,56].

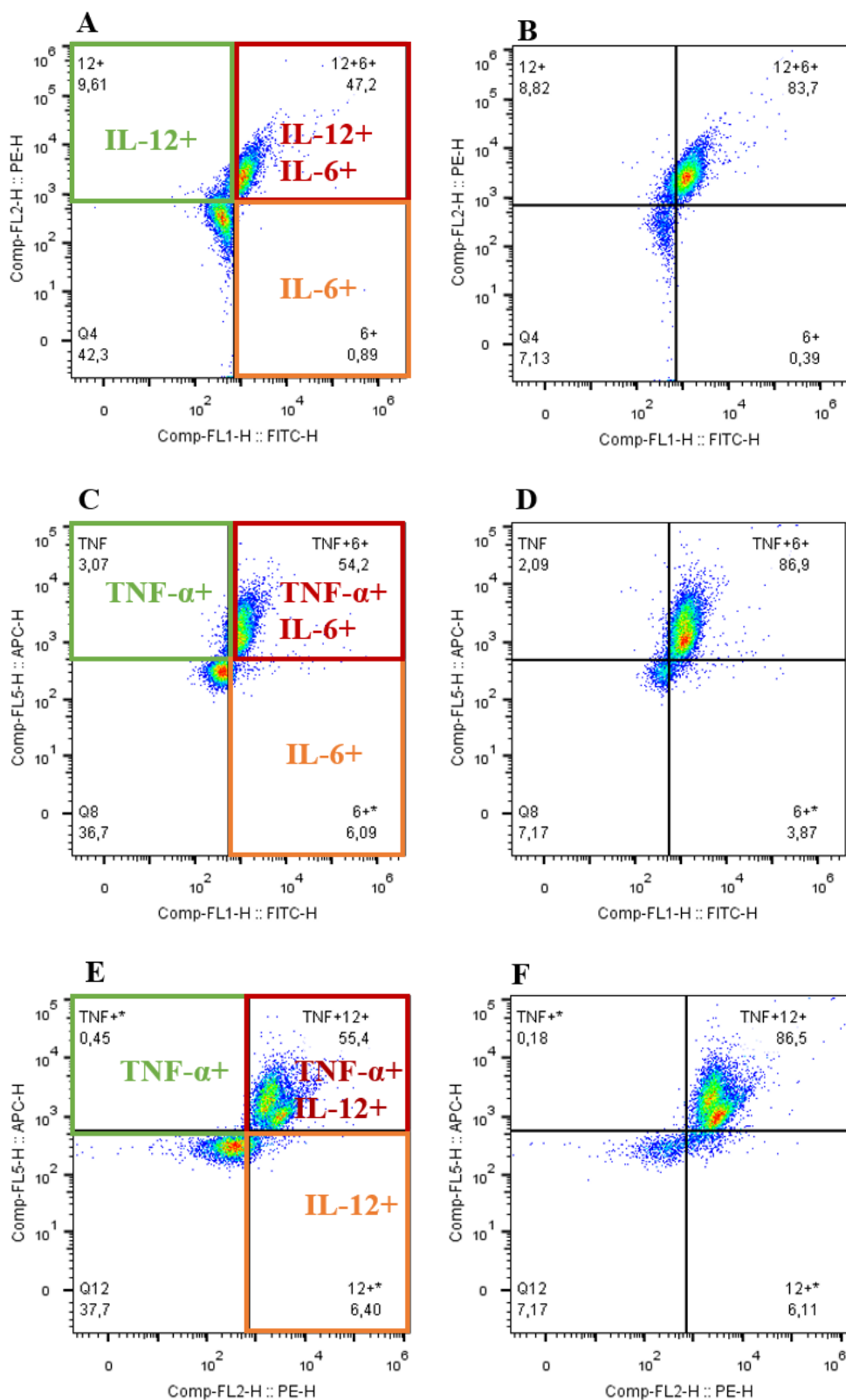
O controlo positivo (CP) de inflamação (M $\Phi$  + PMA) (Fig. 11) levou a um aumento significativo da frequência de M $\Phi$  IL-6<sup>+</sup> ( $p=0,0273$ ), M $\Phi$  IL-12<sup>+</sup> ( $p=0,0391$ ) e M $\Phi$  TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> ( $p=0,0273$ ) (Fig. 12A, B e C), quando comparado com o controlo negativo (CN), o que mais uma vez indica que os M $\Phi$  estavam viáveis e funcionais, capazes de promover resposta pró-inflamatória. Na marcação dupla positiva IL-6IL-12 ( $p=0,0039$ ), IL-6TNF- $\alpha$  ( $p=0,0039$ ) e IL-12TNF- $\alpha$  ( $p=0,039$ ) também houve um aumento significativo da frequência de M $\Phi$  que produziram ambas as citocinas (Fig. 12D, E e F).

Os Dotplots representativos da expressão IL-12IL-6, IL-6TNF- $\alpha$  e IL-12TNF- $\alpha$  por M $\Phi$  de murganho expostos ao parasita *T. cruzi* estão representados nas figuras 13, 14 e 15.

Quando comparado com o controlo negativo a estimulação de M $\Phi$  com AgEpi causou alterações significativas na frequência de M $\Phi$  TNF- $\alpha^+$  ( $p=0,0273$ ). No entanto, a estimulação dos M $\Phi$  com AgTrip não evidenciou alterações importantes na frequência de M $\Phi$  IL-6 $^+$ , M $\Phi$  IL-12 $^+$  ou M $\Phi$  TNF- $\alpha^+$ . Em contraste a exposição dos M $\Phi$  a epimastigotas ou tripomastigotas causou alterações significativas na expressão de citocinas pró-inflamatórias. Os epimastigotas de *T. cruzi* causaram aumento significativo da frequência de M $\Phi$  IL-6 $^+$  M $\Phi$  IL-12 $^+$  e M $\Phi$ TNF- $\alpha^+$  ( $p=0,0039$ ) enquanto que a exposição dos M $\Phi$  a tripomastigotas causou alterações significativas na frequência de M $\Phi$  IL-12 $^+$  ( $p=0,0195$ ) e TNF- $\alpha^+$  ( $p=0,0117$ ). Dados apresentados nos gráficos da Fig. 16A, B e C.

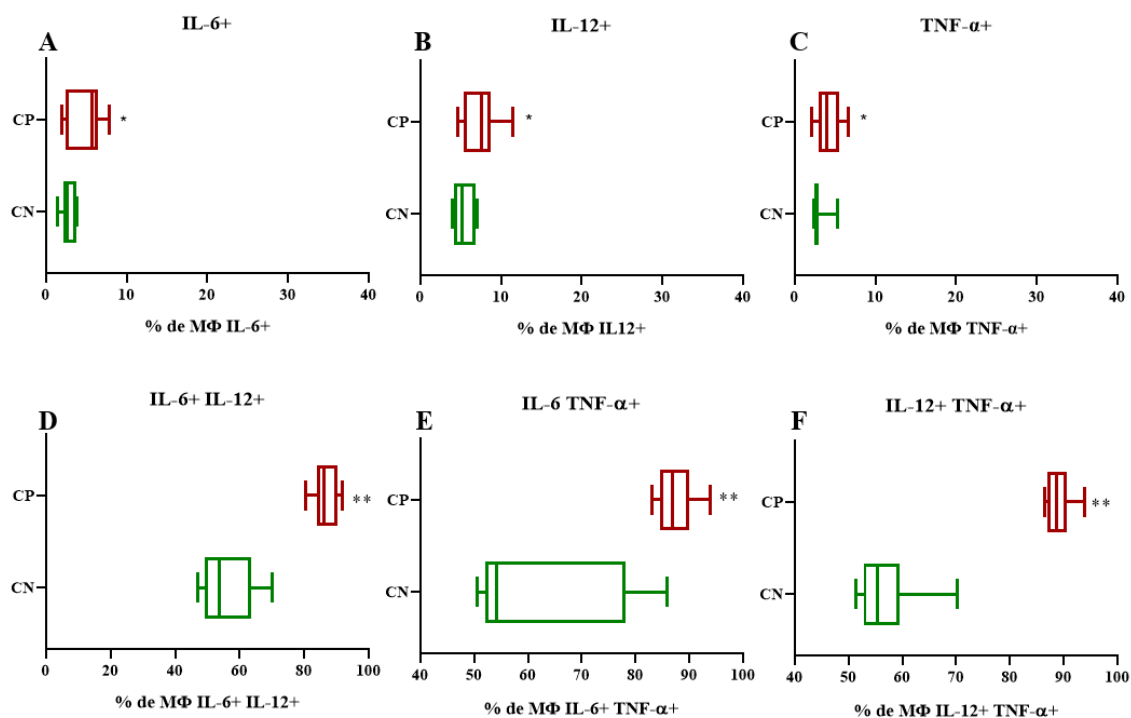
Relativamente à dupla marcação (Fig. 16D, E e F), a estimulação de M $\Phi$  a ambas as formas morfológicas de *T. cruzi* causou alterações significativas na frequência de macrófagos que expressavam duas citocinas. A frequência de M $\Phi$  duplos positivos para IL-6IL-12 ( $p=0,0039$ ) e IL-6TNF- $\alpha$  ( $p_{\text{AgEpi e AgTrip}}=0,0078$ ) ( $p_{\text{tripomastigotas}}=0,0039$ ) aumentaram significativamente após estimulação com os antígenos e exposição a tripomastigotas. Na dupla marcação IL-12TNF- $\alpha$ , tanto os antígenos como os parasitas causaram aumentos significativos na frequência de M $\Phi$  duplos positivos ( $p_{\text{AgEpi AgTrip e tripomastigotas}}=0,0039$  e  $p_{\text{epimastigotas}}=0,0391$ ).

Estes resultados sugerem que tanto os antígenos como ambas as formas de *T. cruzi* são perçecionadas por M $\Phi$  de murganho, induzindo a produção das citocinas pró-inflamatórias analisadas (Fig. 17). Curiosamente, os tripomastigotas parecem não ter tido um efeito acentuado na produção de IL-6, restringindo a indução da produção de citocinas pró-inflamatórias pelos M $\Phi$  à IL-12 e ao TNF- $\alpha$  (Fig. 17).

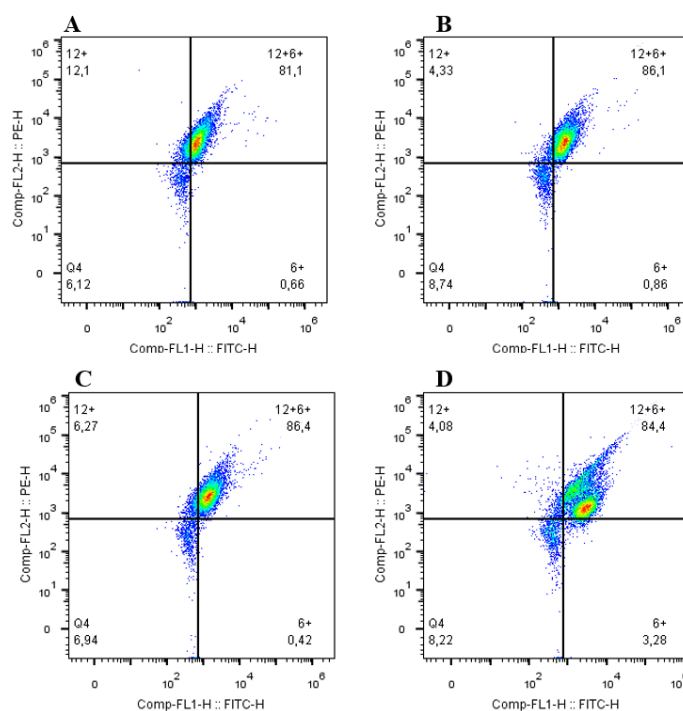


**Figura 11:** Dotplots representativos da expressão de IL-12, IL-6 e TNF- $\alpha$  por M $\Phi$  de murganho em repouso e estimulados com PMA

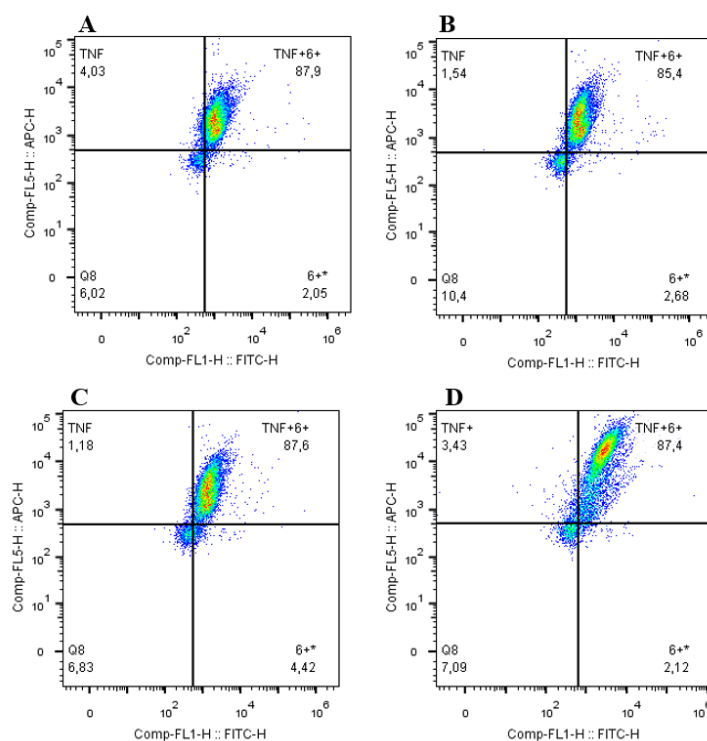
A expressão das citocinas individualizadas e aos pares (duplos positivos) por M $\Phi$  em repouso (CN) (A, C e E) e M $\Phi$  estimulados por PMA (CP) (B, D e F) foi analisado por citometria de fluxo multiparamétrica. O fluoróforo FITC marca macrófagos IL-6 $^{+}$ , o fluoróforo PE marca macrófagos IL-12 $^{+}$  e o fluoróforo APC marca macrófagos TNF- $\alpha$  $^{+}$ .



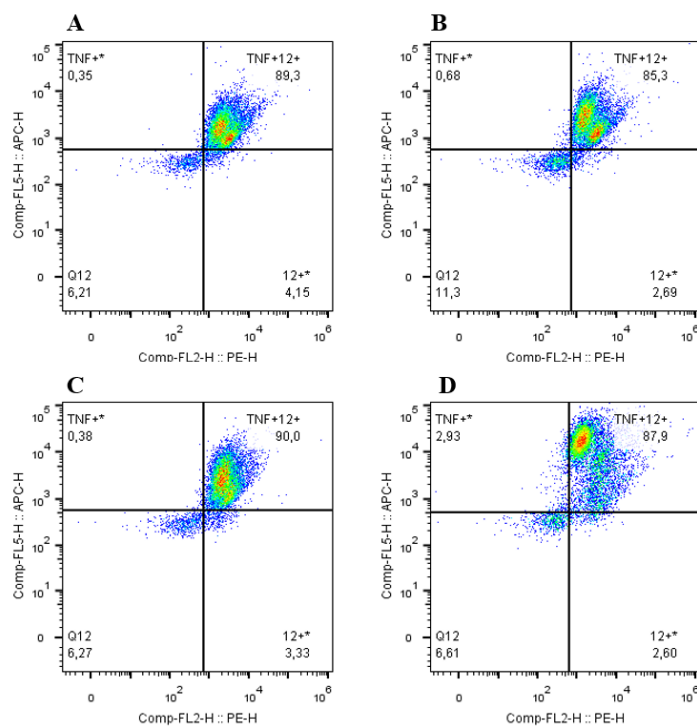
**Figura 12:** Expressão intracelular de citocinas por MΦ de murganho em repouso e estimulados com PMA. A expressão de IL-6 (A), IL-12 (B) e TNF- $\alpha$  (C) e a expressão conjunta de IL-6 e IL-12 (D), IL-6 e TNF- $\alpha$  (E) de IL-12 e TNF- $\alpha$  (F) foi analisada por citometria de fluxo multiparamétrica. Resultados de três experiências independentes e três réplicas por amostra estão representados por diagramas de caixa que incluem mediana, 1º e 3º quartis, limites mínimos e máximos. O teste Wilcoxon foi utilizado na análise dos resultados, (\*) ou (\*\*) indica diferença significativa entre MΦ em repouso (CN) e MΦ estimulados por PMA (CP), (\*)  $p < 0,05$  e (\*\*)  $p < 0,01$ .



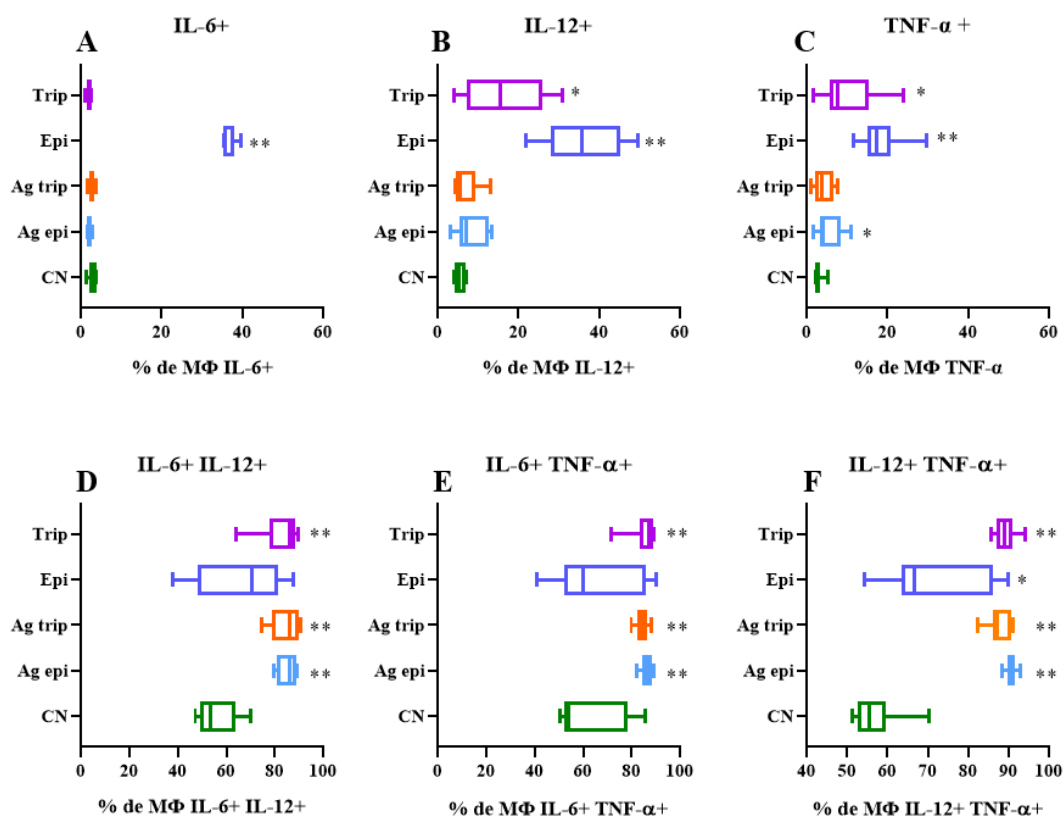
**Figura 13:** Dotplots representativos da expressão IL-12 e IL-6 por MΦ de murganho expostos ao parasita *T. cruzi*. A expressão de cada citocina e das duas citocinas por MΦ estimulados com AgEpi (A) e AgTrip (B) expostos a epimastigotas (Epi) (C) e tripomastigotas (Trip) (D) analisados por citometria de fluxo multiparamétrica. O fluoróforo FITC marca macrófagos IL-6<sup>+</sup> e o fluoróforo PE marca macrófagos IL-12<sup>+</sup>.



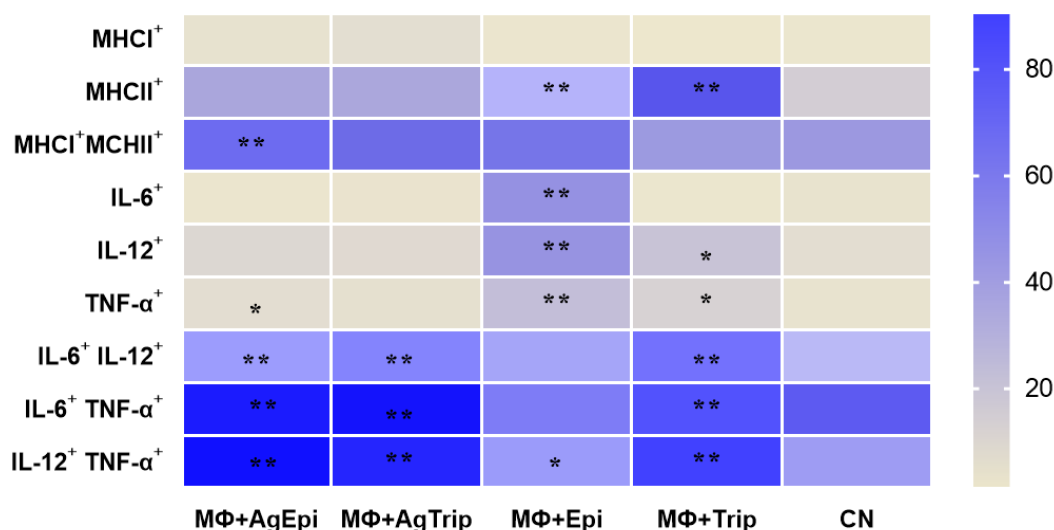
**Figura 14:** Dotplots representativos da expressão TNF-α e IL-6 por MΦ de murganho expostos ao parasita *T. cruzi*. A expressão de cada citocina e das duas citocinas por MΦ estimulados com AgEpi (A) e AgTrip (B) expostos a epimastigotas (Epi) (C) e tripomastigotas (Trip) (D) analisados por citometria de fluxo multiparamétrica. O fluoróforo FITC marca macrófagos IL-6<sup>+</sup> e o fluoróforo APC marca macrófagos TNF-α<sup>+</sup>.



**Figura 15:** Dotplots representativos da expressão TNF- $\alpha$  e IL-12 por M $\Phi$  de murganho expostos ao parasita *T. cruzi*. A expressão de cada citocina e das duas citocinas por M $\Phi$  estimulados com AgEpi (A) e AgTrip (B) expostos a epimastigotas (Epi) (C) e tripomastigotas (Trip) (D) analisados por citometria de fluxo multiparamétrica. O fluoróforo PE marca macrófagos IL-12 $^{+}$  e o fluoróforo APC marca macrófagos TNF- $\alpha^{+}$ .



**Figura 16:** Expressão intracelular de citocinas por MΦ de murganho expostos ao parasita *T. cruzi*. A expressão de IL-6 (A), IL-12 (B) e TNF- $\alpha$  (C) e a expressão conjunta de IL-6 e IL-12 (D), IL-6 e TNF- $\alpha$  (E) de IL-12 e TNF- $\alpha$  (F) foi analisada por citometria de fluxo multiparamétrica. Resultados de três experiências independentes e três réplicas por amostra estão representados por diagramas de caixa que incluem a mediana, 1º e 3º quartil, limites mínimos e máximos. O teste Wilcoxon foi utilizado na análise dos resultados (\* ou \*\*) indica diferença significativa entre as amostras e o CN, (\*)  $p < 0,05$  e (\*\*)  $p < 0,01$ .



**Figura 17:** Heat map da expressão MHC I, MHC II, MHC I e MHC II, de IL-6, IL-12, TNF-α, IL-6 e IL-12, IL-6 e TNF-α e IL-12 e TNF-α em MΦ de murganho expostos ao parasita *T. cruzi*.

A expressão foi analisada por citometria de fluxo multiparamétrica. Estão representados os resultados de três experiências independentes e três réplicas por amostra. O teste Wilcoxon foi utilizado na análise dos resultados (\* ou \*\*) indica diferença significativa entre as amostras e o CN, (\*)  $p < 0,05$  e (\*\*)  $p < 0,01$ .

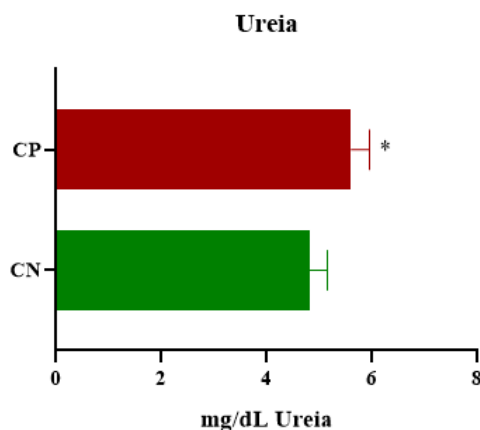
#### 4.4. *T. cruzi* induz os macrófagos a produzirem ureia *de novo*

A produção de ureia foi quantificada nos sobrenadantes das culturas de MΦ expostos a epimastigotas e tripomastigotas, e incubados com antígenos de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Como controlo positivo (CP) foi usado sobrenadante de culturas de macrófagos estimulados com PMA e como controlo negativo (CN) culturas de macrófagos em repouso.

A produção de ureia, no controlo positivo (MΦ estimulados com PMA) foi significativamente maior que o controlo negativo ( $p = 0,0313$ ) indicando que a via da síntese da ureia a partir da arginina estava funcional nos MΦ (Fig. 18).

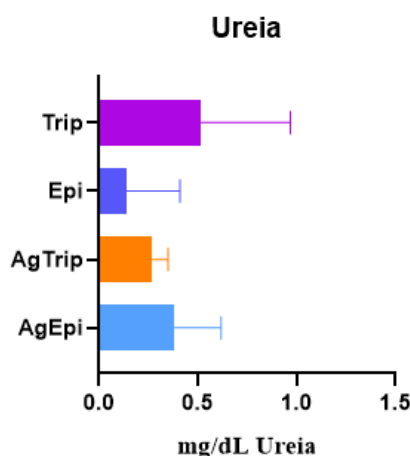
Nas amostras analisadas (MΦ+AgEpi, MΦ+AgTrip, MΦ+Epi e MΦ+Trip), quando se subtraiu a ureia produzida no CN à ureia produzida nas amostras, verificou-se que ocorreu produção de ureia *de novo* pelos MΦ em todos os casos. Mas quando se compara a ureia produzida pelas duas formas do parasita (epimastigotas e tripomastigotas) e pelos antígenos das duas formas do parasita (AgEpi e AgTrip) não se verificaram diferenças significativas (Fig. 19). Apesar da ureia ter um papel importante na sobrevivência do parasita, os baixos níveis de ureia produzido *de novo* podem não ter efeito acentuado durante a fase inicial da infeção. Contudo, tendo em conta que este estudo foi efetuado *in*

*vitro*, terá de se ter em consideração que é possível que esta produção reduzida tenha algum efeito benéfico na multiplicação do parasita.



**Figura 18:** Produção de ureia por MΦ de murganho.

Gráfico de barras representativo da ureia produzida por MΦ no controle negativo e controle positivo. A ureia foi quantificada no sobrenadante de MΦ em repouso (CN) e MΦ estimulados com PMA (CP). A média e desvio padrão dos resultados apresentados são relativos a três experiências independentes e três réplicas por amostra. O teste Wilcoxon foi utilizado na análise dos resultados, (\*) indica diferença significativa entre CP e CN,  $p < 0,05$ .



**Figura 19:** Produção *de novo* de ureia por MΦ expostos ao parasita *T. cruzi*.

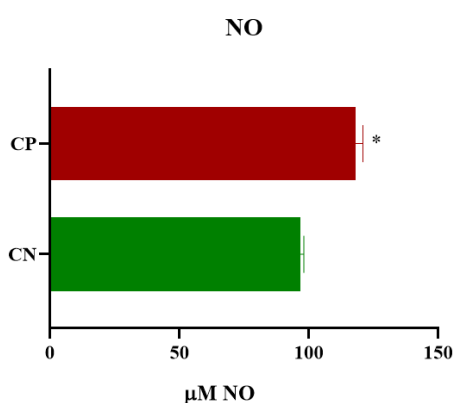
A ureia produzida foi quantificada no sobrenadante de MΦ estimulados com AgEpi e AgTrip e expostos a epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. A média e desvio padrão dos resultados de três experiências independentes e três réplicas por amostra estão representadas no gráfico de barras.

#### 4.5. *T. cruzi* induz a produção de óxido nítrico pelos macrófagos

A produção de óxido nítrico foi quantificada nos sobrenadantes das culturas de macrófagos incubados com epimastigotas, tripomastigotas e antigénios de epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, durante 24 horas. Como controle positivo (CP) foi usado sobrenadante de culturas de macrófagos estimulados com PMA e como controle negativo (CN) culturas de macrófagos em repouso.

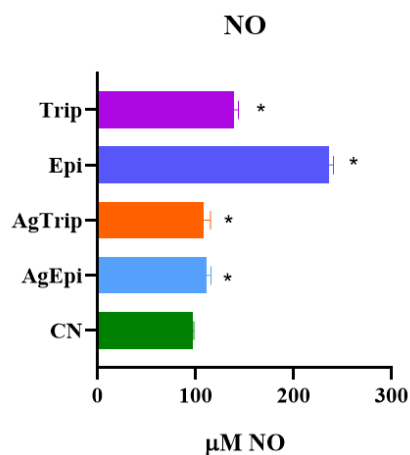
A produção de óxido nítrico (NO), no controlo positivo (MΦ estimulados com PMA) foi significativamente maior que o controlo negativo ( $p=0,0313$ ) indicando que a via da síntese do óxido nítrico a partir da arginina estava a funcionar nos MΦ (Fig. 20).

Os MΦ estimulados por AgEpi e AgTri e os MΦ expostos às duas formas de *T. cruzi* (epimastigotas e tripomastigotas) revelaram aumentos significativos na concentração de NO ( $P_{\text{AgEpi, AgTrip, epimastigotas e tripomastigotas}}=0,0313$ ), quando comparadas com o controlo negativo (Fig. 20). Os macrófagos expostos às formas epimastigotas de *T. cruzi* foram os que mais produziram NO. Estes resultados sugerem que os macrófagos de murganho reconhecem ambas as formas evolutivas de *T. cruzi*, do parasita e os seus antígenos, ficam ativados e produzem quantidades apreciáveis de óxido nítrico que libertam para o exterior. Curiosamente, os macrófagos produzem maior quantidade de óxido nítrico contra a forma não infetante.



**Figura 20:** Produção de óxido nítrico por MΦ de murganho.

Gráfico de barras representativo do NO produzida por MΦ no controlo negativo e controlo positivo. O NO foi quantificada no sobrenadante de MΦ em repouso (CN) e MΦ estimulados com PMA (CP). A média e desvio padrão dos resultados apresentados são relativos a três experiências independentes e três réplicas por amostra. O teste Wilcoxon foi utilizado na análise dos resultados, (\*) indica diferença significativa entre CP e CN,  $p<0,05$ .



**Figura 21:** Produção de óxido nítrico por MΦ expostos ao parasita *T. cruzi*.

O NO foi quantificada no sobrenadante de MΦ estimulados com AgEpi e AgTrip, e expostos a epimastigotas (Epi) e tripomastigotas (Trip) de *T. cruzi*. A média e desvio padrão dos resultados de três experiências independentes e três réplicas por amostra estão representadas por gráfico de barras. O teste Wilcoxon foi utilizado na análise dos resultados, (\*) indica diferenças significativas quando comparado com o CN,  $p < 0,05$ .

## 5. Discussão e Conclusões

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas. A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada com importância médica e veterinária que segundo a OMS constitui um problema de saúde pública global emergente, pois o crescimento populacional e o aumento dos fluxos migratórios, fez com que se alastrasse para regiões do mundo não endêmicas.

*T. cruzi* é um parasita intracelular que infeta células fagocitárias e não fagocitárias. No decorrer da infecção, os parasitas migram para tecidos para o qual têm tropismo elevado como o coração, o esôfago, o cólon, o tecido adiposo e o tecido nervoso. As manifestações clínicas da doença estão relacionadas com o tecido parasitado. Na fase aguda, os principais sintomas, quando estes se manifestam, são a febre, a inflamação no local de inoculação, a linfadenopatia generalizada, o edema dos membros inferiores e a hepatoesplenomegalia. Enquanto na fase crônica da doença, que também poderá ser assintomática, quando ocorrem os sintomas em um ou mais órgãos, estes são consequentes da multiplicação do parasita nesse(s) órgão(s). As duas principais formas clínicas, na fase crônica, são a forma cardíaca e a forma digestiva.

Atualmente, apenas estão disponíveis dois fármacos, o Benznidazole e o Nifurtimox, para o tratamento da doença de Chagas. Contudo, estes apenas apresentam eficácia elevada se forem administrados no início da infecção. A fase inicial é muitas vezes assintomática o que dificulta o diagnóstico precoce da doença. Estes fármacos apresentam diversas limitações por serem tóxicos, levando à ocorrência frequente de efeitos adversos, e por apresentarem variação de taxas de cura consoante a estirpe do parasita. É então relevante a procura de novos fármacos, mais seguros e eficazes contra o parasita. Por isso, o estudo do comportamento do sistema imunitário e das vias metabólicas é importante a fim de encontrar novos alvos terapêuticos [57].

Neste estudo, foi avaliada a ativação dos macrófagos após exposição a epimastigotas, tripomastigotas, antígenos de epimastigotas e antígenos de tripomastigotas de *T. cruzi*. Quando brevemente expostos às formas morfológicas de *T. cruzi* (24 horas), os macrófagos de murganho parecem ter detetado a presença do parasita, alterando a morfologia e emitindo pseudópodes que sugerem a possibilidade de fagocitarem os parasitas. Para compreender se o eventual processo de infecção dos macrófagos de

murganho por *T. cruzi* induzia a ativação imunitária foi analisada a expressão MHC I e MHC II e das citocinas IL-6, IL-12\IL-23 p40 e TNF- $\alpha$  por citometria de fluxo. Os resultados do presente estudo sugerem uma ativação imunológica dos M $\Phi$  induzindo uma maior expressão de MHC I, MHC II, IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ , sendo que a expressão varia consoante a exposição dos M $\Phi$  a AgEpi, AgTrip, epimastigotas e tripomastigotas.

O sistema imunológico inato é o primeiro a ser ativado, em resposta a um agente patológico, seguido por uma cascata de componentes da resposta imunitária adaptativa. Os componentes que participam na imunidade inata são os glóbulos brancos (monócitos que se diferenciam em M $\Phi$ , neutrófilos, eosinófilos, basófilos e células NK), os mastócitos, o sistema do complemento e as citocinas. Os M $\Phi$  e os neutrófilos são as células fagocitárias que fazem parte da primeira linha da resposta a agentes patogénicos. As células dendríticas também realizam a fagocitose e atuam como células apresentadoras de antígenos durante a resposta imunitária adaptativa. Os basófilos e mastócitos são responsáveis por iniciar uma resposta inflamatória, devido a lesão ou infeção. Os eosinófilos têm propriedades específicas para a remoção de parasitas. E as células NK são importantes para a destruição de células infetadas ou que apresentem dano [58]. A inflamação aguda é caracterizada pela infiltração de neutrófilos e monócitos, enquanto a inflamação crónica é caracterizada pela presença de células mononucleares como M $\Phi$  e linfócitos, no local da inflamação [54]. As células dendríticas, M $\Phi$  e células B são capazes de apresentar antígenos às células T CD4<sup>+</sup> (linfócitos T *helper*) e às células T CD8<sup>+</sup> (linfócitos T citotóxicos). As células T CD8<sup>+</sup> destroem diretamente as células infetadas, e as células T CD4<sup>+</sup> amplificam a resposta imunitária libertando citocinas. As citocinas e quimiocinas segregadas são responsáveis pelo recrutamento celular, comunicação célula a célula e facilitam a eliminação do patógeno [58]. A resposta imunitária adaptativa inclui dois tipos de células, as células T e células B. As células T estão envolvidas na imunidade mediada por células enquanto as células B são responsáveis pela imunidade humoral.

Os M $\Phi$  apresentam antígenos das duas classes do complexo major de histocompatibilidade (MHC), importantes para a apresentação de antígenos a linfócitos [59,60]. Os M $\Phi$  reconhecem os agentes patogénicos, fagocitando-os e degradando-os para posterior apresentação antigénica aos linfócitos T. Estes antígenos são expostos à superfície conjugados com moléculas do MHC II, levando à interação com células T

CD4<sup>+</sup>, ou com moléculas MHCI interagindo com células T CD8<sup>+</sup> [61]. A interação com as células T leva à ativação e segregação de citocinas, que vão modular a atividade dos MΦ. O macrófago comporta-se como agente da resposta inata e também como efetor da resposta adaptativa. Assim, a existência de populações heterogêneas de MΦ permite ao sistema imune plasticidade na resposta imunitária. A resposta das células T citotóxicas é importante pois ajuda na destruição de células infetadas, o que evita o desenvolvimento da doença [62].

No presente estudo, o contacto com os parasitas (epimastigotas e tripomastigotas) conduziu ao aumento dos macrófagos MHCII<sup>+</sup> indicando a possibilidade de apresentarem antígenos parasitários aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, conduzindo à ativação da resposta imunitária adaptativa. Por outro lado, praticamente não se detetou alterações na expressão do MHCI o que sugere que dificilmente ocorre apresentação antigénica às células T CD8<sup>+</sup>. O aumento de macrófagos MHCI<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> foi unicamente induzido pelo antígeno solúvel das formas epimastigotas de *T. cruzi*, que não são infetantes. Estes macrófagos duplamente positivos podem apresentar antígenos às células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> conduzindo à estimulação de linfócitos T *helper* e linfócitos T citotóxicos.

No estudo efetuado por Camargo e colaboradores, em modelos murinos infetados por *T. cruzi*, foi demonstrado que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> desempenham um papel crucial no controlo da parasitémia. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> protegem o hospedeiro contra o parasita através da sua atividade tóxica e da produção de IFN-γ e TNF-α, duas citocinas pró-inflamatórias envolvidas no controlo da infeção e que são fundamentais para a ativação dos macrófagos M1 [63]. As células T CD4<sup>+</sup> específicas do parasita auxiliam no controlo da infeção através da secreção de citocinas Th1 (IFN-γ, IL-2), amplificação da atividade fagocítica dos MΦ, estimulação da proliferação de células B, produção de anticorpos e amplificação da ativação de células T CD8<sup>+</sup> [58].

A nomenclatura de MΦ M1 e MΦ M2 deriva das citocinas Th1 (linfócitos T *helper* 1) e Th2 (linfócitos T *helper* 2). As células Th1 e Th2 podem ser divididas com base em seus respetivos perfis de produção de citocinas. Os Th1 produzem IFN-γ, IL-2 e TNF-α e os Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 [18].

Os estímulos do microambiente dos macrófagos definem a sua polarização, sendo a via de ativação clássica (M1) ou alternativa (M2). Antígenos em combinação com IFN-γ

leva à ativação clássica de MΦ (MΦ M1), o que melhora a atividade microbicida e a secreção de mediadores pró-inflamatórios. E os MΦ M2, anti-inflamatórios, são produzidos após estimulação de antígenos e IL-10. De acordo com o microambiente hospedeiro-parasita, a ativação alternativa de macrófagos pode ser subdividida. A diferenciação de M2a é promovida por IL-4 ou IL-13 e está associada à resposta Th2, ao processo alérgico, à internalização de parasitas extracelulares e à morte do parasita. M2b está relacionado com presença de recetores Fc e imunocomplexos estão envolvidos na ativação de células Th2 e na promoção da imunorregulação, contribuindo para o estabelecimento do microambiente que favorece a replicação de parasitas na fase aguda da infecção. A secreção de glicocorticóides e IL-10 leva à diferenciação em M2c, que também induz imunorregulação, remodelação e reparo tecidual. E o subtipo M2d resulta da secreção de IL-6 o que induz a angiogénese [64–66].

MΦ M1 tem propriedades associadas com produção de fatores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e IL-23, e libertação de espécies reativas de oxigênio e azoto (NO). Pelo contrário, a polarização de MΦ em direção ao fenótipo alternativo M2 está envolvida na resolução da inflamação, restabelecimento da homeostasia, angiogénese e cicatrização tecidual [65]. Assim sendo, o perfil pró-inflamatório M1 é benéfico para a eliminação de agentes patogénicos, mas é prejudicial para o processo de cicatrização. Contrariamente, o perfil anti-inflamatório M2 conduz à melhoria de doenças inflamatórias crónicas e à regeneração dos tecidos [66]. O controlo das infeções por *T. cruzi* é dependente da ativação de MΦ mediada por citocinas, levando à morte intracelular do parasita. A polarização M1 está intimamente ligada com a eliminação de parasitas, e a polarização M2 pode ser eficaz na prevenção da progressão da patologia oxidativa e inflamatória na doença de Chagas [65].

Os diferentes agentes patogénicos exploram respostas regulatórias para tentar escapar ao sistema imunitário e aumentar sua sobrevivência no hospedeiro. A ativação celular é fundamental para a indução de uma resposta imunitária eficaz contra os agentes patogénicos, pois a ativação/polarização inadequada dos MΦ pode levar a danos nos tecidos, disfunção imunitária e agravamento da doença [65].

As citocinas intracelulares avaliadas neste estudo, após estimulação dos MΦ (IL-6, IL-12/IL-23 p40 e TNF- $\alpha$ ) são citocinas pró-inflamatórias que estão presentes na fase aguda inicial da infecção e estão associadas à ativação clássica dos MΦ (M1).

A interação de *T. cruzi* com monócitos e MΦ pode ativá-los para adquirir funções pró-inflamatórias importantes para o controlo da infecção durante a fase aguda [65]. No presente estudo, tanto as formas de *T. cruzi* (epimastigotas e tripomastigotas) como os antigénios induziram os macrófagos a produzirem IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ . De facto, a maior parte dos macrófagos continha duas destas citocinas o que indica que nas 24 horas iniciais da infecção ou do contacto com os antigénios parasitários, os MΦ contribuem para o estabelecimento de microambientes inflamatórios. Os MΦ são células versáteis, com plasticidade para reprogramar os seus fenótipos numa ampla gama de estados funcionais, dependendo do estímulo ambiental e das funções fisiológicas. Durante os estádios iniciais da infecção, *T. cruzi* induz uma resposta inflamatória, que desempenha um papel crucial na patogénese da doença [65]. Os MΦ estão envolvidos no desenvolvimento da resposta imunitária protetiva contra a infecção por *T. cruzi*. De acordo com os estudos de Medina-Buelvas e colaboradores, os MΦ M1 aumentaram significativamente três a cinco dias após infecção, mas depois diminuíram ligeiramente. Enquanto os MΦ M2 mantiveram-se reduzidos no início da infecção [64]. Atualmente, procuram-se estratégias para alterar a relação M1/M2. Pois uma relação M1/M2 equilibrada permite combater eficazmente diferentes doenças, desempenhando um papel crítico no controlo e na gravidade da infecção por *T. cruzi* [66]. Na fase aguda, a polarização M1 está associada à secreção de citocinas Th1 e aumento da expressão de iNOS, MHCII, de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$  e de radicais oxidativos, como é o caso de NO e ROS (espécies reativas de oxigénio), resultando em dano tecidual, morte dos parasitas e segregação de IL-10 e TGF- $\beta$ , que são importantes para a imunorregulação e redução do dano tecidual resultante de inflamação excessiva [65]. Os MΦ M2 estão relacionados com remodelação tecidual e secreção de citocinas Th2 que aumenta a expressão da IL-10 e TGF- $\beta$  [65].

No âmbito deste estudo, avaliamos a exposição dos MΦ à forma infetante (tripomastigotas), à forma não infetante (epimastigotas) de *T. cruzi* e aos antigénios parasitários de ambas as formas, após 24 horas, por isso os resultados obtidos referem-se à fase inicial da infecção. Estes resultados corroboram estudos anteriores, onde ocorre uma

resposta inflamatória, com aumento das citocinas IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ , contribui para a morte do parasita [33,65,67].

A IL-6 é considerada uma citocina pró-inflamatória. Quando o agente patológico é removido do hospedeiro, a síntese de IL-6 termina. A produção excessiva de IL-6 desempenha um papel patológico no desenvolvimento de várias doenças inflamatórias. Assim, a expressão adequada de IL-6 é muito importante para a defesa do hospedeiro [55]. A IL-12/IL-23p40 atrai M $\Phi$  e promove a migração de células dendríticas, estando associada a respostas inflamatórias contra agentes patogênicos. A IL-12 é conhecida como uma citocina que estimula a produção de IFN- $\gamma$  por células NK e células T. Parasitas intracelulares estimulam a síntese de IL-12 por M $\Phi$ . E esta citocina possui um papel fundamental na imunidade inata, bem como no desenvolvimento da resposta imune específica. As citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 têm grande importância no controle da infecção através da ativação da imunidade inata e adquirida [68]. Aliberti e colaboradores, demonstraram que os tripomastigotas de *T. cruzi* induzem a produção de IL-12p40 por M $\Phi$ . A IL-12 medeia a resistência à infecção por *T. cruzi* *in vivo* [67].

Ripoll e colaboradores demonstraram em pacientes com doença de Chagas crônica um aumento de células T que expressam TNF- $\alpha$  após estimulação antigênica. Durante a infecção por *T. cruzi*, a secreção de TNF- $\alpha$  é desencadeada pelos parasitas em M $\Phi$  e células T. Em combinação com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  contribuiu para o controle de parasitas intracelulares [69]. A neutralização de IL-12 em ratinhos infetados resulta no aumento da parasitemia e consequente mortalidade. Sugerindo que IL-12 é uma das chaves para a resistência do hospedeiro à infecção por *T. cruzi* [33].

O controle do parasita *T. cruzi* durante as primeiras semanas de infecção é dependente de citocinas que medeiam a ativação microbicida do M $\Phi$ , favorecendo a morte intracelular do parasita [68]. No entanto, *T. cruzi* interage de forma complexa com as defesas imunológicas do hospedeiro sendo capaz de estabelecer uma infecção persistente. As glicoproteínas de superfície de *T. cruzi* e/ou glicofosfolipídios são reconhecidos por células do sistema imunitário inato e estimulam a produção de múltiplas citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-6 por M $\Phi$ . Essas citocinas induzem a produção de ião superóxido e NO por M $\Phi$ , que contribuem para a morte direta do parasita. Contudo, estes radicais livres são produzidos em níveis baixos e não são suficientes para eliminar a infecção parasitária [58].

A persistência de respostas inflamatórias associadas à fibrose tecidual e morte celular é uma característica marcante da fase crônica da doença de Chagas. Zanolini e colaboradores demonstraram que MΦ presentes num miocárdio infetado com o parasita *T. cruzi*, bem como MΦ expostos *in vitro* a soros de murganhos infetados são polarizados para um fenótipo pró-inflamatório com extensa produção de TNF- $\alpha$  [65].

A interação entre o hospedeiro e o agente patogénico regula as isoformas da arginase e determina o resultado da infecção. A conversão em ureia suporta o crescimento do parasita enquanto que a conversão em óxido nítrico contribui para a eliminação do parasita [48]. No presente estudo, os MΦ expostos aos parasitas e aos antígenos levaram à produção *de novo* de uma reduzida quantidade de ureia.

A infecção por *T. cruzi* desencadeia uma produção substancial de NO, que tem efeitos protetores e tóxicos no sistema imunológico do hospedeiro. Células fagocíticas quando detetam tripomastigotas ativam a via induzível de NO-sintetase que produz NO e é amplamente responsável pela morte do parasita. O NO também é responsável por modular muitas das etapas da imunidade inata e adaptativa podendo também causar stress oxidativo, que é prejudicial para o hospedeiro, devido ao aumento do dano tecidual. As citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , são fortes indutores da via induzível de NO-sintetase e são produzidos em grandes quantidades durante a infecção aguda. Por outro lado, TGF- $\beta$  e IL-10 regulam negativamente a produção de NO. Segundo alguns autores, NO demonstrou possuir um efeito protetor contra a infecção por *T. cruzi* [70].

Zanolini e colaboradores demonstraram que MΦ recolhidos de murganhos, na fase aguda da infecção por *T. cruzi* liberam grandes quantidades de NO e acumulam níveis elevados de mRNA de iNOS com secreção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1- $\beta$ . Essa resposta inflamatória inicial leva à polarização M1 [65].

O NO induz a transcrição de IL-12 p40, em MΦ humanos e está envolvido no controlo da parasitémia induzida por *T. cruzi*, conduzindo à morte do parasita *in vitro* [70]. O NO afeta o parasita modificando quimicamente as proteínas contendo cisteína e/ou ligando-se a metaloproteínas que medeiam processos metabólicos cruciais. A toxicidade do NO difere de acordo com a estirpe do parasita e de acordo com o microambiente fisiológico. O NO demonstrou ser a principal molécula efetora envolvida na morte mediada por MΦ de amastigotas de *T. cruzi*, sendo essencial para a sobrevivência do hospedeiro durante a

infecção aguda. A sua produção é rapidamente desencadeada em células do sistema imunitário inato, após a detecção do parasita, e posteriormente por células do sistema imunitário adaptativo [33,70].

No entanto, esse amplo espectro de atividade do NO também pode ser responsável por extensos danos aos tecidos dos hospedeiros infetados e pela manifestação da doença. As funções exercidas pelo NO contra o parasita, faz com que se torne um possível alvo terapêutico, crucial para a imunoterapia desta doença. No entanto, são necessários estudos adicionais para compreender os múltiplos papéis do NO e estabelecer os riscos e benefícios de tais abordagens terapêuticas durante a infecção parasitária [70].

No presente estudo, tanto os parasitas como os antígenos induziram a produção de NO, indicando que no início da infecção *T. cruzi* dirige a ativação clássica de MΦ (M1) e a produção de citocinas pró-inflamatórias que levam à morte do parasita. Sendo por isso, a produção de NO, benéfica no combate à infecção. Pelo contrário baixos níveis de ureia indica uma reduzida ativação da via alternativa de MΦ (M2) que suporta o crescimento do parasita. Estes resultados corroboram estudos que demonstram a produção de NO na infecção aguda por *T. cruzi* [70,71].

As doenças causadas por parasitas protozoários são as principais responsáveis por doença e morte a nível global. O problema é agravado por falta de vacinas e pela resistência dos parasitas aos medicamentos disponíveis [2]. O Benznidazole e o Nifurtimox são as opções de tratamento atualmente disponíveis para tratar a doença de Chagas. Esses medicamentos foram desenvolvidos há mais de 40 anos e o Benznidazole é o único medicamento aprovado pela *Food and Drug Administration* dos EUA, para tratar a infecção por *T. cruzi* [13]. Esses medicamentos antiparasitários são mais eficazes no tratamento da doença em crianças e adultos em fase aguda. No entanto, é comum os pacientes apresentarem sintomas inespecíficos, ou serem assintomáticos, levando à falta de diagnóstico e consequente privação do tratamento. A reativação da parasitemia aguda em indivíduos crônicos, após imunossupressão ou transplante ou em doentes infetados com HIV, leva a que parasitas persistam durante anos após a infecção inicial. A persistência do parasita no hospedeiro providencia a produção de antígenos que continuam a desencadear respostas imunes e a causar lesão tecidual patológica, conduzindo à inflamação cardíaca, fibrose e posteriormente insuficiência cardíaca [58].

É necessário encontrar uma imunoterapia que controle a transmissão de *T. cruzi* e a fase crónica da doença. Nas últimas décadas, vários grupos de investigadores desenvolveram várias vacinas experimentais que mostraram resultados promissores em pequenos modelos animais de infeção por *T. cruzi*. Contudo, são necessários mais estudos para testar as vacinas contra *T. cruzi* em modelos animais de grande porte para o desenvolvimento da melhor terapia imunológica possível de forma a prevenir a cardiomiopatia chagásica humana assim como as outras formas da doença [58]. Para melhorar o conhecimento sobre tópicos cruciais acerca da patogénese, diagnóstico e quimioterapia que envolvem complexas interações entre parasita-hospedeiro são necessários diversos estudos laboratoriais e clínicos para definição de biomarcadores para avaliação precoce das respostas terapêuticas e cura.

Embora ainda não se conheçam todos os mecanismos que medeiam o controlo dos parasitas em humanos, há evidências de que a sobrevivência dos parasitas dependem da atividade de células da imunidade inata, como células NK, neutrófilos e macrófagos [65]. Os macrófagos, células fagocitárias que participam ativamente na resposta à infeção, por possuírem um papel crucial na patogénese são potenciais alvos para aplicações terapêuticas [26].

Neste estudo foi possível demonstrar que os macrófagos, sendo células que atuam na fase aguda da infeção, são ativadas na presença do parasita. A estimulação de macrófagos de murganho com antigénios solúveis das formas do parasita assim como a exposição às duas formas do parasita *T. cruzi* Y (epimastigotas e tripomastigotas), leva à ativação dos macrófagos pela via clássica (M1). Após ativação estes libertam citocinas pró-inflamatórias e induzem o aumento do NO, o que favorece a eliminação do parasita. Também se verificou que a presença das duas formas do parasita (epimastigotas e tripomastigotas), levaram ao aumento MHCII, pelos MΦ. O que possibilita a interação com células T CD4+, que auxiliam no controlo da infeção.

A forma de ativação dos macrófagos e outras células do sistema imunitário, quer na fase aguda quer na fase crónica da doença é importante para estabelecer possíveis alvos terapêuticos. Como neste estudo se avaliou a forma de ativação dos macrófagos após 24 horas de exposição aos antigénios solúveis e às formas epimastigotas e tripomastigotas

de *T. cruzi*, seria interessante também avaliar a ativação dos macrófagos em diferentes tempos de exposição aos antígenos e às formas do parasita.

Sabendo também que as estratégias de regulação da resposta imune, particularmente de macrófagos, dependem da genética do hospedeiro, a interação entre a genética do parasita e do hospedeiro deve ter um papel importante na definição da patogênese da doença de Chagas [65]. Por isso também devem ser avaliadas as respostas dos macrófagos quando expostos a outras estirpes de *T. cruzi* assim como diferentes linhas celulares.

## 6. Referências bibliográficas

1. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis) [Internet]. [cited 2022 Feb 21]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
2. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity : Something new for something known about Chagas disease manifestations , serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop* [Internet]. 2018;184(April 2017):38–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>
3. Jansen AM, Xavier SCDC, Roque ALR. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):1–25.
4. Neves DP, Melo AL de, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologie*. 13ª Edição. *Parasitologia Humana*. Atheneu; 2016. Capítulo 11.
5. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. Infection , The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature : Rationale , epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2012;12(2):240–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
6. Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA. Genotyping of *Trypanosoma cruzi* : systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81:1041–9.
7. Zingales B, Andrade SG, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature : second revision meeting recommends TcI to TcVI. 2009;104:1051–4.
8. Pinto CM, Kalko EK V, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone , with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2012;12(6):1328–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.013>

9. Echeverria LE, Morillo CA. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Infect Dis Clin North Am [Internet]. 2019;33(1):119–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015>
10. Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Orally-transmitted Chagas disease. Med Clínica (English Ed [Internet]. 2017;148(3):125–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcle.2017.02.007>
11. Shyamasundari K, Rao KH. Medical Parasitology. MJP Publishers; 2012. 155–157 p.
12. Sastry AS, K SB. Essentials of Medical Parasitology. 2014. 79–84 p.
13. Centros para el Control y Prevención de Enfermedades. CDC - DPDx - American Trypanosomiasis [Internet]. Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria. 2019 [cited 2022 Jun 10]. p. 2. Available from: [https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html%0Ahttps://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html?fbclid=IwAR3Z7\\_NClwU5owGvsrShvX3jwQeRQPdTh4JHeKEHic4OXe-70nb91XrPJ70](https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html%0Ahttps://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html?fbclid=IwAR3Z7_NClwU5owGvsrShvX3jwQeRQPdTh4JHeKEHic4OXe-70nb91XrPJ70)
14. Walker DM, Oghumu S, Gupta G, McGwirw BS, Drew ME, Satoskar AR. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. Cell Mol Life Sci. 2014;71:1245–63.
15. Cruz-saavedra L, Vallejo GA, Guhl F, Ramírez JD. Transcriptomic changes across the life cycle of *Trypanosoma cruzi* II. PeerJ 8947. 2020;1–26.
16. De Souza W, Barrias ES. May the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* be infective? Acta Trop [Internet]. 2020;212(June):105688. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105688>
17. Bogitsh BJ, Carter CE, Oeltmann TN. Human parasitology. 4th ed. Elsevier; 2013. 108–113 p.
18. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. Fundamentos de Imunologia. 12<sup>a</sup>. Guanabara Koogan LTDA; 2013. Cap. 1.
19. Auto HJ de F. Doenças infecciosas e parasitárias. Revinter; 2002. 211–216 p.

20. Ridley JW. Parasitology for medical and clinical laboratory professionals. Delmar cengage Learning; 2012. 91–94 p.
21. Cavalcante C, Cavalcante AS, Góes ZR. Caracterização epidemiológica e distribuição geográfica de potenciais vetores da doença de Chagas na região do Maciço de Baturité, Ceará, Brasil Epidemiological characterization and geographical distribution of potential vectors of Chagas Disease in Mac. Heal Biol Sci. 2020;8:1–7.
22. Wehrendt DP, Gómez-Bravo A, Ramirez JC, Cura C, Pech-May A, Ramsey JM, et al. Development and evaluation of a duplex TaqMan qPCR assay for detection and quantification of *Trypanosoma cruzi* infection in domestic and sylvatic reservoir hosts. Parasites and Vectors [Internet]. 2019;12(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3817-9>
23. Luquetti AO, Schmun GA. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. Am Trypanos Chagas Dis. 2017;2:687–730.
24. Pan American Health Organization. Guidelines for the diagnosis and treatment of chagas disease. Vol. 59. 2019.
25. Fehder WP, Tuluc F, Ho WZ, Douglas SD. Macrophages. Encyclopedia of Stress. 2007. Cap. 1,8 e 11.
26. Biswas SK, Mantovani A. Macrophages: Biology and role in the pathology of diseases. Springer. 2014. 1–615 p.
27. Simões RS, Girão JHRC, Sasso GR da S, Silva RF da, Alonso LG, Marques SR. Etimologia de termos morfológicos [Internet]. Vol. UNIFESP. 2014 [cited 2022 May 15]. p. 1–99. Available from: <https://dmorfo.sites.unifesp.br/images/doc/Grad/2017/Histologia/Dicionario-etimologico.pdf>
28. Girirajan S, Campbell C, Eichler E. Early hematopoiesis and macrophage development. Physiol Behav. 2011;176(5):139–48.
29. Honold L, Nahrendorf M, Hospital MG. HHS Public Access. 2019;122(1):113–27.

30. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018 Sep 1;6425–40.
31. Sun Y, Li J, Xie X, Gu F, Sui Z, Zhang K, et al. Macrophage-Osteoclast Associations: Origin, Polarization, and Subgroups. *Front Immunol*. 2021;12:1–15.
32. Cardillo F, De Pinho RT, Antas PRZ, Mengel J. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Pathog Dis*. 2015;73(9):1–8.
33. Shoda LKM, Kegerreis KA, Suarez CE, Roditi I, Corral RS, Bertot GM, et al. T . brucei Is Mitogenic for b Lymphocytes and Stimulates Macrophage Expression of Interleukin-12 , Tumor Necrosis Factor Alpha , and Nitric Oxide. *Infect Immun*. 2001;69:2162–71.
34. República D da. Decreto-Lei n.º 102-A/2020. 2020.
35. Duarte P, Costa R. Manual De Segurança Para Laboratórios. Técnico Lisboa. 2016;1–66.
36. ANTÓNIO TAVARES IRENE ALVES PEREIRA. Resíduos hospitalares. 2005;
37. Fujihara M, Wakamoto S, Ito T, Muroi M, Suzuki T, Ikeda H, et al. Lipopolysaccharide-triggered desensitization of TNF- $\alpha$  mRNA expression involves lack of phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  in a murine macrophage-like cell line, P388D1. Lipopolysaccharide-triggered desensitization TNF- $\alpha$  mRNA Expr Involv lack phosphorylation I $\kappa$ B $\alpha$  a murine macrophage-like cell line, P388D1. 2000;68(2):267–76.
38. Gonçalves CS, Ávila AR, De Souza W, Motta MCM, Cavalcanti DP. Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: Morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):1–14.
39. Barbosa HS. Doença de Chagas: manual para experimentação animal. Scielo Books. 2000;Parte II:Cap. 10.4.
40. Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol*

- Biochem Parasitol. 1985;16(3):315–27.
41. Vanrell MC, Losinno AD, Cueto JA, Balcazar D, Fraccaroli LV, Carrillo C, et al. The regulation of autophagy differentially affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(11):1–23.
  42. Rossi IV, Gravinhi B, Ramirez MI. Isolation and Characterization of Extracellular Vesicles Derived from *Trypanosoma cruzi*. In. Gómez KA, Buscaglia CA, editors. Humana Press; 2019. Cap. 7.
  43. 13055 - TC-100 | Thermo Fisher Scientific - PT [Internet]. [cited 2022 Apr 5]. Available from: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/technical-resources/media-formulation.327.html>
  44. Zuma AA, dos Santos Barrias E, de Souza W. Basic Biology of *Trypanosoma cruzi*. Curr Pharm Des. 2020;27(14):1671–732.
  45. Martins RM, Covarrubias C, Rojas RG, Silber AM, Yoshida N. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. Infect Immun. 2009;77(7):3023–32.
  46. Ammerman N, Beier-Sexton M, Azad A. Vero cell line maintenance. Curr Protoc Microbiol. 2009;APPENDIX:1–10.
  47. Mckinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. Curr Protoc Immunol. 2019;120:1–16.
  48. Das P, Lahiri A, Lahiri A, Chakravortty D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: A metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. PLoS Pathog. 2010;6(6).
  49. BioChain Institute I. User 's Manual and Instructions. Z5030016(Urea Assay Kit).
  50. Cayman chemical. Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit. (780001):1–10. Available from: [papers2://publication/uuid/9AFCE987-A0B5-4850-928C-DDB097F5DD55](https://pubs2://publication/uuid/9AFCE987-A0B5-4850-928C-DDB097F5DD55)
  51. Fischer ER, Hansen BT, Nair V, Hoyt FH, Dorward DW. Scanning Electron Microscopy Elizabeth. 2012. 1–76 p.

52. Carr KE, Saleh KM, Carr K E, Saleh TPG. INVITED REVIEW Scanning electron microscopy. *Histopathology*. 1982;6:3–24.
53. Du C, Sriram S. Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 production by IL-10 and TGF- $\beta$  in ANA-1 cells. *J Leukoc Biol*. 1998;64(1):92–7.
54. Kaur S, Bansal Y, Kumar R, Bansal G. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. *Bioorganic Med Chem [Internet]*. 2020;28(5):115327. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115327>
55. Tanaka T, Narazaki M, Masuda K, Kishimoto T. Regulation of IL-6 in immunity and diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2016;941:79–88.
56. Mencoboni M, Lerza R, Bogliolo G. [Tumor necrosis factor: a cytokine with multiple actions]. *Recenti Prog Med [Internet]*. 1992 [cited 2022 Jul 6];83(1):15–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1561477/>
57. Rodriguez JB, Falcone BN, Szajnman SH. Detection and treatment of *Trypanosoma cruzi*: a patent review (2011-2015). *Expert Opin Ther Pat*. 2016;26(9):993–1015.
58. Rios LE, Vázquez-Chagoyán JC, Pacheco AO, Zago MP, Garg NJ. Immunity and vaccine development efforts against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop [Internet]*. 2019;200(September):105168. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105168>
59. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*. 2014;2(1):1–9.
60. Massa PT, Hirschfeld S, Levi B zion, Quigley LA, Ozato K. Expression of major histocompatibility complex ( MHC ) class I genes in astrocytes correlates with the presence of nuclear factors that bind to constitutive and inducible enhancers. *J Neuroimmunol*. 1992;
61. Koppensteiner H, Brack-Werner R, Schindler M. Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology*. 2012;9:1–11.

62. Hobbs SJ, Harbour JC, Yates PA, Ortiz D, Landfear SM, Nolz JC. Vaccinia virus vectors targeting peptides for MHC-II presentation to CD4+ T cells. *Physiol Behav.* 2020;176(3):139–48.
63. Camargo R, Faria LO, Kloss A, Favali CBF, Kuckelkorn U, Kloetzel PM, et al. *Trypanosoma cruzi* infection down-modulates the immunoproteasome biosynthesis and the MHC class I cell surface expression in HeLa cells. *PLoS One.* 2014;9(4):1–12.
64. Medina-Buelvas DM, Rodríguez-Sosa M, Vega L. Characterisation of macrophage polarisation in mice infected with ninoa strain of *trypanosoma cruzi*. *Pathogens.* 2021;10(11):1–17.
65. Zanlucui NG. Macrophage Polarization in Chagas Disease. *J Clin Cell Immunol.* 2015;06(02):1–6.
66. Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, Kalergis AM. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. *Immunology.* 2018;154(2):186–95.
67. Aliberti JCS, Cardoso MAG, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun.* 1996;64(6):1961–7.
68. Offman ROLC, Sa U De. *Trypanosoma cruzi* : IL-10, TNF- $\alpha$  , IFN- $\gamma$ , and IL-12 Regulate Innate and Acquired Immunity to Infection. *Exp Parasitol.* 1996;244:231–44.
69. Ripoll JG, Giraldo NA, Bolaños NI, Roa N, Rosas F, Cuéllar A, et al. T cells responding to *Trypanosoma cruzi* detected by membrane TNF- $\alpha$  and CD154 in chagasic patients: *Immun Inflamm Dis.* 2018;6(1):47–57.
70. Gutierrez FRS, Mineo TWP, Pavanelli WR, Guedes PMM, Silva JS. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(SUPPL. 1):236–45.
71. Hernández-Torres M, Silva do Nascimento R, Rebouças MC, Cassado A, Matteucci KC, D’Império-Lima MR, et al. Absence of Bim sensitizes mice to

experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Cell Death Dis. 2021;12(7):1–8.

## 7. Anexos

### 7.1 Anexo 1

#### Preparação de meio LIT

Juntar num *erlenmeyer* de 1500ml, 2,5g de extrato de fígado, 5g de fosfato de triptose, 4g de cloreto de sódio, 3,15g de di-sódio hidrogénio-ortofosfato, 2g de glucose, 0,4g de cloreto de potássio e 1000ml de água destilada. Esta solução é homogeneizada utilizando um agitador magnético, até dissolver todas as substâncias. De seguida a solução é colocada numa garrafa de 1000ml e para esterilização é filtrada num filtro de 0,22µm.

Na câmara de fluxo laminar, junta-se 0,1g de hemin a 98%, penicilina e estreptomicina na proporção 100 µg/mL. A solução pode ser mantida a 4°C durante 1 mês.

O meio deve ser distribuído para garrafas estéreis onde se adiciona 10% de FBS inativado, ficando assim pronto para utilização.

### 7.2 Anexo 2

#### Coloração de lâminas com Giemsa

Colocar sobre a lâmina uma gota do produto que se pretende analisar, neste caso foram analisados os parasitas em meio de cultura, e deixar secar. Seguidamente procede-se à fixação com metanol durante 30 segundos, colocando algumas gotas sobre a lâmina. Após a fixação, coloca-se algumas gotas da solução de Giemsa a 5%, de modo a cobrir toda a lâmina, durante 20-30 minutos. Por fim a lâmina é lavada com água corrente.

### 7.3 Anexo 3

Composição do meio TAU:

| Componentes do meio TAU | mM  | g/L de meio |
|-------------------------|-----|-------------|
| NaCl                    | 190 | 11,10       |
| KCl                     | 17  | 1,26        |
| MgCl <sub>2</sub>       | 2   | 0,407       |
| CaCl <sub>2</sub>       | 2   | 0,294       |
| Tampão fosfato pH6,0    | 8   | 0,294       |
| NaHCO <sub>3</sub>      | 0,6 | 0,005       |

Para o meio TAU3AAG, para além dos componentes do meio TAU acrescenta-se os seguintes componentes:

|                    | mM | g/L de meio |
|--------------------|----|-------------|
| Glicose            | 10 | 1,80        |
| L-Prolina          | 10 | 1,17        |
| Glutamato de sódio | 50 | 8,45        |
| Aspartato de sódio | 2  | 0,31        |