

LARYSSA FABIANO DO ROSÁRIO COELHO

O PAPEL DA EFEROCITOSE MEDIADA POR
MACRÓFAGOS NAS INFECÇÕES CAUSADAS POR
PROTOZOÁRIOS



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
JUNHO / 2022

Trabalho realizado no Programa de Imunobiologia, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação do(a) Professor(a) Marcela de Freitas Lopes e coorientação de Thaís da Silva Rigoni.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

C672p Coelho, Laryssa Fabiano
O papel da eferocitose mediada por macrófagos nas doenças causadas por protozoários / Laryssa Fabiano Coelho. -- Rio de Janeiro, 2022.
37 f.

Orientador: Marcela de Freitas Lopes.
Coorientador: Thais da Silva Rigoni.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Eferocitose. 2. Fagocitose. 3. Malaria. 4. Leishmania. 5. Doença de Chagas. I. Lopes, Marcela de Freitas, orient. II. Rigoni, Thais da Silva, coorient. III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO
RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Laryssa Fabiano do Rosário Coelho**

DRE: 118064386

BANCA EXAMINADORA: Profa. Dirlei Nico (Presidente)

Dra. Flavia L. Ribeiro Gomes

Dra. Kamila Guimarães Pinto

Profa. Alessandra d'Almeida Filardy (Suplente)

Título da Monografia: **“O papel da eferocitose mediada por macrófagos nas infecções causadas por protozoários”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/wwv-rbxt-vdg>

Data e hora de início: **15 de junho de 2022 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota **10,0** neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 15 de junho de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
10,0	Profa. Dirlei Nico
10,0	Dra. Flavia L. Ribeiro Gomes
10,0	Dra. Kamila Guimarães Pinto
_____	Profa. Alessandra d'Almeida Filardy (suplente)

Presidente da banca



Profa. Dirlei Nico

Aluno:

Laryssa Fabiano do Rosário Coelho

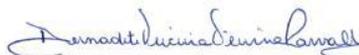
Laryssa Fabiano do Rosário Coelho

Orientador:

Profa. Marcela de Freitas Lopes / Coorientador: Thais da Silva Rigoni

Marcela de Freitas Lopes Thais da Silva Rigoni

Coordenador
de TCC



Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe Dirce Terezinha, ao meu padrasto Gilberto Meira, a minha irmã Rayza Barbosa e a minha sobrinha Manuela Rosário por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, principalmente a minha mãe Dirce Terezinha pelo esforço em investir e insistir na minha educação desde cedo, sem você eu não teria chegado até aqui. Agradeço também a minha irmã, Rayza, por ter me dado o melhor presente do mundo, minha sobrinha Manuela que estava sempre pronta pra lembrar que “A titia Lary é cientista”. Agradeço ao meu padrasto, Gilberto que abraçou essa tarefa com muito carinho e paciência. Agradeço ao meu companheiro, Sidcley que está ao meu lado a cada passo dado nessa caminhada, tornando tudo mais fácil.

Às minhas orientadoras Marcela Lopes e Thaís Rigoni. A Marcela por ter me acolhido como aluna de Iniciação Científica e por todo apoio intelectual e acadêmico durante essa jornada. A Thaís, por todas as conversas, risadas, conselhos e por tornar os longos dias de experimentos em momentos leves de aprendizagem, por ter me mostrado o lado leve da vida acadêmica.

Agradeço meus companheiros de laboratório: Giovana, Ana Victória, Ester, Kamila, Jesuíno e Monique pelas tardes de experimentos e por estarem sempre dispostos a me ajudar e ensinar. Também aos professores que me acompanharam até aqui e, são base de muito que sou. Em especial: Adriana Cortines, Denise Brasil, Alessandra Filardy, Leandro Lobo e Matheus Godoy. Professores do colégio e da graduação que foram e são importantes para a pessoa e profissional que me tornei.

Agradeço aos “amicros”: Adriane, Yan, Amanda, Ana Victória, Juliana, Millena, Mariane, Glauber e Lohane por todos os momentos de risadas no centro acadêmico, de desespero pré provas, de apoio, carinho e respeito que temos entre nós. Aos meus amigos de longa data: Eduarda, Victória, Vivian, Vanessa e Iago por estarem sempre por perto e por crescerem comigo.

Agradeço a equipe da Biblioteca do Instituto de Microbiologia e Imunologia Paulo de Góes, em especial Luiza pela ajuda e capacitação na pesquisa bibliográfica na plataforma Embase.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - (CNPq)

EPÍGRAFE

Mas nunca esqueça onde reside sua força

- Djonga

RESUMO

Laryssa Fabiano do Rosário Coelho

O Papel da Eferocitose Mediada por Macrófagos nas Infecções Causadas por Protozoários

Orientador: Marcela de Freitas Lopes

Coorientadora: Thaís da Silva Rigoni

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

As doenças causadas por protozoários possuem um grande impacto na saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde os sistemas de saúde não possuem estrutura adequada para lidar com essas infecções. A Doença de Chagas, por exemplo, é responsável por aproximadamente 14 mil óbitos por ano. O sistema imunitário desempenha um importante papel no controle das infecções causadas por protozoários. Um dos principais mecanismos efetores na resposta imune inata é o processo de fagocitose, especialmente por macrófagos. A fagocitose auxilia no processo de apresentação de antígeno e conseqüentemente na ativação de linfócitos e no desenvolvimento de uma resposta efetora da imunidade adaptativa. Entretanto, muitos desses parasitas são resistentes às estratégias microbicidas do fagócito, sendo capazes de sobreviver e se multiplicar dentro das células hospedeiras e, por isso, ativam uma resposta imune adaptativa contra esses patógenos. A resposta protetora é mediada principalmente por macrófagos ativados por citocinas derivadas de células Th1, como IFN- γ . Outra estratégia utilizada por estes protozoários intracelulares é a capacidade de modular o metabolismo da célula hospedeira e induzir ou postergar a apoptose dessas células a fim de favorecer a infecção. A morte celular por apoptose é um processo de destruição celular altamente programado e controlado, sendo importante para diversos processos do organismo, como renovação tecidual e desenvolvimento imunológico. A principal molécula sinalizadora de apoptose é a fosfatidilserina que normalmente está localizada na parte interna da membrana de células viáveis. Durante o processo de apoptose, a fosfatidilserina é externalizada e funciona como um sinal “eat-me” para fagócitos. Os macrófagos expressam uma diversidade de receptores que são capazes de reconhecer a fosfatidilserina, com o objetivo de internalizar essas células apoptóticas através do processo de eferocitose. Os receptores de eferocitose são expressos de forma diferencial nas células e divergem na forma de interação com as células apoptóticas e as vias de sinalização ativadas pelas células que as expressam. De maneira geral, a eferocitose

regula negativamente os macrófagos podendo deixá-los permissivos à infecção. Dessa forma, o objetivo do trabalho é entender, através de uma revisão integrativa da literatura, o impacto da eferocitose na resposta mediada por macrófagos. Para isso foram selecionados descritores e operadores booleanos que guiaram a busca na base de dados Embase, da revista Elsevier. De 156 artigos obtidos, 12 foram selecionados após leitura dos resumos. Os resultados mostram que a eferocitose e a modulação de macrófagos é um mecanismo presente em todas as infecções parasitárias analisadas (Malária, Doença de Chagas e Leishmaniose) e que o histórico imunológico e genético dos hospedeiros é um fator crucial para o desfecho da infecção.

Palavras-chave: Eferocitose, Fagocitose, Macrófagos, Malária, Doença de Chagas e Leishmaniose

ABSTRACT

Laryssa Fabiano do Rosário Coelho

The Role of Macrophage-mediated Efferocytosis in Protozoan Infections

Orientador: Marcela de Freitas Lopes

Coorientador: Thaís da Silva Rigoni

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Diseases caused by protozoa have a major impact on public health, especially in underdeveloped and developing countries where health systems do not have an adequate structure to deal with these infections. Chagas disease, for example, is responsible for approximately 14,000 deaths per year. The immune system plays an important role in the control of protozoan diseases. One of the main mechanisms in the immune response is the process of phagocytosis, especially by macrophages. Phagocytosis helps in the antigen-presenting for lymphocytes and the development of an adaptative immune response. However, some parasites are resistant to microbicidal strategies, being able to survive within the host cell and activate an adaptive immune response against these cells. The protective response is mediated mainly by macrophages activated by cytokines derived from Th1 cells, such as IFN- γ . Another strategy used by these intracellular protozoa is the ability to modulate host cell metabolism and induce apoptosis of these cells to favor infection. Apoptosis is a highly programmed and controlled cell death that is important for several processes of the organism, such as tissue renovation and the development of the immune system. The main apoptosis signaling molecule is phosphatidylserine which is normally located on the inner part of the membrane of viable cells. During the process of apoptosis, phosphatidylserine is externalized and functions as an “eat-me” signal. Macrophages express several receptors that can recognize phosphatidylserine and internalize these apoptotic cells, through the process called efferocytosis. Efferocytosis receptors are expressed in several cells and differ in their interaction with apoptotic cells and activation pathways. In general, efferocytosis down-regulates macrophages and may allow them to become permissive to infection. Thus, the goal of this work is to understand, through an integrative literature review, the impact of efferocytosis on the response mediated by macrophages. For this, Boolean operators and descriptors were selected and guided the search in the Embase database, from Elsevier magazine. Of the 156 articles obtained, 12 were selected after reading the abstracts. The results showed that

efferocytosis and macrophage modulation is a mechanism present in all infections analyzed (Toxoplasmosis, Malaria, Chagas Disease, and Leishmaniosis) and that the immunological and genetic background of the host is a crucial factor for the disease outcome.

Keywords: Efferocytosis, Phagocytosis, Macrophages, Chagas Disease, Leishmaniosis

RESUMO PARA LEIGOS

Laryssa Fabiano do Rosário Coelho

O Papel da Eferocitose Mediada por Macrófagos nas Infecções Causadas por Protozoários

Orientador: Marcela de Freitas Lopes

Coorientadora: Thaís da Silva Rigoni

Resumo em linguagem leiga da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

As doenças causadas por protozoários possuem um grande impacto na saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento em que os sistemas de saúde não possuem estrutura adequada para lidar com essas infecções. A Doença de Chagas, por exemplo, é responsável por aproximadamente 14 mil óbitos por ano. O sistema imunológico, que é conhecido como o sistema de defesa, tem um papel importante no controle das infecções causadas por protozoários. Um dos principais mecanismos efetores na resposta imune inata é o processo de fagocitose, ou seja, quando partículas, células mortas ou microrganismos são englobados por células do sistema imune, especialmente por macrófagos. A fagocitose auxilia no processo de ativação de outras células da imunidade, como os linfócitos e na construção de uma resposta efetora da imunidade adaptativa, aquela que tem uma resposta mais específica e duradoura. Entretanto, muitos desses parasitas são resistentes às estratégias de eliminação do fagócito, sendo capazes de sobreviver e se multiplicar dentro das células hospedeiras e, por isso, ativam uma resposta diferencial contra esses patógenos. Esta resposta é mediada principalmente por macrófagos ativados por citocinas, que funcionam como mensageiros de um determinado estímulo. Outra estratégia utilizada por estes protozoários intracelulares é a capacidade de modular o metabolismo da célula hospedeira e induzir ou postergar a apoptose dessas células a fim de favorecer a infecção. A morte celular por apoptose é um processo de destruição celular altamente programado e controlado, sendo importante para diversos processos do organismo, como renovação tecidual e desenvolvimento imunológico. A principal molécula sinalizadora de apoptose é a fosfatidilserina que normalmente está localizada na parte interna da membrana de células viáveis. Durante o processo de apoptose, a fosfatidilserina é externalizada e funciona como um sinalizador de morte, que medeia o contato entre a célula apoptótica e o fagócito. Os macrófagos expressam uma diversidade de receptores em sua superfície que são capazes de reconhecer a fosfatidilserina, com o objetivo de internalizar essas células apoptóticas através do processo de eferocitose. Os receptores de eferocitose são expressos de forma diferente entre as

populações e divergem na forma de interação com as células apoptóticas e as vias de sinalização ativadas pelas células que as expressam. De maneira geral, a eferocitose regula negativamente os macrófagos podendo deixá-los permissivos à infecção. Dessa forma, o objetivo do trabalho é entender, através de uma revisão integrativa da literatura, o impacto da eferocitose na resposta mediada por macrófagos. Para isso foram selecionados descritores e operadores booleanos que guiaram a busca na base de dados Embase, da revista Elsevier. De 156 artigos obtidos, 12 foram selecionados após leitura dos resumos. Os resultados mostram que a eferocitose e a modulação de macrófagos é um mecanismo presente em todas as infecções parasitárias analisadas (Malária, Doença de Chagas e Leishmaniose) e que o histórico imunológico e genético dos hospedeiros é um fator crucial para o desfecho da infecção.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
RESUMO PARA LEIGOS	xii
1 INTRODUÇÃO	4
1.1 Protozoonoses no Brasil	4
1.2 Eferocitose e a modulação da resposta imune do hospedeiro	6
1.3 Eferocitose nas doenças causadas por protozoários	9
1.4 Justificativa	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivo específico	12
3 METODOLOGIA E RESULTADOS	12
3.1 Metodologia	12
3.2 Resultados	14
4 DESENVOLVIMENTO	18
Capítulo 1 – <i>LEISHMANIA</i>	18
Ciclo de vida	18
Eferocitose e a infecção por <i>Leishmania</i>	18
Capítulo 2 - <i>PLASMODIUM</i>	21
Ciclo de vida	21
Eferocitose e a infecção pelo <i>Plasmodium</i>	22
Capítulo 3 – <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	26
Ciclo de vida	26
Eferocitose e a infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÃO	32
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 Protozoonoses no Brasil

As protozoonoses ou protozooses são doenças causadas por protozoários, que são microrganismos eucariontes, unicelulares e que pertencem ao reino Protista (Neves, 2016). O grupo dos protozoários faz parte do domínio Eukarya e é constituído por mais de 60.000 espécies conhecidas distribuídas em sete filos, dos quais apenas quatro são de interesse no estudo da parasitologia humana: Filo Sarcomastigophora (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania sp.*), Apicomplexa (*Toxoplasma Gondii*, *Plasmodium falciparum*), Ciliophora (*Balantidium coli*) e Microspora (*Enterocytosoon biewersi*) (Neves, 2016). Os protozoários formam um grupo heterogêneo, os quais apresentam as mais variadas formas, processos de alimentação, reprodução e locomoção, além das complexidades de seus ciclos de vida.

Dentre as principais doenças causadas por protozoários que afetam a saúde da população, destacam-se a Doença de Chagas, Leishmaniose tegumentar e visceral, (Ministério da Saúde, 2021). Alguns autores classificam doenças como um problema de saúde pública com base em alguns indicadores, como o índice de mortalidade, morbidade e sofrimento causado pela condição. Além desses indicadores, outros autores também ressaltam o interesse da comunidade, a prevalência, a gravidade e a capacidade de controle da doença para tal classificação (Costas e Victora, 2006). Existem tratamentos disponíveis para quase todas as protozoonoses, entretanto em países em que o sistema de saúde ainda é pouco eficiente, a falta de estrutura prejudica o sucesso do tratamento, resultando no impulsionamento da incidência das doenças. Vale ressaltar, que muitas dessas doenças também estão relacionadas a falta de acesso ao saneamento básico e estruturas de atendimento básico em saúde. Assim, são mais incidentes em países subdesenvolvidos ou países em desenvolvimento.

Para além das dificuldades sociais de acesso à saúde e condições sanitárias básicas, outro fator agravante nas protozoonoses diz respeito ao seu aspecto terapêutico. Segundo a Ministério da Saúde (2020), 228 milhões de pessoas são afetadas pela malária no mundo e 405 mil vão a óbito por ano. Entretanto, existem apenas duas vacinas sendo desenvolvidas para a espécie *Plasmodium vivax*, responsável por mais de 80% das infecções nas Américas (Ministério da Saúde, 2020; Bonfim, A. 2020). Além disso, a doença de Chagas, descrita pelo pesquisador

brasileiro Carlos Chagas em 1909, é responsável por aproximadamente 14 mil óbitos ao ano na América Latina (DNDi, 2021). No entanto, ainda não existem tratamentos para a forma crônica da doença ou vacinas disponíveis para a prevenção da mesma. Por se tratarem de doenças negligenciadas, há pouca verba para pesquisa de produção de vacinas e medicamentos eficazes para as diferentes fases das doenças. Apesar das dificuldades, em 6 de outubro de 2021 a Organização Mundial da Saúde anunciou a primeira vacina para malária, A RTS, S/AS01 (RTS,S), a qual apresenta uma eficácia de 26 a 56% e protege contra a malária causada pela espécie *Plasmodium falciparum* (OPAS, 2021).

Os investimentos em pesquisa do Ministério da Saúde são orientados pela Agenda Nacional de Pesquisa em Saúde (ANPPS). As ações iniciais do Ministério com relação as doenças negligenciadas se iniciaram em 2003, com o primeiro edital temático em tuberculose. Em 2006, foi realizada a primeira oficina de prioridades em doenças negligenciadas e iniciado o Programa de Pesquisa e Desenvolvimento de Doenças Negligenciadas no Brasil. Através da análise de dados epidemiológicos juntamente a outros indicadores, foram definidas entre as doenças negligenciadas, sete prioridades de atuação: Dengue, Doenças de Chagas, Leishmaniose, Hanseníase, Malária, Esquistossomose e Tuberculose. Através desse programa já foram liberados editais que contabilizam um investimento de 39 milhões de reais (Ministério da Saúde, 2010). Porém, apesar dos esforços, em 2019 foram confirmados 2.529 novos casos de Leishmaniose visceral no Brasil. Vale ressaltar, que coinfeções causadas por protozoários ou a associação com outras doenças como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) podem aumentar a letalidade de doenças negligenciadas. Em 2019 foi registrado um aumento da coinfeção Leishmania/HIV (Ministério da Saúde, 2020).

De forma geral, o controle das protozoonoses depende de um esforço do governo, incluindo o saneamento básico e a implementação de campanhas de educação em saúde pública, além das medidas que dependem da colaboração dos indivíduos, como o uso de repelentes e a higienização de alimentos. De fato, estudos atuais sobre a saúde da população brasileira mostram um declínio nas taxas de mortalidade causada por doenças infecciosas e parasitárias, mostrando a efetividade de tais ações (Ministério da Saúde, 2010). Contudo, as medidas tomadas pelo governo ainda não são suficientes para a erradicação dessas doenças e a falta de investimento em pesquisa, limita o andamento dos achados que poderiam contribuir para melhores condições de

saúde para a população. Dessa forma, é de extrema importância o investimento em pesquisas brasileiras, para um maior entendimento do papel das protozooses na saúde pública do Brasil.

1.2 Eferocitose e a modulação da resposta imune do hospedeiro

O sistema imunitário desempenha um importante papel no controle das infecções causadas por protozoários. Um dos principais mecanismos efetores da resposta imune inata do hospedeiro é o processo de fagocitose realizado pelos fagócitos, especialmente os macrófagos. A fagocitose é um processo extremamente importante no controle de doenças, uma vez que os microrganismos fagocitados serão degradados no fagolisossoma. Após a degradação, os antígenos desse microrganismo serão apresentados pelas células da imunidade inata, através da apresentação de antígeno aos linfócitos T. Entretanto, muitos desses parasitas são resistentes às estratégias microbicidas do fagócito e podem até mesmo se replicar dentro dessas células. Alguns protozoários são adaptados para sobreviver dentro das células hospedeiras e por isso ativam uma resposta imune adaptativa semelhante àquelas que eliminam vírus e bactérias intracelulares. Essa resposta é mediada principalmente por macrófagos ativados por citocinas derivadas de células Th1, como IFN- γ . Alguns protozoários capazes de se replicar no interior na célula hospedeira, lisam essas células e estimulam respostas específicas de células T citotóxicas (CTLs) (Abbas, 2019). Assim, tanto a resposta imune inata como a adaptativa são cruciais para a resolução das infecções por protozoários. Porém, sabe-se também que alguns protozoários ainda são capazes de induzir a morte celular por apoptose de células imunes do hospedeiro e assim favorecem a infecção, como já foi observado na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* (Freire-de-Lima *et al.*, 2000; Cabral-Piccin *et al.*, 2016).

A morte celular por apoptose é um processo de destruição celular altamente programado e controlado, que demanda síntese de proteínas e sinais celulares específicos. Esse processo, é extremamente importante durante a embriogênese, renovação tecidual, desenvolvimento imunológico e proteção contra a tumorigênese (Fleisher, 1997). De maneira geral, a apoptose pode ocorrer por duas vias, a via intrínseca e a via extrínseca. A via intrínseca é induzida por sinais intracelulares como dano ao DNA, falta de fatores de crescimento e ausência de citocinas (Fleisher, 1997). Já a via extrínseca é associada à ligação de receptores e ligantes de morte presentes na membrana extracelular das células, como Fas/FasL (Krammer, 2000). Ambas as vias convergem na ativação de uma via de sinalização que resulta na clivagem da enzima caspase-3 e

consequentemente no desencadeamento do processo de apoptose, caracterizado pela fragmentação do DNA, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos, os quais serão fagocitados por fagócitos especializados, como macrófagos. Esse processo de fagocitose de células apoptóticas é chamado de eferocitose.

O processo de eferocitose pode ser dividido em quatro etapas. A primeira ocorre quando os fagócitos reconhecem os sinais “find-me” liberados pelas células apoptóticas. Tais sinais são mediadores solúveis como o ATP e UTP extracelulares e a quimiocina CX3CL1, os quais formam um gradiente de concentração e atraem os fagócitos até as células apoptóticas. O segundo estágio é mediado pelos sinais “eat-me”, representado majoritariamente pela fosfatidilserina exposta na face externa da membrana da célula apoptótica e funciona como ponto de ancoragem ao fagócito, permitindo a inicialização do processo de eferocitose. A terceira etapa é caracterizada pela reorganização do citoesqueleto do fagócito durante a fagocitose e o último estágio é a digestão propriamente dita da célula apoptótica dentro do fagócito (Elliot, Koster e Murphy, 2017). Vale ressaltar, que moléculas responsáveis pelos sinais “find-me” como os nucleotídeos extracelulares, podem exercer um papel imunorregulador nos macrófagos pela via de quebra do ATP em adenosina, já descrito como um modulador potente do perfil inflamatório do macrófago (Idzko, 2014). Outras moléculas que exercem essa função de sinalização também apresentam características moduladoras de macrófagos.

A principal molécula sinalizadora de apoptose é a fosfatidilserina, a qual normalmente está localizada na parte interior da membrana de células viáveis. Porém, durante a apoptose ela passa a ser expressa na parte externa da membrana plasmática, resultado das mudanças mediadas pela ativação da caspase-3, e dessa forma funciona como um sinal “eat-me” para os fagócitos. Os macrófagos expressam uma variedade de receptores de eferocitose, que podem reconhecer a fosfatidilserina exposta na membrana da célula apoptótica de forma direta ou indireta. Tais receptores incluem os receptores TAM, integrinas, BAI1, TIM, CD300 (Lemke, 2019). Os receptores de eferocitose são expressos de forma diferencial nas células, divergem na forma de interação com a célula apoptótica e nas vias de sinalização ativadas pelas células que as expressam, especialmente os macrófagos. Em 2002, foi descrito que o reconhecimento da fosfatidilserina regula negativamente a resposta efetora dos macrófagos (Huynh, Fadok e Henson, 2002).

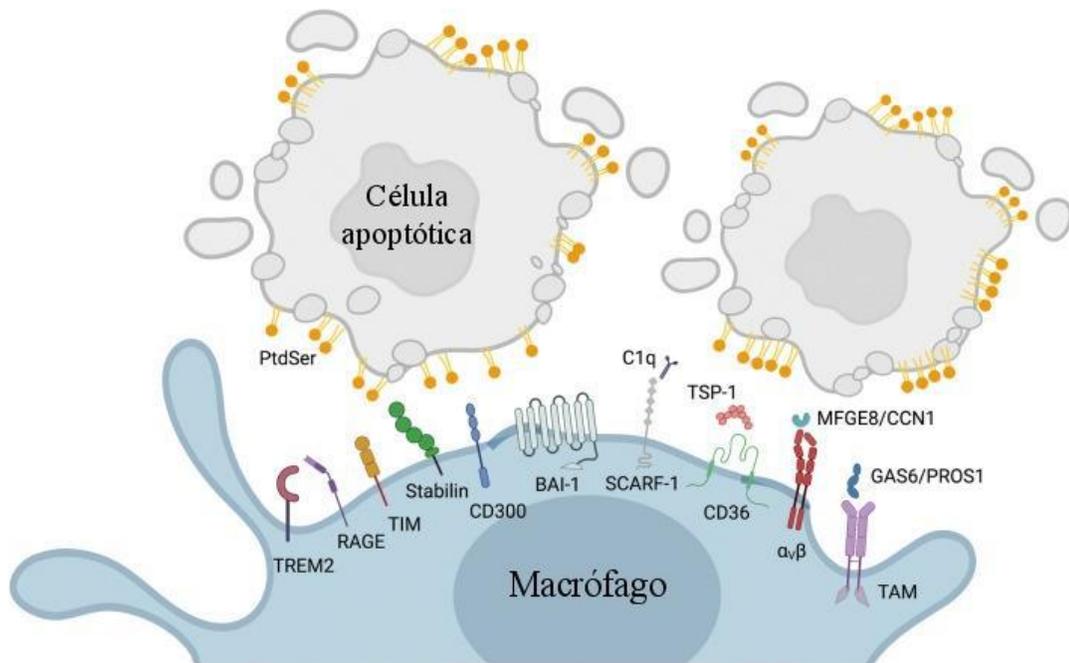


Figura 1 - Receptores de fosfatidilserina presentes na superfície de macrófagos mediando a fagocitose de células apoptóticas. Figura adaptada de Bosurgi e Rothlin, 2021.

De maneira geral, os macrófagos apresentam diferentes perfis funcionais e são classificados de acordo com o tipo de resposta que desenvolvem frente aos diferentes estímulos do ambiente. Eles podem ser classificados em dois perfis fenotípicos principais: os macrófagos com perfil M1 (ou classicamente ativados) ou macrófagos com perfil M2 (ou alternativamente ativados) (Martinez e Gordon, 2014). Os macrófagos M1 são originados em resposta a uma ativação por fatores como o $\text{IFN}\gamma$ e LPS. (Mosser, 2003). Estes produzem altos níveis de citocinas pro-inflamatórias, espécies reativas oxigênio e nitrogênio. Por isso, possuem alta capacidade microbicida (Wang, Liang, Zen, 2014). Já os macrófagos alternativamente ativados (M2), apresentam características imunoregulatórias e estão relacionados ao reparo tecidual e angiogênese. Estes são originados a partir de estímulos como a IL-4 e IL-13 (Martinez e Gordon, 2014; Liu, Yang, 2013).

A eferocitose pode modular a resposta efetora dos macrófagos de duas formas principais. A primeira é por meio do processo de remoção de células apoptóticas do meio extracelular, impedindo que a célula apoptótica libere seu conteúdo citoplasmático em um processo de necrose ou apoptose tardia, que poderia resultar em inflamação e autoimunidade devido a liberação de autoantígenos (Xu, Lai e Hua, 2019). A segunda maneira é a partir da interação entre os

receptores de eferocitose e a fosfatidilserina, uma vez que a cascata de sinalização gerada por essa interação é capaz de estimular a produção de mediadores antiinflamatórios como TGF- β pelo macrófago, deixando-o mais permissivo às infecções (Fadok *et al.*, 1998; Célio-de-Freire, 2000).

Dessa forma, a apoptose e o processo de eferocitose são importantes no contexto de doenças parasitárias, uma vez que podem modular a resposta imune na resolução ou sucesso da infecção. Algumas infecções podem favorecer a indução da apoptose das células do hospedeiro, enquanto outras podem prevenir a apoptose das células hospedeiras e levar ao aumento da sobrevivência celular.

1.3 Eferocitose nas doenças causadas por protozoários

Por muito tempo acreditou-se que a morte de células do hospedeiro durante uma infecção era apenas a manifestação de dano tecidual com consequências críticas para o progresso da doença. Entretanto, já se sabe que a morte celular pode ser uma ferramenta utilizada pelos parasitas para sobreviver no hospedeiro. Assim, promover ou prevenir a apoptose das células do hospedeiro pode ser uma estratégia do patógeno para perpetuar a infecção (Bosurgi e Rothlin, 2021). E embora a eferocitose seja um importante mecanismo para a manutenção da homeostase do organismo, a sinalização imunossupressora decorrente desse processo pode ser explorada por uma série de patógenos para facilitar a infecção.

Existem alguns mecanismos através dos quais os patógenos podem se favorecer para infectar fagócitos. O primeiro deles é pela exposição da fosfatidilserina na membrana de parasitas intracelulares, que burla o mecanismo de reconhecimento dos macrófagos através dessa estratégia, chamada de mimetismo apoptótico, que já foi descrito para *Leishmania*, *Toxoplasma gondii* e também em *Plasmodium* (Wanderley, DaMatta e Barcinski, 2020). O segundo mecanismo é chamado de “cavalo de troia”, nesse caso os parasitas são capazes de induzir ou acelerar a apoptose da célula infectada e por meio da eferocitose destas são capazes de invadir de forma silenciosa os fagócitos, perpetuando a infecção (Chaves *et al.*, 2020).

- *Leishmania sp.*

As Leishmanioses são um grupo de doenças com diferentes manifestações clínicas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. A *Leishmania major* é uma das espécies responsáveis pela Leishmaniose tegumentar ou cutânea. Já foi observado que durante a infecção com *L. major*, *in vivo*, os parasitas eram fagocitados majoritariamente por neutrófilos, que após esse processo entravam em processo de apoptose (Peters *et al.*, 2008). Recentemente, foi visto que durante a infecção por *L. major* há envolvimento dos receptores TAM (Axl e Mer) na modulação da resposta dos macrófagos residentes da derme (TRM) durante a infecção. Foi observado que os TRMs foram predominantes dentre as células infectadas nas primeiras horas de infecção. Além disso, a utilização de abordagens de microscopia intravital, permitiu a visualização da transmissão da infecção aos TRMs por meio da eferocitose de neutrófilos infectados com *L. major*. Os camundongos duplo deficientes em Axl e Mer apresentam menor carga parasitária na lesão. Porém, desenvolveram maior patologia na infecção transmitida pela picada do mosquito. (Chaves *et al.*, 2020). Juntos, esses achados sugerem que a apoptose seguida de eferocitose é um mecanismo para perpetuar a infecção.

- *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas, que acomete aproximadamente 6 milhões de pessoas na América Latina. Durante a infecção por esse parasita, foi observado a apoptose provocada por morte celular induzida por ativação (AICD) como um mecanismo de imunossupressão durante a infecção, resultado da ativação policlonal de linfócitos (DosReis e Lopes, 2009). Estudos sugerem que a eferocitose também favorece a infecção pelo *T. cruzi*. Foi demonstrado que a fagocitose de linfócitos T apoptóticos por macrófagos, por meio do receptor de eferocitose integrina $\alpha\beta3$, estimulou a produção de TGF- β , prostaglandinas, poliaminas e crescimento do parasita nos macrófagos (Freire-de-Lima *et al.*, 2000). E estudos recentes, complementam os achados sobre a modulação da resposta de macrófagos durante a infecção pelo *T. cruzi*. O bloqueio da apoptose de linfócitos T CD8 por meio do tratamento com anticorpos monoclonais anti-FasL promoveu a mudança do fenótipo de macrófagos de M2 para M1. Além disso, o tratamento reduziu a infecção em macrófagos que foram cocultivados com linfócitos TCD8 apoptóticos (Cabral-Piccin *et al.*, 2016). Assim, sugerindo que há uma modulação do fenótipo do macrófago devido a fagocitose das células apoptóticas e que esse processo o torna mais permissivo.

- *Plasmodium falciparum*

O gênero *Plasmodium* compreende diversas espécies, no qual todos são agentes etiológicos na malária. Contudo, o *Plasmodium falciparum* é responsável por mais de 90% dos óbitos. Foi observado que durante a infecção por essa espécie ocorre a abertura dos canais de cátion nas células hospedeiras induzidos pelo parasita, os quais aumentam os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} , o que é capaz de estimular a exposição da fosfatidilserina na camada externa da membrana de eritrócitos infectados (Lang *et al.*, 2004). Apesar de não ser um processo de apoptose verdadeira, essas células expressando fosfatidilserina serão fagocitadas por macrófagos, através dos receptores de eferocitose. Contudo, ainda não se sabe se essa exposição da fosfatidilserina pode contribuir para a persistência do parasita no organismo ou para sua eliminação através da eferocitose mediada por macrófagos.

Os macrófagos são células cruciais na eliminação de microrganismos, na ativação da resposta imune adaptativa e na manutenção da homeostase. Além disso, tem sido observado o papel e a importância dos receptores de eferocitose na modulação do fenótipo dos macrófagos e modulação da resposta imune e encaminhamento da patologia. Dessa forma, entender os mecanismos e estratégias que envolvem a eferocitose e a resposta efetora dos macrófagos pode ser importante para o desenvolvimento de diferentes abordagens no tratamento das protozooses e outras doenças inflamatórias e parasitárias.

1.4 Justificativa

As protozooses, reconhecidas como um problema de saúde pública no Brasil e no mundo, são importantes alvos de pesquisa principalmente para países subdesenvolvidos que enfrentam altas incidências dessas doenças devido à falta de investimento em pesquisa e estrutura enfraquecida dos sistemas de saúde. A complexidade do ciclo de vida desses microrganismos agrava a dificuldade no desenvolvimento de vacinas e medicamentos eficazes para as diferentes fases das doenças. Dessa forma, entender os mecanismos biológicos através do qual os parasitas são capazes de evadir a resposta imune do hospedeiro são importantes para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. O sistema imunológico possui um papel essencial no controle de doenças parasitárias, um dos principais mecanismo de controle é através da fagocitose que tem atuação fundamental na interação entre a resposta imune inata e adaptativa. Os macrófagos são os

principais fagócitos da imunidade inata e se demonstram células importantes nos estágios iniciais das doenças parasitárias pois são capazes de controlar a reprodução do parasita. Apesar disso, muitos conseguem escapar do aparato imunológico e prosseguir com a infecção. O mecanismo de eferocitose ainda é pouco estudado nas doenças parasitárias, apesar de ter se mostrado um fator importante na progressão dessas doenças. Portanto, o presente estudo busca entender, através da revisão da literatura o papel da eferocitose mediada por macrófagos nas doenças causadas por protozoários.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Entender o impacto da eferocitose na resposta imune mediada por macrófagos durante as infecções causadas por protozoários.

2.2 Objetivo específico

- Levantar dados, a partir de uma revisão da literatura que permita a discussão do processo de eferocitose no contexto das protozoanoses.

3 METODOLOGIA E RESULTADOS

3.1 Metodologia

A revisão da literatura é um processo de busca, análise e descrição de um corpo de conhecimento em busca de uma resposta a uma pergunta específica, sendo a “literatura” o conjunto de materiais relevantes sobre o tema em questão (UNESP, 2015). O presente estudo trata-se de uma revisão integrativa da literatura, que permite uma abordagem metodológica mais ampla quando comparada com outras revisões como meta-análise e revisão sistemática, por exemplo. A revisão integrativa tem como propósito obter um profundo entendimento de um determinado fenômeno com base nos estudos anteriores e permite a inclusão de artigos experimentais e não experimentais para a compreensão completa do fenômeno analisado (UNESP, 2015; Souza, Silva e Carvalho, 2010). É um processo realizado em 5 etapas principais: 1) Elaboração da questão de pesquisa, 2) determinação dos critérios de busca 3) Coleta de dados 4) análise de dados 5) apresentação de resultados.

A questão de pesquisa foi elaborada seguindo a linha de pesquisa já realizada pelo laboratório, com o intuito de agrupar informações sobre o tema eferocitose e protozoários, tendo em vista a falta de revisões bibliográficas nesse assunto. A base de dados utilizada foi o EMBASE, o banco de dados bibliográficos biomédico e farmacológico produzido pela revista Elsevier. O EMBASE inclui em sua base de dados todos os títulos presentes no MEDLINE (PUBMED) e também outros periódicos, sendo então uma plataforma mais abrangente com 7% do seu conteúdo dedicado a Microbiologia e Doenças infecciosas (Embase, 2016).

Os descritores, também chamados de palavras-chave, utilizados foram previamente escolhidos e posteriormente adaptados à necessidade e funcionamento da plataforma. A plataforma Embase possui um vocabulário controlado chamado Emtree. Esse vocabulário controlado serve para indicar os melhores descritores para serem utilizados na sua busca, tornando-a mais objetiva. Por exemplo, dentro do Emtree o termo correspondente sugerido para *Plasmodium infection* é *Malaria*. Dessa forma, os descritores foram selecionados conforme a tabela a seguir. Para uma melhor busca também é necessário utilizar operadores booleanos, que são utilizados para relacionar termos de busca e determinar a combinação entre eles, nessa busca foram utilizados os operadores *AND* (E) E *OR* (OU). A busca foi realizada em inglês para se adaptar a língua utilizada pela plataforma.

Infeção	Operador booleano	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<i>Leishmaniasis</i>	AND	<i>Efferocytosis OR 'uptake of apoptotic cell'</i>	<i>TREM 2 OR TAGE OR TIM OR BAI-1 OR SCARF OR SATABILIN OR CD300 OR CD36 OR TAM RECEPTORS OR VITRONECTIN RECEPTOR</i>	<i>Phagocytosis OR apoptosis OR 'cell death' OR macrophage</i>
<i>Malária</i>				
<i>Trypanosomiasis</i>				

Tabela 1. Descritores utilizados para realizar a busca na plataforma EMBASE divididos em grupos de busca.

A plataforma Embase é equipada com diferentes modos de busca que possuem objetivos diferentes como o Medical Device que auxilia os profissionais da saúde em pesquisa por dispositivos médicos e suas aplicações na clínica. Analisando as funcionalidades e objetivo de cada modo de busca foi escolhido o modo “Quick Search” (Pesquisa rápida – Tradução livre), que fornece a pesquisa mais ampla possível. Para realizar a busca dos artigos as palavras-chave para cada infecção foram separadas e os demais descritores foram agrupados em três grupos. Dessa forma, para cada infecção foram realizadas 3 buscas cada uma delas contendo um grupo diferente de descritores. Após a busca, os artigos foram recuperados no formato RIS que permite que eles sejam abertos no programa Mendeley, que é um gerenciador de referências bibliográficas que facilita a organização e compartilhamento de artigos científicos. Os artigos recuperados passaram então pelo processo de seleção onde foram mantidos os artigos que se encaixaram no objetivo da pesquisa, ou seja, aqueles que contivessem no resumo as palavras-chave utilizadas e que demonstrasse, mesmo que indiretamente, o papel de macrófagos e/ou receptores de eferocitose durante a infecção pelo parasita em questão.

3.2 Resultados

Após a busca dos artigos, seguindo a metodologia descrita acima, foram recuperados 179 artigos, dos quais 19 foram selecionados (tabela 1) para compor o desenvolvimento dessa revisão, com base na leitura dos resumos.

Embase (*Quick Search*)

Grupos de busca	Artigos Recuperados	Artigos Seleccionados	Título	Ano de publicação
Leishmania + Grupo 1	3	3	<i>Apoptosis driven infection</i>	2007
Leishmania + Grupo 2	5		<i>Role of oxidative stress and apoptosis in the cellular response of murine macrophages upon Leishmania infection</i>	2012
Leishmania + Grupo 3	40		<i>Induction of apoptosis in host cells: A survival mechanism for Leishmania parasites?</i>	2008
Malária + Grupo 1	1	5	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ-retinoid X receptor agonists increase CD36-dependent phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes and decrease malaria-induced TNF-α secretion by monocytes/macrophages</i>	2001
Malária + Grupo 2	57		<i>Suicide for survival - Death of infected Erythrocytes as a Host Mechanism to survive Malaria</i>	2009

			<i>CD36 receptor regulates malaria-induced immune responses primarily at early blood stage infection contributing to parasitemia control and resistance to mortality</i>	2017
Malária + Grupo 3	23		<i>RAGE modulatory effects on cytokines network and histopathological conditions in malarial mice</i>	2020
Trypanosoma + Grupo 1	4	4	<i>Experimental Chagas disease: Phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth</i>	2000
			<i>Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages</i>	2000
Trypanosoma + Grupo 2	10		<i>Apoptotic lymphocytes treated with IgG from Trypanosoma cruzi infection increase TNFα secretion and reduce parasite replication in macrophages</i>	2010
			<i>Apoptotic CD8 T-lymphocytes disable macrophage-mediated immunity to Trypanosoma cruzi infection</i>	2016
Trypanosoma + Grupo 3	9			
TOTAL	156	12		

Tabela 2. Relação da lista de artigos recuperados e data de publicação para cada grupo de busca realizado.

4 DESENVOLVIMENTO

Capítulo 1 – *LEISHMANIA*

Ciclo de vida

A Leishmaniose é uma doença causada pelos protozoários do gênero *Leishmania*, que são transmitidos ao homem por insetos vetores dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (OMS, 2016). É considerada uma Doença Tropical Negligenciada (DTN) e afeta principalmente as populações mais pobres do planeta, estando relacionada a condições precárias de moradia e migração de pessoas não imunes para as áreas endêmicas. Mudanças ambientais, como desmatamento e urbanização, também podem afetar a incidência da doença (Oryan e Akbari, 2016). De 2001 a 2019 foram notificados 1.028.054 casos de Leishmaniose cutânea e mucosa a OPAS, por 17 dos 18 países endêmicos, tendo uma média anual de 54.108 casos (OPAS, 2020).

A *Leishmania* possui dois ciclos de vida, um no hospedeiro invertebrado e o outro no hospedeiro vertebrado (alguns mamíferos, incluindo o homem). O ciclo se inicia quando o inseto-vetor injeta a forma promastigota metacíclica na pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. As formas promastigotas são então fagocitadas por macrófagos ou outros fagócitos mononucleares e se diferenciam em amastigotas, que se reproduzem por fissão binária. Os amastigotas aumentam em número e levam eventualmente à ruptura do macrófago, podendo infectar as células vizinhas. O ciclo de vida da *Leishmania* se completa quando a fêmea do flebotomíneo é infectada durante o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado. Os amastigotas são liberados no intestino do inseto, se transformam em promastigotas e migram para a faringe e para a probóscide do inseto (Bañuls *et al.*, 2007; CDC, 2022).

Por ter diferentes manifestações clínicas, as espécies e cepas de *Leishmania* vão desencadear diferentes respostas. De maneira geral, a produção de IFN- γ liberado principalmente por células Th1 está associada à resistência. Enquanto a prevalência de células Th2 com produção de IL-4 e IL-10 está associada a susceptibilidade (Barral-Netto *et al.*, 1998).

Eferocitose e a infecção por *Leishmania*

Em “*Apoptosis driven infection*” Zandbergen, Solbach e Laskay (2007) discutem através de uma revisão da literatura como as células da imunidade inata, como neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos podem ser utilizados pela *Leishmania* para promover a

infecção. Sabe-se que no sítio de infecção as primeiras células infectadas pela *L. major* são os PMNs e em seguida os macrófagos são as principais células infectadas. Buscando entender melhor esse mecanismo, foi visto que *L. major* é capaz de recrutar PMN através de um fator quimiotático produzido pelo parasita (Zandbergen *et al.*, 2002). A *Leishmania*, assim como outros parasitas, pode apresentar um processo de morte semelhante ao de morte celular por apoptose, e na população de promastigotas esse processo de morte celular é um fator importante de virulência, visto que no pico do estágio infeccioso, 50% dos promastigotas são apoptóticos e que esses parasitas apoptóticos induzem a liberação de TGF- β por macrófagos e neutrófilos (Arnoult *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Zandbergen *et al.*, 2006). Também foi visto que a infecção por *Leishmania* é capaz de atrasar a apoptose de PMN e quando essas células são capazes de expressar fosfatidilserina na superfície, as células infectadas são fagocitadas pelo processo de eferocitose, o qual regula negativamente o macrófago (Aga *et al.*, 2002). Dessa forma, é possível analisar como a capacidade do parasita de expor a fosfatidilserina ou se esconder dentro de células que estejam apresentando essa molécula em sua superfície é capaz de inibir a resposta efetora de macrófagos, auxiliando no estabelecimento da infecção.

Getti, Cheke e Humber (2008) em “*Induction of apoptosis in host cells: a survival mechanism for Leishmania parasites?*” buscaram determinar se as espécies *L. major*, *L. aethiopica* e *L. tropica* que causam a Leishmaniose cutânea são capazes de interferir na apoptose de macrófagos e se esse processo pode impactar na disseminação do parasita. Os resultados mostram que há a indução de estágios iniciais de apoptose em macrófagos, através da marcação com Anexina V, por todas as espécies e que essa indução depende da fagocitose de parasitas vivos, uma vez que fagocitose de partículas inertes e parasitas mortos não teve o mesmo efeito. Além disso, para todas as espécies a indução de apoptose causada pela infecção foi capaz de aumentar o número de células infectadas, mostrando a relação entre a apoptose e o aumento da infecção. Entretanto, não foram observados sinais tardios de apoptose, como a presença de corpos apoptóticos positivos para PI. Porém, a apoptose pode ocorrer de forma independente da degradação de DNA (Nagata *et al.*, 2000). Dessa forma, o artigo sugere que a apoptose se apresenta como um importante mecanismo para a sobrevivência do parasita.

No trabalho “*Role of oxidative stress and apoptosis in the cellular response of murine macrophages upon Leishmania infection*” Deschacht e colaboradores (2012) abordam que pelo fato de ser um parasita intracelular que sobrevive no interior do vacúolo parasitóforo, a

Leishmania precisa ser capaz de resistir aos mecanismos microbicidas dos macrófagos, como a produção de ROS e NO, através do aumento das defesas oxidativas; ou o parasita precisa ser capaz de inibir essa atividade oxidativa da célula hospedeira. Dessa forma, o estudo tem objetivo investigar a produção de NO e O_2^- em macrófagos infectados por *L. donovani* e *L. infantum*. Os resultados mostram que os níveis de O_2^- e NO aumentam após a infecção, mas voltam aos níveis basais, o que é similar às oscilações que ocorrem com outros estímulos como LPS e corrobora com outros trabalhos em que foi visto a inibição da produção de O_2^- por amastigotas (Kantengwa *et al.*, 1995). Entretanto, apenas para *L. infantum* foi detectado um aumento da apoptose de macrófagos 48 h após a infecção e após 72 h foi observado aumento dos níveis de pró-caspase 3 em todas as espécies. Como a apoptose de macrófagos já havia sido observada por Getti e colaboradores (2008), os autores especulam que possivelmente a indução da apoptose depende da espécie e do tipo de célula usada no modelo de infecção.

Nos artigos selecionados na pesquisa de *Leishmania* é possível observar a importância da modulação das células hospedeiras, especialmente macrófagos, exercida pelo parasita para a manutenção da infecção. Postergar a apoptose de PMN garante ao parasita o tempo necessário para a multiplicação, e a posterior exposição da fosfatidilserina das células infectadas serve como um mecanismo silencioso de transmitir a infecção para outras células. Já foi descrito que durante infecção por *L. major*, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos inibiu completamente a função de apresentação de antígeno das células dendríticas, de maneira dependente do receptor Mer, um receptor de eferocitose pertencente à família de receptores TAM (Tyro3, Axl e Mer) (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2015). Estudos do mesmo grupo visualizaram, através de microscopia intravital a transmissão da infecção de neutrófilos infectados aos macrófagos residentes de derme (TRMs) por meio da eferocitose (Chaves *et al.*, 2020). Os camundongos deficientes em Axl e Mer infectados pela *L. major* apresentaram menor carga parasitária na lesão. Porém, desenvolveram maior patologia na infecção transmitida pela picada do mosquito e apresentam diminuição de marcadores M2, como arginase e aumento de marcadores M1, como iNOS (Chaves *et al.*, 2020). Dessa forma, destaca-se a importância da exposição da fosfatidilserina na superfície das células infectadas e do papel da eferocitose, via receptores TAM, na modulação da resposta dos macrófagos na infecção pela *Leishmania*.

Capítulo 2 - *PLASMODIUM*

Ciclo de vida

A malária é uma hemoparasitose cujo agentes etiológicos fazem parte do gênero *Plasmodium*. Dentro desse gênero as espécies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* causam doenças exclusivamente em humanos (Neves, 2016). A malária possui tratamento eficaz, mas é necessária rápida identificação e administração dos medicamentos, uma vez que a doença possui evolução rápida e pode levar o paciente a óbito em poucos dias (ANVISA, 2022). Além disso, outro obstáculo no tratamento da doença tem sido o desenvolvimento de resistência dos parasitas aos medicamentos. Em 2021 foi liberada pela OMS a primeira vacina para malária, eficaz contra o *P. falciparum*, entretanto a administração da vacina só tem sido recomendada para locais endêmicos para essa espécie, o que não inclui as Américas, onde há predominância da espécie *P. vivax* (OPAS, 2021; Ministério da Saúde, 2020).

Os primeiros sintomas da malária surgem entre 9 e 14 dias após a infecção e os sintomas incluem febre, dor nas articulações, dores de cabeça, vômitos, convulsões e coma. Se a malária não for tratada, ela pode progredir para a forma grave e leva o indivíduo a óbito em um período de 24 horas, geralmente devido a danos cerebrais (malária cerebral) e danos aos órgãos vitais (MSF, 2022). Durante a resposta imunológica contra o *Plasmodium* os macrófagos são células centrais da imunidade inata contra o parasita, medeiam proteção através da fagocitose dependente e independente de anticorpos, liberação de fatores solúveis tóxicos ao parasita, como ROS e NO (Malaguarnera e Musumeci, 2002). Contudo, já foi demonstrado que o aumento da razão entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias estão associadas com as formas severas e fatais de malária (Day *et al.*, 1999).

O ciclo de vida do Plasmodium envolve dois hospedeiros, a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* e o homem. Durante o repasto sanguíneo, o inseto infectado inocula esporozoítos móveis na pele do hospedeiro humano. Os esporozoítos seguem para o fígado onde infectam hepatócitos e originam merozoítos que rompem essas células e são liberados na corrente sanguínea. Após essa replicação inicial no fígado os parasitas sofrem multiplicação assexuada nos eritrócitos. Nas hemácias, o parasita sofre modificações e formam trofozoítos que também amadurecem e dão origem a novos merozoítos, e são esses parasitas em estágio sanguíneo

responsáveis pela manifestação clínica da doença. Alguns parasitas se diferenciam, ainda nas hemácias, em suas formas sexuadas, os gametócitos, que são ingeridos pelo inseto durante o repasto sanguíneo. No estômago do inseto os microgametas (macho) penetram nos macrogametas (fêmea) gerando zigotos, que por sua vez se modificam em oocinetos que invadem a parede do intestino médio dos mosquitos, onde se desenvolvem em oocistos. Os oocistos crescem, se rompem e liberam esporozoítos que chegam até as glândulas salivares do mosquito, prontos para uma nova inoculação, fechando o ciclo de vida do parasita (CDC, 2020).

Os eritrócitos, também chamados de glóbulos vermelhos ou hemácias, são células do sangue que tem como principal função o transporte de oxigênio, essas células possuem grande flexibilidade e quando maduras apresentam ausência de núcleo e algumas organelas como a mitocôndria. Tais características diminuem a meia vida dessas células que circulam por aproximadamente 120 dias (Junqueira e Carneiro, 2013). Durante a infecção pelo *Plasmodium*, eritrócitos infectados são sequestrados para a microvasculatura de órgãos vitais. Tal sequestro de parasitas durante a malária ocorre através da aderência de eritrócitos infectados no endotélio de capilares e vênulas. O sequestro favorece o desenvolvimento do parasita pois o protege da eliminação no sangue e da filtração no fígado, esse fenômeno é associado a forma severa da malária uma vez que capilares cerebrais ficam obstruídos por sequestro de parasitas (David *et al.*, 1983).

Eferocitose e a infecção pelo *Plasmodium*

Diversos tipos de receptores expressos pelas células estão relacionados à citoaderência e ao sequestro de parasitas, um desses receptores é o CD36, uma glicoproteína de membrana presente em diversas células como fagócitos mononucleares e alguns epitélios. Nos fagócitos, esse receptor participa da internalização de células apoptóticas, patógenos bacterianos e lipoproteínas de baixa densidade (Silverstein e Febbraio, 2010). Em camundongos com inflamação pulmonar o CD36 tem um papel importante na reparação do tecido através da eferocitose (Parks *et al.*, 2013). O CD36 tem sido descrito como um importante receptor no curso da malária, uma dessas funções é atuar como receptor da proteína PfEMP1 (*P. falciparum erythrocyte membrane protein 1*), expressa por células infectadas e considerada como uma proteína de maior virulência durante a malária cerebral e malária de placenta (Sartorello, 2008). Essa interação entre o CD36 e a proteína PfEMP1 medeia a aderência de células vermelhas

infectadas na microvasculatura, promovendo o sequestro do parasita e o escape do sistema imunológico (Thylur *et al.*, 2017).

No artigo de revisão “*Suicide for survival - Death of infected Erythrocytes as a Host Mechanism to survive Malaria*” Föller e colaboradores (2009) discutem sobre as estratégias de patógenos intracelulares, que são capazes de alterar o transporte de moléculas na membrana celular da célula hospedeira para favorecer o crescimento do parasita e consequentemente perpetuar a infecção (Gulbins e Lang, 2001). Essa mudança do fluxo de nutrientes foi observada na infecção por *Plasmodium*, e nesse caso, a infecção pelo parasita é capaz de induzir em eritrócitos infectados as chamadas novas vias de permeabilidade, responsável por ajustar a composição eletrolítica no citosol aos requisitos do parasita. Uma consequência da ativação dos canais de cátion é o aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} , que é capaz de estimular a exposição da fosfatidilserina na membrana externa. Apesar de não possuírem núcleo, os eritrócitos sofrem um processo de apoptose muito similar aos de células nucleadas, incluindo o encolhimento celular, alterações de membrana e exposição da fosfatidilserina na membrana externa. Nesse contexto, os autores sugerem que esses eritrócitos apoptóticos serão fagocitados por macrófagos durante o processo de eferocitose, o que poderia reduzir a expansão da infecção e que a manipulação desse processo de apoptose pode ser uma estratégia para modular o curso da doença e diminuir a parasitemia.

Já no trabalho, também de revisão, “*Peroxisome proliferator-activator receptor: A link between macrophage CD36 and inflammation in malaria infection*” Yi Ren (2012) ressalta a importância de macrófagos na imunidade contra parasitas intracelulares, uma vez que essas células são fagócitos profissionais capazes de fagocitar não apenas os parasitas liberados na circulação, mas também células infectadas. Mutações no CD36, observadas em populações africanas, causam deficiência na expressão desse receptor e foram associadas com a susceptibilidade e o desenvolvimento de formas graves da malária (Aitman *et al.*, 2000). *Peroxisome proliferator-activator receptor* (PPAR γ) são fatores de transcrição dependentes de ligantes e pertencem à família dos receptores nucleares. Sabe-se que a ativação desse fator de transcrição regula positivamente a expressão de CD36 na superfície de macrófagos. Essa regulação positiva de CD36 pode aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos e melhorar a fagocitose de parasitas e células infectadas, além de diminuir a produção de citocinas

inflamatórias. Nesse sentido, o artigo sugere que a expressão de CD36 contribui para o controle da malária aguda.

Serghides e Kain (2001) em “*Peroxisome proliferator-activated receptor γ -retinoid X receptor agonists increase CD36-dependent phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes and decrease malaria-induced TNF- α secretion by monocytes/macrophages*”, assim como o artigo anterior, exploram de forma experimental o papel de PPAR γ estimulando a expressão de CD36. Artigos anteriores do mesmo grupo, demonstraram que o CD36 de macrófagos medeia a fagocitose de eritrócitos infectados não opsonizados, ou seja, aqueles que não possuem imunoglobulinas associadas e que são presentes em indivíduos não imunes. Esses estudos prévios demonstram que a interação entre o CD36 e eritrócitos infectados não é capaz de estimular uma resposta inflamatória de macrófagos, uma vez que a fagocitose de eritrócitos infectados não opsonizados não é capaz de induzir a liberação de TNF α (McGilvray *et al.*, 2000). Novamente, demonstrando o papel protetivo de CD36 no desenvolvimento da infecção por *Plasmodium*, uma vez que o aumento de citocinas inflamatórias no soro de pacientes infectados é associado ao desenvolvimento de formas graves da doença (McGilvray *et al.*, 2000; Day *et al.*, 1999). Assim, é possível especular que os eritrócitos estejam apoptóticos e devido a eferocitose, mediada ou não pelo CD36, macrófagos são regulados. Os achados do estudo demonstram que o bloqueio do CD36 levou a uma diminuição de 50-70% da fagocitose de eritrócitos infectados e um resultado similar foi encontrado quando a proteína PfEMP1 foi inibida, através da proteólise com uso de tripsina, sugerindo que a fagocitose de eritrócitos infectados por macrófagos acontece devido a interação entre CD36 e a PfEMP1. Também foi visto que a estimulação do CD36 com agonista de PPAR γ foi capaz de aumentar a expressão do receptor de 40-60% e que esse aumento também influenciou no aumento da fagocitose de células infectadas. Além disso, macrófagos tratados com PPAR γ apresentaram uma redução na produção de TNF α , diminuindo a resposta inflamatória causada pela infecção. Dito isso, os autores reafirmam o papel protetivo do CD36 no controle da malária e sugerem que o estímulo da expressão desse receptor através do PPAR γ é um possível alvo terapêutico.

No artigo intitulado “*CD36 receptor regulates malaria-induced immune responses primarily at early blood stage infection contributing to parasitemia control and resistance to mortality*” Thylur e colaboradores (2017) abordam novamente o papel do CD36 na infecção por

malária. Para entender melhor o desenvolvimento da imunidade inata durante o curso da infecção, foi utilizado o modelo de infecção experimental pelo *Plasmodium yoelli*, uma espécie não letal que causa infecção em camundongos e não é capaz de promover o sequestro do parasita para órgãos do hospedeiro. O autor afirma que em infecções onde há o sequestro de parasitas a resposta inflamatória pode ser prejudicial e é associada ao desenvolvimento de formas graves da doença. No entanto, em infecções em que não ocorre tal sequestro, respostas pró-inflamatórias tendem a ser positivas, uma vez que estimulam a fagocitose. Os resultados do artigo demonstraram que em camundongos deficientes em CD36 a produção de citocinas inflamatórias no soro (TNF α , IL-1 β e IL-18) foi menor quando comparados aos camundongos selvagens, principalmente em estágios iniciais da doença (5 dias pós infecção). Além disso, a resposta mediada por CD36 foi capaz de aumentar a atividade fagocítica de macrófagos e neutrófilos e a expressão de receptores de fagocitose como CR1/CR2 e receptores Fc (Fc γ II/IIIIR e Fc α / μ R) dessas células. Foi visto que em animais selvagens houve maior produção de citocinas inflamatórias por células dendríticas, células NK e células T em comparação aos animais deficientes em CD36, demonstrando a contribuição do mesmo para a ativação da resposta celular. Juntos, esses resultados demonstram o papel do CD36 no aumento da taxa de sobrevivência dos camundongos e no controle da resposta imunológica, principalmente em estágios iniciais da infecção.

Chin e colaboradores (2020) no trabalho intitulado “*RAGE modulatory effects on cytokines network and histopathological conditions in malarial mice*”, o papel do *receptor for advanced glycation end-products* (RAGE) no curso da malária é abordado. O RAGE é um receptor que faz parte da superfamília de imunoglobulinas e é expresso em células do sistema imune, como neutrófilos e linfócitos T e B. É um receptor importante na manutenção da homeostase, uma vez que é capaz de aumentar a eferocitose, facilitando o reconhecimento de células apoptóticas por macrófagos através da fosfatidilserina (Friggeri *et al.*, 2011). Os resultados dos experimentos demonstram que o aumento da concentração de RAGE sistêmico de camundongos coincide com o aumento da parasitemia em estágios mais tardios da infecção pelo *P. berguei* (5 dias após infecção). Também foi observado que o bloqueio de RAGE causou um aumento dos níveis plasmáticos de IL-4, IL-10, IL-2 e IFN γ , demonstrando que esse receptor possui um papel na regulação de diversas citocinas durante o curso da infecção. Portanto, esse artigo nos dá outra perspectiva para o impacto dos receptores de eferocitose na malária, para além

do CD36, e evidencia a importância desses receptores na modulação da resposta imunológica e o seu potencial na regulação das infecções.

Apesar de não usarem a mesma metodologia ou a mesma espécie de *Plasmodium*, todos os artigos recuperados têm por objetivo entender a importância dos receptores de eferocitose na regulação da resposta imune, seja diretamente, através da fagocitose mediada por macrófagos, ou indiretamente, através das funções secundárias exercidas pelo receptor. Ainda que os estudos tenham demonstrado que o receptor CD36 apresenta um papel protetivo, por não ativar uma resposta pró-inflamatória durante a infecção pelo *Plasmodium*, é necessário pontuar que esse mecanismo pode ser utilizado pelo parasita para perpetuar a infecção. Além disso, também é possível que os eritrócitos infectados estejam apoptóticos devido à infecção, como sugere o primeiro artigo neste capítulo e dessa forma podem sofrer eferocitose por macrófagos, via CD36 ou outros receptores. Os artigos nos mostram que a dinâmica entre o controle da parasitemia e o crescimento do parasita depende não apenas do estado imunológico do hospedeiro, mas também de características associadas ao parasita, como o sequestro de parasita para a microvasculatura de órgãos vitais. Todo o contexto impacta no papel do receptor durante a infecção. Serghides e Kain (2001) realizaram um estudo com uma espécie do *Plasmodium* que sofre o processo de sequestro. Nesse estudo foi observado que o papel anti-inflamatório do CD36 era importante para proteger o paciente do desenvolvimento das formas graves. Enquanto Thylur e colaboradores (2017) utilizaram espécies que não promovem o sequestro e observaram que o CD36 teria um papel prejudicial, inibindo a resposta pró-inflamatória, que poderia ser essencial para controle da multiplicação e eliminação do parasita, principalmente nos estágios iniciais da doença.

Capítulo 3 – *TRYPANOSOMA CRUZI*

Ciclo de vida

A Doença de Chagas, descoberta pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas, tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*. A doença é dividida em duas fases clínicas: a fase aguda e a fase crônica. No homem a fase aguda é caracterizada por uma alta parasitemia, que tem início dois meses após o contato inicial com o parasita. Os sintomas incluem febre, cefaleia, diarreia, edema, miocardite entre outros. Durante a fase crônica o indivíduo pode permanecer infectado por anos sem apresentar sintomas clínicos ou pode evoluir para fase crônica sintomática, onde aproximadamente 30% dos pacientes apresentam acometimentos de órgãos

como coração, esôfago, colón e sistema nervoso e caracterizada por uma baixa parasitemia. A Doença de Chagas é uma doença crônica que não possui tratamento efetivo para eliminação do parasita, os tratamentos disponíveis são capazes apenas de controlar a parasitemia durante a fase aguda da doença.

O ciclo de vida do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico, passando por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado e extracelular no vetor invertebrado. O *T. cruzi* é transmitido aos humanos no momento que é eliminado nas fezes e urinas do inseto vetor durante o repasto sanguíneo. A forma tripomastigota metacíclica penetra no hospedeiro pelo ferimento da picada e interage com células do sistema mononuclear fagocitário de peles e mucosas. Uma vez internalizado por essas células permanecem dentro do vacúolo parasitóforo do qual escapam e se transformam em amastigotas residindo no citoplasma celular até se diferenciarem em tripomastigotas sanguíneos e serem liberados na circulação pela ruptura das células hospedeira. Os insetos são infectados pela ingestão de tripomastigotas circulantes na corrente sanguínea de indivíduos infectados. Na porção média do intestino do inseto tripomastigotas sanguíneos se transformam em epimastigotas, na parte posterior do intestino o parasita se diferencia em tripomastigota metacíclicos, e é liberado junto com as fezes e urina do inseto, completando o ciclo de vida.

Eferocitose e a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

A infecção pelo *T. cruzi* causa a ativação do sistema imune, o qual é importante para o controle da parasitemia. Os macrófagos são uma das primeiras células a serem infectadas pelo *T. cruzi* e podem funcionar como hospedeiros permissivos ou células efectoras, dependendo do seu perfil fenotípico (Nogueira *et al.*, 1997; Cabral-Piccin *et al.*, 2016). Além disso, células da imunidade adquirida como as células T CD8 e T CD4, também são cruciais para o controle da infecção (Tarleton, 1995; Kumar e Tarleton, 1998; Tarleton, 2015). As células T podem produzir citocinas como o IFN- γ , o qual induz a produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, aumentando o seu potencial microbicida e o controle do crescimento do parasita (Gazzineli *et al.*, 1992; Michailowsky *et al.*, 2001).

No trabalho “*Experimental Chagas disease: Phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth*” Lopes e DosReis (2000) fazem uma revisão da literatura sobre o impacto da apoptose de linfócitos TCD4⁺, que ocorre durante a infecção por

T. cruzi, na regulação da resposta imune durante o curso da doença. Estudos prévios demonstraram que a apoptose desses linfócitos é um processo de morte celular induzida por ativação (AICD), que decorre do engajamento do TCR e ocorre de maneira dependente de Fas/FasL, uma vez que camundongos deficientes nesses receptores não apresentam apoptose de linfócitos TCD4⁺ após estimulação via TCR (Lopes *et al.*, 1999; Lopes *et al.*, 1995). Além dessa via, o parasita também é capaz de liberar moléculas pró-apoptóticas como a enzima transialidase, que é liberada pelo parasita no meio extracelular e é capaz de induzir a apoptose de linfócitos no timo, fígado e linfonodos quando injetados em camundongos (Leguizamon *et al.*, 1999). Além disso, linfócitos apoptóticos também auxiliam o crescimento do parasita no interior de macrófagos, através do reconhecimento de padrões moleculares associados a células apoptóticas (Freire-de-Lima, 2000). Dessa forma, os autores reforçam o papel crucial da apoptose de linfócitos tanto na disseminação do parasita e crescimento do parasita no interior da células hospedeira, quanto na imunossupressão decorrente da eferocitose.

Em “*Apoptotic CD8 T-lymphocytes disable macrophage-mediated immunity to Trypanosoma cruzi infection*” Cabral-Piccin e colaboradores (2016) investigam os mecanismos moleculares envolvidos na apoptose de células T durante a Doença de Chagas. Os resultados do trabalho demonstraram que a apoptose de linfócitos T CD8 mediada por FasL é capaz de reprogramar a resposta e o perfil fenotípico do macrófago, levando para um perfil fenotípico M2, o qual não é capaz de controlar a replicação do parasita. Por outro lado, o tratamento *in vivo* com anti-FasL foi capaz de reduzir o crescimento do parasita e a expressão de marcadores M2, sendo então capaz de modular o fenótipo de macrófagos infectados. Além disso, o bloqueio da apoptose com zVAD ou anti-Fas restaurou a imunidade mediada por macrófagos, através da redução da expressão de MGL1 e aumento da produção de NO. Dessa maneira, os autores sugerem que o bloqueio da apoptose de células T CD8 é capaz de restaurar a imunidade mediada por macrófagos seja por restringir os efeitos inibitórios da eferocitose ou aumentar a resposta efetora mediada pelas células T CD8, sendo então um possível alvo terapêutico capaz de restaurar a resposta M1 e promover uma imunidade efetiva contra a infecção.

Freire-de-Lima *et al* (2000) em “*Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages*” investigaram as consequências da eferocitose mediada pelo receptor de vitronectina (VnR), também chamado de integrina $\alpha\beta3$, na resposta de macrófagos e no crescimento intracelular do *T. cruzi*. O receptor VnR se liga à fosfatidilserina

presente na superfície das células em apoptose de forma indireta, através da proteína fator 8 do glóbulo de gordura do leite-EGF (MFGE8) e assim está envolvido na fagocitose de células apoptóticas pelos macrófagos (Hanavama *et al.*, 2002). Os resultados deste estudo demonstraram que durante a infecção pelo *T. cruzi*, o receptor VnR medeia a interação entre macrófagos e células T apoptóticas e que o engajamento desse receptor nos macrófagos, até mesmo na ausência de células apoptóticas, é capaz de aumentar a replicação de parasitas dentro dos macrófagos. Além disso, também foi observado que células T apoptóticas bloquearam a produção de NO mesmo em macrófagos ativadas *in vitro* e que o engajamento do VnR aumentou a replicação do parasita de forma dependente da produção de TGF- β . Os resultados retrataram que o engajamento de VnR por células apoptóticas também é capaz de promover a produção de prostaglandina E2 por macrófagos, um fator que pode favorecer o crescimento do parasita. Logo, o artigo sugere que a imunossupressão causada pela eferocitose das células T durante a infecção, cria o microambiente ótimo para o crescimento do parasita e perpetuação da infecção.

Em “*Apoptotic lymphocytes treated with IgG from Trypanosoma cruzi infection increase TNF α secretion and reduce parasite replication in macrophages*” Montalvão e colaboradores (2010) buscaram determinar se a infecção pelo *T. cruzi* era capaz de induzir a produção de anticorpos contra linfócitos apoptóticos. Foi observado a presença de anticorpos IgG no soro de camundongos infectados que foram capazes de opsonizar células T apoptóticas e assim reduzir a replicação do parasita dentro dos macrófagos. Também foi visto que tal redução da replicação do parasita foi dependente da porção Fc do IgG, uma vez que o tratamento apenas com a porção Fab não foi capaz de causar o mesmo efeito. Além disso, o bloqueio do receptor Fc γ R também reverteu o efeito protetor da opsonização dos linfócitos T apoptóticos pelo IgG, indicando a participação do Fc γ R nessa proteção contra a replicação do parasita nos macrófagos. Interessantemente, o trabalho também mostrou que linfócitos apoptóticos tratados com IgG chagásica foi capaz de reduzir a secreção de TGF- β e aumentar a produção de TNF- α por macrófagos infectados. Os efeitos dos linfócitos apoptóticos também foram avaliados *in vivo* e foi observado uma redução da parasitemia em camundongos imunizados com os linfócitos apoptóticos opsonizados com IgG de em comparação aos camundongos imunizados com IgG controle. Dessa forma, os autores sugerem que a opsonização de células apoptóticas é uma forma de estimular a resposta pró-inflamatória, que a fagocitose de células apoptóticas não opsonizadas falha em ativar.

Os artigos recuperados neste capítulo referente à Doença de Chagas evidenciam a importância da resposta pró-inflamatória na eliminação do *T. cruzi* e como o aumento da apoptose desencadeada pela infecção é utilizada pelo parasita como um mecanismo de evasão. Os trabalhos, apesar de não terem utilizado modelos experimentais com diferentes condições imunológicas, dão embasamento para o entendimento de como a eferocitose durante a infecção pelo *T. cruzi* é capaz de desencadear uma resposta anti-inflamatória e é utilizado pelo parasita para perpetuar a infecção. E, nesse contexto, como a presença de uma resposta pró-inflamatória ajuda no controle da parasitemia e possível resolução do quadro.

5 DISCUSSÃO

Tendo em vista o impacto das protozoonoses na saúde pública de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, é importante que as pesquisas realizadas por estes países sejam voltadas para resolução de tais problemas de saúde. Devido à complexidade no ciclo de vida desses organismos e a variedade entre eles, o desenvolvimento de medicamentos e vacinas eficazes se torna difícil e entender os mecanismos biológicos através do qual os parasitas são capazes de evadir a resposta se torna crucial para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

Os macrófagos são células cruciais da imunidade, formam uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa por meio da estimulação das células T. Além disso, são extremamente importantes na manutenção da homeostase dos tecidos, uma vez que participam da fagocitose não apenas de patógenos, mas também de células apoptóticas. De forma relevante, o perfil fenotípico dessas células impactam no desenvolvimento de uma resposta efetiva e adequada para os diferentes contextos.

Pelo fato de serem parasitas intracelulares, os artigos recuperados levantam a discussão sobre como a modulação do metabolismo da célula hospedeira é um importante mecanismo de evasão. Mudanças no transporte de moléculas na membrana de eritrócitos infectados por *Plasmodium* são capazes de induzir a apoptose dessas células. Também foi visto para o *T. cruzi*, que macrófagos que fagocitaram células apoptóticas tiveram maior crescimento intracelular do parasita (Freire-de-Lima *et al.*, 2000). Dessa forma, é possível especular que além de utilizar a célula hospedeira para favorecer o crescimento, o parasita também é capaz de efetuar uma transmissão silenciosa para outras células vizinhas, através da eferocitose.

Os artigos recuperados levantam uma discussão interessante sobre como os macrófagos, por serem uma das primeiras células do hospedeiro a entrarem em contato com o parasita e fazerem a conexão com a resposta imune adaptativa, direcionam o curso e desenvolvimento dessa resposta imune. Esse direcionamento pode ser o principal responsável pelo desenvolvimento da susceptibilidade ou determinação da cronicidade de uma determinada doença. Como foi sugerido por Thylur e colaboradores (2017), os estágios iniciais da doença podem ser determinantes no controle da infecção. Para *Leishmania*, foi observado que a presença de parasitas apoptóticos inibe a ativação de macrófagos e favorece o crescimento de parasitas viáveis, além disso também foi observado a presença de parasitas apoptóticos ainda no vetor (Zandbergen *et al.*, 2006). Nesse sentido, a presença desses parasitas apoptóticos no local da infecção pode ser um fator fundamental na modulação de fagócitos da imunidade inata e, conseqüentemente no desenvolvimento do perfil de resposta desenvolvido pela imunidade adaptativa.

Contudo, muitos fatores influenciam na severidade e na manifestação clínica dessas doenças, incluindo fatores de virulência do parasita e outros fatores relacionados ao hospedeiro. Como foi observado nos artigos recuperados, a divergência na promoção de sequestro de parasitas para microvasculatura de órgãos vitais, durante a infecção por *Plasmodium yoelli* e *P. falciparum* provoca diferentes respostas e abordagens. Estudos realizados com *Plasmodium falciparum* sugerem que o papel anti-inflamatório do CD36 é importante para proteger o paciente do desenvolvimento das formas graves (Serghides e Kain, 2001). Enquanto os estudos realizados com *P. yoelli* observaram que o CD36 teria um papel prejudicial, inibindo a resposta pró-inflamatória, que poderia ser essencial para controle da multiplicação e eliminação do parasita (Thylur *et al.*, 2017). Além disso, o contexto imunológico do hospedeiro é extremamente importante na efetividade da resposta; fatores como infecções pré-existentes, imunocomprometimento e gravidez, são importantes na determinação e no efeito da resposta imunológica no hospedeiro. Na malária, uma resposta pró-inflamatória seria prejudicial para o paciente, uma vez que as formas graves da doença incluem manifestações cerebrais e morte do hospedeiro. Já na Doença de Chagas, se tratando de uma doença crônica que tem danos a longo prazo na saúde do paciente, uma resposta pró-inflamatória, principalmente nos estágios iniciais da infecção, possivelmente é uma solução para o controle da infecção.

Através dos mecanismos de busca utilizados no presente estudo, foi possível encontrar artigos relacionados ao tema proposto. Todavia, é válido citar as dificuldades metodológicas na

realização do trabalho. Apesar de ter sido desenvolvida e aplicada uma metodologia que abrange, através da escolha de descritores validados pelo *Emtree*, as palavras relacionadas ao objetivo de pesquisa. Durante a realização do trabalho foi observado que dificilmente o termo eferocitose é utilizado nos títulos ou como palavra-chave dos artigos, dificultando o resgate de artigos que conversassem melhor com o objetivo da pesquisa.

Apesar das dificuldades, os artigos mostram a presença da apoptose em todas as infecções, sendo considerado um mecanismo de evasão importante para o desfecho da infecção e para a modulação da resposta dos macrófagos aos parasitas intracelulares. Dessa forma, o estudo da eferocitose nas diferentes infecções causadas por protozoários pode elucidar os processos envolvidos na determinação de um perfil de resposta e o impacto disso em diferentes contextos imunológicos do hospedeiro, além de apresentar novas abordagens terapêuticas.

6 CONCLUSÃO

Dessa forma, o presente trabalho foi capaz de estabelecer palavras chaves para a busca na plataforma Embase, organizar e selecionar os artigos recuperados e desenvolver uma revisão da literatura, baseada nos dados, que permite discutir a eferocitose nas doenças causadas por protozoários. Tendo em vista o impacto dessas doenças na saúde pública de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, o trabalho traz grande contribuição para a comunidade acadêmica apontando novas abordagens que podem auxiliar no controle dessas doenças.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K. (2019). *Imunidade aos Microrganismos: Imunidade aos parasitas*. 9 ed. (Elsevier HS – Education). pp 937 – 944.
- Aga, E., Katschinski, D. M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Muller, K., ... Laskay, T. (2002). Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, 169(2), 898–905. doi:10.4049/jimmunol.169.2.898
- Aitman, T. J., Cooper, L. D., Norsworthy, P. J., Wahid, F. N., Gray, J. K., Curtis, B. R., ... Scott, J. (2000). Malaria susceptibility and CD36 mutation. *Nature*, 405(6790), 1015–1016. doi:10.1038/35016636
- Arnoult, D., Akarid, K., Grodet, A., Petit, P. X., Estaquier, J., & Ameisen, J. C. (2002). On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death & Differentiation*, 9(1), 65–81. doi:10.1038/sj.cdd.4400951
- Bonfim, A. (2020). *Doenças parasitárias tropicais: fármacos, vacinas e acesso*. Academia Brasileira de Ciências. 20 out 2020. Disponível em: <<http://www.abc.org.br/2020/10/30/doencas-parasitarias-tropicais-farmacos-vacinas-e-acesso/>>. Acesso em: 11 out 2021.
- Bosurgi, L., & Rothlin, C. V. (2021). Management of cell death in parasitic infections. *Seminars in Immunopathology*, 43(4), 481–492.
- Cabral-Piccin, M.P., Guillermo L.V.C., Vellozo, N.S., Filardy, A.A., Pereira-Marques S.T., Rigoni, T.S., Pereira-Manfro W.F., DosReis, G.A., Lopes, M.F. (2016) Apoptotic CD8 T-lymphocytes disable macrophage-mediated immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Death and Disease* . 7, e2232.
- Chaves, M. M.; Lee, S. H.; Kamenyeva, O.; Ghosh, K.; Peters, N. C.; Sacks, D. The role of dermis resident macrophages and their interaction with neutrophils in the early establishment of *Leishmania major* infection transmitted by sand fly bite. *PLOS Pathogens*, v. 16, n. 11, p. e1008674, nov. 2020.
- Chaves, M.M., Lee, S.H., Kamenyeva, O., Ghosh, K.; Peters, N.C., Sacks, D. (2020) The role of dermis residente macrophages and the interaction with neutrophils in the early establishment of *Leishmania major* infection trasmitted by sand fly bite. *Plos Pathogens*, v.16, n. 11. P. e1008674.
- Chin, V. K., Chuah, Y. K., Lee, T. Y., Nordin, N., Ibraheem, Z. O., Zakaria, Z. A., ... Basir, R. (2020). RAGE modulatory effects on cytokines network and histopathological conditions in malarial mice. *Experimental Parasitology*, 216, 107946. doi:10.1016/j.exppara.2020.107946
- Costa, J.S.D. e Victora. C.G. (2006). O que é “um problema de saúde pública?”. *Ver Bras Epidemiol*, 2006; 9(1): 144-51.
- Day NP, Hien TT, Schollaardt T, Loc PP, Chuong LV, Chau TT, Mai NT, Phu NH, Sinh DX, White NJ, Ho M. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis*. 1999 Oct;180(4):1288-97. doi: 10.1086/315016. PMID: 10479160.
- Dedit (2010). Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. *Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde*. *Rev Saúde Publica* 2010;44(1):200-2.

- Deschacht, M., Van Assche, T., Hendrickx, S., Bult, H., Maes, L., & Cos, P. (2012). Role of oxidative stress and apoptosis in the cellular response of murine macrophages upon *Leishmania* infection. *Parasitology*, 139(11), 1429–1437. doi:10.1017/s003118201200073x
- DNDi América Latina (2021). Doença de Chagas. Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>>. Acesso em: 11 out 2021.
- DosReis, G. A., & Lopes, M. F. (2009). The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(suppl 1), 259–262.
- Elliott, R. M., Koster, M.K., Murphy, P. S. (2017). Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *J Immunol* 2017; 198:1387-1394.
- Elsevier R&D Solutions (2016). Embase: Folheto informativo. Disponível em: https://www.elsevier.com/_data/assets/pdf_file/0008/737279/R_D_Solutions_Embase_Fact_Sheet-PORT.pdf Acesso em: 15/03/2022
- Fadok, V. A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., Hensen, P. M. (1998) Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *J Clin Invest*, 101(4):890-898.
- Fleisher, T. A. (1997). Apoptosis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 78(3), 245–250.
- Föllner, M., Bobbala, D., Koka, S., Huber, S. M., Gulbins, E., & Lang, F. (2009). Suicide for Survival - Death of Infected Erythrocytes as a Host Mechanism to Survive Malaria. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 24(3-4), 133–140. doi:10.1159/000233238
- Freire-de-Lima, C. G., Nascimento, D. O., Soares, M. B. P., Bozza, P. T., Castro-Faria-Neto, H. C., de Mello, F. G., ... Lopes, M. F. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature*, 403(6766), 199–203.
- Friggeri, A., Banerjee, S., Biswas, S., de Freitas, A., Liu, G., Bierhaus, A., & Abraham, E. (2011). Participation of the Receptor for Advanced Glycation End Products in Efferocytosis. *The Journal of Immunology*, 186(11), 6191–6198. doi:10.4049/jimmunol.1004134.
- Gazzinelli, R. T.; Oswald, I. P.; Hieny, S.; James, S. L.; Sher, A. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *European Journal of Immunology*, v. 22, n. 10, p. 2501–2506, 1992.
- Getti, G. T., Cheke, R. A., & Humber, D. P. (2008). Induction of apoptosis in host cells: a survival mechanism for *Leishmania* parasites? *Parasitology*, 135(12), 1391. doi:10.1017/s0031182008004915
- Gulbins, E., & Lang, F. (2001). Pathogens, Host-Cell Invasion and Disease: Invading pathogens can co-opt even the cells of the immune system. New anti-infective drugs may arise from an understanding of this chemical warfare. *American Scientist*, 89(5), 406–413. <http://www.jstor.org/stable/27857528>
- Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*. 2002 May 9;417(6885):182-7. doi: 10.1038/417182a. PMID: 12000961.
- Huynh, M. L., V. A. Fadok, and P. M. Henson. 2002. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* 109: 41–50

Idzko, M., D. Ferrari, and H. K. Eltzschig. 2014. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509: 310–317.

Kim, D., Lee, S.-A., Moon, H., Kim, K., & Park, D. (2020). The Tim gene family in efferocytosis. *Genes & Genomics*. doi:10.1007/s13258-020-00969-x

Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407(6805), 789–795.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. The relative contribution of antibody production and CD8 + T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*, v. 20, n. 5, p. 207–216, 11 maio 1998.

Lang, F., Lang, P. A., Lang, K. S., Brand, V., Tanneur, V., Duranton, C., ... Huber, S. M. (2004). Channel-induced apoptosis of infected host cells - the case of malaria. *Pflugers Arch Eur J Physiol* (2004), 448(3), 319–324.

Leguizamón MS, Mocetti E, García Rivello H, Argibay P, Campetella O. Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in cells from the immune system in vivo. *J Infect Dis*. 1999 Oct;180(4):1398-402. doi: 10.1086/315001. PMID: 10479182.

Lemke, G. (2019). How macrophages deal with death. *Nature Reviews Immunology*, 19(9), 539–549.

Liu, G., & Yang, H. (2012). Modulation of macrophage activation and programming in immunity. *Journal of Cellular Physiology*, 228(3), 502–512.

Lopes MF, Nunes MP, Henriques-Pons A, Giese N, Morse HC 3rd, Davidson WF, Araújo-Jorge TC, DosReis GA. Increased susceptibility of Fas ligand-deficient gld mice to *Trypanosoma cruzi* infection due to a Th2-biased host immune response. *Eur J Immunol*. 1999 Jan;29(1):81-9. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199901)29:01<81::AID-IMMU81>3.0.CO;2-Y. PMID: 9933089.

Lopes, M. F., & DosReis, G. A. (2000). Experimental Chagas disease: Phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth APOPTOSIS, 5(3), 221–224. doi:10.1023/a:1009648311490

Lopes, M.F., da Veiga, V.F., Santos, A., Fonseca, M.E., & DosReis, G.A. (1995). Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *Journal of immunology*, 154 2, 744-52 .

Lüder, C. G. K., & Gross, U. (n.d.). Apoptosis and Its Modulation During Infection with *Toxoplasma gondii*: Molecular Mechanisms and Role in Pathogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 219–237. doi:10.1007/3-540-27320-4_10

Malaguarnera, L., & Musumeci, S. (2002). The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(8), 472–478. doi:10.1016/s1473-3099(02)00344-4.

Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6.

McGilvray I.D., Serghides L., Kapus A., Rotstein O.D., Kain K.C. (2000). Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *The American Society of Hematology, Blood* (2000) 96 (9): 3231–3240. doi: 10.1182/blood.V96.9.3231.

MICHAILOWSKY, V.; SILVA, N. M.; ROCHA, C. D.; VIEIRA, L. Q.; LANNES-VIEIRA, J.; GAZZINELLI, R. T. Pivotal role of interleukin-12 and interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *American Journal of Pathology*, v. 159, n. 5, p. 1723–1733, 2001.

- Montalvão, F., Almeida, G. M., Silva, E. M., Borges, V. M., Vasconcellos, R., Takiya, C. M., ... DosReis, G. A. (2010). Apoptotic lymphocytes treated with IgG from *Trypanosoma cruzi* infection increase TNF- α secretion and reduce parasite replication in macrophages. *European Journal of Immunology*, 40(2), 417–425. doi:10.1002/eji.200939606
- Mosser, D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(2), 209–212.
- MSF (2022). Médico sem fronteiras. Em 2020 , cerca de 627 mil pessoas morreram por causa da malária. Entre elas, 77% eram crianças com menos de cinco anos de idade. Disponível em: https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/malaria/?utm_source=adwords_msf&utm_medium=&utm_campaign=doencas_geral_comunicacao&utm_content=_exclusao-saude_brasil_39923&gclid=Cj0KCQjwhLKUBhDiARIsAMaTLnHMh_C06ehwbbBLavLIOSzeQAmAxH161NNdXzjF3XQHHqG56XG0sM4aAqZXEALw_wcB. Acesso em: 20/05/2022.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA Fragmentation. *Experimental Cell Research*, 256(1), 12–18. doi:10.1006/excr.2000.4834
- Neves, D. P. (2016). Protozoários. In: *Parasitologia Humana*. Vitor, R. W. A. 13 ed (São Paulo: Editora Atheneu), pp. 33-36.
- NOGUEIRA, N.; GORDON, S.; COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: modification of macrophage function during infection. *Journal of Experimental Medicine*, v. 146, n. 1, p. 157–171, 1 jul. 1977.
- OPAS (2020). Organização Mundial da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas. Núm. 9, dezembro de 2020. Washington, D.C.: OPAS; 2020.
- OPAS (2021). Organização Mundial da Saúde. Organização Pan-Americana de Saúde. OMS recomenda vacina inovadora contra malária para crianças em risco. Disponível em <https://www.paho.org/pt/noticias/6-10-2021-oms-recomenda-vacina-inovadora-contra-malaria-para-criancas-em-risco>. Acesso em 20/04/2022.
- Parks, B. W., Black, L. L., Zimmerman, K. A., Metz, A. E., Steele, C., Murphy-Ullrich, J. E., & Kabarowski, J. H. (2013). CD36, but not G2A, modulates efferocytosis, inflammation, and fibrosis following bleomycin-induced lung injury. *Journal of Lipid Research*, 54(4), 1114–1123. doi:10.1194/jlr.m035352.
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M.P., Germain, R.N., Sacks, D. (2008). In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. *Science*, 321(5891), 970–974.
- Randall, L. M., & Hunter, C. A. (2011). Parasite dissemination and the pathogenesis of toxoplasmosis. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 1(1), 3–9. doi:10.1556/eujmi.1.2011.1.3
- Ren, Y. (2012). Peroxisome Proliferator-Activator Receptor: A Link between Macrophage CD36 and Inflammation in Malaria Infection. *PPAR Research*, 2012, 1–6. doi:10.1155/2012/640769
- Riberio-Gomes, F. L.; Romano, A.; Lee, S.; Roffê, E.; Peters, N. C.; Debrabant, A.; Sacks, D. Apoptotic cell clearance of *Leishmania major*-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8+ T-cell priming in vitro by Mer tyrosine kinase-dependent signaling. *Cell Death & Disease*, v. 6, n. 12, p. e2018–e2018, 10 dez. 2015.
- Serghides, L., & Kain, K. C. (2001). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Retinoid X Receptor Agonists Increase CD36-Dependent Phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-Parasitized Erythrocytes and Decrease Malaria-Induced TNF- Secretion by Monocytes/Macrophages. *The Journal of Immunology*, 166(11), 6742–6748. doi:10.4049/jimmunol.166.11.6742

Souza, M.T; Silva, M.D; Carvalho, R. (2010). Revisão integrativa: o que é e como fazer. Einstein. 2010; 8(1 Pt 1):102-6

SVS (2010). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças Infecciosas e parasitárias: guia de bolso.

SVS (2020). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Malária. 9352-7864.

SVS (2021). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Doenças Tropicais negligenciadas 9352-7864

TARLETON, R. L. CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. *Seminars in Immunopathology*, v. 37, n. 3, p. 233–238, 29 maio 2015.

TARLETON, R. L. The role of T cells in Trypanosoma cruzi infections. *Parasitology Today*, v. 11, n. 1, p. 7–9, 1995.

UNESP (2015). Biblioteca Prof. Paulo De Carvalho Mattos. Tipos de Revisão da literatura. Disponível em: <https://www.fca.unesp.br/Home/Biblioteca/tipos-de-evisao-de-literatura.pdf> Acesso em: 17/03/2022.

Van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., ... Laskay, T. (2006). Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13837–13842. doi:10.1073/pnas.0600843103

Van Zandbergen, G., Hermann, N., Laufs, H., Solbach, W., & Laskay, T. (2002). Leishmania Promastigotes Release a Granulocyte Chemotactic Factor and Induce Interleukin-8 Release but Inhibit Gamma Interferon-Inducible Protein 10 Production by Neutrophil Granulocytes. *Infection and Immunity*, 70(8), 4177–4184. doi:10.1128/iai.70.8.4177-4184.2002

Van Zandbergen, G., Solbach, W., & Laskay, T. (2007). Apoptosis driven infection. *Autoimmunity*, 40(4), 349–352. doi:10.1080/08916930701356960

Wanderley, J. L. M., DaMatta, R. A., & Barcinski, M. A. (2020). Apoptotic mimicry as a strategy for the establishment of parasitic infections: parasite- and host-derived phosphatidylserine as key molecule. *Cell Communication and Signaling*, 18(1).

Wang, N., Liang, H., & Zen, K. (2014). Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1-M2 Polarization Balance. *Frontiers in Immunology*, 5.

Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z.-C. (2018). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 39(1), BSR20180992.