

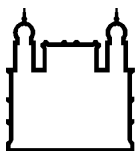
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NO PARASITO  
*TRYPANOSOMA CRUZI*: INCORPORAÇÃO E ATIVAÇÃO  
DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO E PAPEL NA FORMAÇÃO  
DE MEDIADORES LIPÍDICOS

DANIEL AFONSO DE MENDONÇA TOLEDO

Rio de Janeiro  
2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**DANIEL AFONSO DE MENDONÇA TOLEDO**

**CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NO PARASITO *TRYPANOSOMA CRUZI*:  
INCORPORAÇÃO E ATIVAÇÃO DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO E PAPEL NA  
FORMAÇÃO DE MEDIADORES LIPÍDICOS**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em biologia celular e molecular

**Orientador (es):** Prof. Dra. Rossana Correa Netto de Melo  
Prof. Dra. Heloisa D`Ávila da Silva Bizarro

**RIO DE JANEIRO**

**2017**

Toledo, Daniel Afonso de Mendonça.

CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NO PARASITO TRYPANOSOMA CRUZI:  
INCORPORAÇÃO E ATIVAÇÃO DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO E PAPEL NA  
FORMAÇÃO DE MEDIADORES LIPÍDICOS / Daniel Afonso de Mendonça  
Toledo. - Rio de Janeiro, 2017.

136 f.; il.

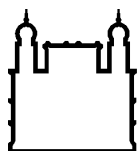
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Rossana Correa Netto de Melo .

Co-orientadora: Heloísa D'Avila da Silva Bizarro.

Bibliografia: f. 74-93

1. Corpúsculos Lipídicos. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Prostaglandinas. 4.  
Doença de Chagas. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***DANIEL AFONSO DE MENDONÇA TOLEDO***

**CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NO PARASITO *TRYPANOSOMA CRUZI*:  
INCORPORAÇÃO E ATIVAÇÃO DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO E PAPEL NA  
FORMAÇÃO DE MEDIADORES LIPÍDICOS**

**ORIENTADOR (ES):** Prof. Dra. Rossana Correa Netto de Melo  
Prof. Dra. Heloísa D`Ávila da Silva Bizarro

**Aprovada em: 19 / 06 / 2017**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza (Presidente)**  
**Prof. Dr.** Célio Geraldo Freire-de-Lima  
**Prof. Dra.** Narcisa Leal da Cunha e Silva  
**Prof. Dra.** Elaine Soares Coimbra  
**Prof. Dra.** Cecília Jacques Gonçalves de Almeida

Rio de Janeiro, 19 de Junho de 2017

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Rossana Correa Netto de Melo e da Prof<sup>a</sup>. Heloísa D`Ávila da Silva Bizarro.

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu pai, irmãos e esposa que sempre foram  
meu alicerce e minha fonte de inspiração  
na busca dos meus objetivos de vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Dra. Heloísa D'Ávila, pelo aprendizado, direcionamento e fundamental participação para o desenvolvimento desta tese. Agradeço também pela amizade, dedicação e paciência, os quais me permitiu desenvolver um absoluto respeito e admiração.

À minha orientadora Dra. Rossana Correa Netto de Melo, pelos ensinamentos ao longo dos anos e fundamental participação para o desenvolvimento desta tese. Agradeço também pela compreensão e apoio nos momentos mais difíceis em grande parte da minha vida acadêmica.

À Dra. Patrícia Elaine a quem considero uma terceira orientadora, pelo aprendizado e amizade nos momentos de convívio no laboratório.

À Dra. Patrícia Torres Bozza, pela colaboração fundamental no desenvolvimento do projeto. Gostaria de agradecer também pela receptividade e conselhos decisivos para o desenvolvimento dessa tese.

Ao Dr. Célio Freire de Lima pela valiosa colaboração com esse trabalho sendo peça chave para o seu desenvolvimento.

À Natália Roque pela contribuição fundamental para a elaboração desse trabalho. Agradeço pela receptividade, compreensão e paciência para desenvolvimento dos desgastantes experimentos.

À Lívia Teixeira pela contribuição na elaboração desse trabalho.

Ao amigo Thiago, pela amizade e conselhos durante nosso convívio em laboratório.

Ao amigo Felipe e Gabriel pela amizade e os inúmeros momentos em que me ajudou.

À amiga Juliana, Aline, Laíris, pela amizade e companheirismo no laboratório.

Aos demais colegas de laboratório, pela ajuda, dedicação e por tornar nosso ambiente de trabalho harmonioso e agradável.

À minha mãe, por me ajudar a acreditar nos sonhos e me fazer pensar que poderia ser capaz.

À minha esposa, Fernanda, pelo amor, companheirismo e paciência. Obrigado por tornar meu trabalho mais doce através de suas palavras, por me apoiar nos momentos mais difíceis durante essa caminhada e por acreditar que seria possível.

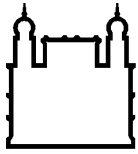
Aos meus irmãos Felipe e Pedro, pelo apoio e pela força em que sempre transmitiram, para que eu pudesse almejar meus objetivos.

Ao meu irmão Lucas, por alegrar a minha vida num momento tão fundamental.

À Amelinha, pelo apoio nos momentos mais difíceis.

À meu Pai, a pessoa que proporcionou meu sonho se tornar realidade ao longo de todos esses anos.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NO PARASITO *TRYPANOSOMA CRUZI*: INCORPORAÇÃO E ATIVAÇÃO DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO E PAPEL NA FORMAÇÃO DE MEDIADORES LIPÍDICOS**

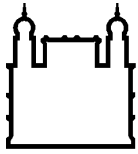
### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO

**Daniel Afonso de Mendonça Toledo**

Corpúsculos Lipídicos (CLs) são organelas complexas, ricas em lipídios, presentes em células eucarióticas e procarióticas. Diferente de todas as outras organelas, os CLs são delimitados apenas por uma monocamada de fosfolipídios. Os CLs apresentam diversas funções como metabolismo de lipídios, sinalização celular, papel na inflamação. O aumento do número de CLs é documentado em células do hospedeiro durante diversas doenças infecciosas e encontra-se associado com a síntese de mediadores inflamatórios como prostaglandinas. A via do PPAR-gamma (PPAR- $\gamma$ ), é conhecida em células de mamíferos como importante moduladora lipídica e relaciona-se à formação de CLs e mediadores inflamatórios. O acúmulo de CLs no citoplasma de patógenos e seu significado funcional ainda são pouco compreendidos. Nesse trabalho, nós investigamos a formação de CLs no parasito intracelular *T. cruzi* durante situações de interação com a célula hospedeira e a possível correlação dessas organelas com a produção e liberação do mediador inflamatório prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Em paralelo, a presença do receptor nuclear PPAR- $\gamma$  foi também investigada no parasito. Análises por microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstraram que CLs são constitutivos em formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. Ocorreu aumento significativo no número de CLs em parasitos cultivados na presença de macrófagos comparado a parasitos cultivados na ausência de macrófagos. Por MET, CLs nas formas amastigotas do parasito, foram analisados em processo de infecção em dois tipos de macrófagos: peritoneais *in vitro* e do tecido cardíaco *in vivo*. CLs da infecção *in vivo*, foram significativamente maiores e elétrons-densos se comparados

aos CLs dos parasitos cultivados *in vitro*. Tripomastigotas estimulados em cultura com ácido araquidônico (AA) e ácido oleico (AO), foram induzidos à gênese de novos CLs e PGE<sub>2</sub>. RAMAM e espectrometria de massas (MALDI-TOF) confirmou a incorporação de AA em CLs do parasito. Revelamos também que os CLs são locais de produção da PGE<sub>2</sub>. A presença da enzima PGE sintetase, envolvida nesta síntese, foi demonstrada no parasito por Western Blotting. Além disso, demonstramos, pela primeira vez, que o parasito expressa a via do PPAR- $\gamma$ . Assim CLs são fonte de recursos lipídicos para o parasito crescer e produzir mediadores da inflamação, que potencialmente podem agir na resposta imune do hospedeiro. Além disso a via do PPAR- $\gamma$  pode estar envolvida no processo. Dessa forma um novo campo de estudos é aberto para doença de Chagas, onde organelas importantes do parasito podem ser exploradas como potencial alvo terapêutico.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NO PARASITO *TRYPANOSOMA CRUZI*: INCORPORAÇÃO E ATIVAÇÃO DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO E PAPEL NA FORMAÇÃO DE MEDIADORES LIPÍDICOS

### ABSTRACT

#### TESE DE DOUTORADO

Daniel Afonso de Mendonça Toledo

Lipid bodies (LBs) are complex organelles, rich in lipids, present in all eukaryotic cells and prokaryotes. Unlike all other organelles which are surrounded by a lipid bilayer, LBs are delimited only by a monolayer of phospholipids. LBs are associated with different processes such as lipid metabolism, signaling and intracellular trafficking. Increase in LBs is documented during several infectious and inflammatory diseases. The PPAR-gamma (PPAR- $\gamma$ ) is a known nuclear receptor involved in lipid metabolism and production inflammatory mediators in mammalian cells. LB accumulation in the cytoplasm of pathogens in response to interactions with host cells has been attracting great interest, but the meaning of this accumulation is not yet understood. In this study, we investigated the formation of LBs in the intracellular parasite *T. cruzi*, during different situations of interactions with host cells and its possible correlation with the production of the inflammatory mediator prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). In parallel, we also investigated if the parasite expressed PPAR- $\gamma$ . Analyses by light microscopy and transmission electron microscopy (TEM) showed that LBs are common organelles of trypomastigotes and amastigotes forms of the parasite. We observed a significant increase in the number of LBs when trypomastigotes were co-cultured in the presence of macrophages, compared with trypomastigotes grown in the absence of these cells. By analyzing two types of infected macrophages: peritoneal macrophages *in vitro* and heart macrophages *in vivo*, we observed by TEM that LBs induced by the *in vivo* infection were significantly larger and more electron-dense in comparison with LBs formed in response to infection *in vitro*. Stimulation of cultured trypomastigotes with fatty acids: arachidonic acid (AA) and oleic acid (OA) induced the formation of LBs and PGE<sub>2</sub> production.

RAMAM spectroscopy and mass spectrometry (MALDI-TOF) confirmed AA incorporation by LBs of the parasite. Remarkably, sites of PGE<sub>2</sub> production analysed by the Eicosacell technique revealed labeling at LBs. Western Blotting demonstrated the presence of the enzyme PGE synthase, involved in PGE synthesis, in the parasite. In parallel, the PPAR- $\gamma$  pathway was detected in the parasite. Our data showed that the parasite *T. cruzi* produces and releases PGE<sub>2</sub> and that this synthesis occurs in LBs. Our study demonstrates that parasite LBs are organelles able to respond to stimuli with potential roles during the infection process and maintenance of the parasite in the host cell. Thus, a new field for the study of Chagas disease is open where specific organelles of the parasite can be explored as possible therapeutic targets.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.1</b>	Ciclo selvagem e doméstico da doença de Chagas -----	3
<b>Figura 1.2</b>	Distribuição do número de casos da doença de Chagas ----- no mundo de 2006 - 2009	6
<b>Figura 1.3</b>	Diferentes formas do parasito durante o ciclo de vida -----	9
<b>Figura 1.4</b>	Ciclo de vida do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	11
<b>Figura 1.5</b>	Aspectos morfológicos da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	15
<b>Figura 1.6</b>	Estruturas do <i>Trypanosoma cruzi</i> observadas por microscopia eletrônica de transmissão e varredura -----	18
<b>Figura 1.7</b>	Principais moléculas de superfície celular envolvidas na interação parasito-célula hospedeira -----	21
<b>Figura 1.8</b>	Aspectos morfológicos de corpúsculos lipídicos (CLs) -----	22
<b>Figura 1.9</b>	Esquema representativo demonstrando o funcionamento dos PPARs como fatores de transcrição de genes -----	30
<b>Figura 4.1</b>	Corpúsculos lipídicos (CLs) de <i>Trypanosoma cruzi</i> exibem variação no número, tamanho e elétron-densidade em resposta à interação com células hospedeiras -----	49
<b>Figura 4.2</b>	Corpúsculos Lipídicos (CLs) são formados em tripomastigotas em resposta ao estímulo com ácido araquidônico (AA) -----	52
<b>Figura 4.3</b>	Espectroscopia RAMAM detectou alto conteúdo de ácidos graxos insaturados e ácido araquidônico (AA) em parasitos estimulados quando comparado aos não estimulados -----	56

<b>Figura 4.4</b> O ácido araquidônico (AA) é incorporado em corpúsculos lipídicos (CLs) do parasito -----	57
<b>Figura 4.5</b> MALDI-TOF espectro de massas, variação de 303 a 306 m/z obtido da solução de ácido araquidônico puro (AA) e de frações isoladas de corpúsculos lipídicos (CLs) de parasitos não estimulados e parasitos estimulados com AA -----	58
<b>Figura 4.6</b> Ácido araquidônico (AA) induz a produção de prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) em tripomastigotas -----	59
<b>Figura 4.7</b> <i>T. cruzi</i> estimulado por AA expressa PGE sintetase, mas não a enzima COX-2 -----	60
<b>Figura 4.8</b> CLs são locais da síntese de PGE <sub>2</sub> em tripomastigotas estimulados com AA -----	63
<b>Figura 4.9</b> <i>T. cruzi</i> expressando o receptor ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR - $\gamma$ ) -----	65
<b>Tabela 1</b> Relação dos parasitos protozoários conhecidos por produzir mediadores inflamatórios na literatura -----	28
<b>Tabela 2</b> Exemplos de agonistas da via do PPAR – $\gamma$ , espécies de extração e ação terapêutica -----	32

## LISTA DE ABREVIATURAS MAIS RELEVANTES

AA	Ácido Araquidônico
ADRP	Proteína Relacionada à Diferenciação de Adipócitos
AO	Ácido Oléico
BCG	Bacillus Calmette Guérin
BCRD	Bloqueio Completo do Ramo Direito
BHI	Brain Heart Infusion (Infusão de coração e fígado)
Ca <sup>++</sup>	Cálcio
CEUA	Comitê de Ética Animal
CLs	Corpúsculos Lipídicos
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxigenase
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
Célula NK	Célula Natural Killer
DGAT	Diacilglicerol Aciltransferase
GIPL	Glicoinositolfosfolípido
EIA	Ensaio Imunoenzimático
Espaço PR	Intervalo entre o processo de despolarização atrial e ventricular
Gp	Glicoproteína
GTPase	Enzima hidrolase que hidroliza GTP (Guanosina Trifosfato)
HBAC	Hemibloqueio Anterior Esquerdo
HeLa	Células de linhagem provenientes de Henrietta Lacks
IL	Interleucina
kDNA	Ácido desoxirribonucleico do Kinetoplasto
LXA <sub>4</sub>	Lipoxina A <sub>4</sub>
LO-5 e 15	Lipoxigenases 5 e 15
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
MALDI-TOF	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz
MAP-quinases	Proteíno-quinases ativadas por mitógenos
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NO	Óxido Nítrico
Onda T	Repolarização Ventricular
ORO	Oil Red O

PH	Potencial Hidrogeniônico
PGs	Prostaglandinas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PAT	Perilipina, Adipofilina e TIP-47
PPAR	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxixomos
PPAR- $\gamma$	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxixomos gamma
PPREs	Elementos responsivos específicos
RXR	Receptor do ácido 9- <i>cis</i> retinóico
RANTES	Regulador de Ativação Expressa e Secretada por Células T
Rab	Família de proteínas GTPases
RPM	Rotações Por Minuto
TIP-47	Proteína de Interação de Cauda de 47 kDa
TLR	Receptor semelhantes a Toll
TAUP	Meio de cultura ácido que mimetiza a urina de triatomíneos
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	Organização Mundial de Saúde



## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 A doença de Chagas – Dados Históricos	1
1.2 Epidemiologia da doença de Chagas	3
1.3 Vetores da doença de Chagas	6
1.4 <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
1.4.1 Aspectos Gerais	8
1.4.2 Ciclo de Vida	10
1.4.3 Aspectos clínicos na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	12
1.4.4 Ultraestrutura do <i>T. cruzi</i>	16
1.4.5 Interação Parasito X Hospedeiro	19
1.5 Corpúsculos Lipídicos	21
1.5.1 Estrutura e Composição	22
1.5.2 Composição de corpúsculos em células do sistema imune	24
1.5.3 Indução da formação de corpúsculos lipídicos por patógenos	25
1.5.4 CLs e mediadores inflamatórios em parasitos	26
1.6 Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos – PPARs	29
1.6.1 Via do PPAR- $\gamma$	30
1.6.2 Via do PPAR- $\gamma$ na inflamação e regulação de CLs	33
<b>2 - Objetivos</b>	<b>36</b>
2.1 Objetivo Geral	36
2.2 Objetivos Específicos	36
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
3.1 Animais	37
3.2 Obtenção de tripomastigotas - Indução da metaciclogênese	37
3.3 Infecção de ratas Holtzman <i>in vivo</i>	38
3.4 Infecção de macrófagos <i>in vitro</i>	38
3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão	39
3.6 Análises Morfométricas Ultraestruturais	40

3.7 Estímulo de tripomastigotas com AA e AO -----	40
3.8 Identificação de CLs -----	41
3.9 Quantificação de CLs -----	41
3.10 Dosagem de PGE <sub>2</sub> -----	42
3.11 Imunodeteção de PGE <sub>2</sub> nos sítios de produção (Eicosacell) -----	42
3.12 Purificação dos CLs -----	43
3.13 Espectroscopia RAMAM -----	44
3.14 MALDI – Espectrometria de Massas -----	45
3.15 Cultura de Macrófagos e infecção com BCG -----	45
3.16 Western Blotting -----	46
3.17 Análises Estatísticas -----	46
<b>4 – RESULTADOS -----</b>	<b>47</b>
4.1 – CLs são formados no parasito em resposta à interação com o hospedeiro -----	47
4.2 – O ácido araquidônico (AA) é incorporado em CLs e induz Formação de CLs em formas infectantes de <i>T. cruzi</i> -----	51
4.3 – O AA é incorporado nos CLs do parasito -----	54
4.4 - Parasitos estimulados com AA produzem PGE <sub>2</sub> -----	59
4.5 – Parasitos mostraram sintetizar a PGE <sub>2</sub> , porém sem atividade De COX-2 -----	60
4.6 – CLs do parasito são sítios de síntese de PGE <sub>2</sub> -----	61
4.7 – O parasito <i>T. cruzi</i> expressa o receptor nuclear PPAR-γ -----	64
<b>5 – DISCUSSÃO -----</b>	<b>66</b>
<b>6 – CONCLUSÕES -----</b>	<b>72</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS -----</b>	<b>74</b>
<b>8 – ANEXOS -----</b>	<b>92</b>

## **1. Introdução**

### **1.1 A Doença de Chagas – Dados Históricos**

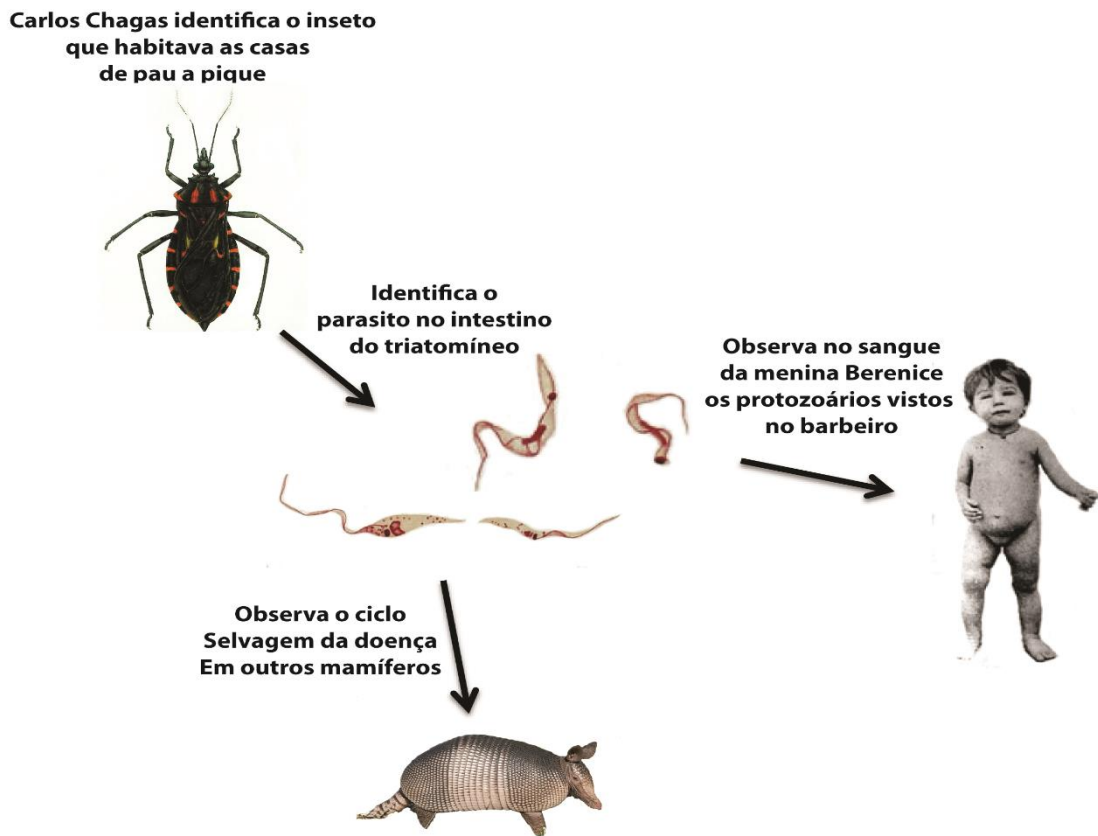
Conhecida há mais de 100 anos, a doença de Chagas é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma doença negligenciada no Brasil e outros países (1, 2), pois acomete populações de baixa renda e tem pouco interesse público e econômico, com baixos investimentos destinados ao seu controle e diminuição da sua incidência. Devido às consequências e a notória disseminação da doença de Chagas ao longo dos anos, a doença vem despertando grande interesse dos pesquisadores, já que não se apresenta uma cura efetiva. Além disso, ainda não são bem conhecidos os mecanismos celulares e moleculares que fazem com que o parasito causador da doença consiga evadir-se do sistema imunológico do hospedeiro.

A história da doença de Chagas é bem difundida entre a comunidade científica no Brasil, e teve início com os estudos do médico e pesquisador Carlos Chagas que caracterizou e deu nome à doença (3, 4). Nascido em 1878, na cidade de Oliveira, município mineiro localizado a cerca de duas horas da capital Belo Horizonte, Carlos Ribeiro Justiano das Chagas mudou-se para o Rio de Janeiro em 1897, onde ingressou na Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro e se interessou fortemente pelo estudo de doenças tropicais, mais especificamente a malária. Carlos Chagas adquiriu experiência de laboratório na prática de atividades relacionadas ao estudo da malária, o que foi importante para sua formação e trabalho como médico sanitário. Ainda aluno, Chagas ingressou no Instituto Soroterápico de Manguinhos (posteriormente Instituto Oswaldo Cruz) para adquirir habilidades na área de medicina experimental. Esse instituto fora criado entre os anos de 1899 e 1900 para desenvolver soros e vacinas em um período em que o Brasil estava infestado de epidemias e navios recusavam-se a ancorar em nossos portos pelos perigos à saúde de seus tripulantes. Um dos maiores problemas era a malária. O pesquisador preparou sua tese de doutoramento em estudos hematológicos no impaludismo (malária), que defendida com eficiência, e proporcionou o reconhecimento de seu orientador, Oswaldo Cruz, então diretor de Manguinhos (3, 5, 6).

Após sua formação, Carlos Chagas adquiriu várias experiências relacionadas a doenças tropicais, como peste bubônica e malária, sendo que, com esta última, seu trabalho obteve sucesso no município de Itatinga (SP), onde conseguiu reduzir

os níveis de incidência da doença. Em 1907, foi nomeado, pela Diretoria Geral de saúde Pública, para trabalhar no controle da malária em Lassance - MG, local onde havia a construção de uma estrada de ferro e ocorria alta incidência de trabalhadores acometidos por várias doenças tropicais (7-10). Nesta época, Carlos Chagas teve contato pela primeira vez, com um inseto que caracteristicamente habitava frestas de casas feitas de pau a pique e era conhecido popularmente como barbeiro, nome destinado ao inseto pelo fato de picar as pessoas no rosto (7, 9, 10). Carlos Chagas se interessou e analisou o inseto, identificando no tubo digestivo do mesmo, protozoários do gênero *Trypanosoma* (4, 7-10). Intitulou o protozoário de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) em homenagem ao seu mestre, Oswaldo Cruz (3-6, 10). Através de testes com macacos, Carlos Chagas percebeu que esse protozoário era um parasito de células de mamíferos (4, 7-11) e posteriormente, analisando células humanas de uma menina de dois anos (Berenice), Carlos Chagas constatou a presença do parasito infectando essas células, relacionando pela primeira vez a doença com o protozoário.

Neste ponto, a repercussão da doença aumentou, principalmente pelo fato inédito na medicina da época, de Carlos Chagas ter identificado juntamente com o parasito, o vetor, o hospedeiro e o reservatório da doença, ou seja, o ciclo completo da zoonose (5) (Fig. 1.1). Assim, a doença passou a ser conhecida e difundida no meio médico-científico, levando à divulgação mundial do nome de Carlos Chagas e da doença, até então desconhecida (11).



**Figura 1.1 – Ciclo selvagem e doméstico da doença de Chagas.** Descoberta por Carlos Chagas em (1909-1912) em Lassance - MG. Os hospedeiros definitivos (homem e “tatu”) e intermediário (“barbeiro”) do parasito são indicados. Figura modificada de (7).

## 1.2 Epidemiologia da Doença de Chagas

A partir de 1909, a doença de Chagas passou a ser estudada com mais detalhes no Brasil e no mundo. Porém, por se tratar de uma doença que geralmente acomete regiões de extrema pobreza, acabou se tornando negligenciada ao longo dos anos, incluindo-se na lista de outras doenças negligenciadas como a leishmaniose e esquistossomose, por exemplo (1, 12-15). As doenças negligenciadas atingem, na sua grande maioria, regiões de difícil acesso, com deficiência ou até mesmo ausência de serviços de saúde pública. Estas regiões sofrem com a falta, tanto de recursos, como de medidas tomadas pela iniciativa pública e privada, o que contribui para a dificuldade de sua erradicação. Cerca de um bilhão de pessoas sofrem com doenças negligenciadas no mundo (1).

Relatos mostram que a tripanossomíase já se perpetua por muito tempo nas Américas, havendo múmias com cerca de dois mil anos antes de Cristo com vestígios de infecção e morte causada pela parasitose (11). Porém, sua grande disseminação ocorreu com aumento da densidade populacional gerada pela ocupação do território americano, desde a época da colonização com a chegada dos primeiros europeus (16). Essa realidade despertou interesse de muitos estudiosos como o Dr. Emmanuel Dias, afilhado de Carlos Chagas e um de seus maiores seguidores, que se engajou no estudo da doença de Chagas a partir de 1920. Emmanuel Dias estimulou estudos regionais, mapeando o problema nas regiões, tentando aproximar com sucesso o governo da situação, mostrando-lhe a importância de investimentos no combate e controle da doença, possíveis tratamentos e drogas a serem utilizadas (17, 18). A partir destes estudos iniciais, o número de publicações, controle e levantamento acerca da doença cresceu exponencialmente após a década de 1950 (19, 20).

A OMS estima em aproximadamente 6 a 7 milhões o número de pessoas infectadas em todo o mundo, a maioria em 21 países da América Latina (Fig. 1.2) (211). Porém um novo problema epidemiológico, econômico e social tem ocorrido em relação à doença de Chagas, trata-se da imigração ilegal e sem controle, o que leva pessoas infectadas e acometidas pela doença à países onde ela não é endêmica. Muitas pessoas com a doença de Chagas na América Latina acabam migrando para Europa, Ásia, Oceania e América do Norte, principalmente para países como Estados Unidos, Canadá, Japão, Espanha e países emergentes da Ásia e Oceania. Esses imigrantes têm criado um novo problema de saúde pública e epidemiológico nos países e regiões que os recebem (21).

No Brasil, estima-se que dois milhões de pessoas estejam infectadas. Em 2015, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), foram registrados no país 250 casos confirmados de doença de Chagas, sendo 236 (94,0%) no estado do Pará, onde o município de Altamira contribuiu com 10 (4,0%) das notificações feitas no estado. Entre os infectados, estima-se que de 10 a 40% das pessoas já sofram ou estão comprometidas com problemas cardíacos crônicos provocados pela doença e 10% já estão condenados com problemas graves cardíacos e provavelmente irão morrer em decorrência desta doença.

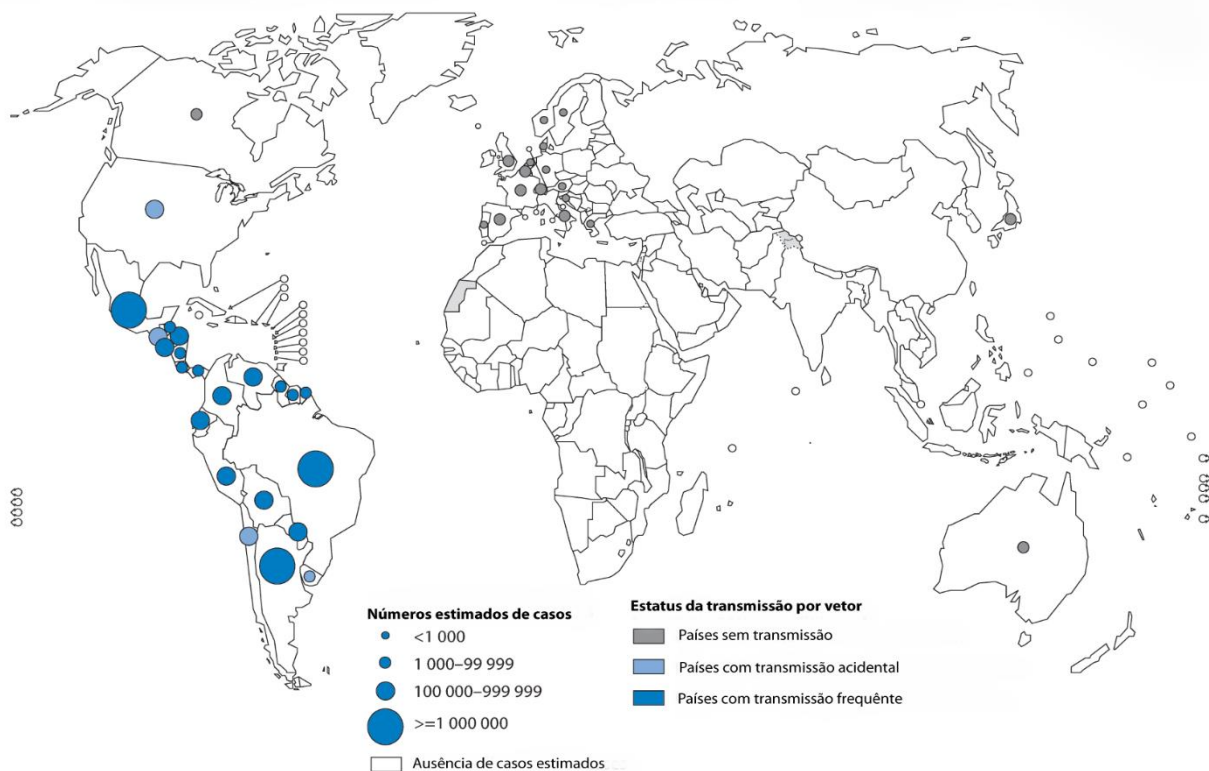
Por se tratar de uma doença sem cura conhecida, o foco do controle para doença de Chagas, se volta para o combate aos vetores e as formas de contágio alternativas (transfusão, transplacentária, transplantes de órgãos, oral) (22, 23). O

combate ao inseto transmissor tem sido amplamente utilizado alcançando-se assim resultados consideráveis e praticamente erradicando a transmissão da doença em diversos países, inclusive partes do Brasil. São utilizados para esse fim, pesticidas e produtos tóxicos que matam ou espantam o barbeiro, tática que vem sendo utilizada desde as décadas de 40 e 50, e que contribuiu bastante para erradicação da doença em algumas regiões e diminuição em outras. Alguns autores dividem as estratégias de controle da doença em uma determinada região em cinco estágios: estágio 0 (Inatividade), estágio 1 (Atividade inicial), estágio 2 (Eliminação da transmissão doméstica), estágio 3 (Controle da transmissão acidental) e estágio 4 (Estágio final) (22).

Em 2006 o Brasil recebeu da OMS o certificado de país livre de transmissão da doença pelo *Triatoma infestans*, até então o principal transmissor da doença de Chagas no país (21). Porém, essa certificação que se baseia na ausência de eventos, gera muitas dúvidas se realmente é verídico tal certificação. Assim, pesquisadores brasileiros têm questionado essa certificação. Eles assinalam que a doença de Chagas pode se manter assintomática por décadas, o que dificulta a identificação de novos casos assim que eles surgem. Além disso, espécies nativas de vetores que, no Brasil, giram em torno de 50, frequentemente reinfestam os domicílios humanos, iniciando novos ciclos de transmissão.

O combate às formas de contágio alternativas tem sido feito principalmente em relação ao controle das transfusões sanguíneas, através de exames mais detalhados dos doadores, o que promoveu diminuição significativa do número de casos da doença de Chagas. Outras formas de contágio também são responsáveis por elevar os números de casos da doença. Estas formas são caracterizadas por gerar surtos, por acometer grande quantidade de pessoas de uma só vez e ser de difícil controle, como por exemplo, contágio por meio oral como ingestão de caldo de cana e suco de açaí, muito comum na região norte e nordeste do Brasil (24, 25).

Além do foco do controle apresentado anteriormente, outra maneira bastante importante para o controle da doença consiste no tratamento com drogas, o que ainda é muito controverso (26). As principais drogas utilizadas (Nifurtimox® e Benzonidazol®) tem um bom efeito tripanocida, porém trazem muitos efeitos colaterais, além de serem eficientes na fase aguda e não terem ação determinante na fase crônica (27, 28).



**Figura 1.2 - Distribuição do número de casos da doença de Chagas no mundo de 2006 - 2009.** Região das Américas do Sul e Central apresentam a maioria da incidência da doença de Chagas no mundo. Figura adaptada (WHO, 2010).

### 1.3 Vetores da doença de Chagas

A Doença de Chagas tem como vetor um grupo de insetos popularmente conhecido por vários nomes no Brasil, entre eles estão: chupança, chupão, bicho-de-frade, percevejo-do-sertão, gaudério, procotó e o mais comum e conhecido, utilizado como referência principal ao inseto, “barbeiro” (5, 7, 9, 10). Trata-se de um grupo de insetos pertencentes à ordem hemiptera, caracterizada devido ao aspecto das asas onde o par anterior tem a metade proximal coriácea e a metade distal membranosa. Possui aparelho bucal do tipo picador-sugador, formado por três ou quatro segmentos colocados ventralmente à cabeça o que favorece o seu modo de alimentação. Estes insetos são constituintes da família Reduviidae e subfamília –



Triatominae – a qual engloba os hemípteros hematófagos transmissores da Doença de Chagas (8, 29-31).

Os triatomíneos são primitivamente considerados indivíduos de hábito silvestre, mas adquiriram evolutivamente a característica de habitar ecótopos artificiais, devido ao desmatamento nas florestas causado pelo homem (32, 33). Triatomíneos possuem hábitos noturnos, quando saem dos seus esconderijos nas casas de pau a pique para se alimentar de um mamífero, no caso um humano (7). Enquanto pica e suga o sangue da presa, o triatomíneo defeca no local, liberando os parasitos que estão presentes no seu intestino próximo à ferida causada pela picada, havendo assim um contato dos protozoários com a corrente sanguínea do hospedeiro.

Os barbeiros estão agrupados em pelo menos 19 gêneros, com aproximadamente 140 espécies (21). Dentro da subfamília Triatominae encontram-se três gêneros principais (*Panstrongylus*, *Triatoma*, *Rhodnius*), capazes de transmitir a doença de Chagas (31). No Brasil existem cerca de nove espécies responsáveis pela transmissão da doença de Chagas humana, esses insetos são capazes de colonizar as cafuas (habitações miseráveis), moradas características de regiões de baixa renda, o que torna essas espécies mais próximas dos ambientes domésticos e em maior contato com os humanos, favorecendo as infecções. As principais espécies são: *T. infestans*, *P. megistus*, *T. sórdida*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* (34). As demais espécies têm menor envolvimento com a doença de Chagas, devido à baixa incidência de infecções, justificado pelo hábito estritamente silvestre e a limitação a infecções em outros animais.

A espécie de “barbeiro” mais comum e de maior relevância na América do Sul, incluindo países como o Brasil, é a espécie *Triatoma infestans*, devido a características que favorecem a infecção em hospedeiros humanos, tais como a capacidade de habitar ecótopos, ciclo de vida favorável à infecção, capacidade reprodutiva e eliminação de dejetos logo após o repasto sanguíneo, o que torna esta espécie o principal vetor da doença de Chagas na América Latina (32, 33). Uma estimativa acerca do nível de infecção natural de acordo com as espécies de barbeiro aponta que cerca de 30% das infecções ocorre por *T. infestans*, 15% por *P. megistus* e 9% por *T. brasiliensis*.

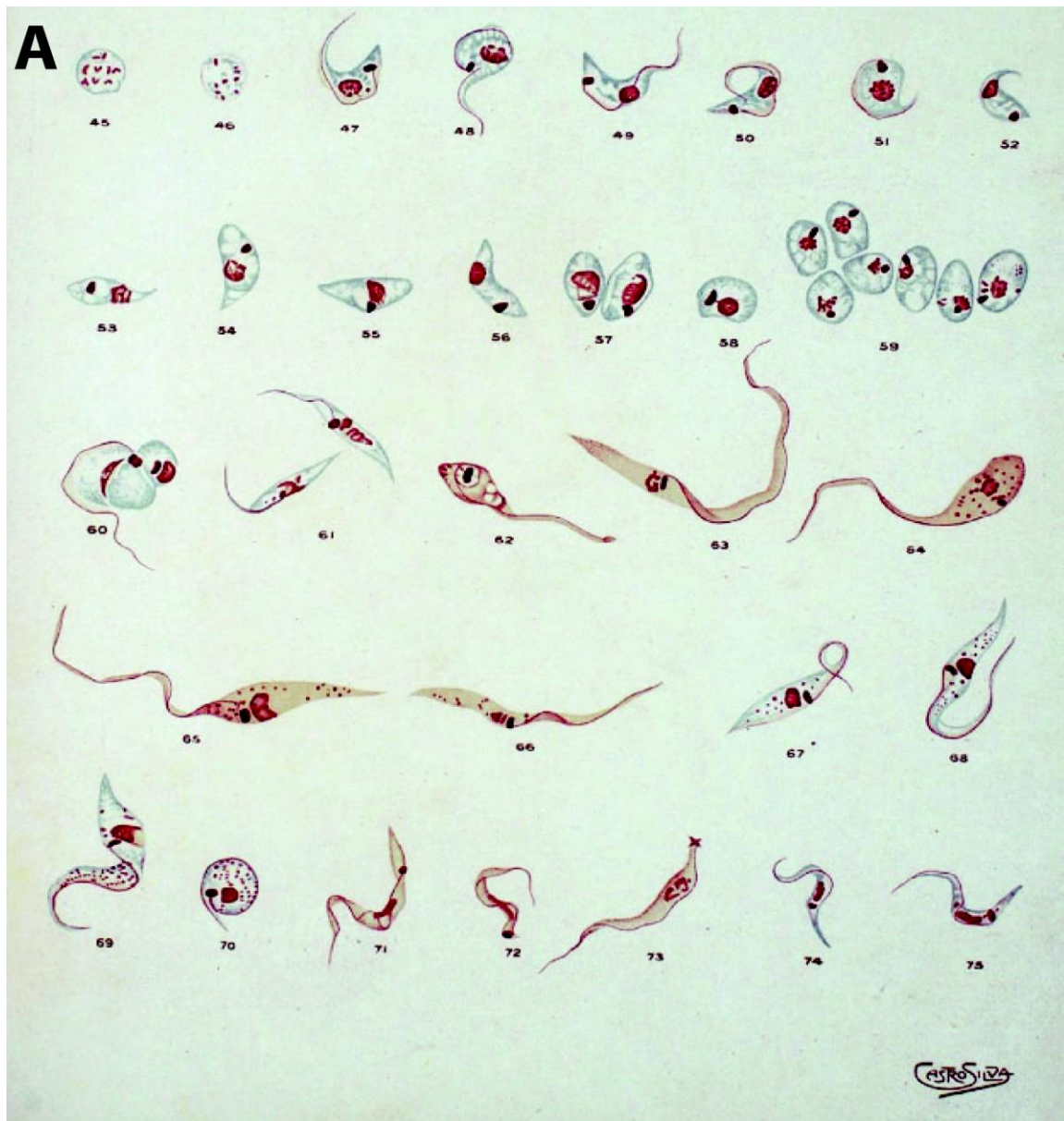
Devido à dificuldade de combater a doença de Chagas quando o indivíduo já se encontra infectado, os vetores são o principal foco de controle da doença, tornando o entendimento acerca dos Triatomíneos de grande relevância (35).

## 1.4 *Trypanosoma cruzi*

### 1.4.1 Aspectos Gerais

O agente etiológico da doença de Chagas ou tripanossomíase Americana, consiste no protozoário *T. cruzi*, parasito pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Este flagelado destaca-se por estar incluído em um grupo de protozoários que possuem um cinetoplasto (Fig. 1.3 B), estrutura essa formada por uma mitocôndria com um tipo especial de DNA, o chamado kDNA, localizado na base da célula do protozoário (36). Possui apenas um núcleo e um flagelo (Fig. 1.3 B). O flagelo nasce na base do cinetoplasto e se alonga pelo corpo do protozoário servindo como estrutura locomotora, uma vez que sua projeção longa e afilada na parte basal do indivíduo realiza movimentos circulares que geram força propulsora e auxiliam na locomoção dessa célula enquanto necessário. O protozoário apresenta também uma membrana envoltória ondulante (Fig. 1.3 B) que em associação ao flagelo auxilia nos movimentos celulares nas formas móveis do parasito.

O *T. cruzi*, apresenta diversas formas durante seu ciclo de vida (Fig. 1.3 A), caracterizadas pela observação à microscopia óptica de algumas estruturas celulares como, por exemplo, do flagelo, membrana ondulante. Há variações na constituição molecular e no tamanho celular, como ocorre quando o parasito muda de forma durante o ciclo de vida. Todos esses processos estão associados à necessidade de adaptação do parasito ao meio ao qual está inserido e à fase do ciclo de vida (37, 38).



**Figura 1.3 – Diferentes formas do parasito durante o ciclo de vida.** Em (A) desenho feito por Carlos Chagas durante pesquisa com o parasito *Trypanosoma cruzi* em 1909, destacando as várias formas observadas do parasito durante parte do ciclo de vida. Em (B) observa-se um tripomastigota, em que as estruturas importantes do parasito são indicadas pelas setas vermelhas. Modificado de (7).

### 1.4.2 Ciclo de Vida

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve dois hospedeiros (definitivo e intermediário) e mudanças importantes na forma e estrutura celular do parasito. Ao ser sugado pelo hospedeiro intermediário (barbeiro), o *T. cruzi* é conduzido das glândulas salivares até o intestino do barbeiro, onde passa da forma tripomastigota para epimastigota. Durante o repasto do barbeiro e evacuação, os parasitos são liberados nas fezes e urina e irão penetrar na pele lesionada ou mucosa íntegra, e assim atingem um novo hospedeiro definitivo. Uma vez no hospedeiro definitivo, o *T. cruzi* pode infectar diversos tipos celulares, podendo dar início à doença de Chagas (37, 39) (Fig. 1.4).

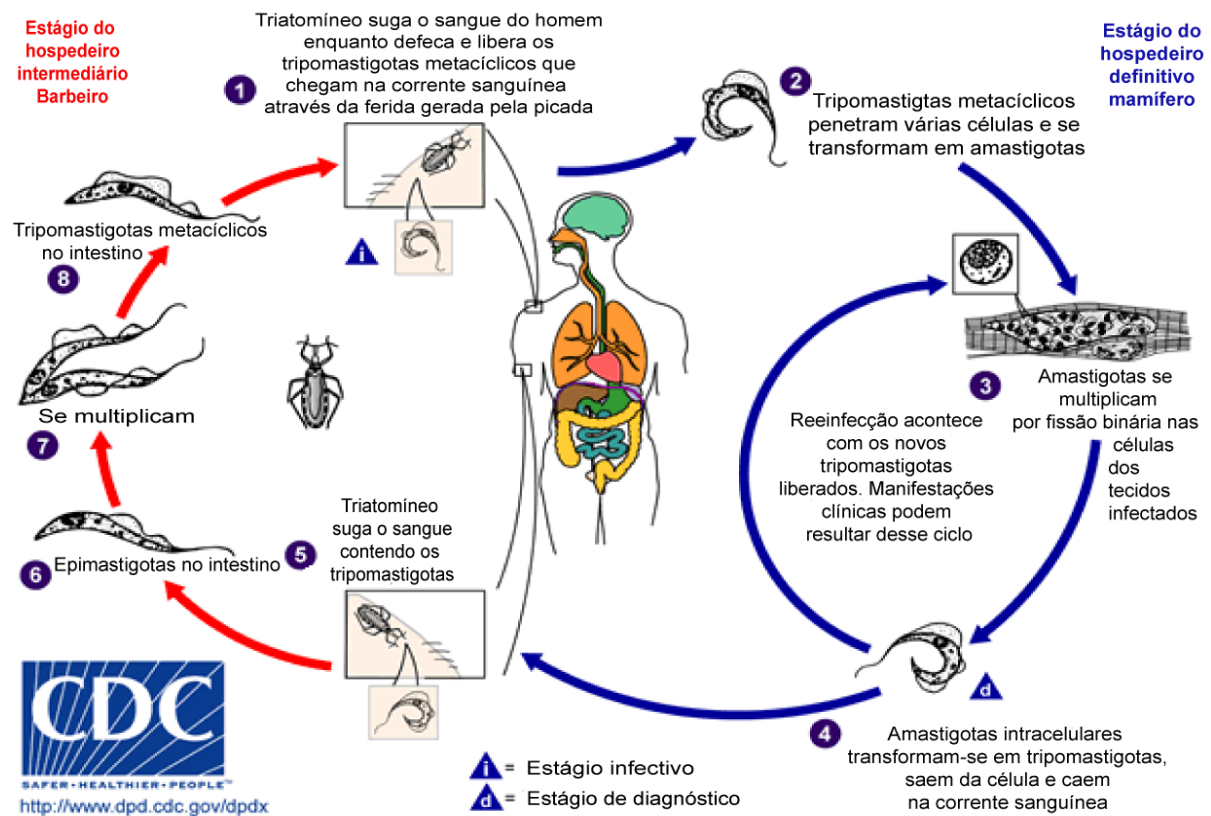
Durante o ciclo de vida do parasito, é possível notar três formas bem distintas e importantes para caracterização do *T. cruzi*. Trata-se de uma classificação onde se considera as formas mais características do ciclo de vida (39) (Fig. 1.4). Em 1909 ao descrever o parasito, Carlos Chagas já havia notado a grande diferença morfológica, e destacou as diferenças das formas do parasito no ciclo evolutivo (7) (Fig. 1.3).

As principais formas são:

- **Amastigota:** forma circular ou ovóide, com pouco citoplasma e núcleo grande. Nesta forma, o flagelo se retém na chamada bolsa flagelar e é invisível em cortes observados por microscopia de luz. Os amastigotas encontram-se imóveis, produzindo grandes quantidades de moléculas. Amastigotas constituem a forma replicativa do parasito, sendo observada caracteristicamente no interior das células hospedeiras dos organismos infectados, principalmente macrófagos e células musculares cardíacas (39) (Fig. 1.3 A, formas numeradas de 57-59).
- **Epimastigota:** Nessa fase, o parasito tem forma fusiforme, bem alongada e membrana ondulante visível e associada ao flagelo. O flagelo emerge perto da metade da célula e alastra-se acompanhando a membrana ondulante até se tornar livre na ponta da extremidade anterior do protozoário. Os epimastigotas apresentam intensa atividade reprodutiva e é encontrada no intestino do inseto. Quando o barbeiro suga os tripomastigotas sanguícolas pelo aparelho bucal, estas formas do parasito migram para o intestino do inseto onde se transformam em epimastigotas. Após sucessivas divisões os epimastigotas migram para a região do reto onde se transformam em tripomastigotas e estão prontos para infectar um vertebrado, os epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos. A forma epimastigota, é uma forma evolutiva encontrada nos hospedeiros invertebrados,

sendo as formas tripomastigotas, tanto sanguícola, quanto metacíclicas, e a forma amastigota, formas evolutivas de hospedeiros vertebrados (Fig. 1.3 A formas numeradas de 65-69).

- **Tripomastigota:** encontra-se em duas formas mais comuns e infectantes - tripomastigotas sanguícolas e metacíclicas. Os tripomastigotas sanguícolas são organismos muito ágeis e que percorrem o sangue periférico do hospedeiro vertebrado. Em visualização por microscopia de luz, apresentam-se em forma de C ou S com extremidades afiladas e um cinetoplasto globoso. Tripomastigotas não se reproduzem no sangue e rapidamente penetram na célula hospedeira onde se diferenciam em amastigotas, ou são destruídos por células do sistema imunológico do hospedeiro. Os tripomastigotas metacíclicos, são as formas mais infectantes, que necessitam penetrar as células do hospedeiro vertebrado. São formas que resistem às altas temperaturas corporais dos hospedeiros vertebrados, além disso têm capacidade de atravessar mucosas e se aderem fortemente às membranas celulares das células hospedeiras (Fig 1.3 A formas numeradas de 74 e 45).



**Figura 1.4 – Ciclo de vida do parasito *Trypanosoma cruzi*.** As principais formas do ciclo de vida do parasito e os respectivos locais onde se encontram nos hospedeiros intermediário e definitivo são indicados. Esquema adaptado do Centro de Controle e Prevenção de Doenças do governo Americano - CDC.

### **1.4.3 Aspectos clínicos na infecção pelo *T. cruzi***

Os aspectos clínicos da doença de Chagas são complexos, distribuídos em fases e períodos de infecção. A doença apresenta duas fases principais, uma mais inicial, denominada aguda e outra mais tardia, denominada crônica. Na maioria dos infectados consiste em uma doença silenciosa.

Na fase aguda, pode apresentar ou não os sintomas que correspondem aos fenômenos clínicos que se estabelecem nos primeiros dias ou meses da infecção, sendo diagnosticada pela ocorrência do parasito no sangue periférico. Pode-se também encontrar tripomastigotas circulando perifericamente no líquido cefalorraquidiano, no leite e no sêmen (40, 41). Após a infecção, formas tripomastigotas podem ser fagocitadas por macrófagos ou penetrar diretamente em outros tipos celulares onde se transformarão nas formas intracelulares reprodutivas – as amastigotas (Fig. 1.5). Um hospedeiro infectado pelo *T. cruzi*, apresenta geralmente parasitos em diversas células e tecidos. Os amastigotas podem ser encontrados em fibras musculares esqueléticas, fibras musculares cardíacas, fibras musculares lisas, células do baço, neurônios, células da glia, na glândula tireóide, nos ovários, e infectando células dos túbulos seminíferos, entre outras (40, 41).

A fase aguda é, portanto, caracterizada por elevado parasitismo, principalmente em órgãos como o coração. Ninhos de amastigotas são facilmente identificáveis no citoplasma destas células, ocupando áreas extensas (Fig. 1.5). Essa disposição nos tecidos, e a grande característica proliferativa do *T. cruzi*, acarretam ao hospedeiro as manifestações clínicas mais evidentes.

As manifestações gerais da fase aguda são febre (pouco elevada), mal-estar geral, cefaléia, astenia, hiporexia, edema, hipertrofia de linfonodos. Frequentemente ocorre hepato-esplenomegalia (17). Às vezes se agrava numa forma meningoencefálica, principalmente nos primeiros meses ou anos de vida (17, 42). Quando existem sinais de infecção, estes podem ser oculares (Sinal de Romaña) ou cutâneos (Chagoma de Inoculação) (17, 43). O Sinal de Romaña é um edema

bipalpebral, que às vezes se expande à face. Coloração rósea-violácea das pálpebras, congestão conjuntival e enfartamento dos linfonodos, constituem características do sinal de Romaña (17). O chagoma de inoculação é uma formação cutânea ligeiramente saliente, arredondada, eritematosa, dura, assemelhando-se a um furúnculo que não supura, mas que às vezes pode exulcerar (17).

As alterações eletrocardiográficas encontradas na fase aguda estão na dependência do grau de acometimento do coração. A fase aguda é o passo inicial para o agravamento da doença que posteriormente se instala na fase crônica. É, na maioria das vezes, assintomática, o que é complicado para o quadro da doença, já que o portador não identifica a doença imediatamente e só irá perceber e tomar as medidas cabíveis contra a doença de Chagas num estado mais avançado, conhecida como fase crônica.

A fase crônica trata-se de um estado que pode ser estacionário e assintomático, porém é principalmente nessa fase que o paciente apresenta complicações cardíacas, causadas pelo acúmulo do parasito no tecido muscular cardíaco, com a formação de edemas locais e posterior fibrose. Isso leva o coração a uma perda de vitalidade, diminuição do seu ritmo e é a principal causa de morte na doença de Chagas. Muitas vezes o paciente não percebe alterações clínicas, porém acaba sofrendo morte súbita, o que é bem característico na doença de Chagas. Na fase crônica, o método mais utilizado e seguro de diagnóstico, é a detecção de antígenos parasitários no sangue dos pacientes (44-46).

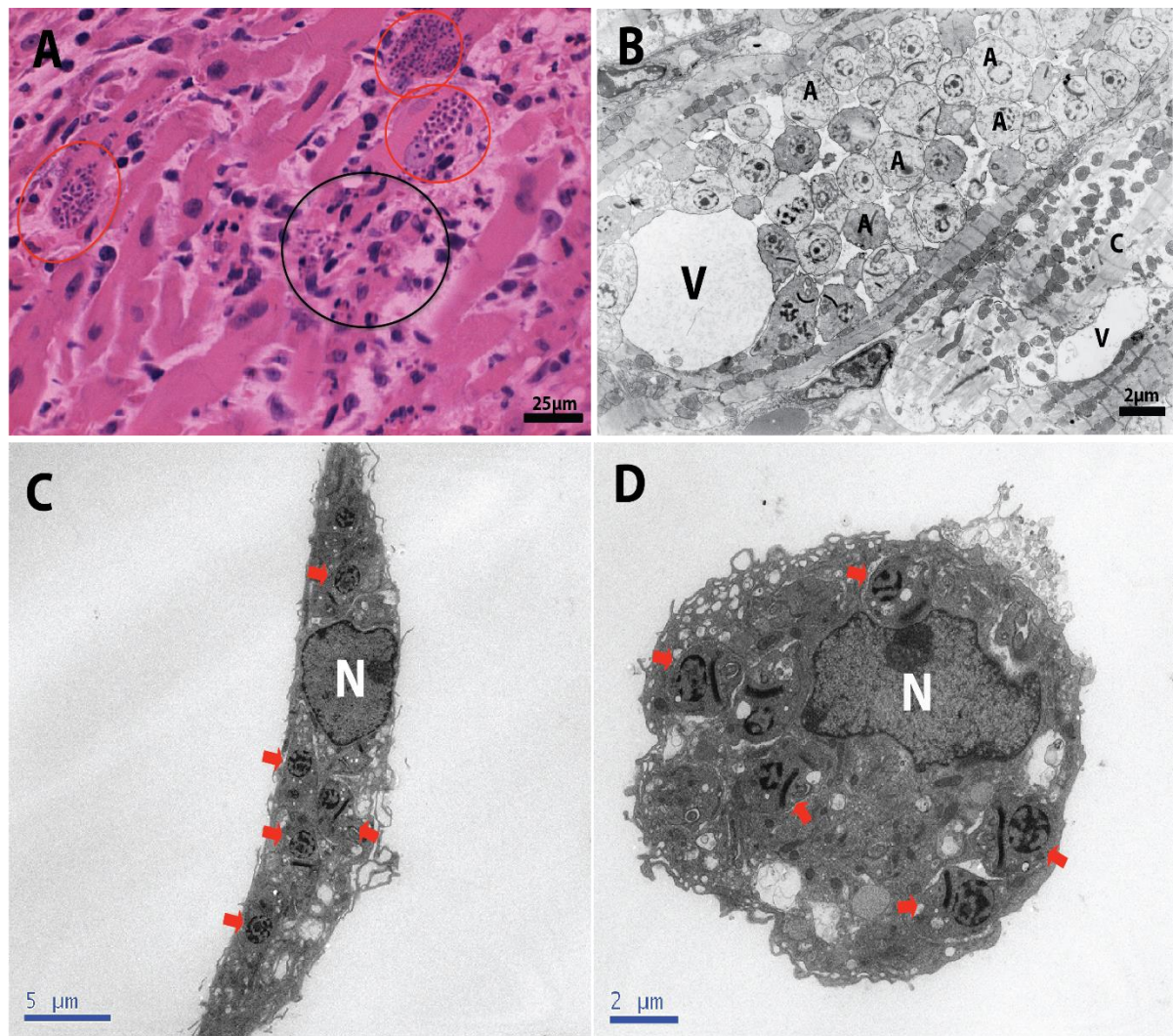
A fase crônica pode ser sintomática e oferecer ao portador indícios como: palpitação, dispnéia, edema, dor precordial, tosse, tonturas, desmaios, acidentes embólicos, extrassistólicas. As principais alterações eletrocardiográficas são: bloqueio completo do ramo direito (BCRD), hemibloqueio anterior esquerdo (HBAE), extrassístoles ventriculares, sobrecarga de cavidades cardíacas, alterações da repolarização ventricular, dentre outras (47). O raio-x de tórax pode revelar cardiomegalia global discreta, moderada ou acentuada, aumento isolado de ventrículo esquerdo, aumento biventricular e congestão vascular pulmonar (17).

Alterações no trato gastrointestinal acontecem em cerca de 15% dos casos da fase crônica e podem ser caracterizadas por alterações ao longo do trato digestivo, ocasionadas por lesões dos plexos nervosos (destruição neuronal simpática), com consequentes alterações da motilidade e morfologia ao nível do trato digestivo, sendo o megaesôfago e o megacólon as manifestações mais comuns (42, 48-50). O megacólon se caracteriza por constipação intestinal (instalação lenta e insidiosa),

meteorismo, distensão abdominal e fecaloma (48, 51). Os exames radiológicos são importantes no diagnóstico da forma digestiva. No caso de megaesôfago, há quatro grupos de alterações que vão desde uma simples dificuldade de seu esvaziamento até ao dolicomegaesôfago, que corresponde àqueles com grande volume, alongado, atônico, dobrando-se sobre a cúpula diafragmática, e produzindo sombra paracardiaca direita ao simples exame de tórax (48, 49, 52).

A doença de Chagas pode ser amenizada caso o portador esteja atento aos sintomas e detecte imediatamente seu problema (53). Todo indivíduo com infecção chagásica deve ter acesso a um serviço médico capaz de fazer os diagnósticos clínico, laboratorial e epidemiológico e identificar a fase da doença para definição do tratamento adequado, quando necessário. O manejo clínico do paciente chagásico, particularmente das formas cardíacas, é importante, pois quando bem conduzido e iniciado precocemente pode resultar na elevação da expectativa de sobrevivência, juntamente com a diminuição da carga parasitária no hospedeiro.





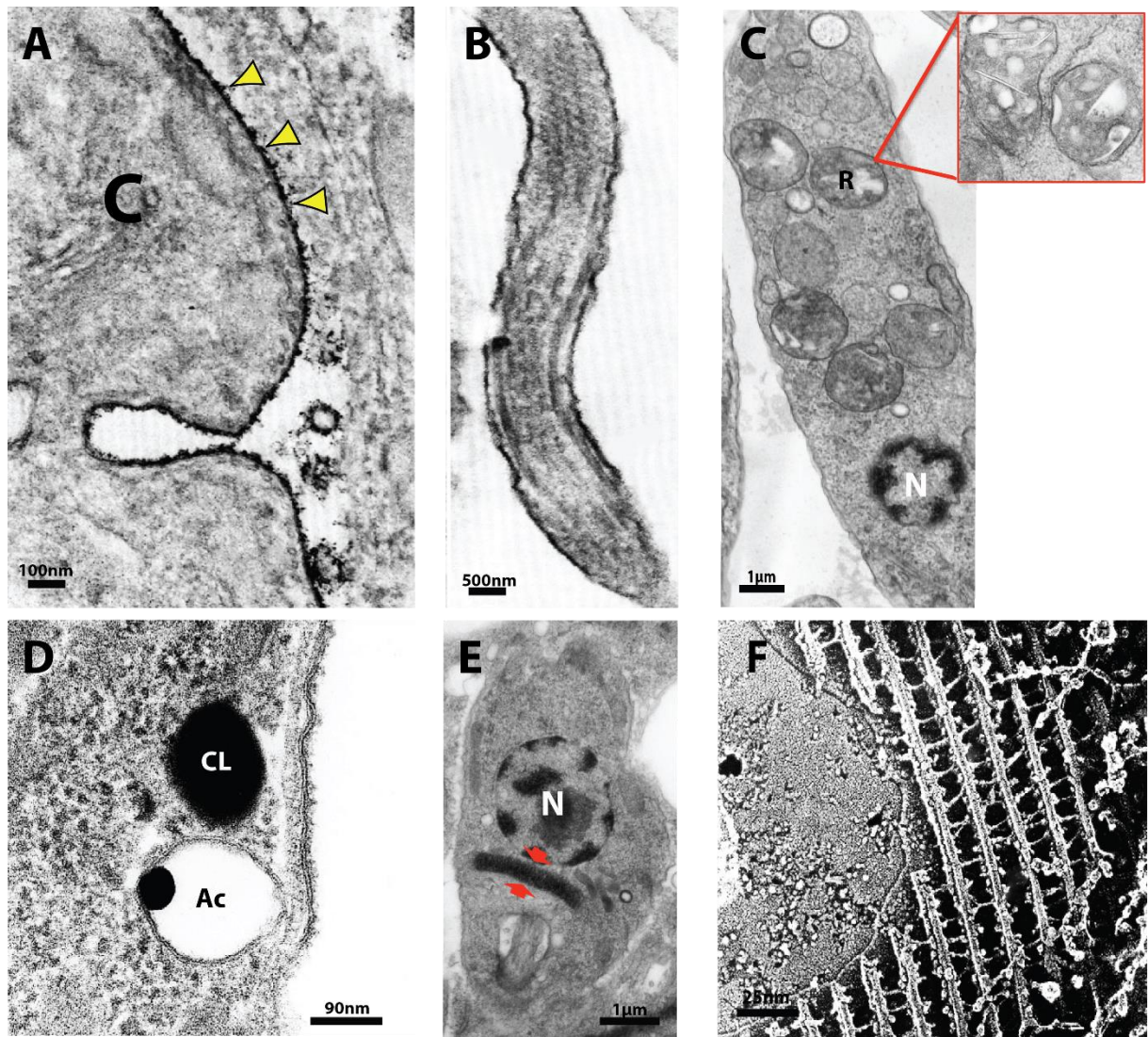
**Figura 1.5 – Aspectos morfológicos da infecção por *Trypanosoma cruzi*.** (A, B) Secções de tecido muscular cardíaco de rata infectada, observadas através de microscopia de luz (A) ou MET (B). Em (A), diversos ninhos de amastigotas (círculos vermelhos) e infiltrado inflamatório mononuclear (círculo preto) são observados. Em (B), nota-se a ultraestrutura de um ninho de amastigotas (A) dentro de um cardiomiócito (c). (C, D) Macrófagos peritoneais murinos após 24 h de infecção, caracterizados pela grande taxa de parasitismo. As setas vermelhas indicam os amastigotas no interior dos macrófagos. Fragmentos de tecido cardíaco de ratas aos 12 dias de infecção e macrófagos peritoneais murinos infectados foram processados para microscopia de luz (A, coloração hematoxilina-eosina) ou para MET (B-D). V, vacúolo; N, núcleo dos macrófagos. A e B: imagens modificadas de (54); C e D (Toledo e cols., imagens não publicadas).

#### 1.4.4 Ultraestrutura do *T. cruzi*

A organização ultraestrutural do *T. cruzi* é um ponto importante, sendo que alguns componentes celulares são fundamentais para o parasito e sua interação com o hospedeiro. Destacam-se as seguintes estruturas:

- **Superfície celular:** é onde ocorre a interação entre o parasito e a célula hospedeira do vertebrado e as células intestinais do invertebrado. Na superfície, estão presentes moléculas como proteínas, lipídios e açúcares que compõem o glicocálix, que são de extrema importância para as funções interativas do parasito (Fig. 1.6 A) (55-58). Dependendo da fase do ciclo de vida do parasito é possível notar diferença nas quantidades e desempenho dessas moléculas. Trata-se de uma superfície iônica negativa que varia de acordo com o pH do meio, o que é importante para o processo de infecção da célula hospedeira (55).
- **Flagelo:** é importante para mobilidade do parasito, principalmente nas formas tripomastigota e epimastigota, formas as quais o parasito não se encontra no interior de células hospedeiras (Fig. 1.6 B) (36, 58). Nesses estágios do ciclo, o parasito necessita de mobilidade, para ir ao encontro das células hospedeiras e ou movimentar-se pelo sangue até ser sugado novamente por um barbeiro e recomeçar o ciclo de vida no invertebrado. A forma amastigota despolimeriza o flagelo que fica condicionado à uma bolsa denominada bolsa flagelar devido a seu modo de vida intracelular e estático (36).
- **Citoesqueleto:** tem papel importante na função celular do parasito. Esses parasitos são organizados em um arcabouço subpelicular de microtúbulos associados à membrana, isso impede e dificulta invaginações da membrana e protege o parasito além de permitir a dinâmica celular ao longo do ciclo. Entretanto, este arcabouço é descontinuado na região da bolsa flagelar, de onde o flagelo emerge do corpo (36, 59). Microfilamentos se organizam num sistema actina-miosina sendo responsável pela mobilidade no citóstomo, por exemplo (Fig. 1.6 F) (36).
- **Complexo cinetoplasto-mitochondrial:** é uma estrutura que varia com a forma do parasito, formada por uma mitocôndria de tamanho avantajado responsável por toda respiração celular do parasito. O cinetoplasto é uma região da mitocôndria onde se encontra rica em DNA, conhecido como kDNA (Fig. 1.6 E) (36). Proteínas básicas são encontradas no cinetoplasto, o que permite deduzir que essas proteínas estejam sendo produzidas localmente. Desta forma, este material genético do cinetoplasto é de grande importância para o parasito e seu ciclo de vida.

- **Glicossomos:** são estruturas esféricas de matriz homogênea, onde podem ser encontradas proteínas de alto ponto isoelétrico semelhantes a catalases por exemplo (36). Em comparação com organelas de células de mamíferos, assemelham-se com os peroxissomos e estão envolvidos em vias importantes no interior da célula parasitária, como a glicólise. As proteínas dos glicossomos são provenientes do genoma do núcleo e transferidas através do citosol para os glicossomos, onde são armazenadas, (revisto em (36, 60)).
- **Acidocalcisomas:** são organelas onde há armazenamento de íons, tal como fósforo, cálcio, ferro, magnésio, sódio, potássio, zinco e participa no controle do pH da célula, bem como controle osmótico (61-64). Através de análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET), pode haver certa dúvida em relação à morfologia dos acidocalcisomas, confundindo-os com alguns CLs elétron-densos. Porém a caracterização ultraestrutural da membrana da organela anula qualquer dúvida existente, já que CLs apresentam uma monocamada lipídica que os diferem das demais organelas que possuem membrana com bicamada lipídica, como os acidocalcisomas (Fig. 1.6 D).
- **Vacúolo contrátil:** comum no controle osmótico, pode estar associado aos acidocalcisomas em vias de metabolismo interno (36).
- **Reservossomos:** Estão associados a diversas funções, e tem como principal papel o armazenamento de moléculas como lipídios (66). Várias proteínas, que possuem papel na metaciclologênese do parasito, também estão associadas à reservossomos (Fig. 1.6 C) (66-69). São organelas definidas basicamente como o sítio de acúmulo de macromoléculas endocitadas pelos parasitas; além de hidrolases lisossomais. Eles têm sido descritos como abundantes nas formas epimastigotas. São organelas envoltas por uma unidade de membrana; com conteúdo elétron-denso e inclusões elétron-lucentes; sem membranas internas. Por não apresentar marcadores lisossomais e ter pH em torno de 6,0; já foram classificados como endossomas tardios.
- **Núcleo:** se enquadra como outra estrutura fundamental da célula, de função semelhante aos núcleos de outras células eucariotas (Fig. 1.6 C, E) (36).
- **CLs:** estas organelas são descritas na literatura como inclusões citoplasmáticas com funções energéticas. São, portanto, relacionadas com reserva lipídica, o que posteriormente poderia ser utilizado pelo parasito para manutenção energética da célula (Fig. 1.6 D) (64). São delimitados por uma monocamada de fosfolipídios e demais funções serão discutidas neste trabalho.



**Figura 1.6 – Estruturas do *Trypanosoma cruzi* observadas por microscopia eletrônica de transmissão.** (A) Superfície celular evidenciando moléculas de carboidratos (cabeças de setas amarelas). (B) Flagelo longo e afilado. (C) Reservossomos (R). (D) Acidocalcisoma (Ac) e Corpúsculo Lipídico (CL). Observe que, enquanto o Ac possui membrana envoltória típica (estrutura trilaminar), o CL não se encontra delimitado por esta estrutura. (E) Cinetoplasto indicado pelas setas vermelhas. (F) citoesqueleto observado pela técnica de criofratura. N, núcleo; C, citoplasma do parasito. Figuras modificadas de: A, B (70); C (68); D (64); F (71); E (Toledo e cols., imagem não publicada).

### 1.4.5 Interação Parasito X Hospedeiro

Ao entrar em contato com o hospedeiro definitivo, o parasito necessita reconhecer, interagir e penetrar nas células desse hospedeiro, do contrário será eliminado pelo sistema imune. Nesse primeiro contato, o parasito utiliza-se de moléculas presentes na sua membrana celular para reconhecimento e adesão nas células hospedeiras (72, 73). A superfície do *T. cruzi* é totalmente recoberta por mucinas, açúcares de extrema importância para proteção contra a ação de moléculas degradantes do hospedeiro e interação celular (74).

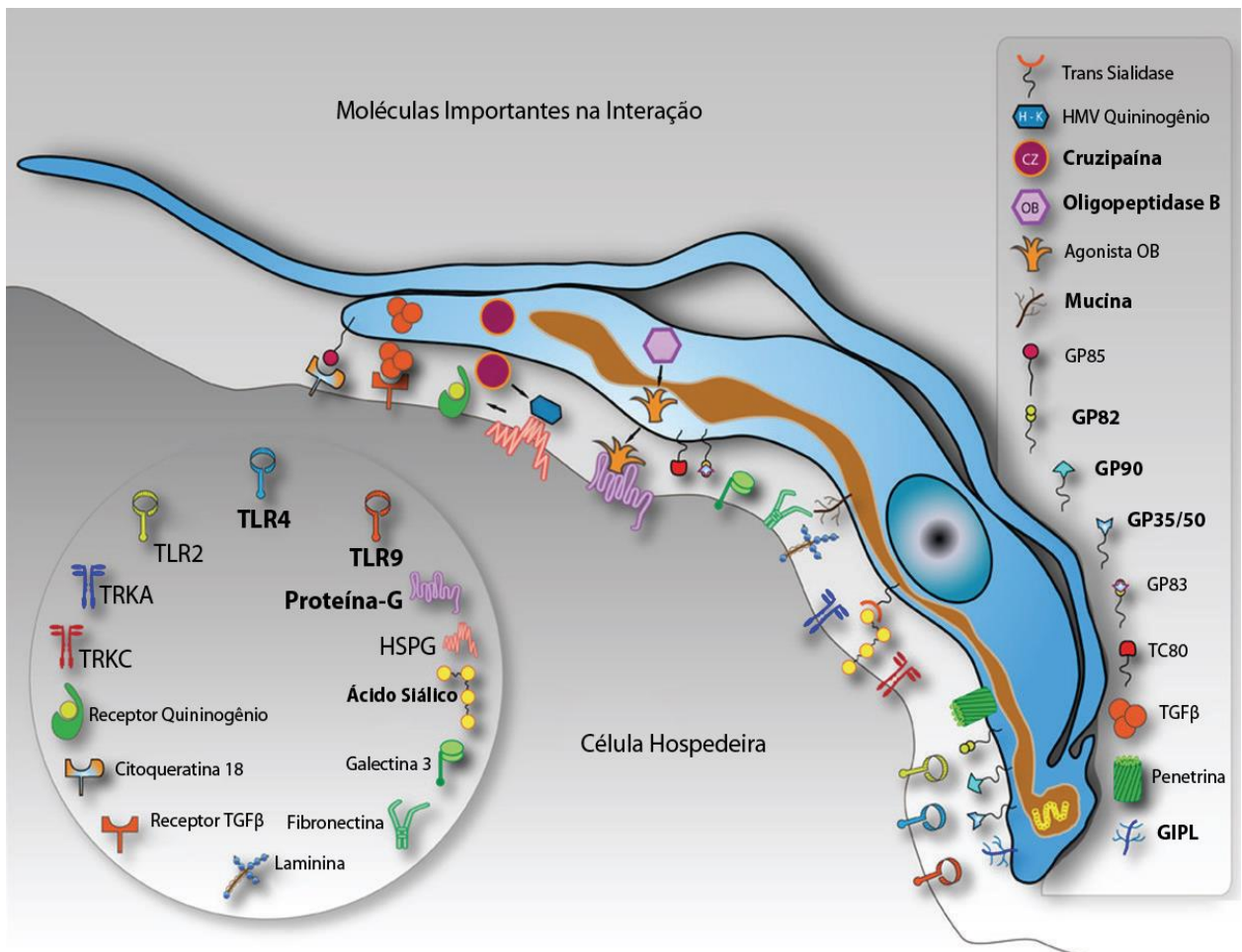
Na superfície das células hospedeiras, lectinas e integrinas funcionam como receptores nesse processo e auxiliam na invasão do parasito (57). Outras moléculas na superfície da célula hospedeira também são reconhecidas e têm papel chave nesse processo, como os receptores do tipo Toll (TLR) - 4 e 9 que são, por exemplo, reconhecidos pela ceramida GIPL de epimastigotas (57). Outro receptor, o receptor TLR-2, expresso pelas células hospedeiras durante a infecção com *T. cruzi*, age durante o processo protegendo a célula hospedeira contra os mecanismos de apoptose gerados durante a infecção (75).

A invasão do parasito na célula hospedeira é algo extremamente complexo envolvendo várias moléculas que estão diretamente ligadas a inúmeras vias de sinalização celular, tanto no parasito, quanto no hospedeiro (76-78). Em (78), mostrou-se que a interação entre glicoproteínas de superfície do parasito com receptores do hospedeiro, provoca regulação nos níveis de  $Ca^{2+}$  da célula hospedeira, o que é determinante no processo de invasão parasitária. Em outro processo, o parasito, através de uma varredura na superfície da célula hospedeira, consegue capturar moléculas durante a interação, desta forma o parasito adquire, por exemplo, ácido siálico do hospedeiro (79). O ácido siálico é importante molécula da superfície da célula hospedeira, participando no reconhecimento celular, como alvo de ligação de várias moléculas (79). Quando o parasito captura e expõe o ácido siálico em sua superfície, em um processo que mimetiza a superfície celular da célula hospedeira, ocorre um aumento em sua virulência, elevando o seu poder infeccioso. Desta forma o parasito adquire capacidade de evadir-se do sistema imunológico e de formar glicoconjugados importantes para eventos de interação e proteção (79, 80).

São vários os grupos e famílias de proteínas envolvidas no processo de interação, invasão e proteção do parasito, como a família das glicoproteínas com diferentes pesos moleculares: gp90, gp82, gp35/50, encontradas na superfície do *T. cruzi* (57, 78, 81) (Fig. 1.7). Outras moléculas participantes na proteção do parasito à ação tripanocida da célula hospedeira, incluem proteases, alguns açúcares e glicoproteínas. Estas moléculas protegem as formas tripomastigotas contra peptídeos antimicrobianos e contra ação de células Natural Killer (NK) do hospedeiro, além de protegerem os amastigotas no interior da célula hospedeira depois da internalização (81, 82).

Acoplado ao processo de reconhecimento, adesão, invasão e manutenção do parasito na célula hospedeira, de acordo com o meio o qual está inserido, há um fluxo intenso de moléculas entre parasito-hospedeiro, que provavelmente serão utilizados na síntese de seus próprios componentes celulares, de acordo com a necessidade apresentada e ciclo de vida do parasito (83-86). Vários trabalhos mostraram em parasitos intracelulares como *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum*, por exemplo, tráfego de lipídios entre parasito e hospedeiro (84, 87). A endocitose de lipídios e proteínas provenientes do meio de cultura foi demonstrada em *T. cruzi*, tendo sido proposta uma possível troca de vesículas lipídicas entre parasito e hospedeiro durante o processo de infecção (88).

Durante a infecção, os parasitos necessitam se manter no organismo hospedeiro, evadindo o sistema imune do mesmo. As principais e mais eficazes formas de se realizar a evasão são a produção de moléculas miméticas e/ou utilização de vias inibitórias do próprio sistema imune do hospedeiro pelo parasito (89). Algumas moléculas produzidas pelo hospedeiro podem ter ação inibitória no sistema imune, como por exemplo, mediadores lipídicos com perfis anti-inflamatórios como prostaglandina (PG) E<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>-alfa e algumas citocinas, como interleucina 10 (IL-10). Essas moléculas podem estar sendo produzidas por parasitos como *T. cruzi*, *Leishmania* e *Plasmodium falciparum*, como foi demonstrado em alguns trabalhos (90-92).



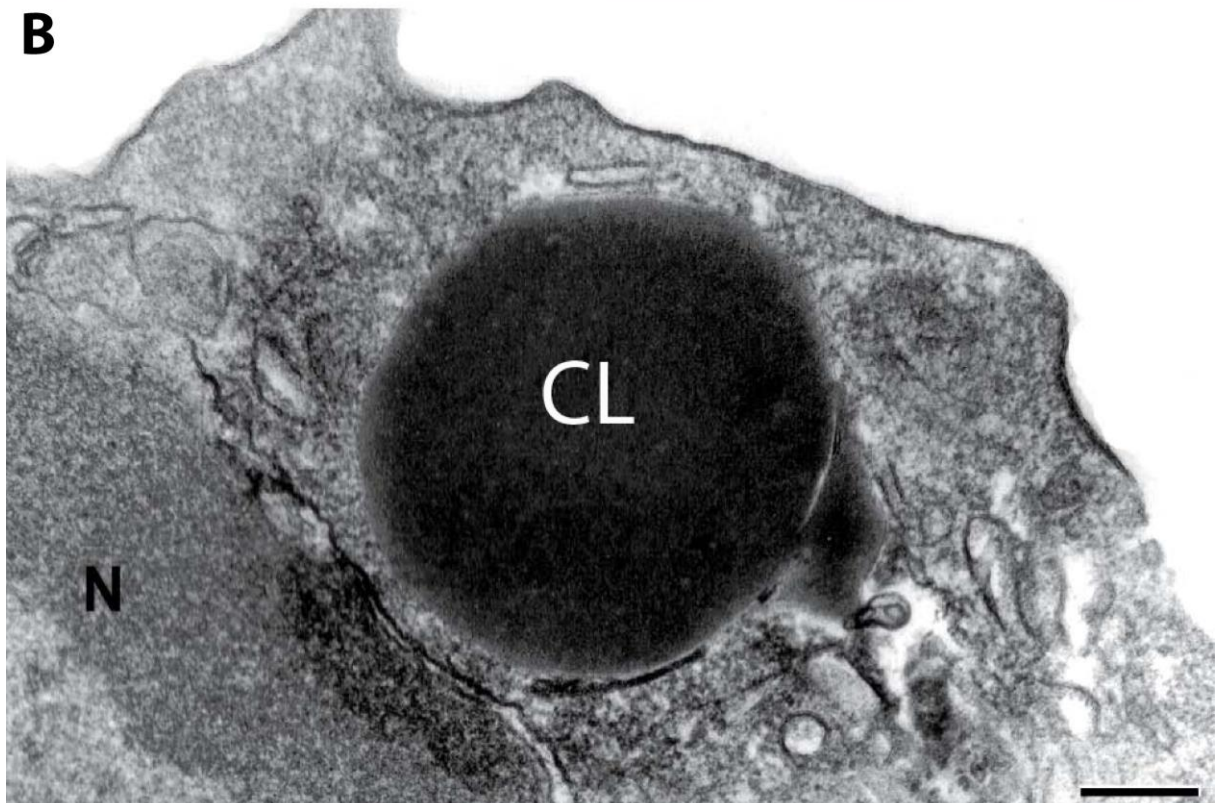
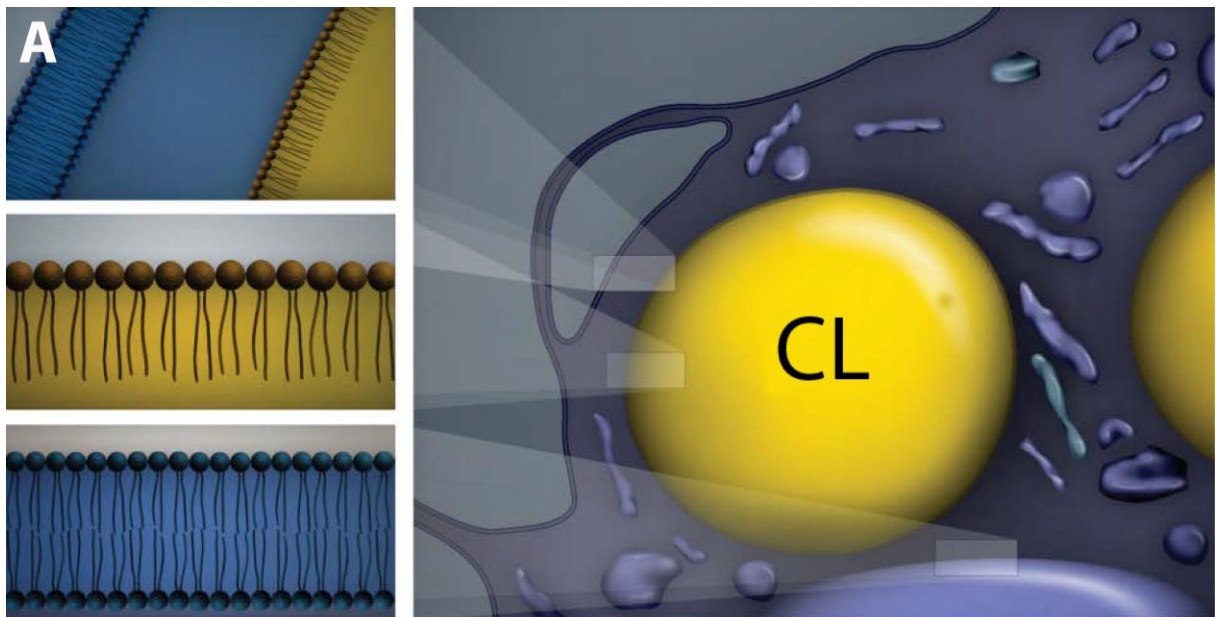
**Figura 1.7 - Principais moléculas de superfície celular envolvidas na interação parasito-célula hospedeira.** Em negrito estão destacadas as principais moléculas descritas no texto. Figura modificada de (57).

### 1.5 Corpúsculos Lipídicos (CLs)

CLs, gotas lipídicas ou inclusões lipídicas, são todas denominações para uma organela presente no citoplasma dos diversos tipos de células, que vão desde organismos mais simples como algas, fungos, protozoários e bactérias a organismos extremamente complexos como mamíferos e plantas (revisado em (93, 94)).

### 1.5.1 Estrutura e Composição

A estrutura dos CLs, em contraste às demais organelas celulares que são revestidas por membrana clássica composta por bicamada lipídica, apresenta uma única camada anfipática de fosfolipídios (revisto em (94-96)) (Fig. 1.8A). Portanto, pelo fato de não apresentarem uma membrana envoltória trilaminar, os CLs são facilmente identificáveis à MET (96) (Fig. 1.8B).





**Figura 1.8 – Aspectos morfológicos de Corpúsculos Lipídicos (CLs).** (A) Desenho esquemático ilustrando a estrutura de CLs. Estas organelas encontram-se delimitadas apenas por uma monocamada de fosfolipídios diferindo da organização estrutural de todas as outras organelas, vesículas citoplasmáticas e membrana plasmática, as quais apresentam uma bicamada lipídica. (B) CL elétron-denso observado no citoplasma de um eosinófilo de sangue humano através de MET. N, núcleo. Barra = 500nm. Figura modificada de (96).

Os CLs são geralmente arredondados e, dependendo de sua composição, podem se apresentar bastante elétron-densos ou elétron-lúcidos, ou mesmo em contrastes intermediários quando analisados em MET, após contrastação com tetróxido de ósmio reduzido (96-98). Quando elétron-densos, os CLs apresentam-se ricos em fosfolipídios devido à forte impregnação pelo tetróxido de ósmio, metal pesado que tem afinidade por esses, e por isso cora fosfolipídios presentes nestas organelas. Quando elétron-lúcidos sua constituição está rica em lipídios neutros, devido ao fato da menor impregnação de tetróxido de ósmio. A quantidade, o tamanho, e a elétron-densidade de CLs no interior de uma célula vai depender das condições a que a célula está submetida e dos estímulos externos que agem sobre a célula influenciando em sua constituição (revisto (96, 99)).

Acredita-se que CLs se formem a partir do retículo endoplasmático, porém os mecanismos celulares e moleculares de formação ainda não são totalmente esclarecidos (93, 100). De maneira geral, CLs possuem uma constituição baseada em lipídios neutros como diacilgliceróis, triacilgliceróis e ésteres de colesterol dispostos em sua estrutura central e o entorno estruturado com fosfolipídios (revisto em (95)).

Em adição, são encontradas nos CLs de células de mamíferos diversos tipos de proteínas, como enzimas envolvidas no papel de síntese de lipídios, proteínas envolvidas no acúmulo e metabolismo de ésteres de colesterol, proteínas relacionadas com o tráfego de membranas, como as proteínas da família Rab de pequenas GTPases, e proteínas envolvidas na sinalização celular como proteínas-quinases (101, 102). As proteínas estruturais dos CLs mais conhecidas em células de mamíferos constituem a chamada família PAT, denominada posteriormente como perilipinas (103). São elas: Perilipina 1 (PLIN 1), Perilipina 2 (PLIN 2), também conhecida como proteína relacionada à diferenciação de adipócitos (ADRP) ou

adipofilina e Perilipina 3 (PLIN 3), também conhecida como TIP-47 (101, 104). Proteínas envolvidas no metabolismo e transporte celular como 17- $\beta$  hidroxisteróide desidrogenase, Acil CoA sintetase também estão presentes em grandes quantidades nos CLs. Outras proteínas estruturais, como tubulina-1 e caveolina, também podem ser encontradas em CLs (101, 102, 105).

### 1.5.2 Composição de CLs em células do sistema imune

Em células do sistema imune, CLs são descritos como sítios de formação de mediadores inflamatórios de origem lipídica (eicosanoides) e contêm moléculas específicas relacionadas à síntese desses mediadores. CLs de células do sistema imune armazenam várias moléculas como fosfolipídios, lipídios neutros e ácido araquidônico. O ácido araquidônico é um ácido graxo importante no processo de sinalização e é substrato para conversão enzimática de eicosanoides (revisto em (95, 96)).

As principais enzimas presentes em CLs são as relacionadas à formação de eicosanoides como ciclooxigenases (COXs) (106-108), 5 e 15- lipooxigenases (5-LO e 15-LO) e leucotrieno C<sub>4</sub> sintetase (109). Além disso, CLs apresentam enzimas como fosfolipases e MAP-quinases (110).

Os CLs são sítios de produção de eicosanoides a partir do ácido araquidônico, onde é formado e liberado rapidamente mediante à estimulação celular. Um exemplo desses mediadores é Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), um potente mediador inflamatório que têm o papel de inibir o sistema imune do hospedeiro. A PGE<sub>2</sub>, produzida em CLs, foi descrita em macrófagos infectados com *Mycobacterium bovis* BCG (111), causador da tuberculose bovina ou com *T. cruzi* (106). Foi demonstrado também, que o leucotrieno C<sub>4</sub> é produzido em CLs de eosinófilos e basófilos, estimulados com as quimiocinas eotaxina/CCL11 e RANTES/CCL5, assim como eosinófilos de modelos murinos em ensaios de alergia e inflamação. Foi encontrado também, leucotrieno B<sub>4</sub> em neutrófilos e macrófagos durante sepse (112).

Durante processos inflamatórios infecciosos ou não, ocorre a ativação das células do sistema imune, culminando com a formação de novos CLs podendo causar mudanças na composição desta organela e produção destes mediadores de origem lipídica, que modulam a resposta imune do hospedeiro.

### 1.5.3 Indução da formação de CLs por patógenos

A maioria das células possui um número pequeno de CLs no citoplasma, mas a formação destas organelas pode ser rapidamente estimulada quando ocorre interação com diferentes patógenos como parasitos, bactérias e vírus (revisito em (99)). Em doenças causadas por protozoários, como a doença de Chagas, é bem documentado o aumento expressivo do número e diâmetro de CLs em macrófagos infectados do hospedeiro (54, 96, 106, 113). Na infecção por *Leishmania amazonensis*, observa-se um aumento numérico de CLs em macrófagos. Nesse caso, a relação com o processo de autofagia é bastante evidente. Todos esses processos, comuns em infecções por parasitos, pode favorecer os próprios parasitos, que evoluíram para explorar tais respostas. Vale ressaltar por exemplo, que nas células do hospedeiro, o crescimento parasitário é favorecido após indução de autofagia, seguida pelo aumento do número de CLs, produção de PGE<sub>2</sub> e diminuição de Óxido Nítrico (NO) (114).

Os CLs são sítios de compartimentalização de ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (LO), estando diretamente relacionado à produção de eicosanoides (109). Desta forma, inibidores de ciclooxigenases, como indometacina, podem agir diretamente nos CLs inibindo as enzimas localizadas nesta organela, diminuindo a produção de mediadores inflamatórios imunossupressores, com isso há uma redução da carga parasitária, por exemplo, em camundongos (BALB/c) infectados na leishmaniose experimental (114).

Durante a infecção por *Toxoplasma gondii*, é evidente também a produção de mediadores inflamatórios lipídicos em macrófagos como PGE<sub>2</sub> e LXA<sub>4</sub>, resultado de ação de ciclooxigenases sobre o ácido araquidônico nos CLs (115). Também nota-se a produção de lipoxina por macrófagos, que tem importante atuação anti-inflamatória e acaba contribuindo de forma favorável ao patógeno em algumas infecções, como por exemplo, na evasão do parasito *Toxoplasma gondii* durante a toxoplasmose (115).

Em estágio avançado, durante a malária causada por *Plasmodium berguei*, observou-se grande número de CLs no citoplasma de hepatócitos, o que provavelmente se trata de uma resposta inflamatória da célula em relação à infecção pelo parasito (116). Embora hepatócitos não sejam células do sistema imune, estas células estão envolvidas na produção de mediadores da resposta de fase aguda

(117), este mecanismo pode indicar uma estratégia envolvida na imunidade, já que CLs e seus produtos são importantes durante o processo de defesa do organismo.

Os CLs exercem papel importante em infecções causadas por outros patógenos, que não protozoários. Durante infecção em células HeLa por *Chlamydia trachomatis*, um aumento na quantidade de CLs é observado nestas células, o que acaba sendo um favorecimento ao parasito, pois estas organelas pode ser utilizadas pelo parasito como fonte de lipídios e proteínas (118).

Nas infecções bacterianas, também é possível destacar alterações na dinâmica dos CLs nas células envolvidas com o processo inflamatório. A infecção por *Mycobacterium bovis* BCG leva a produção de CLs em macrófagos, mecanismo que depende tanto de via de reconhecimento por TLR-2, como também da via de sinalização relacionada com a ativação do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxisomos-gama (PPAR- $\gamma$ ) (111, 119). Paralelamente ao aumento do número de CLs, a produção de PGE<sub>2</sub> pelos macrófagos também é aumentada. Os autores também demonstraram que a inibição de PPAR- $\gamma$  causou um aumento na atividade microbicida dos macrófagos (119). Na infecção por *Mycobacterium leprae* também é evidente o aumento da produção de CLs, acompanhada pela liberação de PGE<sub>2</sub> (120), tanto por macrófagos quanto por células de Schwann (121).

É evidente a formação de CLs durante infecções causadas por diferentes patógenos, porém o papel destas organelas ainda não se encontra totalmente esclarecido, podendo atuar tanto na resistência do hospedeiro como favorecendo a sobrevivência do parasito (revisto em (99)). Diversos trabalhos vêm ressaltando que os CLs favorecem a replicação do microrganismo, seja enfraquecendo a ação imunológica do hospedeiro, seja interagindo e fornecendo a matéria prima para produção das moléculas lipídicas do próprio parasito (83). No entanto, mais estudos devem ser realizados para entender o papel dos CLs na imunidade e inflamação, durante infecções por patógenos.

#### **1.5.4 CLs e mediadores inflamatórios em parasitos**

A presença de CLs e produção de mediadores da inflamação em parasitos protozoários é conhecida há alguns anos, e tem se mostrado um papel bastante relevante em infecções e patologias (90, 122). Em células de mamíferos, sabe-se que muitas enzimas envolvidas na síntese destes mediadores estão presentes em

CLs, que muitas vezes são comprovadamente sítios da produção dos próprios mediadores. Porém, em parasitos, apesar de evidências da presença da organela e da produção de mediadores da inflamação, nem sempre é claro se há uma conexão entre os dois fatos.

Trabalhos antigos já sugeriam a presença de inclusões de origem lipídica no citoplasma de *Leishmania donovani*, pois tais inclusões se dissolviam em xilol, um potente solvente de lipídios (123). Embora anteriormente a função desta organela se limitasse ao armazenamento lipídico como fonte de energia, hoje sabe-se que são CLs característicos, evidentes nesse parasito (124). Foi mostrada também a ocorrência de CLs em parasitos dos gêneros *Plasmodium* e *Trypanosoma* (revisto em (125)).

A observação de CLs em protozoários tem sido classicamente associada ao papel desta organela como fonte de carbono para a sobrevivência do patógeno (36). No entanto, estudos vêm demonstrando que CLs em parasitos podem estar relacionados com outras funções nestes organismos (126). Em *Toxoplasma gondii* tem sido observada a presença dessa organela após interação com o hospedeiro, além da captura de lipídios desse mesmo hospedeiro pelo parasito (84). É interessante também observar que em CLs de *T. gondii*, estão presentes enzimas importantes no metabolismo lipídico como diacilglicerol aciltransferase (DGAT), enzima chave para o processo de formação da organela (122). A conexão entre os CLs e a produção dos mediadores não foi amplamente analisada e a literatura trata de fatos isolados.

A captura de lipídios do hospedeiro em benefício próprio, para formação das suas próprias organelas lipídicas, tem sido mostrada recentemente (84, 127). Em *Trypanosoma brucei*, o processo de formação de CLs é bem evidente, e dependente de proteína quinase encontrada no próprio CL (126).

Na malária, durante infecção pelo *Plasmodium falciparum*, o parasito utiliza lipídios dos eritrócitos para formação de seus próprios CLs com a finalidade de se proteger contra os radicais *heme* liberados durante destruição de hemoglobina e que são extremamente tóxicos para parasito (83, 125, 128). Além disso, o parasito é capaz de produzir PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>, mediadores inflamatórios que têm a capacidade de auxiliar na manutenção do parasito no hospedeiro (92). Mas, de forma geral, o estudo da relação produção dos mediadores lipídicos e CLs são escassos na literatura.

Em *Leishmania infantum* há uma produção aumentada de CLs pelo próprio parasito durante processo de infecção ao hospedeiro, a fim de modular a resposta inflamatória hospedeira. Nesse caso, os CLs do parasito são capazes de produzir PGs, como a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  que influencia na virulência do parasito, devido à uma imunomodulação de macrófagos, propriedade importante de PGs. Paralelamente, a utilização de ácido araquidônico como estímulo para o parasito, demonstra uma potencialização da produção da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , quando estudos são realizados *in vitro* (90, 91).

Em infecção por *Entamoeba histolítica*, apesar de não se ter concluído uma relação direta com CLs, existe uma produção de mediadores inflamatórios pelo parasito, mais especificamente  $\text{PGA}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , (129, 130), o que faz com que macrófagos do hospedeiro tenham na região infectada do fígado, uma menor eficiência em destruir o parasito. *Entamoebas*, apesar de não possuir a enzima ciclooxigenase, possuem uma enzima semelhante em termos de função, sendo fundamental para a produção desses eicosanoides (131).

A produção de PGs pode ser observada em diversos parasitos protozoários como podemos observar na tabela abaixo.

<b>Parasita</b>	<b>Mediador inflamatório</b>	<b>Referência</b>
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	$\text{PGA}_2$ ; $\text{PGE}_2$ ; $\text{PGF}_{2\alpha}$	(132)
<i>Entamoeba histolytica</i>	$\text{PGA}_2$ , $\text{PGE}_2$ , $\text{PGF}_{2\alpha}$	(129, 130)
<i>Leishmania sp.</i>	$\text{PGA}_2$ , $\text{PGE}_2$ , $\text{PGF}_{2\alpha}$	(90, 91)
<i>Plasmodium falciparum</i>	$\text{PGD}_2$ , $\text{PGE}_2$ , $\text{PGF}_{2\alpha}$	(92)
<i>Toxoplasma gondii</i>	$\text{PGE}_2$	(133)
<i>Trypanosoma brucei</i>	$\text{PGD}_2$ , $\text{PGE}_2$ , $\text{PGF}_{2\alpha}$	(134)

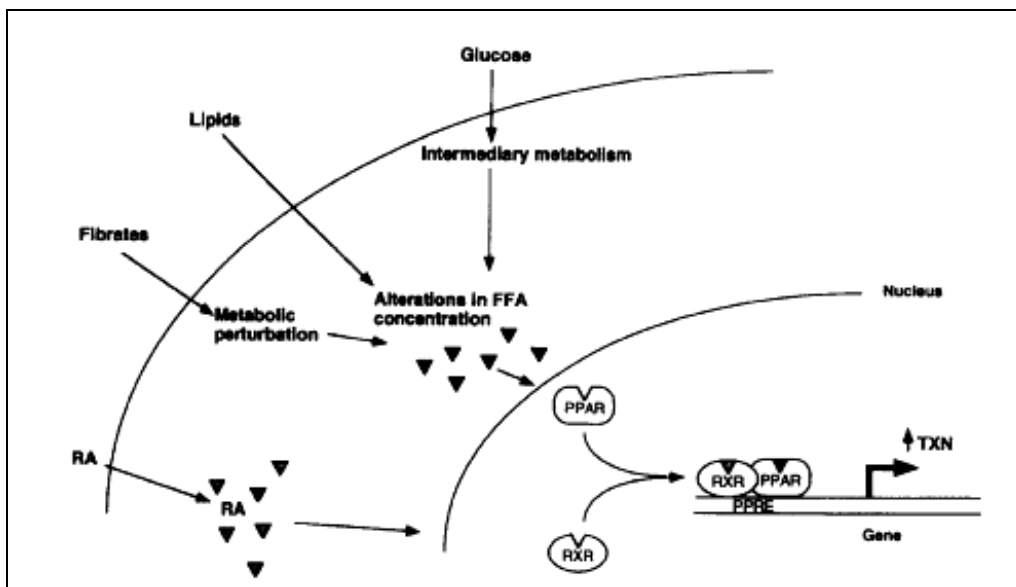
**Tabela 1 – Relação dos parasitos protozoários conhecidos por produzir mediadores inflamatórios na literatura.**

Apesar de já se ter notada a ocorrência de CLs em parasitos, estudos sobre a composição e função desta organela na inflamação ou interação com o hospedeiro são escassos, limitando-se a associar tal organela com funções energéticas, acúmulo e metabolismo de lipídios neutros.

## **1.6 Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos – PPARs**

Os Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos (PPARs), são fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares que regulam a homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e inflamação (135-138). Em termos de estrutura, podem ser incluídos como membros da subfamília de receptores que incluem o da Tireoide, do Ácido Retinóico e o da Vitamina D3. Três proteínas, codificadas por genes distintos, têm sido identificadas: PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta$  e PPAR- $\gamma$ , que controlam a expressão gênica pela ligação a elementos responsivos específicos (PPREs). Os PPREs estão localizados na região promotora e são formados por dois hexanucleotídeos com uma seqüência de consenso AGGTCAAAGGTCA, separada por um único nucleotídeo, também chamado de DR-1 e localizado na região promotora dos genes que estão sob seu controle transcricional. Em seu funcionamento, o receptor liga-se ao PPRE como um heterodímero, juntamente com um fator proteico adicional, o receptor do ácido 9-*cis* retinóico (RXR) (139) (Fig. 1.10). Sob a atuação de agonistas, a conformação do PPAR é alterada e estabilizada, criando um sítio de ligação, com posterior recrutamento de co-ativadores transcricionais, resultando em aumento na transcrição gênica.

O PPAR foi identificado na década de 90, mais especificamente em 1990 e desde então sua atuação na célula vem se tornando de grande valia para o entendimento do metabolismo de moléculas orgânicas importantes (140).



**Figura 1.9 – Esquema representativo demonstrando o funcionamento dos PPARs como fatores de transcrição de genes.** Diferentes produtos do metabolismo como glicose e lipídeos regulam o funcionamento dos PPARs que formam, junto ao receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR), um heterodímero que atuará no gene como fator transcricional. O complexo PPAR:RXR ativado liga nas sequências de ligação responsivas (PPRE), produzindo alteração na estrutura da cromatina, originando uma estrutura transcricionalmente competente e ativadora de genes da família Tiodoxina (TXN). Figura modificada de (141).

### 1.6.1 Via do PPAR- $\gamma$

O PPAR- $\gamma$ , consiste em uma das três proteínas que atuam como receptor nuclear e suas funções terão um direcionamento principalmente para a homeostase lipídica. É pertencente à família de receptores nucleares ativados por lipídeos e possui função chave na diferenciação celular, inflamação, metabolismo lipídico. O PPAR- $\gamma$  como fator transcricional, regula diretamente a expressão de vários genes, e está presente em macrófagos, células dendríticas, linfócitos B, linfócitos T, onde atuam como receptores no processo inflamatório (142, 143). De forma interessante, tem sido demonstrado o papel do PPAR- $\gamma$  como repressor de genes que participam



na produção de citocinas pró inflamatórias, o que demonstra que o papel na inflamação pode ser de diferentes formas (144).

O gene do PPAR- $\gamma$ , foi mapeado no cromossomo 3 (145), região 3p25, dando origem a três RNA mensageiros: PPAR- $\gamma$  1, PPAR- $\gamma$  2 e PPAR- $\gamma$  3, que diferem em sua extremidade 5', como consequência de diferentes promotores e ao *splicing* alternativo. O PPAR- $\gamma$  1 é codificado por oito éxons, compreendendo dois éxons  $\gamma$  1 específicos na região 5' não traduzida, A1 e A2, e seis éxons comuns aos três RNAs mensageiros. PPAR- $\gamma$  2, codificado por sete éxons, sendo o éxon B específico para este receptor, codificando 28 aminoácidos na região N-terminal, e PPAR- $\gamma$  3, que codifica a mesma proteína que PPAR- $\gamma$  1, sendo controlado por um promotor distinto, localizado na região 5', próxima a A2 (146). PPAR- $\gamma$  1 é expresso em uma ampla variedade de tecidos, incluindo coração, cólon, intestino delgado e grosso, rins, pâncreas e baço. PPAR- $\gamma$  2 é expresso no tecido adiposo e PPAR- $\gamma$  3 tem expressão restrita a macrófagos e intestino grosso (146).

O papel fundamental do PPAR- $\gamma$  na adipogênese é bem conhecido onde numerosos genes são regulados por ação do PPAR- $\gamma$ , como genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, incluindo aP2 (147), acil-CoA sintetase e lipase lipoprotéica (LPL) (141). Também controla a expressão da proteína transportadora de ácidos graxos 1 (FATP-1) e CD36 (148), ambos envolvidos na captação de lipídeos pelos adipócitos. Esses genes também apresentam elementos responsivos (PPREs) em sua região regulatória. Além da homeostase lipídica, a homeostase de outras moléculas podem estar associadas a via do PPAR- $\gamma$ . Há fortes evidências no papel dessa via por exemplo, na ação da insulina, onde quadros patológicos demonstram diferenças importantes do PPAR- $\gamma$ , o que evidencia a ação da via na homeostase da glicose em diferentes tecidos (149).

A via do PPAR- $\gamma$  pode ser modulada por ação de alguns produtos que fazem o papel de agonistas ou antagonistas. São compostos que agem em alguma etapa da via resultando em potencialização (agonista) ou bloqueio e redução de funcionalidade (antagonistas). Na literatura, muitos compostos podem agir como moduladores, alguns deles podem ser obtidos inclusive de forma natural, através de vegetais *in natura* (150). Vários moduladores têm possibilidades terapêuticas de uso e podem ser explorados no tratamento de patologias, bem como na medicina preventiva em vários países (150). Interessantemente, alguns agonistas são explorados na medicina natural, sendo utilizados de forma relacionada à cultura

popular. Na tabela abaixo, podemos identificar alguns dos importantes agonistas da via do PPAR- $\gamma$  utilizados como terapêuticos naturais.

<b>Espécies fontes de agonistas da via do PPAR-<math>\gamma</math></b>	<b>Agonista isolado</b>	<b>Objetivo Terapêutico</b>
<i>Amorpha fruticosa</i> (Fabaceae)	Amorfrutinas (151)	Hipertensão, Antidiabético (151)
<i>Cannabis</i> (Cannabaceae)	<i>sativa</i> D9-Tetrahydrocannabinol (152)	Sedativo, Analgésico, Anti-Inflamatório, Antidiabético (153)
<i>Panax ginseng</i> (Araliaceae)	Ginsenoside 20(S) - protopanaxatriol; ginsenoside Rb1 (raízes) (154)	Revigorante, Secreção de Fluidos corporais, Reestabelecimento da pulsação (150)
<i>Salvia officinalis</i> (Lamiaceae)	Carnosol; $\alpha$ -linolenic acid (155)	Antidiabético, Anti-Inflamatório (150)
<i>Astragalus membranaceus</i> Moench (Fabaceae)	Astragaloside Formononetina (156)	IV; Crescimento e Renovação Tecidual (150)

**Tabela 2 – Exemplos de agonistas da via do PPAR- $\gamma$ , espécies de extração e ação terapêutica.**

Alguns moduladores sintéticos são amplamente utilizados na pesquisa. A Rosiglitazona (BRL49653), é um potente agonista da via do PPAR- $\gamma$ , pertencente a classe dos fármacos antidiabéticos Tiazolidinedionas, juntamente com a Pioglitazona (157). É amplamente utilizada no tratamento da diabetes tipo 2, pois provoca redução dos níveis de glicose circulante e torna as células (hepática, muscular e adiposas) mais sensíveis a insulina. Atua nos receptores da insulina e também reduz a gliconeogênese hepática (157). Porém, devido aos efeitos colaterais, principalmente anormalidades cardíacas e aumento no risco de infartos, foi proibida em vários países. Seu uso em experimental *in vitro* é bastante amplo, uma vez que tais efeitos colaterais não são problemáticos.

Outro modulador importante da via do PPAR- $\gamma$  amplamente utilizado na pesquisa, é o 2-chloro-5-nitrobenzanilida (GW9662), com grande potencial inibitório,

seletivo e irreversível, sendo assim um importante antagonista de PPAR- $\gamma$  (119). Trabalhos recentes têm demonstrado que o GW9662 pode ter ação terapêutica como, por exemplo, inibindo o crescimento de células tumorais, dentre outros mecanismos, auxiliado pela ação na via de sinalização do PPAR- $\gamma$  (158).

### 1.6.2 Via do PPAR- $\gamma$ na inflamação e regulação de CLs

O importante papel do PPAR- $\gamma$  na homeostase lipídica está relacionado ao efeito da ativação desta via na formação de CLs nas células durante infecção por BCG (119, 159). Como vimos anteriormente, CLs são importantes organelas da inflamação, o que nos permite conectar a via do PPAR- $\gamma$  a importantes mecanismos do processo inflamatório. Ativado por lipídeos, o PPAR- $\gamma$  torna-se fundamental nos mecanismo das células imunitárias em mamíferos (119), participa efetivamente da regulação da organela e demonstra uma ligação entre a via do PPAR- $\gamma$  e a modulação de CLs. CLs são fonte de uma série de citocinas inflamatórias, assim como mediadores lipídicos da inflamação, como é o caso de prostaglandinas, como já vimos em tópicos anteriores. Aumento da expressão de PPAR- $\gamma$  é amplamente observado em muitos tipos de células, em diferentes tecidos, incluindo macrófagos e células dendríticas no pulmão (160-162). Além disso, as citocinas e agentes patogênicos podem regular a expressão de PPAR- $\gamma$  em células do sistema imune (163).

Estudos recentes demonstraram que, durante a infecção micobacteriana, a expressão de PPAR- $\gamma$  aumenta significativamente em macrófagos humanos e murinos, com importantes consequências para as respostas imunitárias do hospedeiro à infecção (119). A infecção de macrófagos por BCG ou por *M. tuberculosis*, aciona um aumento na expressão de PPAR- $\gamma$  em macrófagos *in vitro*, dependente do tempo de infecção (119, 164) e *in vivo* no pulmão (165). Aumento na expressão de PPAR- $\gamma$  foi evidente em 2 horas após a infecção e atingiram níveis máximos dentro de 24 h. Por outro lado, o *M. smegmatis*, uma micobactéria não patogênica, não induz a expressão de PPAR- $\gamma$  em macrófagos, sugerindo que expressão PPAR- $\gamma$  pode estar relacionada à patogênese bacteriana (119, 164). Os mecanismos envolvidos na expressão de PPAR- $\gamma$  induzidos por bactéria tem sido amplamente investigado e curiosamente, mesmo a estimulação com bactérias mortas desencadeia expressão do PPAR- $\gamma$ , como *M. tuberculosis* morto por

paraformaldeído ou até mesmo componentes da parede celular de BCG ou *M. tuberculosis*, são capazes de induzir a expressão de PPAR- $\gamma$ , sugerindo o papel de receptores de reconhecimento de padrões (PPRs) na regulação do PPAR- $\gamma$  (119, 165). A formação de macrófagos espumosos (ricos em CLs) durante a infecção por micobactérias desencadeiam uma resposta imune inata mediada por padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPs), tais como receptores TLR e receptores NOD-like (NLRs).

TLRs representam alguns dos mais importantes Receptores de Reconhecimento de Padrões (PPRs) que reconhecem produtos de micobactérias (166, 167). Reconhecimento através TLRs resulta na ativação rápida de fatores de transcrição dependentes de sinal, incluindo os membros do fator nuclear-kB (NF-kB), ativador de proteína 1 (AP1) (168, 169). A ativação de múltiplos TLRs, incluindo TLR2, TLR4, e TLR9, bem como TLR6 e TLR1, quando dimerizado com TLR2, contribui para uma resposta inata e eficiente contra a infecção bacteriana, resultando na produção de citocinas (166, 167, 170-172). O papel dos TLR na regulação da expressão de PPAR- $\gamma$  é importante e já foi demonstrada (173).

O PPAR- $\gamma$  regula positivamente a produção de PGE<sub>2</sub> em macrófagos infectados com BCG (119), em um processo potencializado por agonistas do PPAR- $\gamma$  e inibido pelos antagonistas. Deste modo, a ativação de PPAR- $\gamma$  levou a um aumento da expressão de COX-2 (164) e PGE<sub>2</sub> (174) em macrófagos infectados por *M. tuberculosis*. A PGE<sub>2</sub> é um modulador imune potente que regula negativamente respostas Th1 e atividade bactericida para organismos intracelulares (111, 175). A produção de óxido nítrico (NO) e outros intermediários reativos de nitrogênio por células imunitárias inatas é considerado um mecanismo eficaz de defesa contra agentes patogênicos. Um papel de PPAR- $\gamma$  na modulação da produção de NO durante a infecção por *M. tuberculosis* demonstrou que o silenciamento (knockdown) de PPAR- $\gamma$  em macrófagos infectados aumentou significativamente expressão de iNOS e a produção de NO nestas células, enquanto a expressão da arginase I foi inibida. Isso sugeriu um papel endógeno do PPAR- $\gamma$  na modulação negativa da produção de NO durante a infecção (174).

A expressão elevada de PPAR- $\gamma$  em macrófagos humanos é um dos marcadores biológicos de ativação mediada por IL-4 / IL-13. Por outro lado, a inibição de PPAR- $\gamma$  em macrófagos ativados, leva a uma resposta inflamatória pulmonar por Th1, que favorecem a morte do patógeno intracelular (176). A expressão de PPAR- $\gamma$  é elevada em macrófagos alveolares humanos, que são

caracterizadas como macrófagos ativados (164). Silenciamento do PPAR- $\gamma$  em macrófagos levou a um aumento de TNF- $\alpha$  e diminuição de IL-10 em macrófagos infectados com tuberculose (164, 174), indicando que a ativação de PPAR- $\gamma$  levou a um aumento de IL-10 / TNF, relação criada por um ambiente anti-inflamatório, que acaba sendo favorável para o crescimento de agentes patogênicos.

Inúmeros são os exemplos que demonstram como o PPAR- $\gamma$  participa direta e indiretamente na regulação de CLs e conseqüentemente do processo inflamatório em mamíferos, demonstrando a importância do estudo do receptor em processos patológicos e inflamatórios, podendo ser um efetivo alvo para terapêutica celular. Observando a grande quantidade de funções com as quais os CLs estão envolvidos em células de mamíferos, bem como sua presença em parasitos protozoários, investigou-se a ocorrência e função dessa organela em *T. cruzi*. Tentamos entender a dinâmica dos CLs no citoplasma de diferentes formas do parasito, além de avaliar o papel dos CLs quando os parasitos foram estimulados com ácido araquidônico e ácido oleico, e na interação com macrófagos, bem como o possível papel desta organela na síntese de mediadores inflamatórios lipídicos - PGE<sub>2</sub>. Por fim, avaliamos se ocorre expressão de PPAR- $\gamma$  no *T. cruzi*, e o possível papel desta via sobre o metabolismo lipídico do parasito.

Baseado em evidências e dados na literatura, nós hipotenzamos que o parasito *T. cruzi* possui os CLs e que essas organelas podem participar de processos importantes do metabolismo do parasito. Imaginamos também que de alguma forma essa organela pode ajudar o parasito no mecanismo de infecção ao hospedeiro, e conseqüente evasão do parasito ao sistema imunológico do hospedeiro na doença de Chagas.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar o papel dos CLs como organela que incorpora o AA absorvido do meio e se produz a PGE<sub>2</sub>. Analisar também se a via do PPAR- $\gamma$ , comum em mamíferos, estaria presente no parasito.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Identificar CLs nas formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, com o uso de MET e marcadores de lipídios (Nile Red, BODIPY, Oil Red O e tetróxido de ósmio) durante a infecção experimental *in vivo* e após estímulo *in vitro* com ácido araquidônico (AA).
- Analisar o papel de CLs como sítios de síntese de mediadores lipídicos, como PGE<sub>2</sub> no patógeno por técnica de imunofluorescência - EicosaCell; e da análise da presença de enzimas formadoras de eicosanoides, como COX-2 e PGE sintetase, no parasito por Western Blotting.
- Investigar a produção de PGE<sub>2</sub> e derivados de CLs de *T. cruzi* e seu papel na interação patógeno-célula hospedeira após estímulos dos parasitos com AA e AO.
- Investigar o envolvimento da via de sinalização do PPAR- $\gamma$  no parasito.

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizadas ratas da linhagem Holtzman da colônia do centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG), apresentando 26 a 29 dias de idade e 60 a 75 g de peso corporal. Também foram utilizados camundongos C57BL/6 do centro de bioterismo da FIOCRUZ/IOC com 56 dias de idade e peso corporal entre 20 e 25 g. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ # P-0069).

#### **3.2 Obtenção de Tripomastigotas – Indução da metaciclogênese**

Cultura do *T. cruzi* (cepa DM28c) foi obtida e mantida em laboratório como descrito em (177). As culturas de *T. cruzi* foram crescidas e mantidas em Meio de Infusão de Coração e Cérebro suíno (Brain Heart Infusion Medium – BHI) (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) à 27°C em uma estufa B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) por 7 dias, contendo aproximadamente 100% de epimastigotas. No final da fase exponencial de crescimento, os parasitos foram centrifugados à 2200 rpm (centrífuga excelsa® baby I 206 BL – FANEM) por 15 minutos à 10°C, re-suspendidos em meio que simula a Urina Artificial de Triatomínio (TAU) (NaCl 190 mM, tampão fosfato 8 Mm pH 6,0, KCl 17 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM), e incubados por 2 h à temperatura ambiente. Os parasitos foram diluídos para concentração final de 5 x 10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> em TAU suplementado com bicarbonato de sódio 1,4%, 2,5% (v/v), 500 unidades de penicilina (mL<sup>-1</sup>), 10 mM de L-prolina (meio TAU-P) e incubados à 27°C em garrafas de cultura na incubadora B.O.D por 5 dias, obtendo assim os tripomastigotas metacíclicos (178).

### **3.3 Infecção de ratas Holtzman *in vivo***

Ratas Holtzman (obtidas por colaboração com a UFMG com 26 a 29 dias de idade) foram infectadas com  $3 \times 10^5$  células da cepa Y de *T. cruzi*, inoculadas na cavidade peritoneal, conforme estudos anteriores (179). O controle da infecção foi realizado através de pesquisa de tripomastigotas vivos em gota de sangue espessa, obtido por secção da extremidade da cauda dos animais no 12º dia após a inoculação do parasito. Posteriormente os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e fragmentos do coração (átrio) foram processados para análises histopatológicas e ultraestruturais como descrito abaixo.

### **3.4 Infecção de macrófagos *in vitro***

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram plaqueados sobre lamínula ( $1 \times 10^6$ /poço) em placas de 24 poços e incubados com meio RPMI, suplementado com soro fetal bovino a 2%, L-glutamina a 0,2 mM e penicilina e estreptomicina a 2% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Os macrófagos foram mantidos a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> pelo período de 16h. Posteriormente, os macrófagos foram infectados com a cepa dm28c do parasito (MOI 5:1) durante 1 e 24 h (180). Para análise de microscopia de campo claro dos CLs dos parasitos em contato com macrófagos, 1h após a interação, foram retirados 200 µL de meio de cultura de cada poço contendo parasitos não internalizados e foram confeccionados os citoesfregaços (Cytospin™ Cytocentrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc.) a 550 rpm por 5 min, em lâmina de vidro para contagem de CLs nos parasitos que interagiram com os macrófagos. Como controle, foram utilizados citoesfregaços contendo parasitos que não entraram em contato com os macrófagos.

Para análise de MET dos CLs dos amastigotas dentro dos macrófagos, 24 h após a interação, os parasitos não internalizados foram retirados pela lavagem com PBS e as células foram incubadas por mais 24 h e posteriormente processadas para MET, conforme descrito no item 3.5. Assim foi possível observar os amastigotas dentro dos macrófagos. Para utilização como controle positivo em Western Blotting, macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram aderidos em placa de 6 poços por 2 h à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> atmosférico e lavados 2 x com PBS para remover



as células não aderidas. Os macrófagos foram infectados com BCG (vacina de *Mycobacterium bovis* BCG (cepa Moreau), obtido na Fundação Athaulpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brasil), na proporção de 1:1 (MOI) e incubados por 24 h à 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> com meio RPMI 1640 contendo 2% de soro fetal bovino como descrito em (111).

### 3.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Para estudo ultraestrutural dos macrófagos infectados *in vivo* foram retirados fragmentos do apêndice auricular do átrio esquerdo dos animais infectados e controles. Todos os procedimentos para MET foram realizados de acordo com trabalhos prévios do grupo (181-184). O material foi fixado em solução de Karnovsky modificada (185), constituída de paraformaldeído e glutaraldeído a 1% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3, durante 16h, a 4°C. Em seguida, as amostras foram lavadas no mesmo tampão, a 4°C por cerca de 30 min. Posteriormente, os fragmentos foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1% reduzido por ferrocianeto de potássio a 1,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3. O material foi então desidratado em etanol e acetona e processado rotineiramente para inclusão em resina Epon (Eponate 12 Resin; Ted Pella, Redding, CA, USA). Os cortes semifinos obtidos foram corados com azul de toluidina/borato de sódio para a seleção de áreas adequadas à ultramicrotomia, realizada em ultramicrótomo (Leica, Baden-Württemberg, Alemanha). Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila a 3% e citrato de chumbo a 1% e analisados em microscópio eletrônico de transmissão (CM 10; Philips ou Tecnai-G2-20-FEI 2006, Eindhoven, Holanda) a 60 kV no Centro de Microscopia da UFMG.

Para estudo ultraestrutural dos parasitos no experimento *in vitro*, os macrófagos infectados foram fixados ainda em suspensão com o mesmo fixador usado acima durante 1 h e lavados em tampão fosfato. Os sedimentos foram posteriormente incluídos em ágar a 2% e processados rotineiramente para MET.

### 3.6 Análises morfométricas ultraestruturais

Para análises morfométricas dos CLs dos parasitos, eletromicrografias contendo os parasitos no interior de macrófagos, foram obtidas a partir de MET dos experimentos *in vivo* e *in vitro*. Foi utilizado o programa ImageJ® (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) para a realização das medidas comparativas de área e densidade. Os CLs foram definidos conforme densidade: Fortemente elétron-denso (FED), Elétron-denso (ED) e Elétron-lúcido (EL) de acordo com escalas de cinza obtidas no programa citado acima (0-85, 86-170 e 171-255 respectivamente), onde o 0 é o preto absoluto e o 255 o branco absoluto.

Foram analisadas um total de 36 micrografias sendo 12 do experimento *in vivo* e 24 do experimento *in vitro*. Dessas micrografias foram analisados 20 parasitos *in vivo* e 25 *in vitro* apresentando média aproximadamente de 33 e 89 CLs, respectivamente. As comparações foram feitas com o auxílio do programa estatístico GraphPad Software (La Jolla, CA, USA).

### 3.7 Estímulo de tripomastigotas com AA e AO

Foram utilizados tripomastigotas obtidos da metaciclologênese descrita acima em 3.2. Em placa de 24 poços, foram feitas triplicatas de cada grupo. Cada poço recebeu 2 mL da solução contendo cerca de  $3,4 \times 10^6$  parasitos em meio de cultura (TAUP) como descrito em 3.2. Foram utilizados 2 tempos diferentes (1 h e 24 h), duas doses de ácido araquidônico (1,5  $\mu\text{M}$  e 7,5  $\mu\text{M}$ ) e duas de ácido oleico (1  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ ) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). O grupo controle recebeu veículo (etanol a 0,1%). Após os diferentes tempos de incubação foi realizada a análise de viabilidade celular com azul de tripan onde observou-se mais de 95% de células vivas. Posteriormente, foram confeccionados citoesfregaços contendo cerca de  $1 \times 10^5$  parasitos/lâmina em Cytospin (550 rpm por 5 min).

### 3.8 Identificação de CLs

Para análise dos CLs nos parasitos em presença de macrófagos, os CLs foram marcados com tetróxido de ósmio. As lamínulas contendo parasitos e macrófagos infectados foram fixadas em formalina a 3,7%, lavadas em tampão cacodilato (0,1M) e fixadas em tetróxido de ósmio a 1,5% por 5 min. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas em água destilada, tratadas com tetróxido de ósmio a 1,5% reduzido por tiocarbohidrazida a 1% por 5 min, lavadas em água destilada e montadas com o meio aqua polymount (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Nas análises para a quantificação dos CLs nos tripomastigotas puros, seguiu-se os passos acima, com exceção no preparo da lâmina que se deu por citocentrifugação em Cytospin (550 rpm por 5 min).

Para marcação com BODIPY e Nile Red, suspensão celular do parasito foi incubada com 1  $\mu$ M de BODIPY® 493\503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3,4-diaza-s-indaceno) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) ou Nile Red (9-dietilamino-5H-benzo[alfa]phenoxazina-5-1) (Sigma Aldrich) (de solução estoque 1\10,000, 0,1 mg/mL em acetona) por 1 h a 37°C (186). Posteriormente, as células foram centrifugadas 1800 rpm por 5 min (centrífuga excelsa® baby I 206 BL – FANEM) para formação do e re-suspendidas em tampão fosfato à 0,1 M. Assim foram confeccionados os citoesfregaços (Cytospin à 550 rpm por 5 min) dos parasitos estimulados com os ácidos graxos (AA). Na marcação com Oil Red O (1-([4-(xylylazo)xylyl]azo)-2-naphtol) (Sigma Aldrich), as lâminas confeccionadas como descrito acima devidamente fixadas, receberam propileno glicol 100% por 5 min e depois foram incubadas com solução de Oil Red O 0,5% por 10 min à 60°C. Posteriormente, as lâminas foram montadas com o meio aqua polymount e analisadas em microscopia de luz (Microscópio BX 51 com câmera digital XC-50 em objetiva 100x; Olympus, Tokyo, Japão).

### 3.9 Quantificação de CLs

Para quantificação dos CLs nos tripomastigotas metacíclicos, os parasitos foram cultivados nas placas de 24 poços, divididos em grupos controle ou estimulados pelos tempos de 1 e 24 h, tratados ou não com AA e AO (doses 1 e 5  $\mu$ M de AO ou 1,5 e 7,5 de AA). Foram confeccionados citoesfregaços em lâminas de

vidro, que foram posteriormente coradas com tetróxido de ósmio como descrito acima. As análises para quantificação dos CLs foram feitas em microscópio de luz (objetiva de 100X). A quantificação dos CLs foi realizada fazendo-se a contagem de 50 células consecutivas por lâmina.

### **3.10 Dosagem de PGE<sub>2</sub>**

Os sobrenadantes das culturas de parasitos controles e estimulados com AA e AO no tempo de 1 e 24 h, foram coletados para análise dos níveis de PGE<sub>2</sub>. A dosagem de PGE<sub>2</sub> foi realizada por ensaio imunoenzimático (EIA) com o kit Prostaglandin E<sub>2</sub> EIA – Monoclonal, segundo instruções do fabricante (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Foram utilizadas placas pré – revestidas do Kit citado, com IgG de cabra anti-camundongo. Primeiramente, as placas foram lavadas 1x com tampão de lavagem. A curva padrão foi feita utilizando alíquota de PGE<sub>2</sub> em diluições seriadas, em tampão EIA (diluições de 1 a 0,016 ng/mL). Os poços correspondentes à amostra receberam 50 µL de sobrenadante das culturas e o controle (branco) foi utilizado 50 µL de tampão EIA. Todos os poços foram simultaneamente incubados com 50 µL de anticorpo monoclonal PGE<sub>2</sub> e 50 µL de tracer (PGE<sub>2</sub> conjugada com colinesterase), exceto no branco. A placa foi incubada pelo período de 16h à temperatura ambiente. No dia seguinte, a placa foi lavada por 5x com tampão de lavagem e adicionado o revelador ELMAN`S que é o substrato para a enzima colinesterase presente no tracer. A placa foi incubada sobre agitação por 2h. Em seguida foi realizada a leitura da placa em leitora de Elisa, utilizando o programa Soft Max Pro®.

### **3.11 Imunodeteção de PGE<sub>2</sub> nos sítios de produção (Eicosacell)**

Para realização do Eicosacell foram utilizados 4 grupos: 2 controles (etanol a 0,1%) e 2 estimulados com AA (7,5 µM correspondente à dose que mais estimulou) ambos nos tempos de 1h de estímulo. As amostras contendo os parasitos em suspensão, posteriormente foram fixadas e permeabilizadas com EDAC (N-(3-Dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidrocloreto) (Sigma-Aldrich) a 1% por 15 min e 37°C. O EDAC é utilizado para fazer uma ligação cruzada entre o grupamento

carboxil dos eicosanoides com os grupamentos amins das proteínas adjacentes. Posteriormente, foram confeccionados citoesfregaços contendo cerca de  $1 \times 10^5$  parasitos por lâmina. As lâminas foram lavadas 2 vezes por 10 min em PBS e incubadas por 1h com os anticorpos primários: anticorpo de camundongo anti-PGE<sub>2</sub> (1\100) (Cayman Chemical, Ann Arbour, MI, USA) e anticorpo de porco da índia anti-adipofilina (ADRP) murino (diluição 1:1000) (Fitzgerald – 20R – AP002, Acton, MA, USA), os quais foram diluídos em solução contendo 0,1% soro normal de burro (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA). Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes por 10 min em PBS e incubadas com os anticorpos secundários para ligação aos primários anti-PGE<sub>2</sub> e anti-ADRP [(anticorpo de cabra anti-camundongo conjugado com CY3 e anticorpo de burro anti-porco da índia conjugado com CY2) (Jackson Immuno Research Laboratories)], respectivamente, ambos na proporção de 1:1000. Como controle, foram utilizadas lâminas incubadas somente com os anticorpos secundários e incubadas com IgG<sub>1</sub>, anticorpo monoclonal controle, clone MOP 21 (Sigma Aldrich). Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes por 10 min em PBS e montadas com meio de montagem contendo o DAPI - Vectashiel® (Vector Laboratories). As células foram analisadas em microscopia de fluorescência e contraste de fase. Para co-localização, foram analisadas um total de 12 células.

### 3.12 Purificação dos CLs

As formas tripomastigotas metacíclicas do parasito foram obtidas através da metacicloogênese descrita. Os parasitos foram divididos em dois grupos, cada um contendo  $1,5 \times 10^9$  células, onde um grupo foi o controle e o outro os parasitos estimulados com AA (7,5  $\mu$ M) por período de 1h. Para a lise celular e purificação, os parasitos foram submetidos à solução de 20 nM/L Tris, 1 mM/L EDTA, 1 mM/L EGTA, 100 mM/L de tampão KCl (pH 7,4) contendo 10  $\mu$ g/mL leupeptina, 10  $\mu$ g/ mL benzamidina, 0,7  $\mu$ g/mL pepstatina, e 0,1 mM/L phenylmethylsulfonylfluoride, onde foram submetidos à cavitação em nitrogênio à 700  $\Psi$  por 5 minutos à 4°C. O homogenato obtido foi centrifugado à 1800 rpm (centrífuga excelsa® baby I 206 BL – FANEM) por 5 minutos para remover o núcleo. O sobrenadante foi posteriormente colocado em quantidades de 1,5 mL de cada vez à 0,27 M/L de tampão de sacarose, 0,135 M/L tampão de sacarose, solução TEE [25 mM/L Tris- HCl, 1 mM/L

EDTA, e 1 mM/L EGTA (pH 7,4)] e centrifugado à 35000 rpm a 4°C por 70 minutos. Os CLs foram coletados da primeira e segunda fração. Posteriormente um ensaio de atividade da lactato desidrogenase foi feito para demonstrar que as amostras estavam livres de contaminações citoplasmáticas.

### **3.13 Espectroscopia RAMAM**

Tripomastigotas ( $2 \times 10^6$  células por ml) foram estimuladas por 1h com 7,5  $\mu\text{M}$  de AA, como descrito acima e posteriormente centrifugadas a 2200 rpm (centrífuga excelsa® baby I 206 BL – FANEM). As células foram re-suspendidas em 3,7% de formalina pelo período de uma noite, novamente centrifugadas a 2200 rpm (centrífuga excelsa® baby I 206 BL – FANEM), lavadas com tampão fosfato e posteriormente analisadas em espectroscopia RAMAM sem nenhuma marcação. O espectro RAMAM foi obtido usando um espectrômetro FT-RAMAM modelo RFS 100S associado com RamanScobell (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, GE) equipado com um laser ND-YAG com linha de excitação em 1064 nm. Para a aquisição do espectro o laser foi ajustado para 500 mW (na fonte) e uma boa relação sinal/ruído foi obtido realizando 2048 varreduras na região de 3500-50  $\text{cm}^{-1}$  com uma resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ . A obtenção do espectro RAMAM foi realizada no software OPUS 6.0 (Bruker). Para analisar a presença de AA diretamente nos CLs purificados dos parasitos, com e sem o estímulo com AA, pequenas amostras dos CLs puros foram colocadas sobre janelas de  $\text{CaF}_2$  (Edmund Optics, Barrington, NJ, USA) e os dados foram obtidos a partir de utilização de um laser com força de 20mW sem nenhuma marcação. O espectro RAMAM foi obtido em um espectrômetro RAMAM Senterra (bruker) baseado em uma configuração de espalhamento de 180° e usando uma objetiva de 50x e o comprimento de onda de saída do laser com 632,8 nm para excitação. Os experimentos foram realizados no laboratório de nanoestruturas plasmônicas, espectroscopia molecular, do departamento de química da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG.

### 3.14 MALDI – Espectrometria de Massas

Todos os espectros MALDI foram obtidos a partir de um espectrômetro de massas por separação de íons e moléculas. Equipamento que trabalha com a técnica por espectrometria de massas através de “ionização por dessorção a laser assistida por matriz” (MALDI-TOF). Os experimentos foram realizados utilizando um pulso de laser de nitrogênio à 337 nm de um Shimadzu Biotech Axima Performance MALDI-TOF do departamento de física da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG. A matriz utilizada foi a alpha-cyano-4-ácido hydroxycinnamic ( $\alpha$ -CHCA) dissolvida em cetonitrila HPLC/água milli-Q (50:50 v:v) em uma concentração de cerca de  $5 \times 10^{-2}$  mol/L. As amostras de CLs puros (conforme item 3.12) foram diluídas em tampão fosfato (0,1M) e uma amostra de 10  $\mu$ L dessa solução final foi adicionada à 10  $\mu$ L da solução da matriz. Essa mistura (0,5  $\mu$ L) foi colocada em uma placa de aço inoxidável própria do equipamento, onde foi aguardada a secagem da solução. Posteriormente essa placa foi introduzida no equipamento para análise. O instrumento foi configurado em alta resolução em modo refletor de íons positivos e o espectro foi obtido de 0 para 500 m/z. A configuração experimental inclui um manipulador automático de amostras, onde 200 scans foram acumulados, cada um com 20 repetições para gerar o espectro. Os experimentos foram realizados no departamento de física da Universidade Federal de Juiz de Fora.

### 3.15 Cultura de macrófagos e infecção com BCG

Macrófagos infectados foram usados como controle positivo para análise de enzimas formadoras de eicosanoides por Western Blotting. Para infecção *in vitro*, macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram retirados e incubados em placas de cultura contendo meio RPMI 1640 estéril. As células ( $1 \times 10^6$  células) aderidas, foram mantidas em placa de 6 poços e meio RPMI 1640, por 2h a temperatura de 37°C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Os poços contendo as células foram posteriormente lavados por 2 vezes com PBS para remoção das células não aderidas na placa. Os macrófagos foram infectados com BCG [(Vacina *Mycobacterium bovis* BCG (cepa Moreau)] da Fundação Athaulpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brazil), (MOI) 1:1 e incubados por 24h à 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e meio RPMI 1640 suplementado com 2% de soro fetal bovino.

### 3.16 Western Blotting

Para detecção de proteínas importantes, lizados de macrófagos ( $1 \times 10^6$  células) e tripomastigotas ( $3 \times 10^6$  células) foram preparados e desnaturados em SDS-PAGE. As amostras foram submetidas à eletroforese em géis contendo 10% de acrilamida e posteriormente transferidas para membrana de nitrocelulose. As ligações inespecíficas (proteínas indesejadas) foram bloqueadas com solução de 5% de leite em pó desnatado diluído em TBST (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20). As membranas foram incubadas com o anticorpo policlonal anti-PGE sintetase (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) anti-ciclooxigenase-2 (COX-2) (Santa Cruz Biotechnology) e anticorpo monoclonal anti- $\beta$  actina (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA) diluídos em TBST com 1% de leite em pó desnatado. Desta forma, as proteínas de interesse presentes na membrana de nitrocelulose foram identificadas após incubação com anticorpos secundários HRP-conjugados diluídos em TBST, seguido pela detecção de complexos antígeno-anticorpo por sinal quimioluminescente gerado pela reação do HRP do anticorpo secundário com o ECL (Healthcare, Fairfield, CT, USA, ECL™ Prime Western Blotting System, RPN2232). As análises foram realizadas utilizando parâmetros de densidade de sinal e tamanho das bandas no filme fotográfico.

### 3.17 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e analisados segundo o teste de ANOVA seguido pelo *teste t de Student*, com nível de significância  $p < 0,05$ . Cada experimento foi realizado em triplicata, sendo repetido por pelo menos 2 vezes.



## 4 Resultados

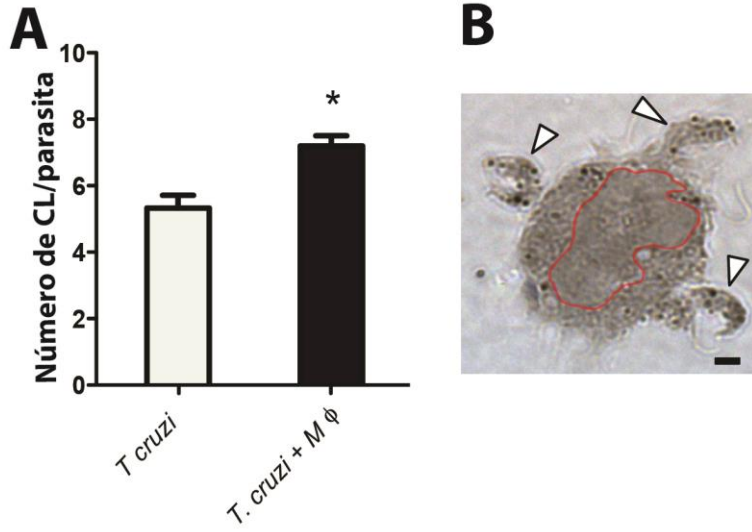
### 4.1 CLs são formados no parasito em resposta à interação com o hospedeiro

CLs são notavelmente produzidos nas células hospedeiras, principalmente em macrófagos, na resposta à infecção pelo *T. cruzi* (54, 106, 187, 188). Nós questionamos se CLs poderiam estar sendo formados no citoplasma do parasito em resposta à interação com essas células inflamatórias do hospedeiro mamífero. Formas tripomastigotas metacíclicas do parasito, foram cultivadas com macrófagos peritoneais por 1 h (Fig 4.1B), e mostraram um aumento significativo do número de CLs quando comparadas com o parasito cultivado sem as células hospedeiras (Fig 4.1A). Isso sugere que o contato das formas infectantes do *T. cruzi* com as células inflamatórias do hospedeiro, pode modular a formação de CLs no parasito.

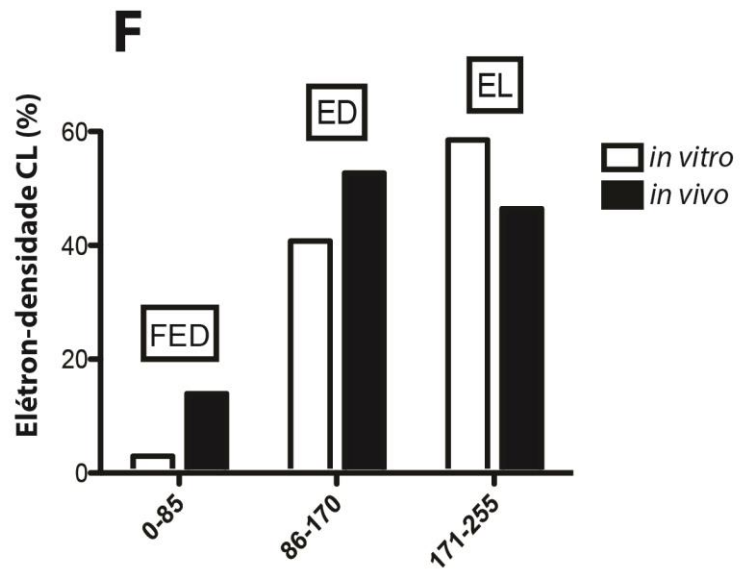
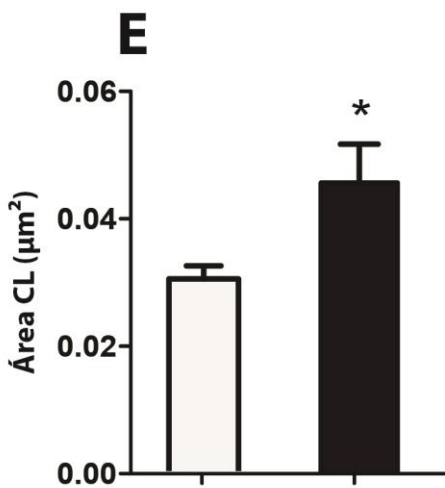
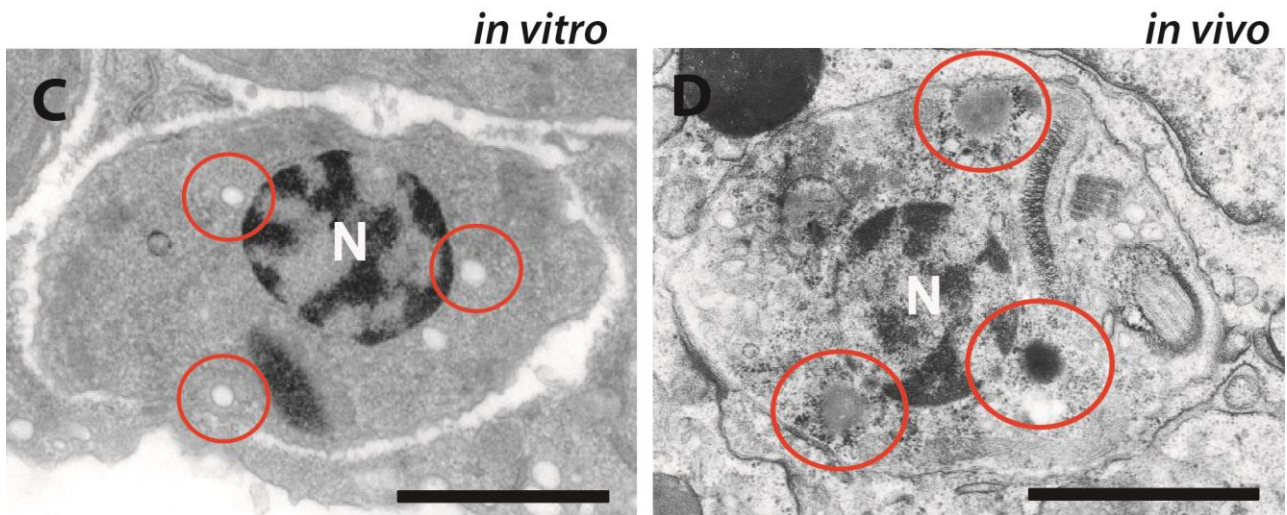
O *T. cruzi* cresce e se reproduz dentro das células hospedeiras, como formas intracelulares denominadas amastigotas. Sendo assim, nós investigamos a ultraestrutura de CLs nessas formas intracelulares do parasito por MET em duas condições: amastigotas em macrófagos infectados por 24 h *in vitro* e amastigotas em macrófagos inflamatórios de tecido cardíaco após 12 dias de infecção aguda *in vivo*. Esses tempos de infecção utilizados são os determinados para divisão consistente dos amastigotas no interior das células infectadas do hospedeiro nas condições *in vitro* e *in vivo*. Além disso, o pico do parasitismo no tecido cardíaco pelo *T. cruzi*, alvo importante na doença de Chagas, é observado no décimo segundo dia de infecção aguda, seguida de um elevado número de macrófagos ativados que se infiltram no tecido (181). Os CLs nos amastigotas mostraram-se arredondados, com ausência da bicamada lipídica típica de organelas membranosas observadas em MET e com diferentes elétrons-densidades (Fig. 4.1C, D). Curiosamente, os CLs formados nos amastigotas *in vivo* eram maiores se comparados aos CLs formados nos amastigotas *in vitro* (Fig. 4.1C-E). Uma vez que os CLs formados dentro das células hospedeiras alteram-se em densidade de acordo com o processo inflamatório (189), nós analisamos posteriormente os aspectos de elétrons-densidade dos CLs dos amastigotas. Baseado em estudos prévios do grupo (189-191) e usando um software para analisar variação nas elétrons-densidades dos CLs (190), classificamos os CLs em 3 tipos, fortemente elétrons-denso (SED), elétrons-denso (ED) ou elétrons-lúcido (EL).

Análises quantitativas, por MET, revelaram que além de se mostrar significativamente maiores (Fig. 4.1E), os CLs dos amastigotas em macrófagos cardíacos (infecção *in vivo*) foram mais elétron-densos, com elevados números de CLs SED e ED se comparados aos CLs dos parasitos dos macrófagos peritoneais (infecção *in vitro*) (Fig. 4.1F; compare Fig. 4.1C e 4.1D). Todos esses resultados mostram que os CLs do parasito não são organelas inertes e puramente de armazenamento de moléculas, mas sim organelas dinâmicas, capazes de responder à interação com o hospedeiro e a eventos inflamatórios.

## CL em tripomastigotas



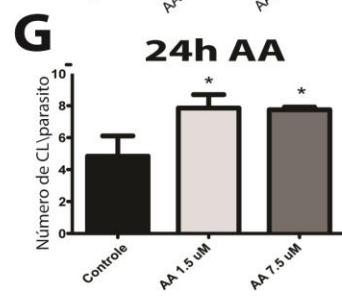
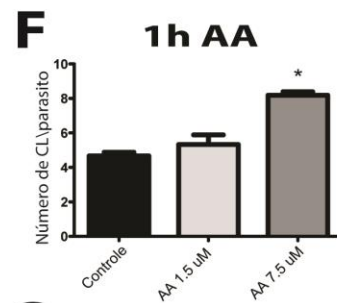
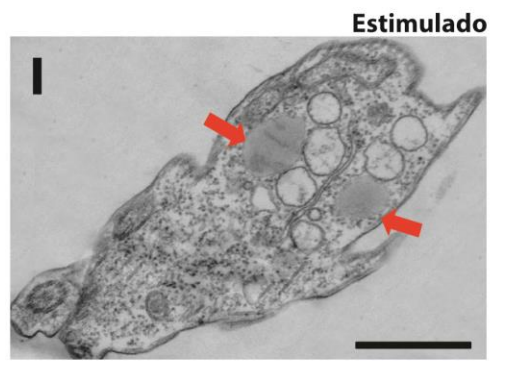
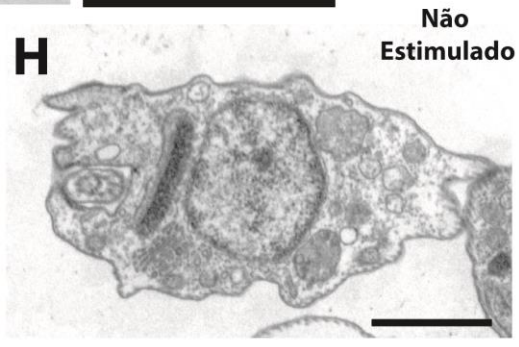
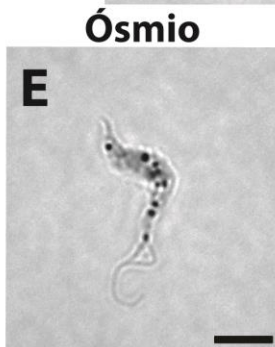
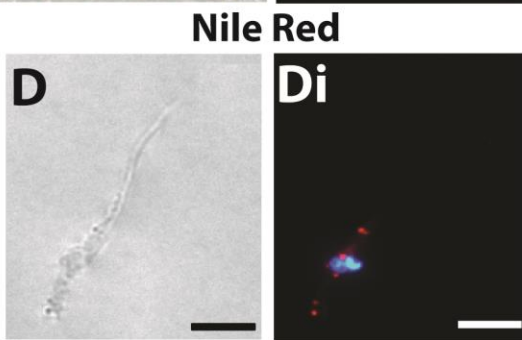
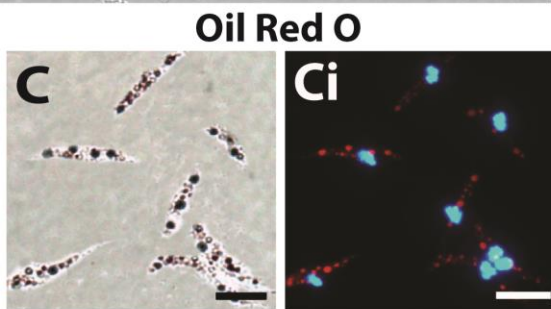
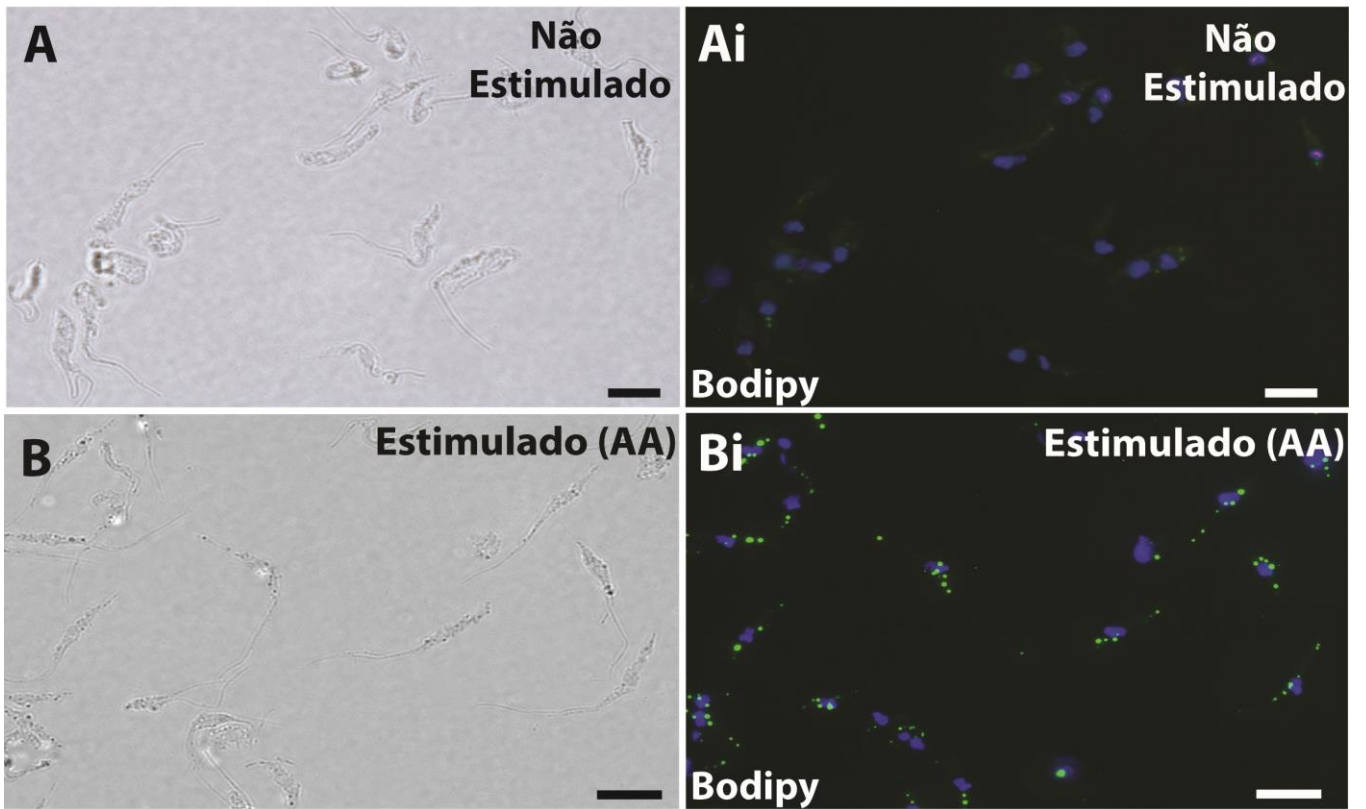
## CL em amastigotas



**Fig. 4.1 Corpúsculos Lipídicos (CLs) de *Trypanosoma cruzi* exibem variação no número, tamanho e elétron-densidade em resposta à interação com células hospedeiras.** (A) Tripomastigotas cultivados com macrófagos peritoneais demonstraram aumentado número de CLs citosólicos se comparado com parasitos cultivados sem os macrófagos, após 1 h de interação. (B) nesse momento, vários tripomastigotas (setas) podem ser vistos em contato com a superfície dos macrófagos. O núcleo do macrófago foi circundado em vermelho. (C, D) MET de *T. cruzi* amastigotas dentro de macrófagos peritoneais (infecção *in vitro* após 24h) (C) e de tecido cardíaco (infecção *in vivo* após 12 dias) (D). CLs de amastigotas estão indicados (círculos). (E) O tamanho dos CLs é significativamente maior em amastigotas procedentes de infecção *in vivo* (barra preta) se comparado com os CLs de amastigotas da infecção *in vitro* (barra branca). (F) CLs de amastigotas em macrófagos do tecido cardíaco são mais elétron-densos se comparados com os CLs de macrófagos peritoneais. Para estudos quantitativos por MET, macrófagos peritoneais e de tecido cardíaco foram processados conforme (192). Um total de 36 eletromicrografias, 50 parasitos e 125 CLs foram analisados. CLs foram classificados como fortemente elétron-denso (FED) elétron-denso (ED) e elétron-lúcido (EL) através de medições de densidade realizadas em software ImageJ® conforme descrito em material e métodos. Escala da barra, 10  $\mu\text{m}$  (B); 5  $\mu\text{m}$  (C, D). \*  $P < 0.05$ .

## **4.2 O ácido araquidônico (AA) é incorporado em CLs e induz formação de CLs em formas infectantes de *T. cruzi*.**

Estudos anteriores, demonstraram que AA é um potente estímulo para a formação de CLs em células de mamíferos (97) e que essas organelas incorporam o AA e principalmente fosfolipídios esterificados (97, 110, 193). Assim, o efeito de AA na formação de CLs no parasito foi investigada. A visualização de CLs foi realizada utilizando diferentes técnicas de marcação e coloração de CLs como: tetróxido de ósmio, que marca fosfolipídios e três sondas fluorescentes (BODIPY, Oil Red O e Nile Red), que são mais específicos para lipídeos neutros (96, 194). Todos os métodos demonstraram um aumento dependente da dose de CLs em parasitos tripomastigotas estimulados com AA se comparados aos controles não estimulados (recebendo o veículo de diluição do AA) após 1 h ou 24 h (Fig. 4.2A-G). A formação de CLs em tripomastigotas também foi confirmada por MET, considerando a morfologia da organela, com ausência de bicamada e formato arredondado no citoplasma (Fig. 4.2I).



**Fig. 4.2 Corpúsculos Lipídicos (CLs) são formados em tripomastigotas em resposta ao estímulo com ácido araquidônico (AA).** Tripomastigotas metacíclicos foram marcados com BODIPY (A, Ai, B, Bi), Oil Red O (C, Ci), Nile Red (D, Di) ou tetróxido de ósmio (E) para detecção dos CLs. As imagens A e Ai; B e Bi; C e Ci; D e Di representam campos idênticos de tripomastigotas visto em contraste de fase e microscopia de fluorescência após 1 h de incubação com veículo (A, Ai) ou AA (B-D). Note em (C) que na marcação com Oil Red O possível visualizarmos os CLs em contraste de Fase e microscopia de fluorescência. Em (E), marcação com ósmio é observada em microscopia de campo claro. (F, G) Número de CLs em tripomastigotas após estímulo com AA exógeno por 1 h (F) ou 24 h (G). As barras representam a média  $\pm$  EPM de CLs por parasito de 50 parasitos consecutivamente contados em pelo menos 4 campos independentes. O \*,  $P < 0.05$  entre os grupos. As células foram enumeradas após coloração com tetróxido de ósmio. Em (I), um tripomastigota, observado por MET, mostrando típica monocamada fosfolipídica ao redor dos CLs no citoplasma (setas). Em (H) um epimastigota sem a presença de CLs no citoplasma. Barra de escala, 5  $\mu$ m (A-E); 1  $\mu$ m (H).

### 4.3 O AA é incorporado nos CLs do parasito

Para explorar as propriedades moleculares dos lipídios no parasito, nós usamos posteriormente a espectroscopia RAMAM. Essa técnica fornece informações sobre a estrutura dos componentes químicos presentes nas amostras biológicas, com as vantagens de um preparo mínimo das amostras, sem a necessidade de marcações e livre da interferência da água (195). Os resultados foram demonstrados pelo espectro RAMAM, onde a intensidade dos sinais é proporcionalmente relativa à concentração do composto procurado (195). A Figura 4.3 mostra o espectro RAMAM de AA puro, de parasitos controles e parasitos estimulados. O espectro das células estimuladas diferem do espectro das células controles por um aumento relativo da intensidade nas bandas em 3015 e 2929  $\text{cm}^{-1}$ , que são características do espectro de AA (196). A banda exibida em 3015  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde às caudas =C-H, indicam auto teor de lipídeos insaturados nas células estimuladas (Fig. 4.3). Essa banda é mais proeminente em AA se comparado com outros ácidos graxos (196). O AA também possui uma ampla e intensa banda por volta de 2920  $\text{cm}^{-1}$ , devido às regiões C-H<sub>2</sub> na vibração. O aumento observado na intensidade de 2929  $\text{cm}^{-1}$  em células estimuladas pode ser devido à presença de alongamentos que determinam bandas 2920  $\text{cm}^{-1}$  o que indica o AA. Além disso, o aumento na intensidade das bandas 3015 e 2929  $\text{cm}^{-1}$  são indicativos da incorporação do AA. Nossos resultados mostram que o AA é incorporado nos parasitos, e induz formação de CLs, organelas amplamente envolvidas no metabolismo do AA.

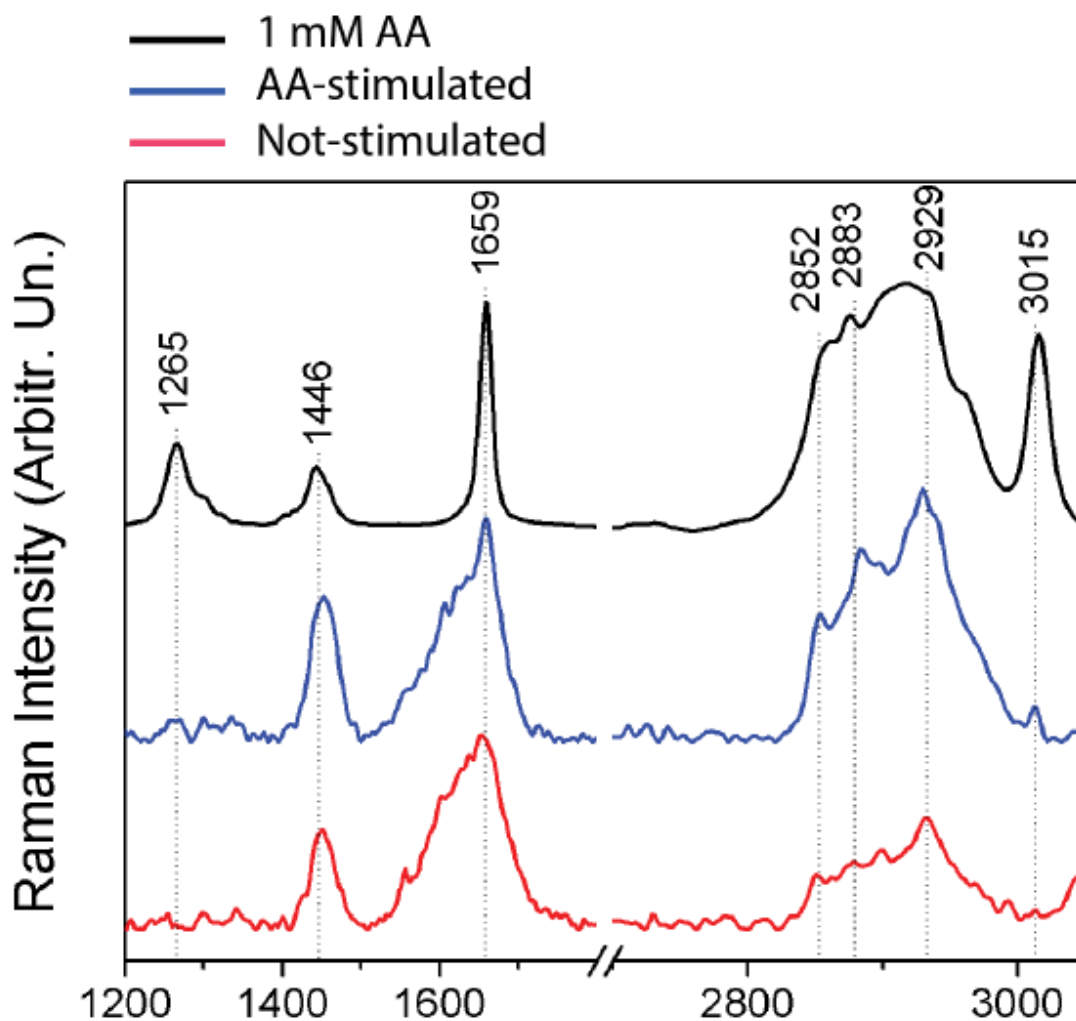
O espectro RAMAM obtido do parasito inteiro tem também contribuição para análise de diferentes tipos de lipídios e outras biomoléculas como, por exemplo, proteínas e DNA, o que pode interferir na análise precisa dos lipídeos, afetando assim o espectro do AA. Para sanar esse problema, nós usamos CLs isolados por fracionamento celular, puros, de parasitos controles e estimulados com AA e submetemos essa fração pura de CLs ao RAMAM. Essa técnica tem sido bastante usada e se mostrado eficiente no estudo dos CLs em processos patológicos e fisiológicos. O resultado está demonstrado na Fig. 4.4. Utilizando essa abordagem, foi possível determinar que o CL foi um importante contribuinte para a presença do AA no parasito de forma geral, como visto anteriormente. Como mostrado na Fig. 4.4, o espectro de AA na solução é similar ao conhecido na literatura (196). Este tem a banda mais intensa à 1265  $\text{cm}^{-1}$  (ligações =C-H), 1446  $\text{cm}^{-1}$  (ligações C-H) e 1659  $\text{cm}^{-1}$ . O espectro da fração de CLs não tratados com AA não mostrou nenhum espectro



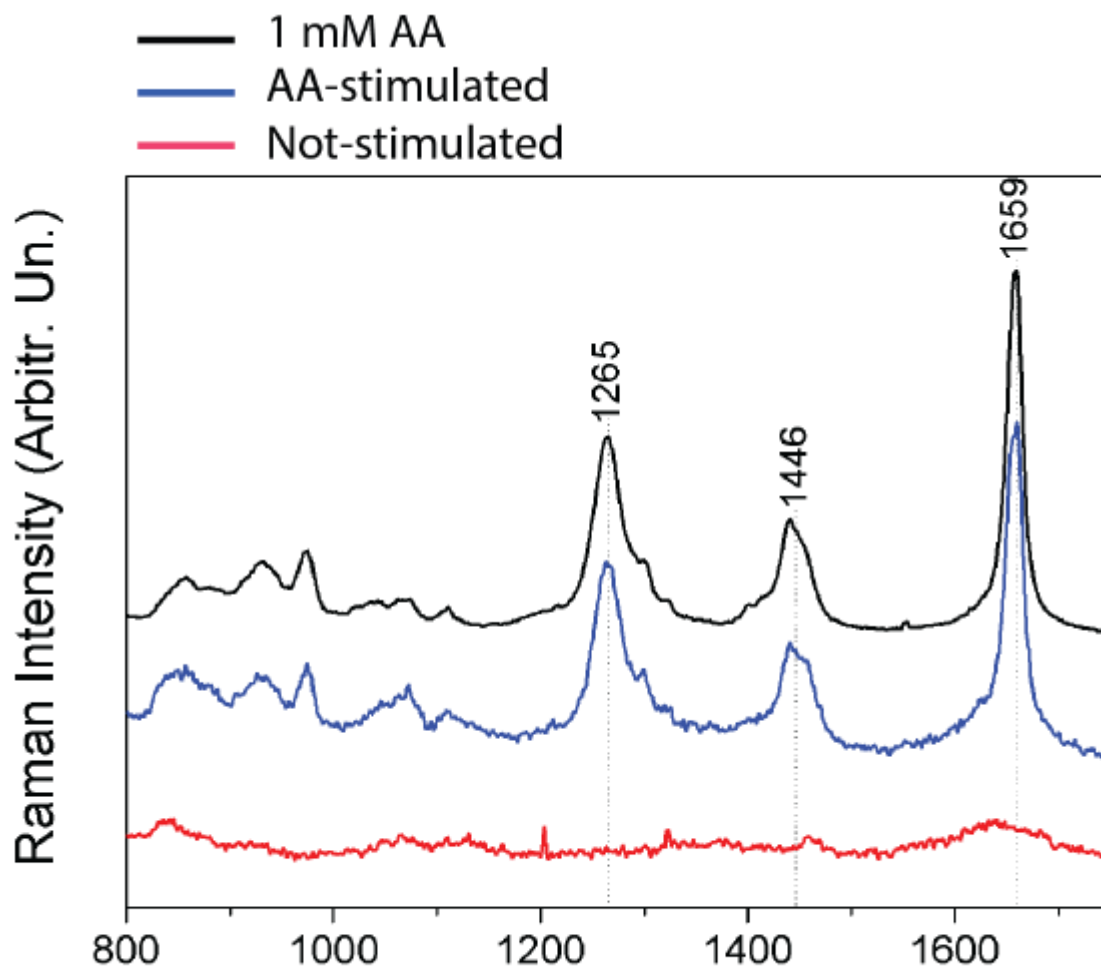
característico de AA. Entretanto o espectro da fração de CLs obtidos de parasitos tratados com AA mostrou o mesmo perfil de espectro que o da solução pura de AA, o que demonstra a presença de AA nos exemplares (Fig. 4.4).

A constatação do aumento de AA nas frações de CLs purificados de parasitos estimulados foi posteriormente confirmada por espectrometria de massas MALDI-TOF (Fig. 4.5). Em primeiro, um espectro de solução pura de AA ( $m/z$  304.24) foi obtida como controle positivo (Fig. 4.5A). Em segundo, essa técnica identificou o pico  $m/z$  304.24 relacionado ao AA em ambas as amostras, parasitos não estimulados e estimulados com AA, a produção relacionada a esse pico foi calculada dividindo a área do pico obtida pela área total correspondente ao espectro do AA puro. Assim o pico  $m/z$  304.24 do grupo não estimulado e do grupo dos estimulados com AA mostraram uma produção relativa de 0.0035 e 0.018, o que é 5x maior no grupo estimulado (Fig. 4.5B, linha preta) em comparação ao grupo dos não estimulados (Fig. 4.5B, linha vermelha).

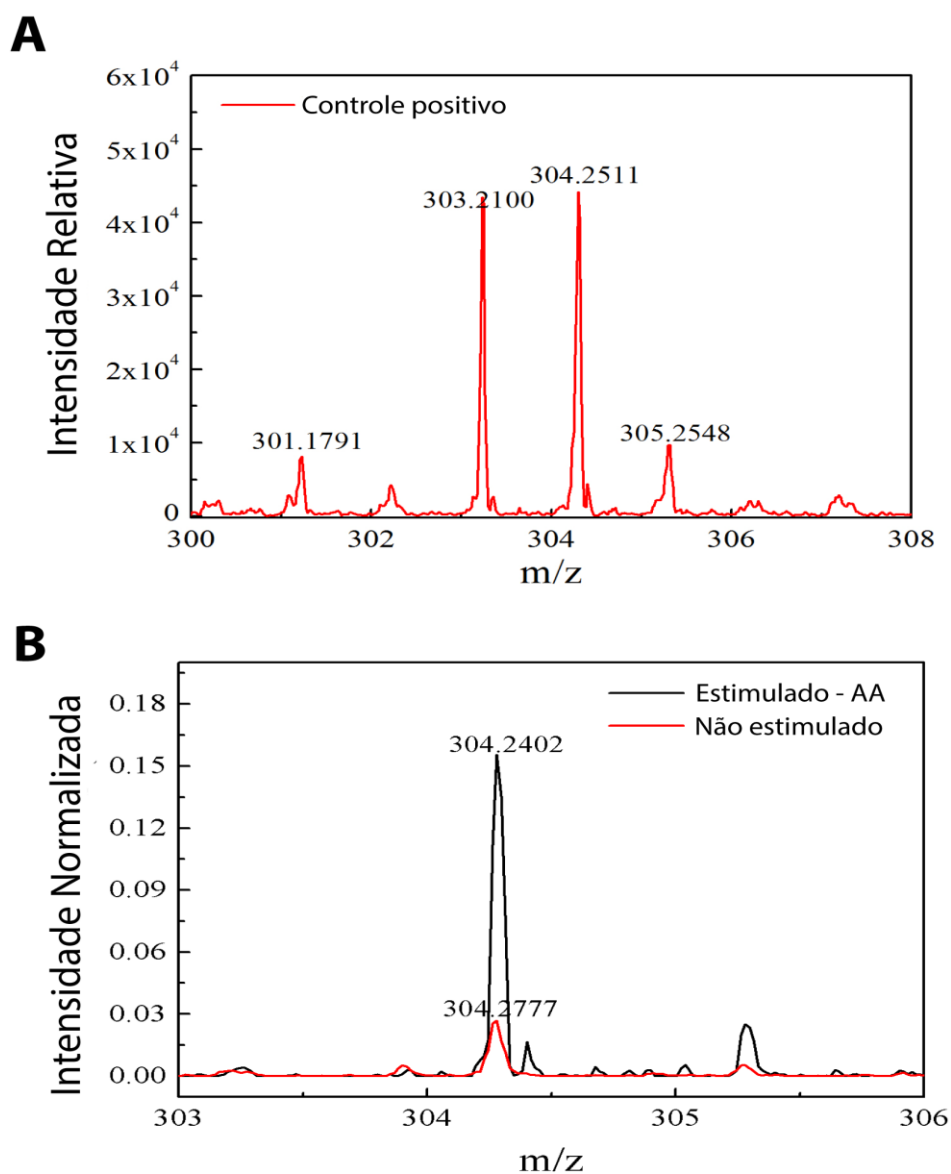
Dessa forma, utilizando diferentes abordagens, nossos resultados demonstram consistentemente que CLs são sítios citoplasmáticos de acúmulo de AA no parasito *T. cruzi*.



**Fig. 4.3 Espectroscopia RAMAM revela alto conteúdo de ácidos graxos insaturados e ácido araquidônico (AA) em parasitos estimulados quando comparado aos não estimulados.** Espectro RAMAM de AA (preto), parasitos estimulados com AA (azul) e parasitos não estimulados (vermelho). Os parasitos foram estimulados ou não por 1 h com 7,5  $\mu\text{M}$  de AA, fixados e analisados por espectroscopia RAMAM sem nenhuma marcação. Os picos do espectro representam pontos típicos do espectro do AA (1446, 1659, 2929, 3015).



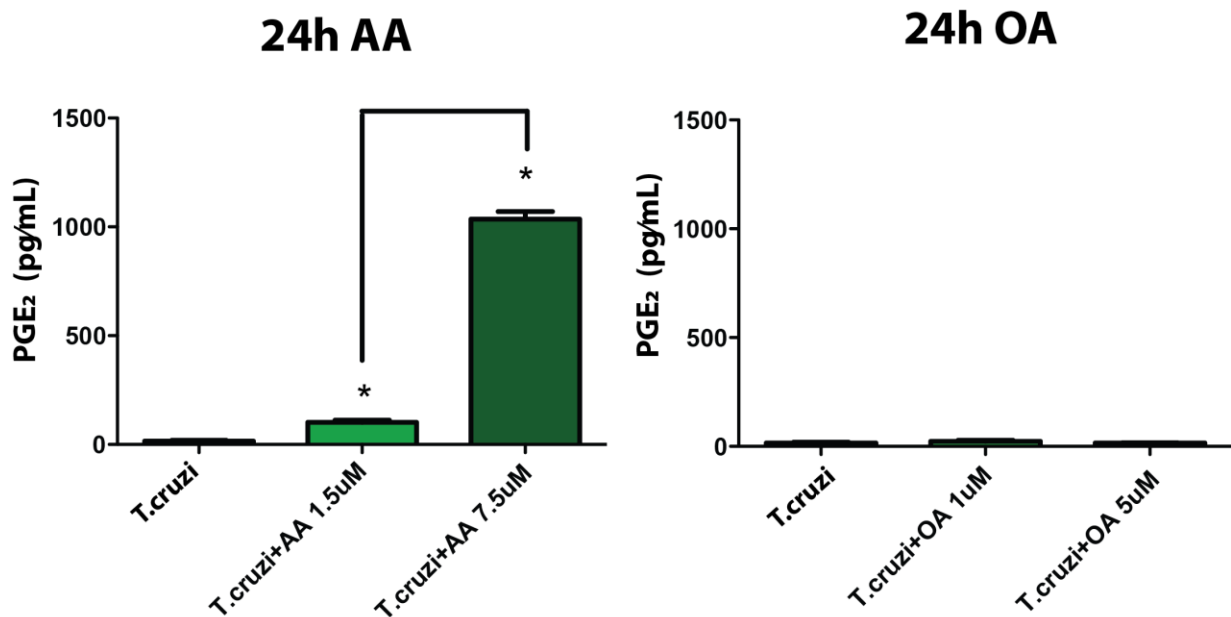
**Fig. 4.4 O ácido araquidônico (AA) é incorporado em Corpúsculos Lipídicos (CLs) do parasito.** Espectro RAMAM de 1 mM de AA em solução aquosa (preto) e de frações de CLs isoladas por fracionamento celular de parasitos não estimulados (vermelho) e parasitos estimulados (azul), mostram que a composição química de CLs é constituída principalmente de AA em relação a outros ácidos graxos. O espectro foi normalizado usando a banda de  $1659\text{ cm}^{-1}$ . Os exemplares foram analisados sem nenhuma marcação. Figura representativa de 2 experimentos independentes. Os picos do espectro representam pontos típicos do espectro do AA (1265, 1446, 1659).



**Fig. 4.5 MALDI-TOF espectro de massas, variação de 303 a 306 m/z obtido da solução de ácido araquidônico puro (AA) (A) e de frações isoladas de corpúsculos lipídicos (CLs) de parasitos não estimulados e parasitos estimulados com AA (B).** Em (A), o espectro mostra o peso molecular do AA puro (m/z 304,24). Em (B), um alto índice de AA é observado na fração de CLs purificadas de parasitos estimulados (preto) se comparado à fração de CLs de parasitos não estimulados (vermelho). Amostras foram analisadas sem nenhuma marcação. Figura representativa de 3 experimentos independentes. O pico do espectro (304,24) representam o espectro do AA.

#### 4.4 Parasitos estimulados com AA produzem PGE<sub>2</sub>

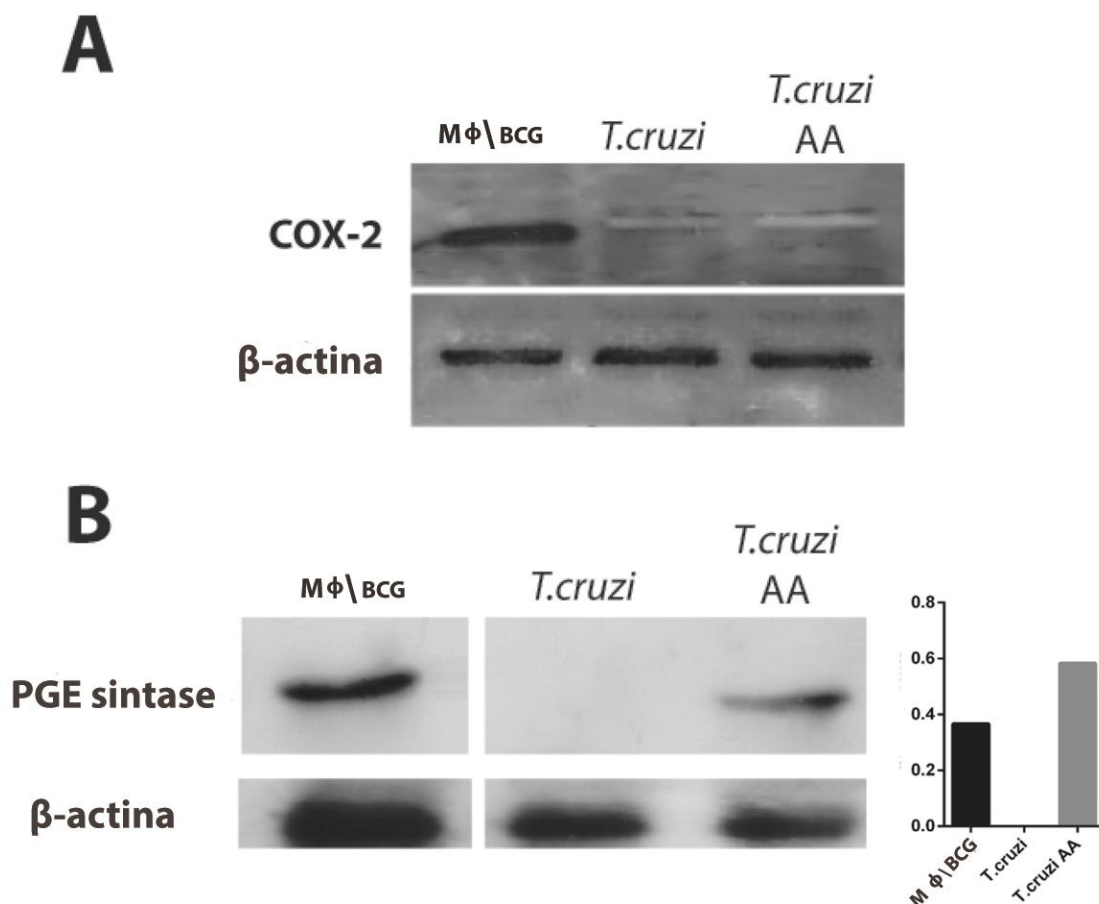
Eicosanoides biologicamente ativos são derivados do metabolismo do AA. Nós investigamos se o parasito produziria PGs sobre estímulo com AA. Considerando que a PGE<sub>2</sub> é consistentemente sintetizada durante infecção por *T. cruzi* (197, 198), nós avaliamos a produção dessa PG por tripomastigotas. A incubação dessas formas do parasito com AA produziram altos níveis de PGE<sub>2</sub> após 24 h se comparado aos controles cultivados sem o AA (Fig. 4.6A). A incubação dos parasitos com AO, que é também um indutor na formação de CLs em tripomastigotas, não induziu a produção da PGE<sub>2</sub> (Fig. 4.6B). Assim, nós concluimos que o *T. cruzi* é capaz de gerar PGE<sub>2</sub> através da metabolização do AA.



**Fig. 4.6 Ácido araquidônico (AA) induz a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) em tripomastigotas.** (A) Níveis de PGE<sub>2</sub> obtido do sobrenadante de cultura de tripomastigotas estimulados por 24 h com 1,5 ou 7,5 µM de AA. (B) ácido oleico a 1 e 5 µM (AO) não induz produção de PGE<sub>2</sub>. As barras representam média ± EPM, n = 3, sendo o gráfico representado por pelo menos 3 experimentos independentes (\*)  $P < 0.05$ .

#### 4.5 Parasitos sintetizam PGE<sub>2</sub> sem atividade de COX-2

Nesse próximo passo, nós avaliamos por Western blotting, se enzimas fundamentais na formação de eicosanoides como COX-2 e PGE sintetase estavam presentes nos parasitos. Para controles positivos, nós usamos culturas de macrófagos infectados com *Mycobacterium bovis* BCG, que demonstraram tanto a atividade dessas enzimas, quanto a produção de PGE<sub>2</sub> em resposta à infecção (111, 199). Os lisados de tripomastigotas estimulados com AA e controles (não estimulados), não demonstraram a presença da enzima COX-2 (Fig. 4.7A). Em outra análise, nós encontramos altos níveis de PGE sintetase em parasitos estimulados com AA, mas não em parasitos não estimulados (Fig. 4.7B), o que indica uma ativação da cascata de reações de metabolização do AA e uma possível via de síntese de PGE<sub>2</sub> associada a esta via.



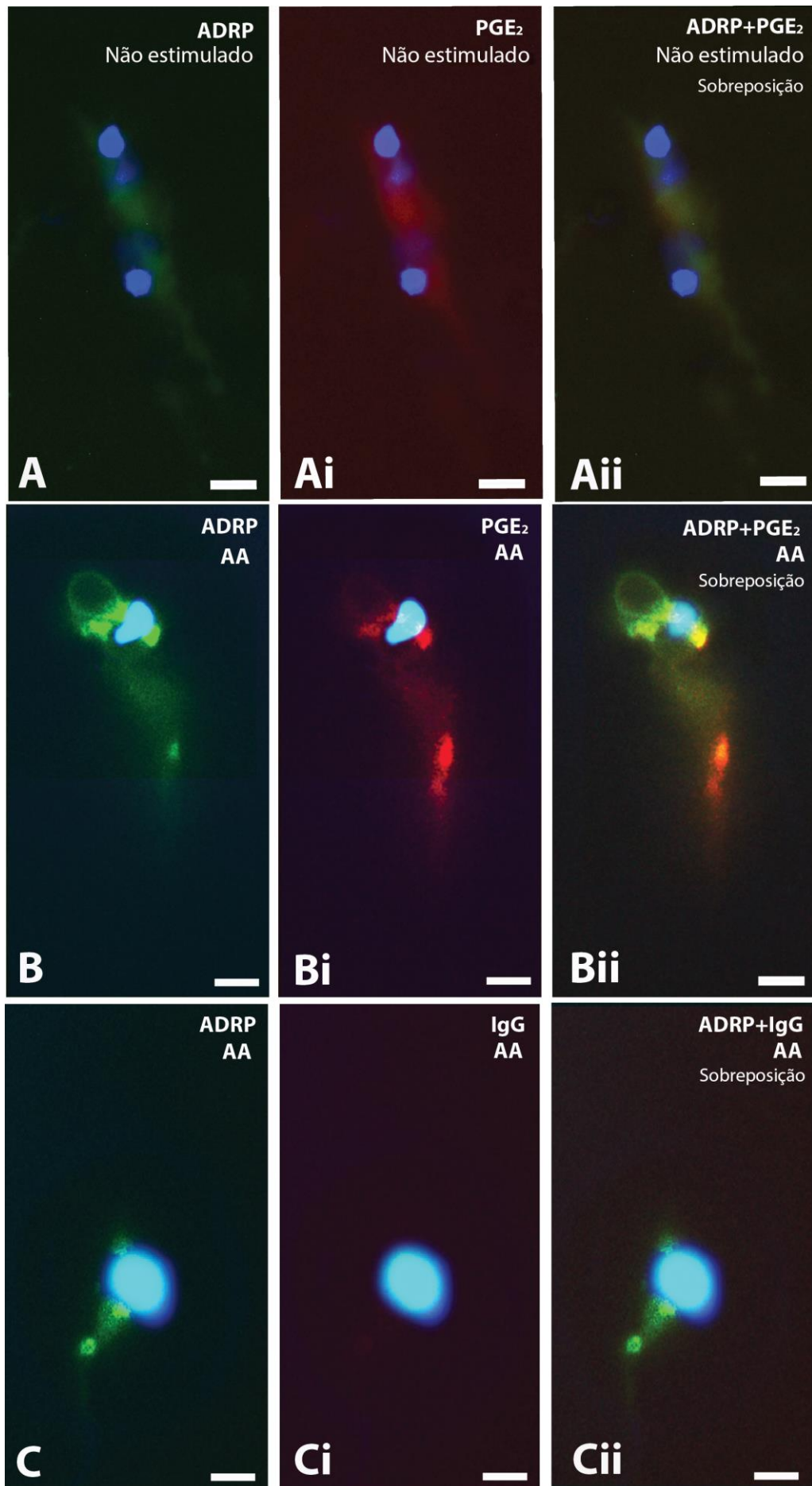
**Fig. 4.7 *T. cruzi* estimulado por AA expressa PGE sintetase, mas não a enzima COX-2.** Expressão de COX-2 (A) e PGE sintetase (B) em formas tripomastigotas de *T. cruzi* após estimulação com AA ou não estimulação por um período de 1 h. Macrófagos peritoneais de camundongos (M $\phi$ ) estimulados por BCG por 24 h foram usados como controles positivos (111). Um total de *T. cruzi* ( $2 \times 10^6$  cells/banda) e macrófagos ( $2 \times 10^6$  cells/banda) foram lisados, separados por SDS-PAGE (10%) e submetidos ao Western blotting para COX-2, PGE sintetase ou  $\beta$ -actina (controle de quantidade de células). As imagens representam pelo menos 2 análises diferentes. Os gráficos representam a análise de densitometria da enzima PGE sintetase (unidades arbitrárias) das bandas de Western blotting.

#### 4.6 CLs do parasito são sítios de síntese de PGE<sub>2</sub>

Devido ao estímulo do parasito com AA levar a um aumento no número de CLs, liberação de PGE<sub>2</sub> e atividade da PGE sintetase, nós hipotetizamos que os CLs do parasito poderiam também estar servindo de sítio para compartimentalização da síntese da PGE<sub>2</sub>. Com a adaptação do método usando carbodiimida para imobilizar grupos carboxila de proteínas próximas à eicosanoides em formação (200), a formação desses eicosanoides foi investigada nos seus sítios de produção. PLIN-2\ADRP foi usada como marcador de CLs para uma futura co-localização com a síntese (201). Com o uso dessa técnica (EicosaCell) (201), a formação de PGE<sub>2</sub> foi demonstrada especificamente nos CLs dos tripomastigotas de *T. cruzi* estimulados com AA (Fig. 4.8). Tripomastigotas estimulados com AA exibiram uma forte localização pontual ou em forma de anel quando os CLs foram marcados por PLIN-2\ADRP (compare Fig. 4.8A and 4.8B,C), indicando a formação de CLs quando estimulados com AA. Tripomastigotas estimulados com AA, mas não estimulados com o veículo, demonstraram intensa e pontual imunofluorescência para PGE<sub>2</sub> (Comparar 4.8Ai e 4.8Bi). Como mostrado na figura 4.8Bii, o sítio de produção intracelular da PGE<sub>2</sub> (Fig. 4.8Bi) coincide com a marcação – PLIN-2\ADRP – dos CLs (Fig. 4.8B). A co-localização foi analisada e mensurada utilizando ImageJ, mostrando que PGE<sub>2</sub> e PLIN-2\ADRP estão co-localizados nas células de uma forma significativa [Coeficiente de Pearson's de  $0.84 \pm 0.02$  (média  $\pm$  EPM)]. A especificidade da imunofluorescência de PGE<sub>2</sub> foi confirmada pela ausência de imunomarcação, quando o anticorpo isotipo controle substituiu o anticorpo

monoclonal anti-PGE<sub>2</sub> (Fig. 4.8C-Cii). Os controles em que o anticorpo anti-PLIN-2\ADRP foram substituídos por soro de porco da índia, foram negativos. Esses resultados validam a especificidade para detecção de PGE<sub>2</sub> formada em seu sítio de produção nos tripomastigotas estimulados, e evidencia os CLs como candidatos para o local de produção e formação de PGE<sub>2</sub> durante a infecção na doença de Chagas.

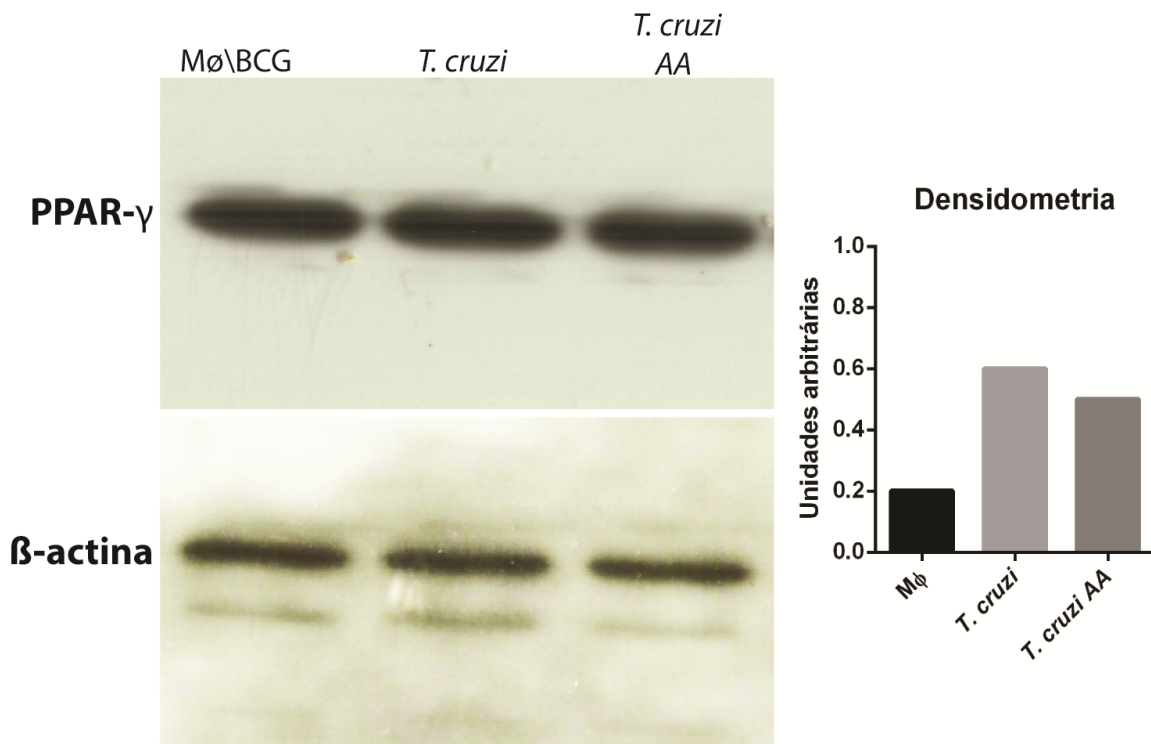




**Fig. 4.8 CLs são locais da síntese de PGE<sub>2</sub> em tripomastigotas estimulados com AA.** (A-Aii) Tripomastigotas não estimulados foram marcados por PLIN-2\ADRP nos CLs (A) e para PGE<sub>2</sub> (Ai). Imagens sobrepostas (Aii) (A-Aii). Os tripomastigotas não estimulados foram marcados para PLIN-2\ADRP nos CLs (A) e PGE<sub>2</sub> (Ai). Imagem sobreposta (Aii) exibe marcação negativa para ADRP e PGE<sub>2</sub>. (B-Bii) tripomastigotas estimulados mostram forte marcação para PGE<sub>2</sub> recém-formada (Bi) em associação com CLs marcados para PLIN-2\ADRP (B). A imagem sobreposta é observada em (Bii) (C-Cii). Um isotipo de IgG1 irrelevante foi utilizado (clone MOPC21) como controle para marcar PGE<sub>2</sub> em combinação com a marcação para PLIN-2\ADRP. (Cii) representa a imagem sobreposta de (C) e (Ci). Os núcleos dos parasitos foram observados após marcação com DAPI (azul). As células foram imunomarcadas através da técnica do EicosaCell (201). Barra de escala 2 µm (todas as imagens).

#### 4.7 O parasito *T. cruzi* expressa o receptor nuclear PPAR- $\gamma$

É sabido de forma ampla na literatura, que o receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gamma (PPAR- $\gamma$ ) age de maneira ostensiva e reguladora no metabolismo lipídico de células de mamíferos envolvidas em processos infecciosos ou patológicos (149, 159). Dessa forma, com nosso foco no metabolismo dos CLs do parasito *T. cruzi* e mediadores lipídicos sendo formados nessa organela, analisamos se o parasito possuía o PPAR- $\gamma$  e se o ácido araquidônico, utilizado em todo o trabalho, teria influência na sua expressão. Observamos por Western blotting, a existência desse receptor nuclear proteico (PPAR- $\gamma$ ) na forma tripomastigota do parasito, porém o AA não influenciou a sua expressão, mantendo o mesmo padrão de bandas, tanto no controle, quanto no estimulado (Fig. 4.9). Assim, como em células de mamíferos, o parasito possui o PPAR- $\gamma$ . Tal constatação pode implicar a presença da via do PPAR- $\gamma$  que modula CLs e produção de PGE<sub>2</sub> (demonstrados anteriormente no *T. cruzi*), alimentando um novo campo para pesquisas futuras.



**Fig. 4.9** *T. cruzi* expressando o receptor ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR- $\gamma$ ). Expressão do PPAR- $\gamma$  em parasitos de cultura axênica não estimulados e estimulados com AA (7,5  $\mu$ M) por 1 h. Macrófagos peritoneais (Mø) de camundongos estimulados por BCG por 24 h foram utilizados como controle positivo. Um total de parasitos ( $2 \times 10^6$  células/banda) e macrófagos ( $1 \times 10^6$  células/poço) foi lisado e submetido à análise por Western blotting para PPAR- $\gamma$  ou  $\beta$ -actina (controle de quantidade de células). Imagens representativas de dois experimentos independentes. Os gráficos representam a análise de densitometria do PPAR- $\gamma$  (unidades arbitrárias) das bandas de Western blotting.

## 5. Discussão

Os CLs são organelas comprovadamente presentes em quase todos os organismos, podendo ser encontradas em plantas, protozoários e bactérias (93, 94). São comumente observados e bem descritos em células de mamíferos, nas quais participam de vários processos celulares como metabolismo lipídico, tráfego de vesículas, estocagem de citocinas e receptores de citocinas [revisto em (95, 99, 111)].

Em células do sistema imune, os CLs são sítios de produção de mediadores inflamatórios, como os eicosanoides, produzidos a partir da atuação de várias enzimas, como COXs, LOs, e PGE sintetase (202, 203), [revisto em (204, 205)]. Desta forma, CLs exercem papel importante em células do sistema imune por serem sítios reconhecidos de produção de mediadores inflamatórios de origem lipídica (109, 202). A formação de CLs é bastante expressiva em resposta a doenças inflamatórias, incluindo doenças infecciosas, o que leva a estas organelas a serem consideradas marcadores estruturais de inflamação (revisto (96)). O processo de formação e modulação da organela, pode ser associado à vias de ativação interna nas células, uma dessas vias é a do PPAR- $\gamma$ , que em processos de infecção em células de mamíferos pode ser amplamente ativada e induzir a formação de CLs e prostanóides (138, 159, 173).

Na última década, o conhecimento acerca dos CLs ganhou grande destaque em células de mamíferos, principalmente em razão da associação destas organelas com muitas doenças metabólicas e inflamatórias; porém os estudos em CLs de patógenos são ainda muito limitados. Trabalhos iniciais focados em aspectos morfológicos de vários patógenos, incluindo *T. cruzi* descrevem os CLs como inclusões lipídicas arredondadas relacionadas com reserva lipídica (36, 206). Mais recentemente, surgiram evidências indicando a associação de CLs de patógenos com a sobrevivência do mesmo dentro da célula hospedeira (86, 122). De fato, em *P. falciparum*, por exemplo, são formados CLs a partir de lipídios extraídos do hospedeiro como mecanismo de escape. Interessantemente, o parasito utiliza lipídios das células hospedeiras (eritrócitos) que se acumulam próximo ao vacúolo parasitóforo (83). Entretanto, as vias e os mecanismos relacionados com a modulação dos CLs em parasitos ainda não estão definidos.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmaram que o parasito *T. cruzi* possui CLs no seu citoplasma nas formas amastigota e tripomastigota, observação constatada após identificação específica para essa organela com quatro marcadores de CLs – tetróxido de ósmio, BODIPY®, Oil Red O e Nile Red, utilizando microscopia de luz e MET, através de análises ultraestruturais. Conforme ressaltado anteriormente, a MET permite a identificação precisa de CLs, visto que estas organelas não apresentam membrana envoltória com estrutura trilaminar típica (revisto em (96)). Desta forma, CLs no parasito podem ser diferenciados morfológicamente de outras organelas, como por exemplo, acidocalcisoma e reservossomo, que são delimitadas por membrana verdadeira (64, 65).

Observamos que, dependendo do estímulo, ou do meio no qual o parasito está inserido, o número e morfologia dos CLs alteram no citoplasma do *T. cruzi*. Isto significa que CLs não são organelas estáticas no parasito, mas sim organelas que respondem prontamente a condições em que este patógeno se encontra, principalmente se o parasito estiver em interação com a célula do hospedeiro. Desta forma, tripomastigotas mantidos em contato com macrófagos *in vitro* mostraram formação de CLs, com aumento significativo do número destas organelas em comparação com tripomastigotas mantidas sem a presença de macrófagos. Esse fato reforça a ideia de que os estímulos gerados pelo contato com as células do hospedeiro influenciam na formação de CLs do parasito e que a interação do parasito com a célula do hospedeiro, mesmo que de forma rápida (1 h), é essencial para as respostas da célula parasitária. É sabido que durante um processo infeccioso, parasito e hospedeiro interagem intensamente, havendo moléculas de superfície importantes na mediação dessas interações e transdução de sinais na célula estimulada, como gp 90, gp 82, GIPL, entre outras, (revisto em (57)).

Outro dado interessante do presente trabalho foi a comparação de aspectos morfológicos de CLs em amastigotas infectando macrófagos *in vitro* e macrófagos infiltrados em órgão alvo da doença de Chagas - coração - *in vivo*. Apesar de não ter sido detectado aumento no número de CLs em amastigotas, quando estas duas situações foram comparadas, o tamanho destas organelas foi significativamente maior em amastigotas de macrófagos inflamatórios cardíacos do que em amastigotas dos macrófagos infectados *in vitro*. Esta observação indica que, quando o parasito se encontra dentro do organismo hospedeiro, os estímulos gerados durante o processo de infecção, assim como a resposta do hospedeiro, são capazes de influenciar diretamente os CLs, ou seja, CLs do parasito são aptos a

responderem às interações entre o mesmo e células do hospedeiro. Em um sistema de cultura, a quantidade de variáveis envolvidas é muito menor que em um sistema *in vivo*, onde as moléculas e a fisiologia do organismo hospedeiro operam sobre o parasito.

Além do aumento de tamanho, outra indicação ultraestrutural de que os CLs do *T. cruzi* estão sendo modulados pela interação com o organismo hospedeiro, é o fato da elétron-densidade destas organelas também ter mostrado diferenças em amastigotas presentes em macrófagos infectados *in vitro* e *in vivo*. Exemplos de variação de elétron-densidades em CLs é bem documentado em células de mamíferos. Durante estudo por infecção por patógenos como *T. cruzi* e *Mycobacterium bovis* BCG, CLs de macrófagos mostraram diferenças entre elétron-densidades dependendo do tempo de infecção e da carga parasitária (111) e (revisto em (188)). Esta diferença de elétron-densidade de CLs pode estar relacionada com diferentes composições químicas, tanto de lipídios, como de outras moléculas, como proteínas, estágios de formação ou flutuação/mobilização de moléculas nestas organelas (188). Além disso, sugere-se que CLs são de fato modulados no citoplasma a partir de estímulos dados a célula.

As análises de MET também revelaram a presença CLs no citoplasma do macrófago, claramente dispostos na proximidade do parasito e de vesículas de transporte aparentemente transitando entre as formas amastigotas do parasito e o citoplasma do macrófago (dados não mostrados), assim como observado por Melo 2003 (187). Estas observações chamaram a atenção porque é documentado na literatura que CLs em células do hospedeiro, além de serem formados em resposta à infecção com diferentes patógenos, são capazes de se realocarem no citoplasma e interagir com fagossomos contendo parasitos (revisto em (99)). Além disso, a literatura relata várias situações onde o patógeno parece usurpar lipídios do hospedeiro em benefício próprio, ou seja, para manutenção de sua sobrevivência (83, 86, 128). Esse processo de troca de material já foi demonstrado em outros parasitos. Parasitos protozoários como *T. gondii* e *P. falsiparum*, trocam lipídios com o hospedeiro, mais especificamente, capturam lipídios do hospedeiro para benefício próprio e síntese do seu próprio material, esse fato foi mostrado basicamente através de rastreamento dos lipídios do hospedeiro, marcando-os com elementos radioativos (84, 86, 87).

A capacidade de AA modular a formação de CLs no *T. cruzi* na forma tripomastigota também foi investigada. Esses lipídios são conhecidos como

precursores da formação de eicosanoides e indutores da formação de CLs em células de mamíferos (202).

Quando os parasitos foram estimulados com AA, observamos aumentos significativos de CLs no parasito em relação ao controle não estimulado, dependendo da dose utilizada do ácido graxo e do tempo de estímulo (Fig 4.2 Bi-G). Este fato é correspondente, por exemplo, com o que acontece em células de mamíferos, no caso, CLs do parasito são rapidamente formados em respostas a agentes indutores. Foi observado também, que parasitos estimulados nos tempos mais tardios (24 h), apesar de apresentarem um perfil de indução no número de CLs menor que nos tempos mais recentes (1 h), mostraram aumento no tamanho dos CLs no citoplasma (dado não mostrado), o que pode ser atribuído a uma deposição consistente de ácidos graxos nos CLs já formados e/ou coalescência desses CLs. Estes perfis de aumento na quantidade de CLs provavelmente se devem ao mesmo processo conhecido em mamíferos, quando demonstrou-se que esses ácidos graxos são indutores na formação de CLs e podem ser incorporados nestas organelas e futuramente utilizados no metabolismo celular (98, 193).

Investigando a dinâmica do AA no parasito, avaliamos a incorporação desse lipídio no parasito e vimos que não somente incorporava o AA (Fig. 4.3), como também o direciona para os CLs citoplasmáticos (Fig. 4.4 e 4.5), justificando seu aumento e o aumento na produção da PGE<sub>2</sub>, como será abordado posteriormente. Esse caminho do AA, nos leva a crer seu papel de matéria prima não só para produção de CLs, mas também como elemento chave na produção de mediadores lipídicos da inflamação.

O aumento no número de CLs induzido por AA foi acompanhado por aumento significativo na liberação de PGE<sub>2</sub> (Fig 4.6). Além disso, demonstrou-se no presente trabalho que CLs do parasito são sítios da produção deste mediador inflamatório (Fig. 4.6 e 4.8), e que uma importante enzima que age no metabolismo de PGE<sub>2</sub> em células de mamíferos a partir do AA, a ciclooxigenase-2 (109), não estava presente no parasito. Uma vez que várias enzimas participam da metabolização de ácidos graxos para a produção de PGs, alguma enzima relacionada a via de formação de PGE<sub>2</sub> era necessária estar presente no parasito. De fato, demonstrou-se a presença de PGE sintetase e que o parasito utilizava uma via dependente dela e independente de COX-2 (Fig.4.7).

Um mecanismo conhecido relacionado ao processo de produção de CLs e PGE<sub>2</sub> em células de mamíferos é a via que envolve o receptor nuclear PPAR- $\gamma$ .

Dessa forma, identificamos a presença do PPAR- $\gamma$  no *T. cruzi*, o que pode explicar e correlacionar vários eventos na via de sinalização AA  $\rightarrow$  CLs  $\rightarrow$  PGE<sub>2</sub>. Considerando que a identificação do PPAR- $\gamma$  se fez presente no parasito, para futuros estudos, é imprescindível a análise da influência que a via do PPAR- $\gamma$  tem na formação de CLs e PGE<sub>2</sub> no *T. cruzi*.

A PGE<sub>2</sub> é um potente eicosanoide que age no organismo como um mediador inflamatório inibitório do sistema imune, pois tem seu papel relacionado ao controle da resposta imune, proporcionando inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, restringindo a ação de células importantes para imunidade como macrófagos, células NK, linfócitos T entre outras (207-209). A PGE<sub>2</sub> está, por exemplo, associada aos danos ocasionados aos tecidos dos hospedeiros durante a doença de Chagas, devido à sua ação sistêmica e de contenção (198). Desta forma, através da liberação desse mediador, parece que o parasito consegue evadir-se do sistema imune do hospedeiro, o que pode ser uma de suas estratégias para sobrevivência em um período maior.

A relação PGE<sub>2</sub>/parasito pode ser importante durante a infecção por *T. cruzi*. Considerando que o parasitismo é muito acentuado na fase aguda da doença (Fig. 1.5), quantidades consideráveis de PGE<sub>2</sub> podem estar sendo produzidas pelo conjunto de parasitos no organismo hospedeiro. A disposição em ninhos dos *T. cruzi* durante um processo de infecção, onde vários parasitos encontram-se interiorizados numa única célula hospedeira, torna possível a liberação de grande quantidade de mediador (PGE<sub>2</sub>) no tecido local. A PGE<sub>2</sub> liberada pelos parasitos invade o tecido infectado e conseqüentemente, irá causar uma inibição da ação de várias células do sistema imune que têm a capacidade de controlar e destruir os parasitos. Várias citocinas importantes, pró-inflamatórias, também deixam de ser liberadas por essas células devido a inibição pela PGE<sub>2</sub>. Com a resposta imune do hospedeiro mais atenuada e controlada, o parasito encontra mais facilidades para se manter no tecido o qual está infectando.

Além disso, durante a infecção por *T. cruzi*, há no tecido cardíaco indução da formação de PGE<sub>2</sub> gerada pelas células hospedeiras em apoptose. Essas células induzem os macrófagos do infiltrado cardíaco a produzirem esse mediador inflamatório como forma de retrair o processo inflamatório ocorrido no local, o que causaria danos ao tecido cardíaco. Desta forma, há uma inibição do sistema imune naquele local onde a PGE<sub>2</sub> foi liberada, contribuindo para o crescimento parasitário (106, 210). A inibição do sistema imune pela PGE<sub>2</sub> gerada pelas células do



hospedeiro, associada à produção de PGE<sub>2</sub> diretamente por *T. cruzi* podem beneficiar a sobrevivência deste parasito. Desta forma, sugere-se que a síntese de PGE<sub>2</sub> pelo *T. cruzi* possa ser um mecanismo de evasão desenvolvido pelo parasito.

Estudos futuros são importantes para melhor entendimento dos mecanismos de formação de CLs no *T. cruzi* e do papel da PGE<sub>2</sub> neste parasito com vistas de se alcançar um melhor controle da infecção.

## 6. Conclusões

- O parasito *T. cruzi* possui CLs no seu citoplasma tanto nas formas amastigotas como tripomastigotas. O número e morfologia destas organelas alteram dependendo do estímulo recebido pelo parasito. Isto significa que CLs não são organelas estáticas no parasito, mas sim organelas que respondem prontamente a condições em que este patógeno se encontra.
- A formação de CLs no *T. cruzi* pode ser modulada pela interação com o organismo hospedeiro. Além disso, a composição destas organelas também parece ser influenciada por esta interação. Portanto, CLs do parasito podem ser considerados organelas dinâmicas, as quais encontram envolvidas na fisiopatologia da doença de Chagas.
- O *T. cruzi* é capaz de produzir PGE<sub>2</sub>, um potente inibidor do sistema imune hospedeiro. Quando estimulados com AA, os parasitos produziram quantidades elevadas deste mediador inflamatório quando comparado com os parasitos não estimulados. Essa pode ser uma estratégia de evasão utilizada pelo parasito.
- A produção de PGE<sub>2</sub> ocorre em CLs do parasito. Desta forma, pode-se fazer uma analogia funcional entre essa organela nas células de mamíferos e de parasitos. Estudos futuros são importantes para melhor entendimento do significado funcional desse mediador inflamatório em formas do parasito.
- O parasito *T. cruzi* possui o PPAR- $\gamma$  que pode ser um receptor nuclear, ou uma proteína com forte homologia, conhecido em células de mamíferos por ser um fator chave na modulação do número de CLs nas células e sua produção de PGE<sub>2</sub>. Tal fato nos abre um campo a ser explorado no processo de modulação de CLs e mediadores inflamatórios, levando a muitas possibilidades.
- Em conjunto, os resultados do presente trabalho, mostraram que CLs presentes no citoplasma do parasito *T. cruzi* podem ser formados e/ou alterados morfológicamente pelos estímulos do meio e pela interação com a

célula hospedeira. Essas organelas constituem sítios de produção e liberação de PGE<sub>2</sub> o que pode agir na célula hospedeira e ser de extrema importância para a evasão do parasito. Além disso, é possível que os processos de produção dos CLs estejam sendo modulados pela via do PPAR- $\gamma$  ou enzima semelhante que pode ou não estar agindo como receptor nuclear. Os CLs no parasito podem ser importantes alvos de controle no curso da doença de Chagas.

## 7 Referências

1. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, et al. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*. 2007;357(10):1018-27.
2. Yacoub S, Mocumbi AO, Yacoub MH. Neglected tropical cardiomyopathies: I. Chagas disease: myocardial disease. *Heart*. 2008;94(2):244-8.
3. Lewinsohn R. Carlos Chagas (1879-1934): the discovery of *Trypanosoma cruzi* and of American trypanosomiasis (foot-notes to the history of Chagas's disease). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1979;73(5):513-23.
4. Chagas C. A new disease entity in man: a report on etiologic and clinical observations. *Int J Epidemiol*. 2008;37(4):694-5.
5. Kropf SP, Sa MR. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2009;16 Suppl 1:13-34.
6. Chagas C. Traços de Oswaldo Cruz. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1922;15(1):5-57.
7. Chagas C. Nova tripanozomiase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909;1(2):159-218.
8. Chagas E. Summula dos conhecimentos actuaes sobre a Trypanosomiasis americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [online]. 1935;30(3):387-416.
9. Chagas C. Nova entidade morbida do homem: rezumo geral de estudos etiologicos e clinicos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1911;3(2):219-75.
10. Chagas C. Descoberta do *Tripanozoma cruzi* e verificação da Tripanozomiase Americana: retrospecto historico. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1922;15(1):67-76.
11. Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*. 2010;115(1-2):5-13.
12. Dye C, Mertens T, Hirschall G, Mpanju-Shumbusho W, Newman RD, Raviglione MC, et al. WHO and the future of disease control programmes. *Lancet*. 2013;381(9864):413-8.
13. Molyneux DH, Hotez PJ, Fenwick A. "Rapid-impact interventions": How a policy of integrated control for Africa's neglected tropical diseases could benefit the poor. *Plos Medicine*. 2005;2(11):1064-70.
14. Mecaskey JW, Knirsch CA, Kumaresan JA, Cook JA. The possibility of eliminating blinding trachoma. *The Lancet infectious diseases*. 2003;3(11):728-34.

15. Molyneux DH, Zagaria N. Lymphatic filariasis elimination: progress in global programme development. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 2002;96 Suppl 2:S15-40.
16. Briceno-Leon R. [Chagas disease in the Americas: an ecohealth perspective]. *Cad Saude Publica*. 2009;25 Suppl 1:S71-82.
17. Laranja FS, Dias E, Nobrega G. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1948;46(2):473-529.
18. Dias E, Laranja FS. Chagas' disease and its control. *Abstr Int Congr Trop Med Malar*. 1948;56(4th Congr):91.
19. Dias E. Aspectos climáticos da distribuição dos transmissores da doença de Chagas no Vale do Rio São Francisco. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1958;56(2):407-13.
20. Dias E. Variações mensais da incidência das formas evolutivas do *Triatoma infestans* e do *Panstrongylus megistus* no Município de Bambuí, Estado de Minas Gerais. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1955;53(2-3-4):457-72.
21. Coura JR, Viñas PA, Junqueira ACV. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Mem I Oswaldo Cruz*. 2014;109(7):856-62.
22. Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(5):603-12.
23. Rassi A, Dias JCP, Marin-Neto JA. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart*. 2008;95(7):524-34.
24. Valente SAS, Da Costa Valente V, Das Neves Pinto AY, De Jesus Barbosa César M, Dos Santos MP, Miranda COS, et al. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;103(3):291-7.
25. Coura JR. [Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39 Suppl 3:113-7.
26. Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*. 2003;19(11):495-501.
27. Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J*. 1994;127(1):151-62.
28. Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(1):3-24.

29. Jurberg J, Galvao C. *Hermanlenticia* n gen. of tribe Triatomini, with a list of species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Mem I Oswaldo Cruz. 1997;92(2):181-5.
30. Jurberg J, Galvao C, Bowers WS, Garcia ES, Azambuja P. Biomorphological alterations induced by an anti-juvenile hormonal compound, 2-(2-ethoxyethoxy)ethyl furfuryl ether, on three species of triatominae larvae (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997;92(2):263-8.
31. Rebelo JMM, Barros VLL, Mendes WA. [Triatominae species]. Cad Saude Publica. 1998;14(1):187-92.
32. Bargues MD, Klisiowicz DR, Panzera F, Noireau F, Marcilla A, Perez R, et al. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. Infection, Genetics and Evolution. 2006;6(1):46-62.
33. Noireau F. Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. Mem I Oswaldo Cruz. 2009;104:60-4.
34. Correa RR. [Report on Chagas' disease in Brasil and especially in the State of Sao Paulo]. Rev Bras Malariologia Doencas Trop. 1968;20(1):39-81.
35. Bryan RT, Balderrama F, Tonn RJ, Dias JC. Community participation in vector control: lessons from Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg. 1994;50(6 Suppl):61-71.
36. De Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104 Suppl 1:89-100.
37. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int J Parasitol. 2001;31(5-6):472-81.
38. Contreras VT, Araque WH, Delgado VS. Biological properties of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes: usefulness for studying Chagas' disease (brief report). Biol Res. 1993;26(1-2):315-6.
39. Burleigh BA, Andrews NW. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. Annu Rev Microbiol. 1995;49:175-200.
40. Calabrese KS, Lagrange PH, da Costa SC. *Trypanosoma cruzi*: histopathology of endocrine system in immunocompromised mice. International journal of experimental pathology. 1994;75(6):453-62.
41. Chimelli L, Scaravilli F. Trypanosomiasis. Brain Pathol. 1997;7(1):599-611.
42. Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in Chagas disease - A review. Mem I Oswaldo Cruz. 2006;101(5):463-91.

43. Chagas E. Forma cardiaca da Trypanosomiase Americana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1930;24(3):89-125.
44. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2013;7(1).
45. Pierimarchi P, Cerni L, Alarcon de Noya B, Nicotera G, Diaz-Bello Z, Angheben A, et al. Rapid Chagas diagnosis in clinical settings using a multiparametric assay. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2013.
46. Verissimo da Costa GC, Lery LM, da Silva ML, Moura H, Peralta RH, von Kruger WM, et al. The identification and characterization of epitopes in the 30-34kDa *Trypanosoma cruzi* proteins recognized by antibodies in the serum samples of chagasic patients. Journal of proteomics. 2012;80C:34-42.
47. Borges-Pereira J, Xavier SS, Pirmez C, Coura JR. Chagas disease in Virgem da Lapa, Minas Gerais, Brazil. IV. Clinical and epidemiological aspects of left ventricular aneurism. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31(5):457-63.
48. Matsuda NM, Miller SM, Evora PR. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. Clinics (Sao Paulo). 2009;64(12):1219-24.
49. Kamiji MM, De Oliveira RB. Features of Chagas' disease patients with emphasis on digestive form, in a tertiary hospital of Ribeirao Preto, SP. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(4):305-9.
50. Bassotti G, Villanacci V. The pathophysiology of chagasic megacolon: beyond ICC. Virchows Archiv : an international journal of pathology. 2013;462(1):125.
51. Florez O, Esper J, Higuera S, Barraza MF, Cabrera HB, Mantilla JC, et al. Chagasic megacolon associated with *Trypanosoma cruzi* I in a Colombian patient. Parasitol Res. 2010;107(2):439-42.
52. Rassi A, Rezende JM, Rassi Jr A. Advanced megaesophagus (Group III) secondary to vector-borne Chagas disease in a 20-month-old infant. Rev Soc Bras Med Trop. 2012;45(2):266-8.
53. Chamond N, Coatnoan N, Minoprio P. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 2002;2(3):247-54.
54. D'Avila H, Toledo DA, Melo RCN. Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-*Trypanosoma cruzi* interplay during innate immune responses. Mediators Inflamm. 2012;2012:478601.

55. Souto-Padron T, de Carvalho TU, Chiari E, de Souza W. Further studies on the cell surface charge of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop. 1984;41(3):215-25.
56. Barrias ES, Reignault LC, De Souza W, Carvalho TMU. Dynasore, a Dynamin Inhibitor, Inhibits *Trypanosoma cruzi* Entry into Peritoneal Macrophages. Plos One. 2010;5(1).
57. De Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. Int J Cell Biol. 2010;2010.
58. Rocha GM, Miranda K, Weissmuller G, Bisch PM, de Souza W. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* revisited by atomic force microscopy. Microsc Res Tech. 2008;71(2):133-9.
59. Barbosa HS, Meirelles MNL. Evidence of Participation of Cytoskeleton of Heart-Muscle Cells during the Invasion of *Trypanosoma cruzi*. Cell Struct Funct. 1995;20(4):275-84.
60. Penha LL, Sant'Anna CB, Mendonca-Previato L, Cunha-e-Silva NL, Previato JO, Lima APCA. Sorting of phosphoglucomutase to glycosomes in *Trypanosoma cruzi* is mediated by an internal domain. Glycobiology. 2009;19(12):1462-72.
61. Moreno SN, Docampo R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. J Eukaryot Microbiol. 2009;56(3):208-13.
62. Docampo R, Moreno SN. Acidocalcisomes. Cell Calcium. 2011;50(2):113-9.
63. Correa AF, Andrade LR, Soares MJ. Elemental composition of acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi* bloodstream trypomastigote forms. Parasitol Res. 2002;88(10):875-80.
64. Miranda K, Benchimol M, Docampo R, de Souza W. The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. 2000;86(5):373-84.
65. Sant'Anna C, de Souza W, Cunha-e-Silva N. Biogenesis of the reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. Microsc Microanal. 2004;10(5):637-46.
66. Pereira MG, Nakayasu ES, Sant'Anna C, De Cicco NN, Atella GC, de Souza W, et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservosome lipid inclusions. Plos One. 2011;6(7):e22359.
67. Sant'Anna C, Pereira MG, Lemgruber L, de Souza W, Silva NLCE. New insights into the morphology of *Trypanosoma cruzi* reservosome. Microsc Res Techniq. 2008;71(8):599-605.
68. Sant'Anna C, Nakayasu ES, Pereira MG, Lourenco D, de Souza W, Almeida IC, et al. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. Proteomics. 2009;9(7):1782-94.



69. Soares MJ. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:139-41.
70. De Souza W, Meyer H. An electron microscopic and cytochemical study of the cell coat of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures. Z Parasitenkd. 1975;46(3):179-87.
71. Souto-Padron T, De Souza W, Heuser JE. Quick-freeze, deep-etch rotary replication of *Trypanosoma cruzi* and *Herpetomonas megaseliae*. J Cell Sci. 1984;69:167-78.
72. Barbosa HS, Meirelles MN. The role of RCA-binding sites in the adhesion of *Trypanosoma cruzi* to heart muscle cells, as revealed by electron spectroscopic imaging. J Submicrosc Cytol Pathol. 1993;25(1):47-51.
73. Crane MS, Dvorak JA. Influence of monosaccharides on the infection of vertebrate cells by *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol. 1982;5(5):333-41.
74. Buscaglia CA, Campo VA, Frasch AC, Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. Nat Rev Microbiol. 2006;4(3):229-36.
75. Ponce NE, Cano RC, Carrera-Silva EA, Lima AP, Gea S, Aoki MP. Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection. Medical microbiology and immunology. 2012;201(2):145-55.
76. Fernandes MC, Cortez M, Geraldo Yoneyama KA, Straus AH, Yoshida N, Mortara RA. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. Int J Parasitol. 2007;37(13):1431-41.
77. Bambino-Medeiros R, Oliveira FOR, Calvet CM, Vicente D, Toma L, Krieger MA, et al. Involvement of host cell heparan sulfate proteoglycan in *Trypanosoma cruzi* amastigote attachment and invasion. Parasitology. 2011;138(5):593-601.
78. Ruiz RC, Favoreto S, Dorta ML, Oshiro MEM, Ferreira AT, Manque PM, et al. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signalling activity. Biochem J. 1998;330:505-11.
79. Freire-de-Lima L, Oliveira IA, Neves JL, Penha LL, Alisson-Silva F, Dias WB, et al. Sialic acid: a sweet swing between mammalian host and *Trypanosoma cruzi*. Frontiers in immunology. 2012;3:356.
80. Freire-de-Lima L, Alisson-Silva F, Carvalho ST, Takiya CM, Rodrigues MM, DosReis GA, et al. *Trypanosoma cruzi* subverts host cell sialylation and may

compromise antigen-specific CD8+ T cell responses. *J Biol Chem.* 2010;285(18):13388-96.

81. Cuevas IC, Cazzulo JJ, Sanchez DO. gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. *Infect Immun.* 2003;71(10):5739-49.

82. Yao CQ. Major Surface Protease of Trypanosomatids: One Size Fits All? *Infect Immun.* 2010;78(1):22-31.

83. Jackson KE, Klonis N, Ferguson DJP, Adisa A, Dogovski C, Tilley L. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology.* 2004;54(1):109-22.

84. Charron AJ, Sibley LD. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 15):3049-59.

85. Nishikawa Y, Quittnat F, Stedman TT, Voelker DR, Choi J-Y, Zahn MM, et al. Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* 2005;7(6):849-67.

86. Coppens I. Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2006;8(1):1-9.

87. Palacpac NMQ. Developmental-stage-specific triacylglycerol biosynthesis, degradation and trafficking as lipid bodies in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Journal of Cell Science.* 2004;117(8):1469-80.

88. Soares MJ, De souza W. Endocytosis of Gold-Labeled Proteins and Ldl by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* 1991;77(6):461-8.

89. DosReis GA. Susceptible hosts: a resort for parasites right in the eye of the immune response. *An Acad Bras Cienc.* 2000;72(1):79-82.

90. Araujo-Santos T, Rodriguez NE, Moura-Pontes S, Dixt UG, Abanades DR, Bozza PT, et al. Role of prostaglandin F2alpha production in lipid bodies from *Leishmania infantum chagasi*: insights on virulence. *J Infect Dis.* 2014;210(12):1951-61.

91. Kabututu Z, Martin SK, Nozaki T, Kawazu S, Okada T, Munday CJ, et al. Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H2 reductase in *Leishmania*. *Int J Parasitol.* 2003;33(2):221-8.

92. Kilunga Kubata B, Eguchi N, Urade Y, Yamashita K, Mitamura T, Tai K, et al. *Plasmodium falciparum* produces prostaglandins that are pyrogenic, somnogenic, and immunosuppressive substances in humans. *J Exp Med.* 1998;188(6):1197-202.

93. Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res.* 2001;40(5):325-438.
94. Murphy DJ. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma.* 2012;249(3):541-85.
95. Bozza PT, Melo RCN, Bandeira-Melo C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther.* 2007;113(1):30-49.
96. Melo RCN, D'Avila H, Wan HC, Bozza PT, Dvorak AM, Weller PF. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *J Histochem Cytochem.* 2011;59(5):540-56.
97. Weller PF, Monahan-Earley RA, Dvorak HF, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. *Am J Pathol.* 1991;138(1):141-8.
98. Dvorak AM, Dvorak HF, Peters SP, Shulman ES, MacGlashan DW, Jr., Pyne K, et al. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J Immunol.* 1983;131(6):2965-76.
99. Melo RC, Dvorak AM. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS pathogens.* 2012;8(7):e1002729.
100. Wan HC, Melo RCN, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J.* 2007;21(1):167-78.
101. Fujimoto Y, Itabe H, Sakai J, Makita M, Noda J, Mori M, et al. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1644(1):47-59.
102. Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2004;279(45):46835-42.
103. Kimmel AR, Brasaemle DL, McAndrews-Hill M, Sztalryd C, Londos C. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *Journal of lipid research.* 2010;51(3):468-71.
104. Digel M, Eehalt R, Fullekrug J. Lipid droplets lighting up: insights from live microscopy. *Febs Lett.* 2010;584(11):2168-75.

105. Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10(1):51-8.
106. D'Avila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, et al. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E(2) generation and increased parasite growth. *J Infect Dis.* 2011;204(6):951-61.
107. Dvorak AM, Weller PF, Harvey VS, Morgan ES, Dvorak HF. Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. *International archives of allergy and immunology.* 1993;101(2):136-42.
108. Dvorak AM, Morgan ES, Tzizik DM, Weller PF. Prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase): ultrastructural localization to nonmembrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human eosinophils and 3T3 fibroblasts. *International archives of allergy and immunology.* 1994;105(3):245-50.
109. Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med.* 1997;186(6):909-20.
110. Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, Gray JP, Cassara J, Dvorak AM, et al. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol.* 1998;152(3):759-69.
111. D'Avila H, Melo RCN, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: Intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *Journal of Immunology.* 2006;176(5):3087-97.
112. Pacheco P, Vieira-de-Abreu A, Gomes RN, Barbosa-Lima G, Wermelinger LB, Maya-Monteiro CM, et al. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B4-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. *J Immunol.* 2007;179(12):8500-8.
113. Melo RCN, D'Avila H, Fabrino DL, Almeida PE, Bozza PT. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell.* 2003;35(1):59-67.

114. Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, et al. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes and Infection*. 2009;11(2):181-90.
115. Aliberti J, Bafica A. Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2005;73(3-4):283-8.
116. Rodriguez-Acosta A FH, Pulido-Méndez M, et al. Liver ultrastructural pathology in mice infected with *Plasmodium berghei*. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1998;30(2):299-307.
117. Shavva VS, Mogilenko DA, Dizhe EB, Oleinikova GN, Perevozchikov AP, Orlov SV. Hepatic nuclear factor 4alpha positively regulates complement C3 expression and does not interfere with TNFalpha-mediated stimulation of C3 expression in HepG2 cells. *Gene*. 2013;524(2):187-92.
118. Kumar Y, Cocchiari J, Valdivia RH. The Obligate Intracellular Pathogen *Chlamydia trachomatis* Targets Host Lipid Droplets. *Current Biology*. 2006;16(16):1646-51.
119. Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Torocsik D, D'Avila H, Dezso B, et al. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Infection Induces TLR2-Dependent Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Expression and Activation: Functions in Inflammation, Lipid Metabolism, and Pathogenesis. *The Journal of Immunology*. 2009;183(2):1337-45.
120. Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VG, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol*. 2010;87(3):371-84.
121. Mattos KA, Lara FA, Oliveira VGC, Rodrigues LS, D'Avila H, Melo RCN, et al. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell Microbiol*. 2011;13(2):259-73.
122. Quittnat F, Nishikawa Y, Stedman TT, Voelker DR, Choi JY, Zahn MM, et al. On the biogenesis of lipid bodies in ancient eukaryotes: synthesis of triacylglycerols by a *Toxoplasma* DGAT1-related enzyme. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;138(1):107-22.

123. Chang PC. The ultrastructure of *Leishmania donovani*. J Parasitol. 1956;42(2):126-36.
124. Flaspohler JA, Rickoll WL, Beverley SM, Parsons M. Functional identification of a *Leishmania* gene related to the peroxin 2 gene reveals common ancestry of glycosomes and peroxisomes. Mol Cell Biol. 1997;17(3):1093-101.
125. Coppens I, Vielemeyer O. Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: from storage to potential mediation in parasite metabolic activities. International Journal for Parasitology. 2005;35(6):597-615.
126. Flaspohler JA, Jensen BC, Saveria T, Kifer CT, Parsons M. A Novel Protein Kinase Localized to Lipid Droplets Is Required for Droplet Biogenesis in Trypanosomes. Eukaryot Cell. 2010;9(11):1702-10.
127. van der Meer-Janssen YP, van Galen J, Batenburg JJ, Helms JB. Lipids in host-pathogen interactions: pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. Prog Lipid Res. 2010;49(1):1-26.
128. Vielemeyer O, McIntosh MT, Joiner KA, Coppens I. Neutral lipid synthesis and storage in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. Molecular & Biochemical Parasitology. 2004;135(2):195-207.
129. Alam M. Ionophore A23187 stimulates *Entamoeba histolytica* to release prostaglandin F2 alpha. Prostaglandins, leukotrienes, and medicine. 1986;22(3):259-64.
130. Belley A, Chadee K. Eicosanoid production by parasites: from pathogenesis to immunomodulation? Parasitology today. 1995;11(9):327-34.
131. Dey I, Keller K, Belley A, Chadee K. Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(23):13561-6.
132. Hadas E, Mazur T. Biosynthesis of prostaglandins in pathogenic and nonpathogenic strains of *Acanthamoeba spp.* Parasitol Res. 1997;83(3):296-9.
133. Dauschies A, Joachim A. Eicosanoids in parasites and parasitic infections. Adv Parasitol. 2000;46:181-240.
134. Kubata BK, Duszenko M, Kabututu Z, Rawer M, Szallies A, Inui T, et al. Enzymatic formation of prostaglandin D2, E2, and F2 $\alpha$  in the parasitic protozoan *Trypanosoma brucei*. International Congress Series. 2002;1233:461-6.
135. Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. The Journal of clinical investigation. 2006;116(3):590-7.

136. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPAR[gamma] signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med.* 2013;99(5):557-66.
137. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med.* 2004;10(4):355-61.
138. Janani C, Ranjitha Kumari BD. PPAR gamma gene--a review. *Diabetes & metabolic syndrome.* 2015;9(1):46-50.
139. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem.* 1997;272(32):20230-5.
140. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990;347(6294):645-50.
141. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *Journal of lipid research.* 1996;37(5):907-25.
142. Szatmari I, Torocsik D, Agostini M, Nagy T, Gurnell M, Barta E, et al. PPARgamma regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism. *Blood.* 2007;110(9):3271-80.
143. Szanto A, Nagy L. Retinoids potentiate peroxisome proliferator-activated receptor gamma action in differentiation, gene expression, and lipid metabolic processes in developing myeloid cells. *Molecular pharmacology.* 2005;67(6):1935-43.
144. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature.* 2005;437(7059):759-63.
145. Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, et al. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene expression.* 1995;4(4-5):281-99.
146. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *Febs Lett.* 1998;438(1-2):55-60.
147. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994;79(7):1147-56.

148. Sfeir Z, Ibrahim A, Amri E, Grimaldi P, Abumrad N. Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 1997;57(1):17-21.
149. Afzal N, Hassan M, Fatima S, Tariq S, Qayum I. EXPRESSION OF PEROXISOME-PROLIFERATOR ACTIVATED RECEPTORS-gamma IN DIABETICS, OBESE AND NORMAL SUBJECTS. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC*. 2016;28(1):130-4.
150. Wang L, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Blunder M, Liu X, Malainer C, et al. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): a review. *Biochem Pharmacol*. 2014;92(1):73-89.
151. Weidner C, de Groot JC, Prasad A, Freiwald A, Quedenau C, Kliem M, et al. Amorphutins are potent antidiabetic dietary natural products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(19):7257-62.
152. O'Sullivan SE, Tarling EJ, Bennett AJ, Kendall DA, Randall MD. Novel time-dependent vascular actions of Delta9-tetrahydrocannabinol mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;337(3):824-31.
153. Takahashi N, Goto T, Taimatsu A, Egawa K, Katoh S, Kusudo T, et al. Bixin regulates mRNA expression involved in adipogenesis and enhances insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes through PPARgamma activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(4):1372-6.
154. Shang W, Yang Y, Jiang B, Jin H, Zhou L, Liu S, et al. Ginsenoside Rb1 promotes adipogenesis in 3T3-L1 cells by enhancing PPARgamma2 and C/EBPalpha gene expression. *Life Sci*. 2007;80(7):618-25.
155. Christensen KB, Jorgensen M, Kotowska D, Petersen RK, Kristiansen K, Christensen LP. Activation of the nuclear receptor PPARgamma by metabolites isolated from sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of ethnopharmacology*. 2010;132(1):127-33.
156. Shen P, Liu MH, Ng TY, Chan YH, Yong EL. Differential effects of isoflavones, from *Astragalus membranaceus* and *Pueraria thomsonii*, on the activation of PPARalpha, PPARgamma, and adipocyte differentiation in vitro. *The Journal of nutrition*. 2006;136(4):899-905.



157. Sahajpal NS, Jain SK. Molecular Remodeling of Insulin Receptor Pathway by Thiazolidinediones in Type II Diabetes Mellitus: A Brief Review. *Protein and peptide letters*. 2016.
158. Seargent JM, Yates EA, Gill JH. GW9662, a potent antagonist of PPARgamma, inhibits growth of breast tumour cells and promotes the anticancer effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone, independently of PPARgamma activation. *Br J Pharmacol*. 2004;143(8):933-7.
159. Almeida PE, Carneiro AB, Silva AR, Bozza PT. PPARgamma Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing. *PPAR research*. 2012;2012:383829.
160. Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther*. 2006;110(3):371-85.
161. Glass CK, Saijo K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(5):365-76.
162. Nakken B, Varga T, Szatmari I, Szeles L, Gyongyosi A, Illarionov PA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated cathepsin D is required for lipid antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol*. 2011;187(1):240-7.
163. Chawla A. Control of macrophage activation and function by PPARs. *Circulation research*. 2010;106(10):1559-69.
164. Rajaram MV, Brooks MN, Morris JD, Torrelles JB, Azad AK, Schlesinger LS. Mycobacterium tuberculosis activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. *J Immunol*. 2010;185(2):929-42.
165. Lagranderie M, Abolhassani M, Vanoirbeek JA, Lima C, Balazuc AM, Vargaftig BB, et al. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin killed by extended freeze-drying targets plasmacytoid dendritic cells to regulate lung inflammation. *J Immunol*. 2010;184(2):1062-70.
166. Jo EK, Yang CS, Choi CH, Harding CV. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cell Microbiol*. 2007;9(5):1087-98.
167. Ryffel B, Jacobs M, Parida S, Botha T, Togbe D, Quesniaux V. Toll-like receptors and control of mycobacterial infection in mice. *Novartis Foundation symposium*. 2006;279:127-39; discussion 39-41, 216-9.

168. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 2003;301(5633):640-3.
169. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*. 2002;169(12):6668-72.
170. Means TK, Jones BW, Schromm AB, Shurtleff BA, Smith JA, Keane J, et al. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. *J Immunol*. 2001;166(6):4074-82.
171. Means TK, Lien E, Yoshimura A, Wang S, Golenbock DT, Fenton MJ. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol*. 1999;163(12):6748-55.
172. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*. 2002;169(1):10-4.
173. Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Torocsik D, D'Avila H, Dezso B, et al. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol*. 2009;183(2):1337-45.
174. Mahajan S, Dkhar HK, Chandra V, Dave S, Nanduri R, Janmeja AK, et al. *Mycobacterium tuberculosis* modulates macrophage lipid-sensing nuclear receptors PPARgamma and TR4 for survival. *J Immunol*. 2012;188(11):5593-603.
175. Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol*. 1991;146(1):108-13.
176. Malur A, McCoy AJ, Arce S, Barna BP, Kavuru MS, Malur AG, et al. Deletion of PPAR gamma in alveolar macrophages is associated with a Th-1 pulmonary inflammatory response. *J Immunol*. 2009;182(9):5816-22.
177. Contreras VT, Morel CM, Goldenberg S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 1985;14(1):83-96.
178. Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol*. 1985;16(3):315-27.

179. L.H.P. Silva VN. Sobre uma cepa de *T. cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clinica et Biologica*. 1953;20:191–208.
180. Luna-Gomes T, Filardy AA, Rocha JD, Decote-Ricardo D, LaRocque-de-Freitas IF, Morrot A, et al. Neutrophils increase or reduce parasite burden in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages, depending on host strain: role of neutrophil elastase. *Plos One*. 2014;9(3):e90582.
181. Fabrino DL, Leon LL, Genestra M, Parreira GG, Melo RC. Rat models to investigate host macrophage defense against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of innate immunity*. 2011;3(1):71-82.
182. Melo RCN, Weller PF. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histol Histopathol*. 2010;25(10):1341-54.
183. Melo RCN, Dvorak AM, Weller PF. Contributions of Electron Microscopy to Understand Secretion of Immune Mediators by Human Eosinophils. *Microscopy and Microanalysis*. 2010;16(6):653-60.
184. Ueki S, Melo RC, Ghiran I, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion competent eosinophil granules. *Blood*. 2013.
185. Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *The Journal of cell biology*. 1965;27:137-8.
186. Melo RCN, D'Avila H, Bozza PT, Weller PF. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. *Methods Mol Biol*. 2011;689:149-61.
187. Melo RCN. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue and Cell*. 2003;35(1):59-67.
188. Melo RCN, Fabrino DL, Dias FF, Parreira GG. Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflammation Research*. 2006;55(8):342-8.
189. Dias FF, Zarantonello VC, Parreira GG, Chiarini-Garcia H, Melo RC. The Intriguing Ultrastructure of Lipid Body Organelles Within Activated Macrophages. *Microsc Microanal*. 2014:1-10.
190. Dias FF, Chiarini-Garcia H, Parreira GG, Melo RCN. Mice Spermatogonial Stem Cells Transplantation Induces Macrophage Migration into the Seminiferous

- Epithelium and Lipid Body Formation: High-Resolution Light Microscopy and Ultrastructural Studies. *Microscopy and Microanalysis*. 2011;17(6):1002-14.
191. Bozza PT, D'Avila H, Silva AR, Freire-De-Lima CG, Roque NR, Melo RCN, et al. Apoptotic cell uptake induces macrophage lipid body formation: Impact to intracellular pathogen infection. *Journal of Immunology*. 2006;176:S98-S.
192. Melo RCN, Spencer LA, Perez SA, Neves JS, Bafford SP, Morgan ES, et al. Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein. *Lab Invest*. 2009;89(7):769-81.
193. Weller PF, Dvorak AM. Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. *Blood*. 1985;65(5):1269-74.
194. Chiarini-Garcia H, Melo RCN. Light microscopy : methods and protocols. *Methods in molecular biology*,. 2011(689):x, 244 p.
195. Manoharan R, Wang Y, Feld MS. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*. 1996:215-49.
196. Czamara K, Majzner K, Pacia MZ, Kochan K, Kaczor A, Baranska M. Raman spectroscopy of lipids: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2015;46:4-20.
197. D'Avila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, et al. Host Cell Lipid Bodies Triggered by *Trypanosoma cruzi* Infection and Enhanced by the Uptake of Apoptotic Cells Are Associated With Prostaglandin E-2 Generation and Increased Parasite Growth. *J Infect Dis*. 2011;204(6):951-61.
198. Abdalla GK, Faria GE, Silva KT, Castro EC, Reis MA, Michelin MA. *Trypanosoma cruzi*: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. *Experimental parasitology*. 2008;118(4):514-21.
199. Shibata Y, Henriksen RA, Honda I, Nakamura RM, Myrvik QN. Splenic PGE2-releasing macrophages regulate Th1 and Th2 immune responses in mice treated with heat-killed BCG. *J Leukoc Biol*. 2005;78(6):1281-90.
200. Liu LX, Buhlmann JE, Weller PF. Release of prostaglandin E2 by microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. *Am J Trop Med Hyg*. 1992;46(5):520-3.
201. Bandeira-Melo C, Weller PF, Bozza PT. EicosaCell - an immunofluorescent-based assay to localize newly synthesized eicosanoid lipid mediators at intracellular sites. *Methods Mol Biol*. 2011;689:163-81.
202. Bozza PT, Payne JL, Morham SG, Langenbach R, Smithies O, Weller PF. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(20):11091-6.

203. Weibel GL, Joshi MR, Wei C, Bates SR, Blair IA, Rothblat GH. 15(S)-Lipoxygenase-1 associates with neutral lipid droplets in macrophage foam cells: evidence of lipid droplet metabolism. *Journal of lipid research*. 2009;50(12):2371-6.
204. Bozza PT, Bakker-Abreu I, Navarro-Xavier RA, Bandeira-Melo C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2011;85(5):205-13.
205. Bandeira-Melo C, Bozza PT, Weller PF. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2002;109(3):393-400.
206. Soares MJ, De Souza MF, De Souza W. Ultrastructural visualization of lipids in trypanosomatids. *J Protozool*. 1987;34(2):199-203.
207. Van Elssen CH, Vanderlocht J, Oth T, Senden-Gijsbers BL, Germeraad WT, Bos GM. Inflammation-restraining effects of prostaglandin E2 on natural killer-dendritic cell (NK-DC) interaction are imprinted during DC maturation. *Blood*. 2011;118(9):2473-82.
208. Minakuchi R, Wacholtz MC, Davis LS, Lipsky PE. Delineation of the mechanism of inhibition of human T cell activation by PGE2. *J Immunol*. 1990;145(8):2616-25.
209. Goodwin JS, Bankhurst AD, Messner RP. Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. Existence of a prostaglandin-producing suppressor cell. *J Exp Med*. 1977;146(6):1719-34.
210. Freire-de-Lima CG, O. ND, Soares MBP, *al. e*. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature Communications*. 2000;403(6766):199-203.
211. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [citado 2015 Nov 13]. Disponível em: Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.

## 8 Anexos

- Durante o desenvolvimento do projeto dois artigos foram publicados com primeira autoria do doutorando e são apresentados como anexos:

- Toledo DA, Roque NR, Teixeira L, Milan-Garces EA, Carneiro AB, Almeida MR, et al. Lipid Body Organelles within the Parasite *Trypanosoma cruzi*: A Role for Intracellular Arachidonic Acid Metabolism. *Plos One*. 2016;11(8):e0160433.
- Toledo DA, D'Avila H, Melo RCN. Host Lipid Bodies as Platforms for Intracellular Survival of Protozoan Parasites. *Frontiers in immunology*. 2016;7:174.

RESEARCH ARTICLE

# Lipid Body Organelles within the Parasite *Trypanosoma cruzi*: A Role for Intracellular Arachidonic Acid Metabolism

Daniel A. M. Toledo<sup>1</sup>, Natália R. Roque<sup>2</sup>, Lívia Teixeira<sup>1,2</sup>, Erix A. Milán-Garcés<sup>3</sup>, Alan B. Carneiro<sup>2</sup>, Mariana R. Almeida<sup>3</sup>, Gustavo F. S. Andrade<sup>3</sup>, Jefferson S. Martins<sup>4</sup>, Roberto R. Pinho<sup>4</sup>, Célio G. Freire-de-Lima<sup>5</sup>, Patrícia T. Bozza<sup>2</sup>, Heloisa D'Avila<sup>1\*</sup>, Rossana C. N. Melo<sup>1\*</sup>

**1** Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, MG, Brazil, **2** Laboratory of Immunopharmacology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Laboratory of Plasmonic Nanostructures, Molecular Spectroscopy and Structure Group, Department of Chemistry, Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, MG, Brazil, **4** Department of Physics, Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, MG, Brazil, **5** Laboratory of Immunomodulation, Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

\* [rossana.melo@ufjf.edu.br](mailto:rossana.melo@ufjf.edu.br) (RCNM); [davila.bizarro@ufjf.edu.br](mailto:davila.bizarro@ufjf.edu.br) (HD)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Toledo DAM, Roque NR, Teixeira L, Milán-Garcés EA, Carneiro AB, Almeida MR, et al. (2016) Lipid Body Organelles within the Parasite *Trypanosoma cruzi*: A Role for Intracellular Arachidonic Acid Metabolism. PLoS ONE 11(8): e0160433. doi:10.1371/journal.pone.0160433

**Editor:** M Carolina Elias, Instituto Butantan, BRAZIL

**Received:** February 21, 2016

**Accepted:** July 19, 2016

**Published:** August 4, 2016

**Copyright:** © 2016 Toledo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil).

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

**Abbreviations:** LB, lipid body; AA, arachidonic acid; OA, oleic acid; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; COX-2, cyclooxygenase 2; PLIN2/ADRP, perilipin 2/adipose

## Abstract

Most eukaryotic cells contain varying amounts of cytosolic lipidic inclusions termed lipid bodies (LBs) or lipid droplets (LDs). In mammalian cells, such as macrophages, these lipid-rich organelles are formed in response to host-pathogen interaction during infectious diseases and are sites for biosynthesis of arachidonic acid (AA)-derived inflammatory mediators (eicosanoids). Less clear are the functions of LBs in pathogenic lower eukaryotes. In this study, we demonstrated that LBs, visualized by light microscopy with different probes and transmission electron microscopy (TEM), are produced in trypomastigote forms of the parasite *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas' disease, after both host interaction and exogenous AA stimulation. Quantitative TEM revealed that LBs from amastigotes, the intracellular forms of the parasite, growing in vivo have increased size and electron-density compared to LBs from amastigotes living in vitro. AA-stimulated trypomastigotes released high amounts of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and showed PGE<sub>2</sub> synthase expression. Raman spectroscopy demonstrated increased unsaturated lipid content and AA incorporation in stimulated parasites. Moreover, both Raman and MALDI mass spectroscopy revealed increased AA content in LBs purified from AA-stimulated parasites compared to LBs from unstimulated group. By using a specific technique for eicosanoid detection, we immunolocalized PGE<sub>2</sub> within LBs from AA-stimulated trypomastigotes. Altogether, our findings demonstrate that LBs from the parasite *Trypanosoma cruzi* are not just lipid storage inclusions but dynamic organelles, able to respond to host interaction and inflammatory events and involved in the AA metabolism. Acting as sources of PGE<sub>2</sub>, a potent immunomodulatory lipid mediator that inhibits many aspects of innate and adaptive immunity, newly-formed parasite LBs may be implicated with the pathogen survival in its host.

differentiation-related protein; TEM, transmission electron microscopy.

## Introduction

The dynamic nature of lipid bodies (LBs), also known as lipid droplets has led to their recognition as highly active organelles within most cell types involved in different biological functions and containing not only lipids but also many proteins (reviewed in [1–3]). During the last decades, the structure and function of these lipid-rich organelles, which are surrounded by a single layer of phospholipids, have been consistently investigated in mammalian cells and attracted great attention due to their association with human diseases (reviewed in [1–4]).

LB biogenesis is a well-documented process that happens *in vivo* within many types of mammalian cells during inflammatory reactions of varied causes, including infectious diseases with different pathogens such as bacteria, parasites and virus. Host-pathogen interaction leads to increased formation of LBs within cells from the immune system mainly macrophages. In these cells, LBs serve as intracellular sites for metabolic transformation of arachidonic acid (AA) into biologically active inflammatory mediators (eicosanoid derivatives) (reviewed in [5–7]). Thus, LBs in mammalian cells are remarkably linked to inflammatory responses and are considered structural markers of inflammation [5, 6, 8].

In recent years, there has been a renaissance of interest and recognition in the structure, composition and function of lipid-rich organelles formed within pathogenic prokaryotes and lower eukaryotes. In the past, pathogen-derived LBs were mostly considered as lipid deposits with slow rates of turnover (reviewed in [1]). However, evidence begins to accumulate that cytosolic LBs of intracellular bacteria and parasitic protozoa have more dynamic roles. These pathogens are able to usurp host lipids or to encode their own lipid biosynthesis machinery, thus allowing formation of LBs independently of their host (reviewed in [9, 10]). For example, the infection of erythrocytes with the malaria parasite *Plasmodium falciparum* induces LBs formation within the parasite [11]. These newly synthesized LBs accumulate in the food parasite vacuole and are involved in the detoxification of *heme*, enabling parasite persistence [11]. During the infection with *Toxoplasma gondii* [12] or *Mycobacterium tuberculosis* [13], host-derived lipids are imported and used for the synthesis of cholesteryl esters or triglycerides that are deposited in pathogen LBs. More recently, it was demonstrated that LBs numbers as well as the expression of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha (PGF<sub>2</sub>α) synthase (PGFS) increases during the development of *Leishmania infantum chagasi* to a virulent metacyclic stage [14].

Here, we studied the formation of LBs within the parasite *Trypanosoma cruzi* and the ability of parasite-derived LBs to produce eicosanoid in response to exogenous AA. *T. cruzi* is an obligate intracellular parasite capable of infecting different types of nucleated cells of humans and warm-blooded animals, and responsible for Chagas' disease, which remains a major problem with a great impact on public health in Latin America [15].

We demonstrate, for the first time, that *T. cruzi* LBs are formed and respond to both host interaction and AA-stimulation, are able to incorporate AA and can be sources of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), a potent immunomodulatory lipid mediator known to inhibit many aspects of innate and adaptive immunity [16–18]. Our results raise the possibility that pathways of AA metabolism of potential pathophysiological significance may exist within human-living *T. cruzi*.

## Materials and Methods

### Animals and infection

Peritoneal macrophages from uninfected C57BL/6 mice were plated in RPMI-1640 medium plus 10% fetal bovine serum, 1% streptomycin/penicillin and L-glutamin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Cells ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were then infected with metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi* clone Dm 28c at a ratio of 5:1 parasite:cell [19]. After 1 h of incubation, macrophages



and free (non-interiorized) parasites in the medium were citospun onto slides. At the end of the exposure period (24h), non-interiorized parasites were removed by repeated washings. For in vivo infection, female Holtzman rats aged 27–30 days (obtained from Universidade Federal de Minas Gerais animal facility) were inoculated intraperitoneally with of  $3 \times 10^5$  of *T. cruzi* Y strain as described elsewhere [20]. Fresh blood samples taken from the tail showed living trypomastigotes in all animals at 12 days after inoculation. At this time, animals were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber and fragments of the heart (atria) were processed for both histopathological and ultrastructural studies as described below.

## Ethics statement

This study was carried out in full accordance with all international and Brazilian accepted guidelines and was approved by the Oswaldo Cruz Foundation Ethics Committee on Animal Use (CEUA-*Comissão de Ética no Uso de Animais*, under protocol CEUA: P-0069). CEUA follows the Brazilian national guidelines recommended by CONCEA (Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal). Animals were monitored daily for survival and well-being status (home cage evaluation, body condition, skin lesions, mobility and general conditions such as diarrhea). No animals died prior to the experimental endpoint (12 days of infection).

## Culture of trypomastigotes

*T. cruzi* Dm 28c strain was obtained and kept in the laboratory as previously described [21]. *T. cruzi* cultures was grown in Brain Heart Infusion medium (BHI) (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) at 27°C in a B. O. D. (Biochemical Oxygen Demand) incubator (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) for 7 days, containing approximately 100% of epimastigotes. At the end of the exponential phase, parasites were centrifuged at 2200 rpm for 15 min at 10°C, resuspended in artificial triatomine urine (TAU) (190 mM NaCl, 8 mM phosphate buffer pH 6.0, 17 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>), and incubated for 2 h at room temperature (RT). The parasites were diluted to a final concentration of  $5 \times 10^6$  parasites ml<sup>-1</sup> in TAU supplemented with 2.5% (v/v) sodium bicarbonate 1.4%, 500 units penicillin mL<sup>-1</sup>, 10 mM L-proline (TAU-P medium) and incubated at 27°C in tightly closed culture flasks in a B. O. D. incubator for 5 days, obtaining approximately 100% of metacyclic trypomastigotes [22].

## Trypomastigote stimulation and viability

Trypomastigotes ( $1.7 \times 10^6$  cells per ml) were incubated in 24 well-plates with AA (1.5–10 μM), oleic acid -OA- (1 and 5 μM), or vehicle (0.1% ethanol) for 1 or 24 h at 27°C. Subsequently, trypomastigotes ( $1 \times 10^5$  cells per slide) were cytocentrifuged (550 rpm for 5 min) onto glass slides. Cell viability, determined by the trypan blue dye exclusion at the end of each experiment, was always greater than 90%.

## Cells and tissue preparation for TEM

Samples from cultured trypomastigotes alone were immediately fixed in a mixture of phosphate buffer 1%, pH 7.3 and freshly prepared aldehydes (1% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde) [23] for 1 h, at room temperature (RT), washed in the same buffer and centrifuged at 1500 g for 1 min. Samples were then re-suspended in molten 2% agar in phosphate buffer 1% and quickly re-centrifuged. To obtain optimal morphology, *T. cruzi*-infected macrophages directly on the slide surface were fixed as above, after 24 h of infection. Atria fragments

collected from infected animals were also fixed in the same fixative for 4 h. After fixation, all samples were kept in phosphate buffer at 4°C for subsequent EM procedures.

## Histological analyses

Fragments of the heart (atria) from controls and infected animals were fixed in 4% paraformaldehyde in buffered phosphate, pH 7.3, 0.1 M for 24 h, dehydrated and embedded in plastic resin-glycol metacrylate (Leica, Heidelberg, Germany) as previous work [24]. Semi-serial 5- $\mu$ m-thick sections were cut on a microtome (RM 2155; Leica) stained by hematoxylin and eosin and examined for evaluation of the inflammatory processes and parasitism.

## TEM

Cultured trypomastigotes alone, *T. cruzi*-infected macrophages and heart fragments from infected animals were fixed in a mixture of freshly prepared aldehydes (1% paraformaldehyde and 1.25% glutaraldehyde) in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 h (isolated cells) or 4h (tissue) at RT and processed as before [25]. Samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide in Sym-Collidine buffer (pH 7.4) for 2 h at RT. After washing with sodium maleate buffer (pH 5.2), pellets were stained en bloc in 2% uranyl acetate in 0.05 M sodium maleate buffer (pH 6.0) for 2 h at RT and washed in the same buffer as above before dehydration in graded ethanol's and infiltration and embedding with a propylene oxide-Epon sequence (Eponate 12 Resin; Ted Pella, Redding, CA, USA). After polymerization at 60°C for 16 h, thin sections were cut using a diamond knife on an ultra-microtome (Leica, Baden-Württemberg, Germany). Sections were mounted on uncoated 200-mesh copper grids (Ted Pella) before staining with lead citrate and viewed with a transmission electron microscope (CM 10; Philips, or Tecnai-G2-20-FEI 2006, Eindhoven, the Netherlands) at 60 kV.

## TEM quantitative analyses

In addition to qualitative observations, quantitative study was made in electron micrographs. The area and electron-density of cytoplasmic LBs within parasites were evaluated in thin sections of peritoneal and heart macrophages infected with amastigotes. LBs were classified as Strongly Electron-Dense (SED), Electron-Dense (ED) or Electron-Lucent (EL) according to a grayscale (0–85, 86–170, 171–255, respectively) where 0 is absolute black and 255 absolute white. For LB evaluation, a total of 36 electron micrographs, 50 parasites and 125 LBs were carefully analyzed. Quantitative EM analyses were also performed in electron micrographs randomly taken from metacyclic trypomastigotes to investigate the occurrence of morphological alterations. For this analysis, a total of 50 electron micrographs (25 from control and 25 from AA-stimulated) were used for evaluation of the parasite area and length. All analyses were performed using the ImageJ<sup>®</sup> software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

## LB staining

Different techniques were used for LB staining and quantification. For most studies, trypomastigotes were stained with osmium tetroxide and enumerated as before [26]. LBs within trypomastigotes were also visualized with different fluorescent probes. Cells were incubated with 1 $\mu$ L BODIPY493/503 dye (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 1 h at 37°C or with Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo[ $\alpha$ ]phenoxazine-5-one) (Sigma-Aldrich) (1/10,000 from a stock solution of 0.1 mg/mL in acetone) [26]. Alternatively, analysis of LBs were performed by incubating the cells with 0.5% Oil Red O (1-([4-(Xylylazo)xylyl]azo)-2-naphthol) (Sigma Aldrich) for 10 min at 60°C.

After incubation, trypomastigotes were washed twice in  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS (HBSS<sup>-/-</sup>), cytospun onto slides, and fixed in 3.7% formaldehyde at RT for 10 min. Slides were mounted with VECTASHIELD<sup>®</sup> mounting medium containing DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for nuclear recognition, and examined under BX-51 fluorescence microscopy and digital color camera XC-50, using a x100 objective lens (Olympus, Tokyo, Japan).

## LB purification

LB purification from control and AA-stimulated (7.5  $\mu\text{M}$  trypomastigotes was performed by modifications of prior methods [27]. The trypomastigotes ( $1.5 \times 10^9$ ) in 20 mM/L Tris, 1 mM/L EDTA, 1 mM/L EGTA, 100 mM/L KCl buffer (pH 7.4) containing 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  benzamidin, 0.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pepstatin, and 0.1 mM/L phenylmethylsulfonylfluoride were disrupted by nitrogen cavitation at 700  $\Psi$  for 5 min at 4°C. The homogenates were centrifuged at 1800 rpm for 5 min to remove the nuclei. The supernatants were overlaid sequentially with 1.5 mL each of 0.27 M/L sucrose buffer, 0.135 M/L sucrose buffer, TEE solution [25 mM/L Tris-HCl, 1 mM/L EDTA, and 1 mM/L EGTA (pH 7.4)] and centrifuged at 35,000 rpm at 4°C for 70 min. The LBs were collected from the first and second top fractions. After that, a lactate dehydrogenase activity assay was performed to demonstrate that the samples were free of cytoplasmic contaminating contents.

## Raman spectroscopy

Trypomastigotes ( $2 \times 10^6$  cells per mL) were stimulated for 1h with 7.5  $\mu\text{M}$  AA as above and centrifuged. Cells were then resuspended in 3.7% formaldehyde overnight, pelleted and analyzed by Raman spectroscopy without any labeling. Raman spectra of cells were recorded using a FT-Raman spectrometer model RFS 100S coupled to RamanScopeIII (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany), equipped with a ND:YAG laser with an excitation line at 1064 nm. For acquisition of the spectra, the laser power was adjusted to 500 mW (at source) and a good signal/noise ratio was obtained by performing 2048 scans in the region of 3500–50  $\text{cm}^{-1}$  with a spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ . The acquisition of Raman spectra was performed by OPUS 6.0 software (Bruker).

To investigate the presence of AA directly in LBs, purified LBs from untreated and 7.5  $\mu\text{M}$  AA-treated groups were placed over 20 mm  $\text{CaF}_2$  windows (cat. number 63207; Edmund Optics, Barrington, NJ, USA) and the data collected with a laser power of 20 mW, 50 s integration time and 5 co-additions, without any labeling. The Raman spectra were obtained in a Senterra Raman spectrometer (Bruker) based in a 180° backscattering configuration and using a 50x objective and the 632.8 nm wavelength of He-Ne laser output as excitation. A spectral resolution of 3–5  $\text{cm}^{-1}$  and slit width of 50x1000  $\mu\text{m}$  were chosen.

## MALDI mass spectroscopy

All MALDI spectra were obtained using a time of flight mass spectrometer. Mass spectrometry matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) [28, 29] experiments were performed using a pulsed nitrogen laser at 337 nm of a Shimadzu Biotech Axima Performance MALDI-TOF at the Physics Department, Federal University of Juiz de Fora. The matrix was alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid ( $\alpha$ -CHCA), dissolved in acetonitrile-HPLC/milli-Q water quality (50:50 v:v) at a concentration of about  $5 \times 10^{-2}$  mol/L. Samples of purified LBs were dissolved in phosphate buffer and 10  $\mu\text{L}$  of this final sample solution were added to 10  $\mu\text{L}$  of the matrix solution. This mixture (~0.5  $\mu\text{L}$ ) was then deposited in the stainless steel multiprobe and allowed to dry before introduction into the mass spectrometer. A typical starting laser

power is 40–50. The instrument was set in the high-resolution in positive reflector ion mode and spectra were taken from 0 to 500 m/z. The experimental setup includes an automatic sample manipulator, where 200 scans were accumulated with 20 repetitions each.

### Macrophage culture and BCG *in vitro* infection

Infected macrophages were used as positive controls for Western Blotting analyses of eicosanoid-forming enzymes as below. For the *in vitro* infection, peritoneal macrophages from C57BL/6 mice were harvested with sterile RPMI 1640 cell culture medium. Cells ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were allowed to adhere in culture plates (6 wells) for 2 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and were vigorously washed twice with PBS to remove nonadherent cells. Macrophages were infected with BCG (*Mycobacterium bovis* BCG (Moreau strain) vaccine from the Fundação Athaulpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brazil), multiplicity of infection (MOI) 1:1 and incubated for 24 h at 37°C in a CO<sub>2</sub> atmosphere with RPMI 1640 cell culture medium containing 2% Fetal Bovine Serum (FBS) as before [30].

### Western blotting

Macrophages ( $1 \times 10^6$  cells) and trypomastigotes lysates ( $3 \times 10^6$  cells) were prepared under reducing and denaturing conditions and subjected to SDS-PAGE. Samples were submitted to electrophoresis in 10% acrylamide gradient SDS-PAGE gels. After transferring onto nitrocellulose membranes, nonspecific binding sites were blocked with 5% nonfat milk in TBST (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20). Membranes were probed with the polyclonal antibody (Ab) anti-PGE synthase (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, S-16; sc-12268), anti-cyclooxygenase-2 (COX-2) (Santa Cruz Biotechnology, C-20; sc-1745) and anti-actin monoclonal Ab (BD Transduction Laboratories, 612657) in TBST with 1% nonfat dry milk. Proteins of interest were then identified by incubating the membrane with HRP-conjugated secondary Abs in TBST, followed by the detection of antigen-Ab complexes by Super-signal Chemiluminescence (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA, ECL™ Prime Western Blotting System, RPN2232). A colleague blind to the identity of the sample performed the spotting and the analysis parameters.

### Immunodetection of PGE<sub>2</sub> at its sites of production

Immunolocalization of PGE<sub>2</sub> at its *in vivo* sites of production was performed in AA-stimulated trypomastigotes [31]. Briefly, unstimulated (kept in vehicle) and AA-stimulated (7.5 μM) cells were incubated, after 1h of stimulation, with EDAC (*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride) (Sigma-Aldrich), at 37°C. Besides the precise positioned coupling of an immuno-detectable eicosanoid at its sites of formation, EDAC enables: (I) the ending of cell stimulation step; (II) cell fixation; (III) cell permeabilization, allowing the penetration of both anti-eicosanoid and the detecting fluorochrome-conjugated antibodies into cells; and, importantly, (IV) the relative preservation of lipid domains, such as membranes and droplets, which dissipate with air drying or commonly used alcohol fixation [31]. Trypomastigotes were then washed with HBSS, cytospun onto glass slides, and incubated with mouse anti-PGE<sub>2</sub> (1/100) Ab (Cayman Chemical—414013, Ann Arbor, MI, USA) in 0.1% normal goat serum and guinea pig polyclonal anti-mouse perilipin 2/adipose differentiation related protein (PLIN2/ADRP) Ab (Fitzgerald - 20R-AP002) (1/ 1000) in 0.1% normal donkey serum simultaneously for 1 h at RT. IgG<sub>1</sub>, kappa monoclonal Ab isotype control, clone MOPC 21 (Sigma Aldrich) and non immune guinea pig serum were used as controls for PGE<sub>2</sub> and PLIN2/ADRP Abs, respectively. Cells were washed twice and incubated with secondary Abs, goat anti-mouse conjugated with AlexaFluor-488 (1/1000) (Molecular Probes), and CY3-conjugated donkey anti-guinea pig

(1/1000) (Jackson Immuno Research Laboratories). The slides were then washed (three times, 10 min each) and mounted with Vectashield<sup>®</sup> mounting medium containing DAPI (Vector Laboratories). Cells were analyzed by both phase-contrast and fluorescence microscopy. For colocalization quantitative study, fluorescence images were taken and colocalizations were quantified for 12 cells. Quantifications were determined using *ImageJ* software by calculating the Pearson's correlation coefficient that measures the degree of linear dependence between the localization of a red signal and the localization of a green signal in the same cell [32].

## PGE<sub>2</sub> evaluation

PGE<sub>2</sub> levels were measured directly in the supernatant from cell-free cultures from metacyclic trypomastigotes obtained 24 h after AA (7.5 μM) stimulation. PGE<sub>2</sub> was assayed in the cell-free supernatant by EIA, according to the manufacturer's instructions (PGE<sub>2</sub> enzyme-linked immunoassay (EIA) kit, Cayman Chemical).

## Statistical analysis

Data were compared using the Student-Neuman-Keuls test and expressed as mean values ± SEM ( $P < 0.05$ ). Analyzes were performed using the software Prism 6.01 (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

## Results

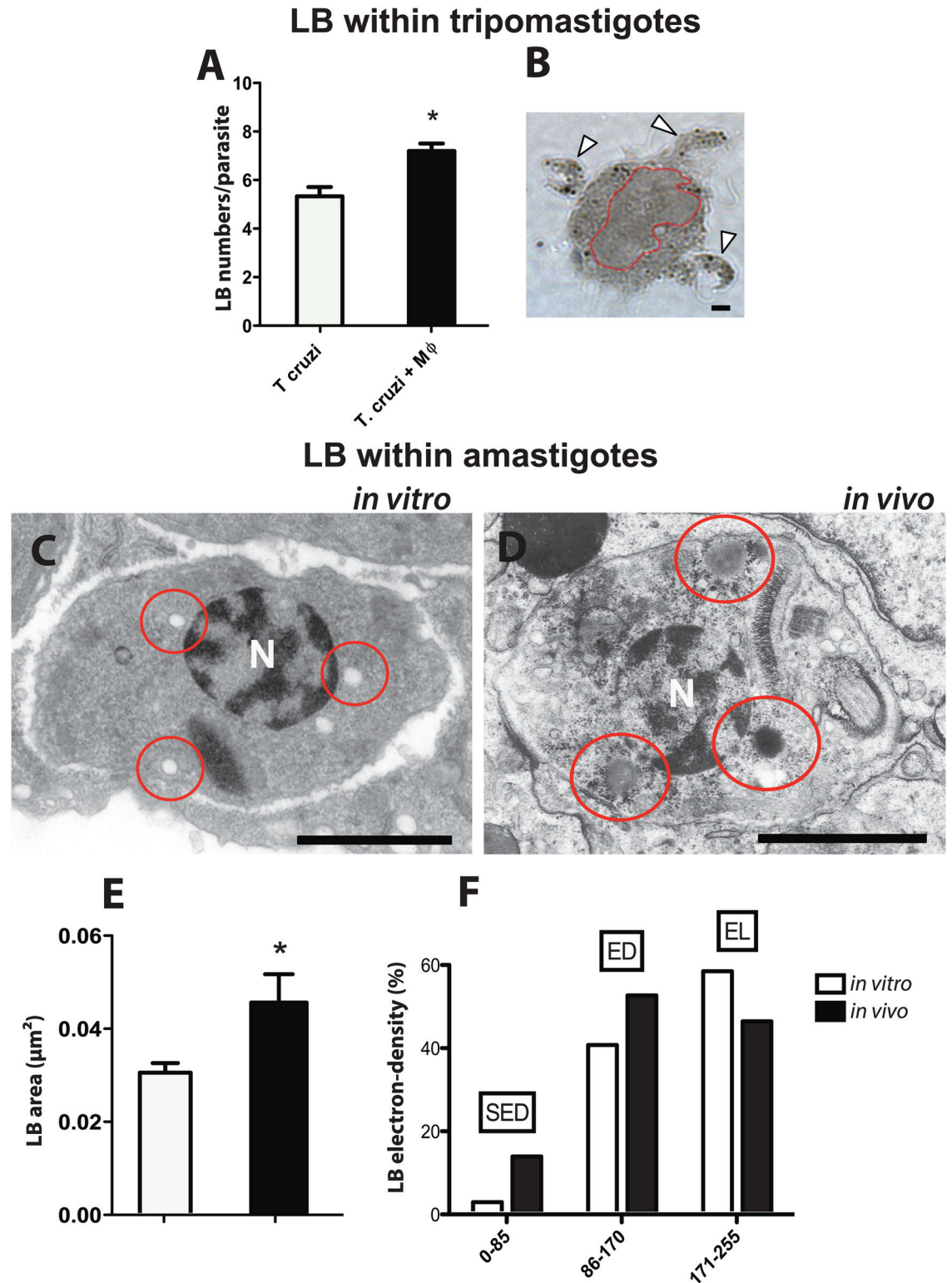
### LBs are formed within the parasite in response to host interaction

LBs are remarkably produced in host cells, mainly in macrophages, in response to *T. cruzi* infection [33–36]. We wondered if LBs could also be formed in the parasite cytoplasm in response to the interaction with these inflammatory cells. Metacyclic trypomastigote forms cultured in the presence of peritoneal macrophages for 1 h showed indeed a significant increase of LB numbers compared to trypomastigotes alone (Fig 1A and 1B). This indicates that the contact of *T. cruzi* infective forms with inflammatory host cells might modulate LB formation in the parasite.

*T. cruzi* grows and reproduce inside host cells, as amastigotes. Therefore, we next investigated the ultrastructure of LBs in these intracellular forms of the parasite by TEM in both peritoneal (after 24 h of the in vitro infection) and heart inflammatory macrophages (after 12 days of the acute in vivo infection). At these time points of the infection, there is consistent division of amastigotes. Moreover, the parasitism peak in the heart, a target organ of the Chagas' disease, is observed at day 12 of the acute infection in conjunction with an elevated number of infiltrating activated macrophages [24, 37]. Histopathological analysis of the myocardium at this time of the infection confirmed the presence of prominent mononuclear inflammatory processes and amastigote nests (S1 Fig)

LBs within amastigotes were observed as round, typical non-membrane bound organelles with varied electron-density (Fig 1C and 1D). Interestingly, LBs in amastigotes growing in vivo within macrophages infiltrated in the myocardium (Fig 1D) showed higher sizes compared to LBs formed within amastigotes living in cultured macrophages (Fig 1C) as shown by morphometric analyses (Fig 1E).

Since LBs formed within host cells such as macrophages change electron-density during inflammatory responses (reviewed in [38]), we next analyzed electron-density aspects of LBs formed within amastigotes. Based on our previous studies [34, 38, 39] and using a software for analyzing different electron-density gradations [39], LBs were classified as strongly electron-dense (SED), electron-dense (ED) or electron-lucent (EL) organelles. Quantitative TEM studies



**Fig 1. *Trypanosoma cruzi* lipid bodies (LBs) show variation in number, size and electron-density in response to the interaction with host cells.** (A) Trypomastigotes cultured with peritoneal macrophages show increased numbers of cytosolic LBs compared to parasites alone, after 1h of interaction. (B) At this time, several trypomastigotes (arrows) can be seen in contact with the macrophage surface. Macrophage nucleus was outlined in red. (C, D) Transmission electron microscopy (TEM) of *T. cruzi* amastigotes within a peritoneal (*in vitro* infection after 24h) (C) and heart inflammatory

macrophage (in vivo infection after 12 days) (D). Amastigote LBs are indicated (circles). (E) LB sizes are significantly higher in amastigotes growing in vivo (black bar) compared to amastigotes LBs living in vitro (white bar). (F) LBs from amastigote forms of the parasite within heart macrophages are more electron-dense compared to amastigote LBs from peritoneal macrophages. Cultured peritoneal macrophages and heart macrophages were fixed and processed for TEM [25]. A total of 36 electron micrographs, 50 parasites and 125 LBs were evaluated. LBs were classified as Strongly Electron-Dense (SED) Electron-Dense (ED) or Electron-Lucent (EL) by using the software ImageJ<sup>®</sup> as in materials and methods. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$  (B); 5  $\mu\text{m}$  (C, D). \*  $P < 0.05$ .

doi:10.1371/journal.pone.0160433.g001

revealed that LBs from amastigotes living in heart macrophages (in vivo infection) were more electron-dense, with elevated numbers of SED and ED LBs compared to LBs from peritoneal macrophages (in vitro infection) (Fig 1F; compare Fig 1C and 1D).

Taken together, these results show that parasite LBs are not inert but dynamic organelles, able to respond to host interaction and inflammatory events.

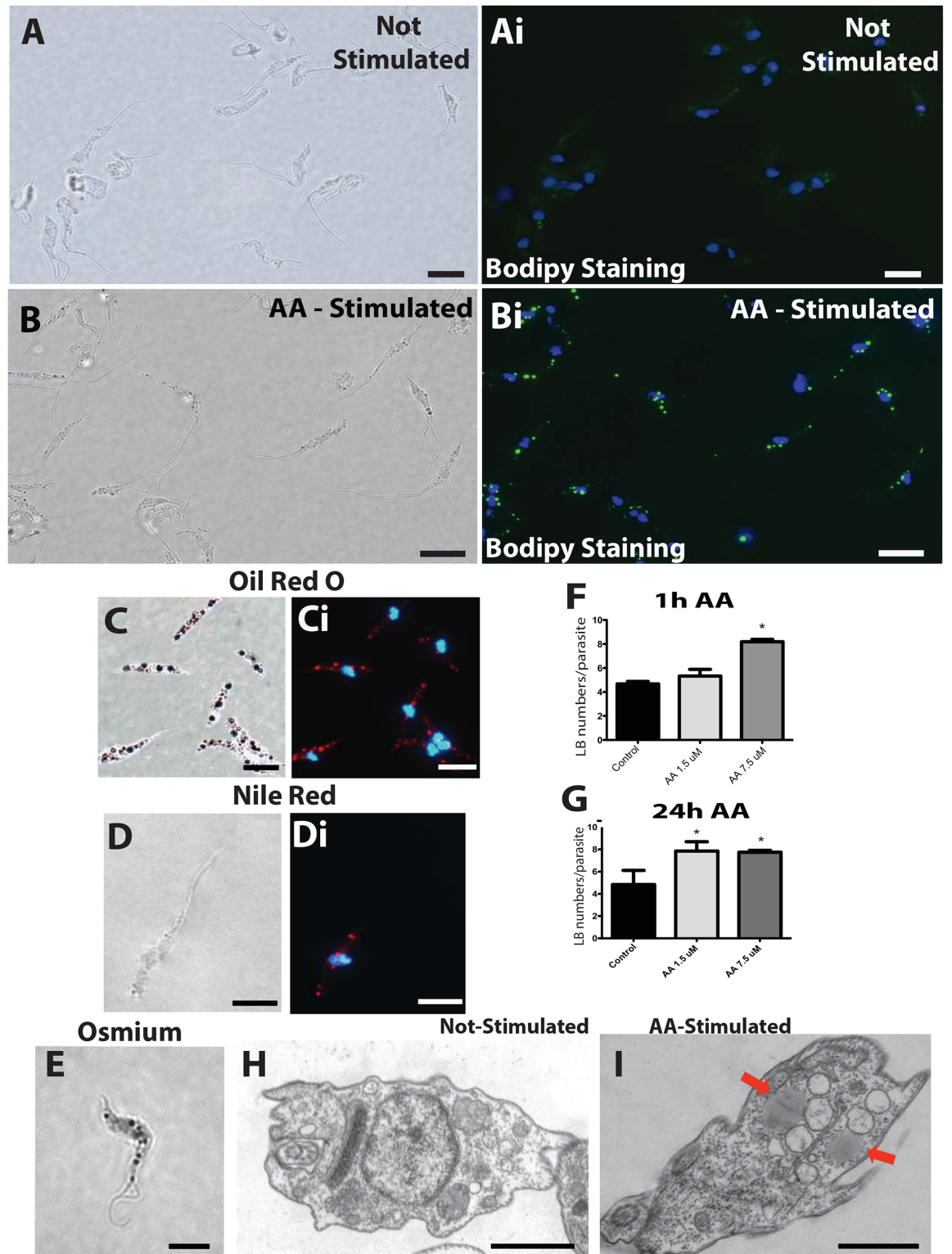
### AA induces rapid LB formation in *T. cruzi* infective forms

Earlier studies demonstrated that AA is a potent stimulator of LB formation in mammalian cells [40–41] and that these organelles incorporate AA, mainly esterified in phospholipids [42–44]. The effect of AA on parasite LB formation was investigated. Four different staining techniques were used for LB visualization: osmium tetroxide, which stains phospholipids and three fluorescent probes (BODIPY, Oil Red O and Nile Red), which are more specific for neutral lipids [5, 26]. All methods enabled clear visualization of LBs within the parasite (Fig 2A–2E). Moreover, by enumerating LBs with osmium staining, it was observed a dose-dependent increase in LB numbers in AA-stimulated trypomastigotes compared to unstimulated controls (kept in vehicle) after 1 or 24 h, with a maximum LB formation at the dose of 7.5  $\mu\text{M}$  (Fig 2F, 2G and S2 Fig). Trypomastigote forms of the parasite were also evaluated by TEM (Fig 2H and 2I). LBs were seen as typical, cytoplasmic non-membrane bound organelles (Fig 2I, arrows). AA had no effect on the general morphology of stimulated parasites compared to unstimulated ones as shown by qualitative and quantitative ultrastructural analyses (S3 Fig)

### AA is incorporated into LBs

To explore the molecular properties of lipids within the parasites, we next used Raman spectroscopy. This technique provides information about the structure of chemical components present in the biological sample, with the advantages of minimal sample preparation, without need of labeling and free from water interference [45]. The result is showed by the Raman spectrum, where the intensity of the signals is proportional to the relative concentration of a compound [45]. Fig 3 shows Raman spectra of AA (positive control), unstimulated and AA-stimulated parasites. The spectrum of stimulated cells differed from the spectrum of unstimulated cells by increased relative intensity of the bands at 3015 and 2929  $\text{cm}^{-1}$ , which are characteristic of AA-lipid spectra [46]. The band exhibited at 3015  $\text{cm}^{-1}$  which corresponds to the = C-H stretching, indicates higher content of unsaturated lipids in stimulated cells (Fig 3). This band is more prominent in AA than in other fatty acids [46]. AA also has a broad and intense band at around 2920  $\text{cm}^{-1}$  region due to C-H<sub>2</sub> stretching vibrations. The observed increase in the relative intensity of the 2929  $\text{cm}^{-1}$  in the stimulated cells may be due to the presence of the 2920  $\text{cm}^{-1}$  broad band of AA. Therefore, the increase in the relative intensity of the bands at 3015 and 2929  $\text{cm}^{-1}$  are indicative of the AA incorporation. These results showed that AA is incorporated into parasites, induces LB formation and that these organelles are likely involved in the AA metabolism.

The Raman spectra obtained from the entire parasite have also contribution from different types of lipids and from other biomolecules, as for example proteins and DNA, which can



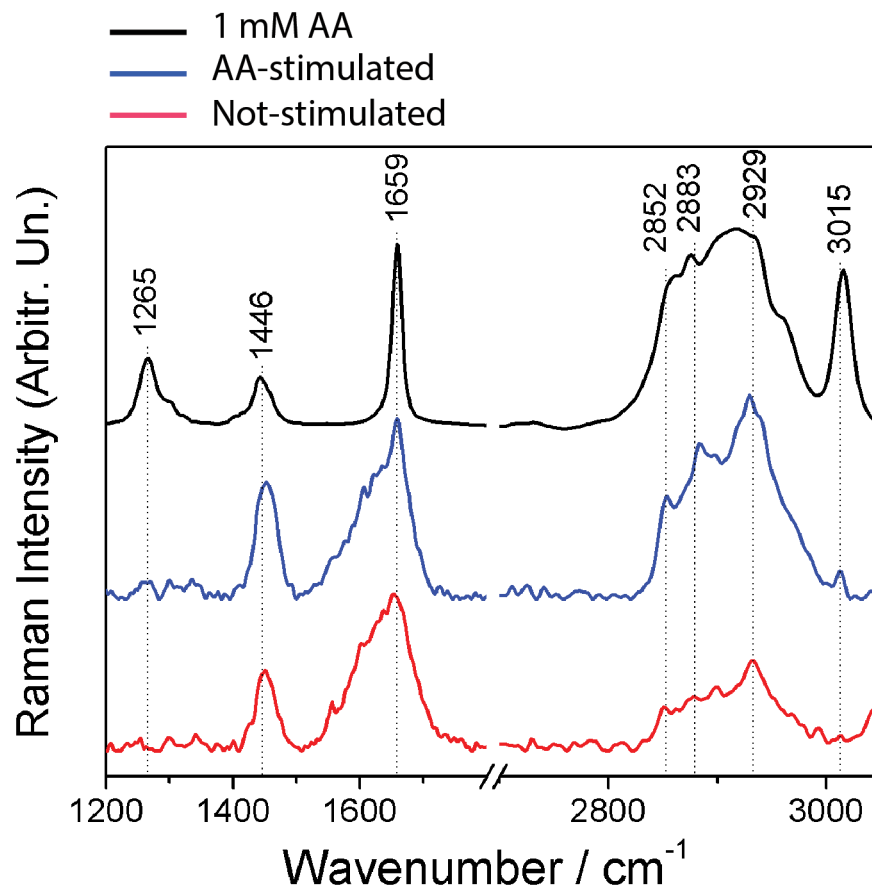
**Fig 2. Lipid bodies (LBs) are formed within trypomastigotes in response to arachidonic acid (AA) stimulation.** Metacyclic trypomastigotes were stained with BODIPY (A, Ai, B, Bi), Oil Red O (C, Ci), Nile Red (D, Di) or osmium (E) for LB detection. Panels A and Ai; B and Bi; C and Ci, and D and Di represent identical fields of trypomastigotes seen by contrast phase and fluorescence microscopy after 1 h of incubation with vehicle (A, Ai) or 7.5 μM AA (B-D). Note in (C) that Oil Red O staining enables visualization of LBs at both contrast phase and fluorescence microscopy. Parasite nuclei are visualized after



DAPI staining in Ai, Bi, Ci and Di. In (E), osmium staining is observed under bright field microscopy. (F, G) Number of LBs within trypomastigotes after stimulation with exogenous AA for 1 h (F) or 24 h (G). Bars represent the mean  $\pm$  SEM of LB per parasite from 50 consecutively counted parasites from at least 4 independent pools. \*  $P < 0.05$  between groups. Cells were enumerated after osmium staining. In (H, I), trypomastigotes are observed by transmission electron microscopy. Typical non-membrane bound LBs (arrows) are seen in the cytoplasm after stimulation with AA (I). Scale bar, 5  $\mu\text{m}$  (A-E); 1  $\mu\text{m}$  (H, I).

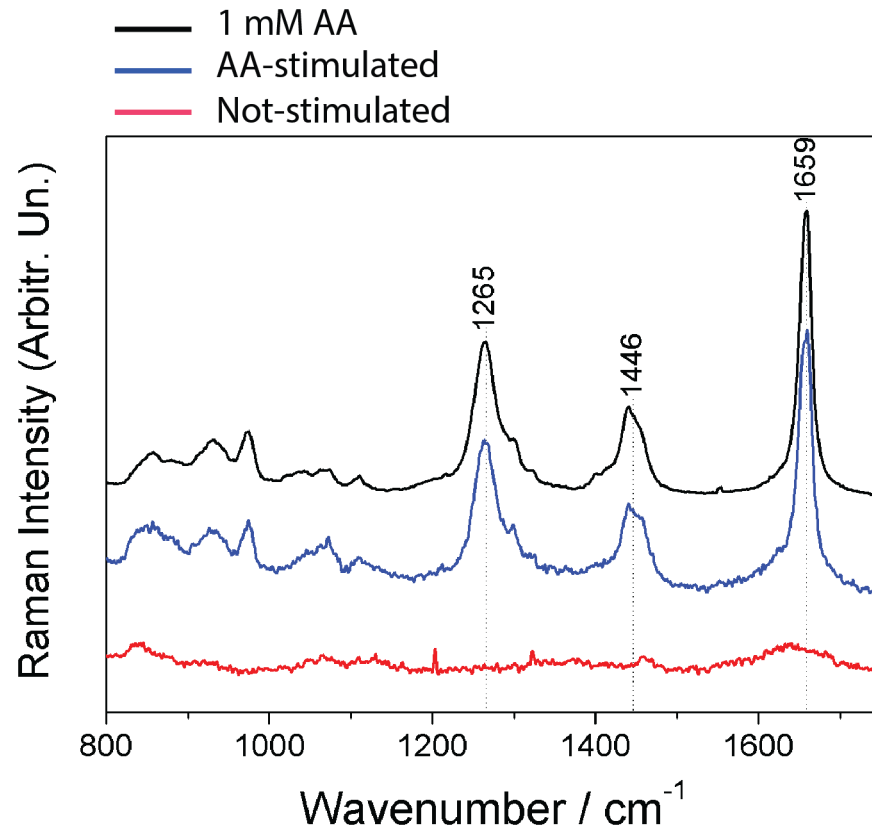
doi:10.1371/journal.pone.0160433.g002

make difficult to obtain the relative contribution of different lipids to the Raman spectra. To overcome this difficulty, we isolated LB using subcellular fractionation from unstimulated and AA-stimulated parasites and used Raman directly on LBs. This technique has been used as a valuable tool to study LBs in physiology and pathology [47]. The results are shown in Fig 4. By using this approach, it was possible to determine that the major contribution to the LB comes from the presence of AA. As shown in Fig 4, the spectrum of AA in solution is similar to the previous published in the literature [47]. It has the more intense bands at  $1265\text{ cm}^{-1}$  (= C-H in plane bending),  $1446\text{ cm}^{-1}$  (C-H bending) and  $1659\text{ cm}^{-1}$  (C = C stretching) [47]. The spectrum of the non-treated LB fraction did not show any spectral characteristic of the AA (Fig 4). However, the spectra of the LB fraction obtained from parasites treated with AA showed the same spectral profile than that of the AA in solution, which demonstrate the presence of the AA in the sample (Fig 4).



**Fig 3. Raman spectroscopy detects higher content of unsaturated fatty acids and arachidonic acid (AA) in stimulated parasites compared to control unstimulated cells.** Raman spectra of AA (black), AA-stimulated (blue) and unstimulated (red) parasites. Parasites were stimulated or not for 1h with  $7.5\text{ }\mu\text{M}$  AA, fixed and analyzed by Raman spectroscopy without labeling.

doi:10.1371/journal.pone.0160433.g003



**Fig 4. Arachidonic acid (AA) is incorporated into parasite lipid bodies (LBs).** Raman spectra of 1 mM AA in aqueous solution (black) and from LB fractions isolated by subcellular fractionation from unstimulated (red) and AA-stimulated (blue) parasites show that the chemical composition of LBs is due to AA and not to the presence of other fatty acids. The spectra were normalized using the band at 1659 cm<sup>-1</sup>. Samples were analyzed without any labeling. Data are representative of 2 independent experiments.

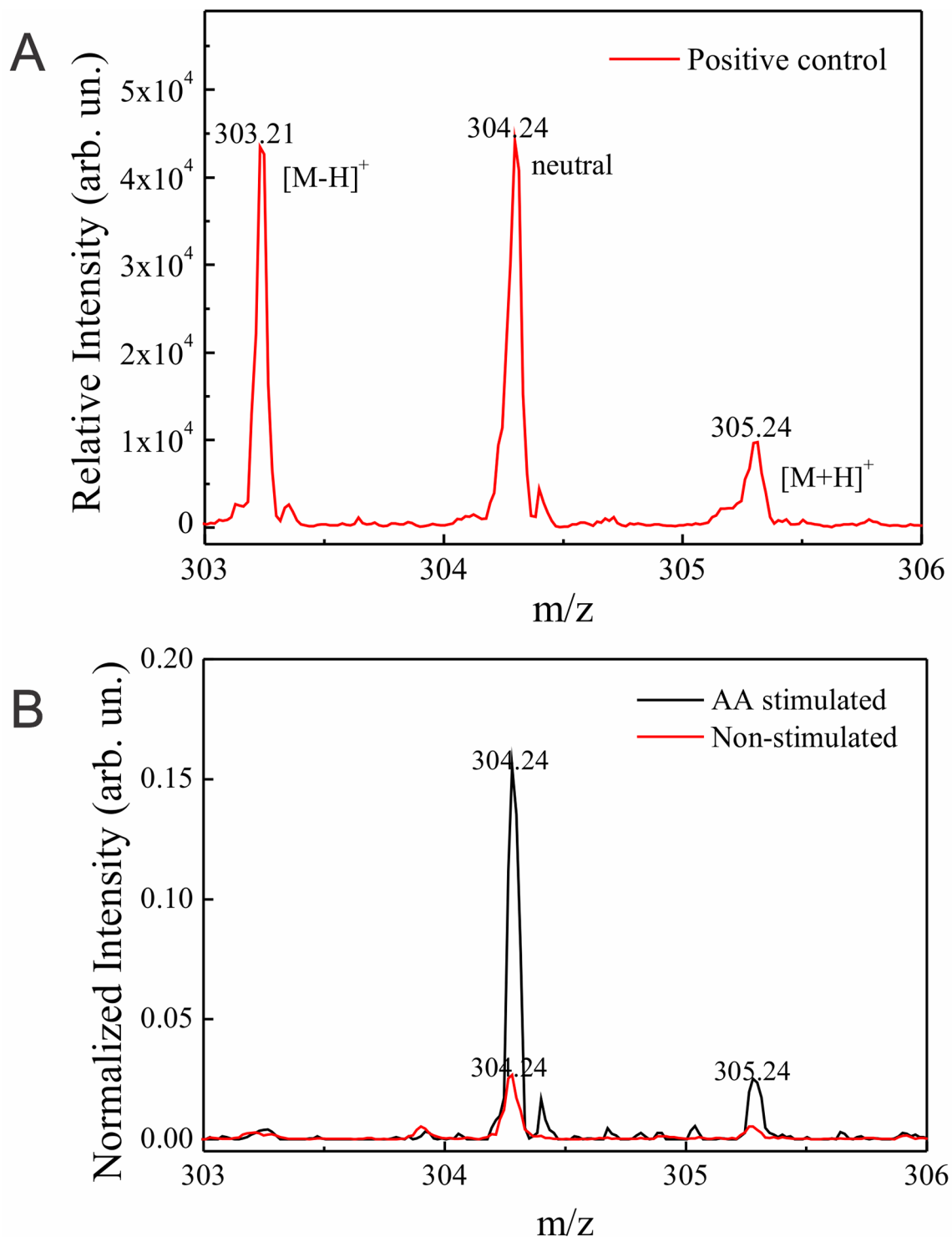
doi:10.1371/journal.pone.0160433.g004

The presence of increased AA in the LB fraction purified from the stimulated group was next confirmed by MALDI-TOF mass spectroscopy (Fig 5). First, a spectrum from a pure AA solution ( $m/z$  304.24) was acquired as a positive control (Fig 5A). Second, this technique identified the  $m/z$  304.24 peak related to the AA in both non-stimulated and AA-stimulated samples. In order to verify the existence of a fluctuation at the  $m/z$  304.24 peak of the non-stimulated and AA-stimulated sample, the yield related to this peak was calculated by dividing the peak area by the total area of the corresponding spectrum, as before [48]. Thus,  $m/z$  304.24 peak from the non-stimulated and AA-stimulated samples showed a related yield of 0.0035 and 0.018 respectively, that is, 5 times higher in the stimulated group (Fig 5B, black line) compared to the value obtained from the non-stimulated sample (Fig 5B, red line).

Therefore, by using different approaches, our results consistently demonstrate that LBs are cytoplasmic sites of AA accumulation in the parasite *T. cruzi*.

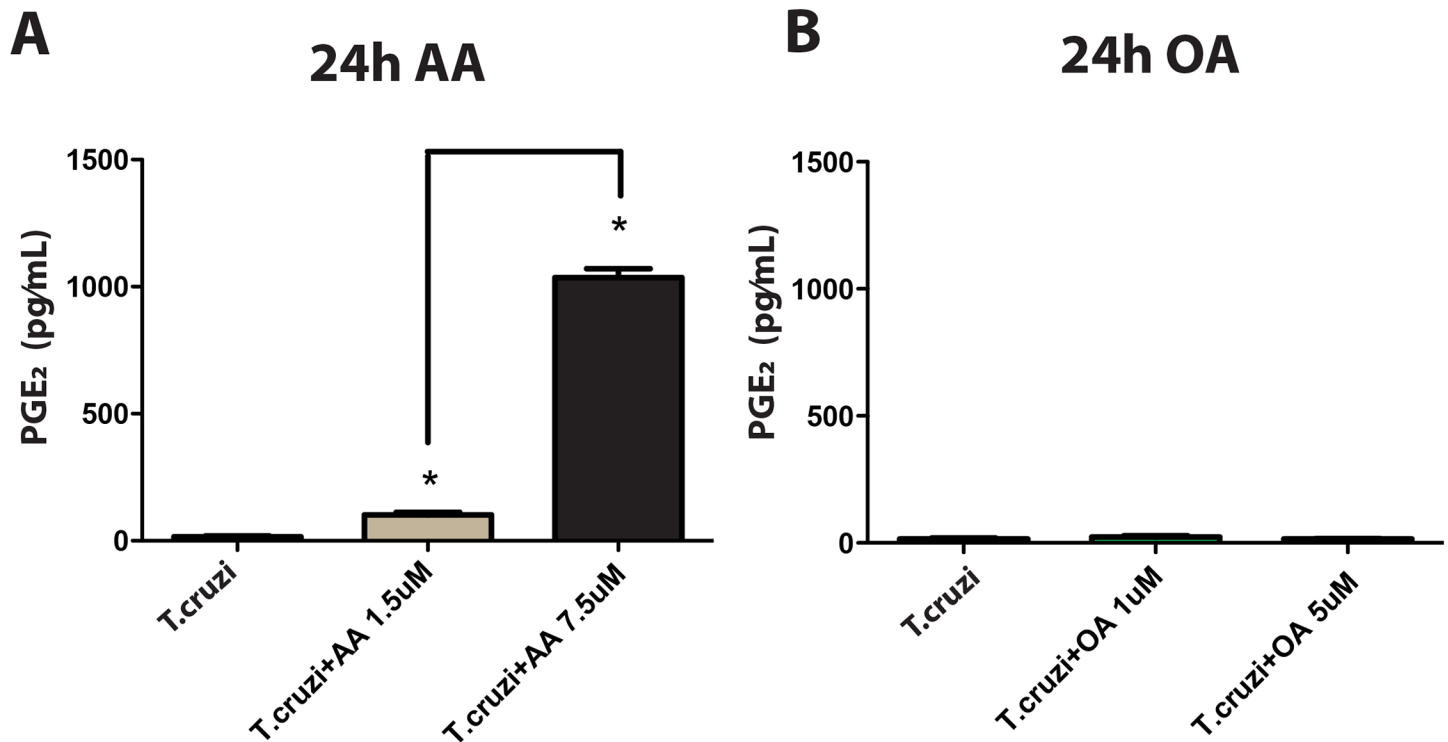
### AA-stimulated parasites generate PGE<sub>2</sub>

Biologically active eicosanoids such as PGs are derived from AA [8, 49]. We next investigated if the parasite would produce PGs upon AA stimulation. Since PGE<sub>2</sub> is consistently synthesized during *T. cruzi* infections [35, 50], we evaluated the production of this PG by trypomastigotes. Incubation of these parasite forms with AA produced high levels of PGE<sub>2</sub> after 24h compared



**Fig 5. MALDI-TOF mass spectrum, from 303 to 306 m/z range, acquired from a pure arachidonic acid (AA) solution (A) and from lipid body (LB) fractions isolated from unstimulated and AA-stimulated parasites (B).** In (A), the spectrum shows the molecular weight of the pure AA (m/z 304.24). In (B), a higher content of AA is observed in the LB fraction purified from stimulated parasites (black) compared to the LB fraction from unstimulated cells (red). Samples were analyzed without any labeling. Data are representative of 3 independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0160433.g005



**Fig 6. Arachidonic Acid (AA) induces prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production by metacyclic trypomastigotes.** (A) PGE<sub>2</sub> levels in supernatants harvested from trypomastigotes stimulated for 24 h with 1.5 or 7.5 µM AA. (B) Oleic Acid (OA) did not induce PGE<sub>2</sub> production. Bars represent the mean ± SEM, n = 3, being the graph representative of, at least, 3 independent experiments (\*) *P* < 0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0160433.g006

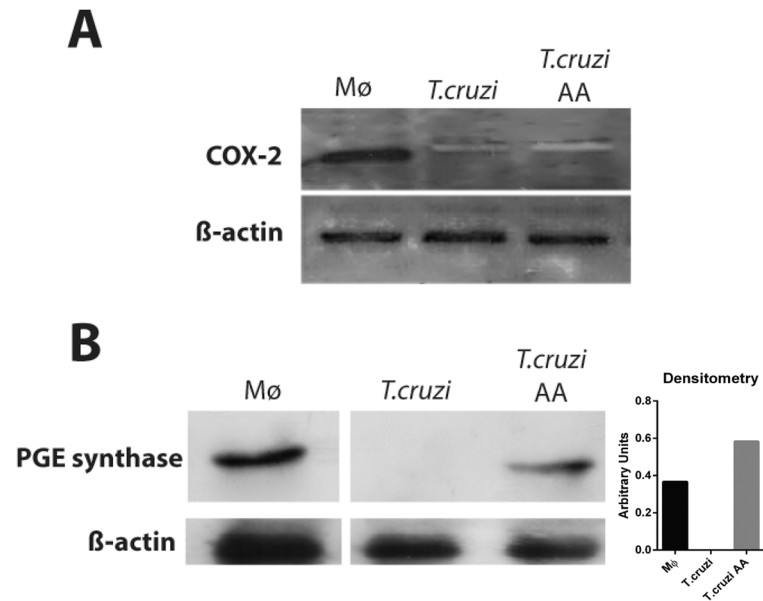
to controls cultured in the absence of AA (Fig 6A). Incubation of the parasites with OA, which is also able to induce LB formation in trypomastigotes (S4 Fig), did not induce PGE<sub>2</sub> production (Fig 6B). Thus, we concluded that *T. cruzi* is capable to generate PGE<sub>2</sub> through the AA metabolism.

### Parasites show PGE synthase but not COX-2 expression

We next evaluated by Western blotting whether key eicosanoid-forming enzymes COX-2 and PGE synthase were localized within the parasites. As positive controls, we used cultures of macrophages infected with *Mycobacterium bovis* BCG, which show both expression for these enzymes and high PGE<sub>2</sub> production in response to the infection [30, 51]. Trypomastigotes lysates from both unstimulated and AA-stimulated cells were negative for COX-2 (Fig 7A). On the other hand, we found a high level of PGE synthase within AA-stimulated parasites but not in unstimulated cells (Fig 7B), indicating an activation of the AA cascade and a possible pathway for PGE<sub>2</sub> synthesis.

### Parasite LBs are sites for PGE<sub>2</sub> synthesis

Because parasite stimulation with AA led to quantitative increases in LB numbers, PGE<sub>2</sub> release and PGE synthase expression, we hypothesized that parasite LBs might also serve as domains for compartmentalized PGE<sub>2</sub> synthesis. With the adaptation to a method using carbodiimide to immobilize eicosanoid carboxyl groups to proximate proteins [52], formation of eicosanoids was investigated at its sites of production. PLIN 2/ADRP was used as a marker of LBs for co-localization purpose [31]. With the use of this technique (EcosaCell) [31], PGE<sub>2</sub> formation



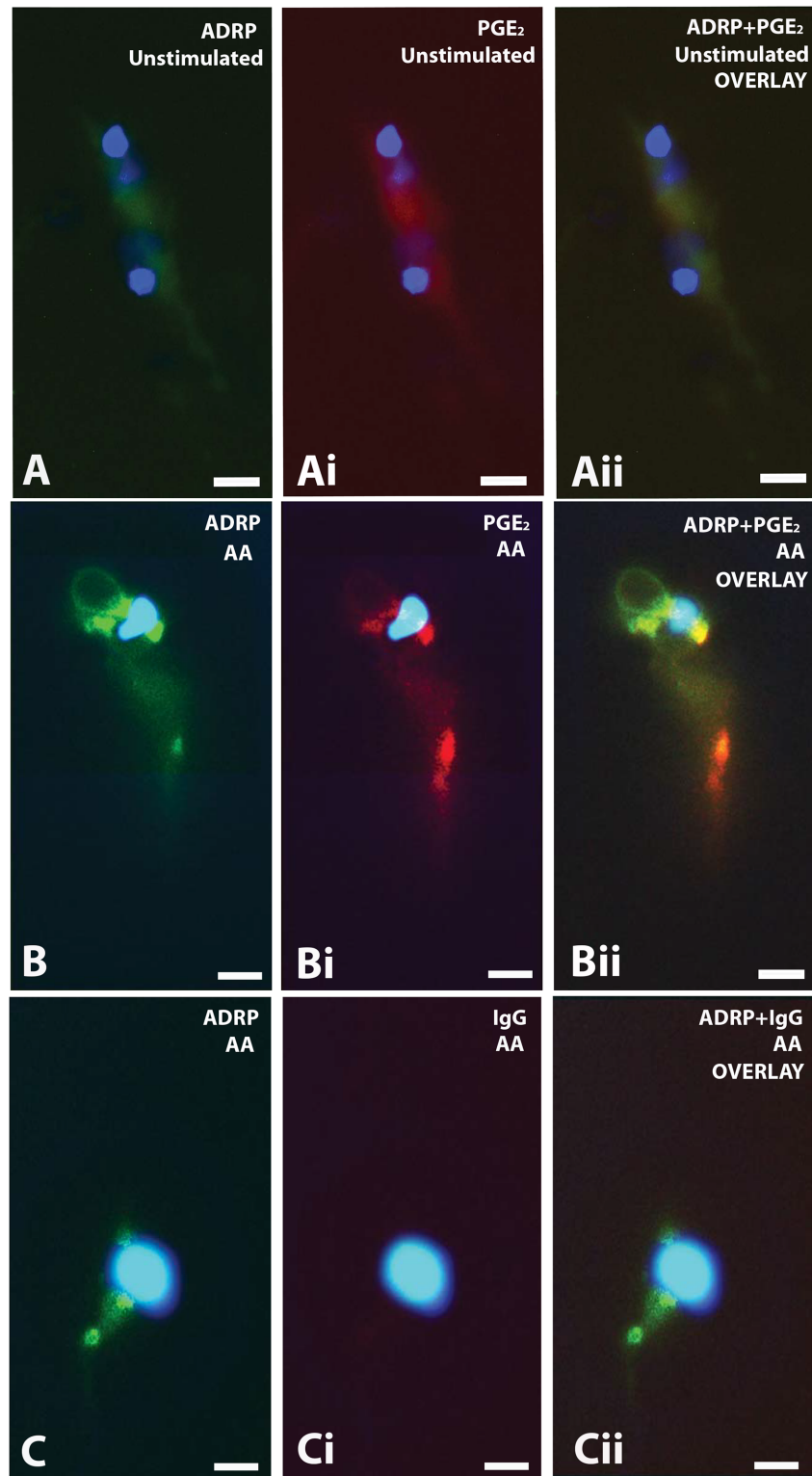
**Fig 7. *T. cruzi* stimulated by AA expresses PGE synthase, but not COX-2 enzymes.** Expression of COX-2 (A) and PGE synthase (B) in trypomastigote forms of *T. cruzi* after stimulation or not with AA during 1h. Mice peritoneal macrophages (Mφ) stimulated by BCG during 24h were used as positive controls [30]. Total *T. cruzi* ( $2 \times 10^6$  cells/lane) and macrophage cell ( $1 \times 10^6$  cells/lane) lysates were separated by SDS-PAGE (10%) and subjected to Western blotting for COX-2, PGE synthase or β-actin. The images are representative of at least two different blots. The graph represents the densitometric analysis of PGE synthase enzyme (arbitrary units) of the Western blotting bands.

doi:10.1371/journal.pone.0160433.g007

was demonstrated specifically at LBs from trypomastigotes of *T. cruzi* stimulated with AA (Fig 8). AA-stimulated trypomastigotes, exhibited a strong localized punctuated or ring shape staining for PLIN2/ADRP-labeled LBs (compare Fig 8A–8C), indicating formation of LBs in response to the stimulation of AA. AA-stimulated trypomastigotes, but not vehicle-stimulated parasites, showed intense and punctuated immunofluorescent staining for PGE<sub>2</sub> (compare Fig 8Ai and 8Bi). As shown in Fig 8Bii, the PGE<sub>2</sub> intracellular site of production (8Bi) matched PLIN2/ADRP-stained LBs (Fig 8B). Our colocalization quantitative analyses using *ImageJ* showed that PGE<sub>2</sub> and PLIN2/ADRP significantly colocalized in cells [Pearson’s coefficient of  $0.84 \pm 0.02$  (mean  $\pm$  SEM)]. The specificity of the immunofluorescence for PGE<sub>2</sub> was supported by the absence of immunostaining when an isotype control antibody replaced the anti-PGE<sub>2</sub> monoclonal antibody (Fig 8C–8Cii). Controls in which the anti-PLIN2/ADRP Ab was replaced by guinea pig serum were negative (data not shown). These findings validated the specificity for detecting PGE<sub>2</sub> formed at its formation sites within stimulated trypomastigotes, and place LBs as candidate sites for newly formed PGE<sub>2</sub> during the *T. cruzi* infection.

## Discussion and Conclusions

Here we demonstrate for the first time that the parasite *T. cruzi* itself produces LBs in response to the host-parasite interaction and that these organelles may be sources of inflammation mediators. Analogous to LB formed in mammalian leukocytes and macrophages during infectious diseases [30, 33–35, 53], increases in parasite LB numbers and sizes, in conjunction with changes in LB electron-density highlight the fact that parasite LBs are also dynamic and active organelles, able to modify their structure in concert with cell activation.



**Fig 8. LBs are sites of PGE<sub>2</sub> synthesis in AA-stimulated trypomastigotes.** (A-Aii) Unstimulated trypomastigotes were labeled for PLIN2/ADRP, a marker for LBs, (A) and for PGE<sub>2</sub> (Ai). Merged image (Aii) exhibited negative labeling for both ADRP and PGE<sub>2</sub>. (B-Bii) Arachidonic acid (AA)-stimulated trypomastigotes showed strong labeling for newly-formed PGE<sub>2</sub> (Bi) in PLIN2/ADRP-associated LBs (B). The merged image is observed in (Bii). (C-Cii) An IgG1 irrelevant isotype (clone MOPC 21) was used as control for PGE<sub>2</sub> labeling in

combination with labeling for PLIN2/ADRP. (Cii) is the merged image of (C) and (Ci). The nuclei of parasites are observed after DAPI staining (blue). Cells were immunolabeled by using the EicosaCell technique [31]. Colocalization quantitative analyses showed that PGE<sub>2</sub> and PLIN2/ADRP significantly colocalized in cells [Pearson's correlation coefficient of  $0.84 \pm 0.02$  (mean  $\pm$  SEM)]. Scale bar, 2  $\mu$ m (all images). Images are representative of 3 independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0160433.g008

Evidence that LBs participate in the regulation of the *T. cruzi* response during host-parasite interaction was provided here during both in vitro and in vivo infection. Interestingly, LBs in amastigote forms growing in macrophages elicited from the in vivo infection during the acute phase showed higher size and electron-density compared to amastigotes LBs living in cultured macrophages after 1h. This observation is likely consequence of the amplified exposure of proliferating *T. cruzi* forms to the host inflammatory milieu. In mammalian cells, the size and electron-density of newly formed LBs represent an important structural indicative of the participation of these organelles in innate immune responses [34].

LB morphological changes may reflect differences in lipid composition, stages of formation of new LBs, and/or neutral lipids/phospholipids ratio within LBs [34]. In fact, lipid composition affects LB electron-density [54] based on the fact that osmium tetroxide binds preferentially to the unsaturated bonds of fatty acids [55, 56]. Here, we demonstrated by Raman spectroscopy that both AA-stimulated parasites and LBs isolated from AA-stimulated-parasites have a higher content of unsaturated fatty acids, as a result of AA incorporation, compared to unstimulated cells (Figs 3 and 4). The presence of increased AA in the LB fraction was also confirmed by MALDI-TOF mass spectroscopy in LBs purified from the stimulated group (Fig 5). This can explain the changes of LB electron-density within the parasites during the in vivo infection. These LBs, formed as a result of host interaction, are more electron-dense which likely reflects the high content of AA, captured by the reaction with osmium during sample preparation for TEM. Accordingly, in macrophages, increase in LB electron-density was also associated with the cascade of events involved in the synthesis of inflammatory mediators within LBs formed in response to cell activation (reviewed in [38]). Under stimulation, AA is released from its sterified pool and acts as a substrate for enzymatic conversion into lipid mediators [49].

Based on our previous findings of production of AA-derived PGE<sub>2</sub> within LBs from macrophages taking part in immune responses during *T. cruzi* infection (reviewed in [36]), we considered whether parasite LBs might also play a role in inflammation. Evidence for prostaglandin production in parasites including *T. cruzi*, *T. brucei* and Leishmania species was provided by studies from Kubata and other groups (reviewed in [57]). Parasite enzymes involved in the AA cascade and PG synthesis were also identified in protozoans [57]. However, these studies did not associate eicosanoid synthesis with LB formation within the parasite.

Both mammalian [42, 43] and parasite [58, 59] LBs incorporate AA, the common precursor of eicosanoids. As noted, by using Raman spectroscopy, we detected AA incorporation into stimulated parasites (Fig 3). This technique also detected increased AA content directly in LBs isolated from AA-stimulated parasites (Fig 4). In fact, Raman has gained recognition for biomedical applications [60] and has been recently used to characterize molecular details associated with lipid metabolism and LB formation in macrophages [61] and host-parasite interaction [62]. Our results also demonstrated the existence of a pathway associated with the AA cascade. PGE<sub>2</sub> synthase, but not COX-2, was consistently identified, for the first time, within the parasite (Fig 4). The lack of COX expression might be explained by the absence of homologs of mammalian COX in parasitic microbes although a COX-like enzyme has been reported (reviewed in [57]). On the other hand, several PG synthases with different degrees of homology with human have been identified in parasites [57].

In a recent work it was demonstrated that AA stimulation increases both the number of LBs and the release of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  by metacyclic forms of the parasite *Leishmania infantum chagasi* [14]. Moreover, PGF synthase was localized in LBs formed within this parasite, thus suggesting that these organelles are sites involved in the synthesis of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  [14].

Here, we provide direct evidence that parasite LBs are indeed intracellular sites of eicosanoid production. AA-, but not OA-stimulated trypomastigotes released PGE<sub>2</sub> in parallel to a consistent formation of cytoplasmic LBs (Fig 2) and this PG was fully immunolocalized within parasite LBs (Fig 8). Our data are in agreement with a previous work demonstrating high levels of PGE<sub>2</sub> in lysates of *T. cruzi* when incubated with AA [63]. However, the results presented here are the first association of the PG production with specific intracellular sites, i.e., LBs.

Therefore, from our present results in *T. cruzi* and evidences provided by studies in other protozoan parasites, as noted, it seems evident that these organisms are able to generate PGs, but what is the role of parasite-derived PGs in the pathogenesis of parasitic diseases? Because PGE<sub>2</sub> is a potent immunomodulator, it could contribute to the immunosuppression observed during *T. cruzi* infections with implications to the survival of the parasite in its host. Investigations need to be done to explore this possibility and to uncover the PG metabolic pathways in this parasite.

In conclusion, this work demonstrates that LBs are formed in the parasite *T. cruzi* in response to the host-parasite interaction and exogenous AA stimulation, that AA is incorporated into parasite LBs and that these organelles serve as sites for PGE<sub>2</sub> synthesis, implying a role for *T. cruzi*-derived PGs in Chagas' disease pathogenesis.

## Supporting Information

**S1 Fig. Myocarditis elicited by the acute phase of experimental Chagas' disease.** (A, B) Histopathological analyses from control (A) and infected animals show myocarditis predominantly mononuclear and diffuse, dissociated myocardial fibers and edematous interstitial tissue. Parasite nests are encircled. Holtzman rats were infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain) and fragments of the heart processed for histological analyses at day 12 of infection. Data are representative of, at least, 3 independent experiments. Slides were stained with hematoxylin and eosin.

(EPS)

**S2 Fig. Arachidonic-acid (AA)-induced lipid body (LB) formation is a rapid and dose-dependent phenomenon within the parasite *Trypanosoma cruzi*.** The dose-response curve of LB genesis was analyzed 1 h after stimulation with AA (1–10  $\mu$ M). LBs were visualized and enumerated using osmium staining. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM, from at least 3 experiments.

(TIF)

**S3 Fig. Quantitative ultrastructural analyses of the parasite *Trypanosoma cruzi* stimulated or not with 7.5  $\mu$ M arachidonic acid (AA).** Samples from unstimulated AA-stimulated parasites were fixed and processed for transmission electron microscopy. A total of 50 electron micrographs (25 from unstimulated and 25 from AA-stimulated groups) were analyzed and the parasite area and length were quantitated using the *ImageJ*<sup>®</sup> software.

(EPS)

**S4 Fig. Number of lipid bodies (LBs) within trypomastigotes after stimulation with exogenous oleic acid (OA) for 1 h (A) or 24 h (B).** Bars represent the mean  $\pm$  SEM of LBs per parasite from 50 consecutively counted parasites from at least 4 independent experiments.



\*  $P < 0.05$  between groups. Cells were enumerated using osmium staining (TIF)

## Acknowledgments

We gratefully acknowledge the helpful discussions with Dr. Patrícia E. Almeida and the skillful assistance of Dr. Suzana Corte-Real (Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ), Dr. Hélio Chiarini-Garcia (UFMG), Felipe F. Dias (UFJF) and Thiago P. Silva (UFJF). We thank the Centro de Microscopia (UFMG) and Centro de Aquisição e Processamento de Imagens-CAPI (UFMG) for the use of their facilities.

## Author Contributions

**Conceived and designed the experiments:** DAMT PTB HD RCNM.

**Performed the experiments:** DAMT NRR LT ABC CGFL HD RCNM.

**Analyzed the data:** DAMT EAMG MRA GFSA JSM RRP HD RCNM.

**Contributed reagents/materials/analysis tools:** RRP GFSA CGFL PTB HD RCNM.

**Wrote the paper:** DAMT EAMG MRA JSM RRP GFSA HD RCNM.

## References

1. Murphy DJ. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma*. 2012; 249(3):541–85. Epub 2011/10/18. doi: [10.1007/s00709-011-0329-7](https://doi.org/10.1007/s00709-011-0329-7) PMID: [22002710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22002710/).
2. Beller M, Thiel K, Thul PJ, Jackle H. Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus. *FEBS Lett*. 2010; 584(11):2176–82. Epub 2010/03/23. doi: [10.1016/j.febslet.2010.03.022](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.022) PMID: [20303960](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303960/).
3. Fujimoto T, Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Shinohara Y. Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol*. 2008; 130(2):263–79. Epub 2008/06/12. doi: [10.1007/s00418-008-0449-0](https://doi.org/10.1007/s00418-008-0449-0) PMID: [18546013](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18546013/); PubMed Central PMCID: [PMC2491702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2491702/).
4. Melo RCN, Weller PF. Unraveling the complexity of lipid body organelles in human eosinophils. *J Leukoc Biol*. 2014; 96(5):703–12. Epub 2014/09/12. doi: [10.1189/jlb.3RU0214-110R](https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0214-110R) PMID: [25210147](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25210147/); PubMed Central PMCID: [PMC4197557](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4197557/).
5. Melo RCN, D'Avila H, Wan HC, Bozza PT, Dvorak AM, Weller PF. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *J Histochem Cytochem*. 2011; 59(5):540–56. Epub 2011/03/25. doi: [10.1369/0022155411404073](https://doi.org/10.1369/0022155411404073) PMID: [21430261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21430261/); PubMed Central PMCID: [PMC3201176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3201176/).
6. Saka HA, Valdivia R. Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012; 28:411–37. Epub 2012/05/15. doi: [10.1146/annurev-cellbio-092910-153958](https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-153958) PMID: [22578141](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22578141/).
7. Bozza PT, Bakker-Abreu I, Navarro-Xavier RA, Bandeira-Melo C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2011; 85(5):205–13. Epub 2011/05/14. doi: [10.1016/j.plefa.2011.04.020](https://doi.org/10.1016/j.plefa.2011.04.020) PMID: [21565480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21565480/).
8. Melo RCN, Weller PF. Lipid droplets in leukocytes: Organelles linked to inflammatory responses. *Exp Cell Res*. 2016; 340(2):193–7. Epub 2015/10/31. doi: [10.1016/j.yexcr.2015.10.028](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.028) PMID: [26515551](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26515551/); PubMed Central PMCID: [PMC4744558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4744558/).
9. Melo RCN, Dvorak AM. Lipid Body-Phagosome Interaction in Macrophages during Infectious Diseases: Host Defense or Pathogen Survival Strategy? *PLoS Pathog*. 2012; 8(7):e1002729. Epub 2012/07/14. doi: [10.1371/journal.ppat.1002729](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002729) PMID: [22792061](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22792061/); PubMed Central PMCID: [PMC3390411](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3390411/).
10. Herker E, Ott M. Emerging role of lipid droplets in host/pathogen interactions. *J Biol Chem*. 2012; 287(4):2280–7. Epub 2011/11/18. doi: [10.1074/jbc.R111.300202](https://doi.org/10.1074/jbc.R111.300202) PMID: [22090026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22090026/); PubMed Central PMCID: [PMC3268388](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3268388/).
11. Jackson KE, Klonis N, Ferguson DJ, Adisa A, Dogovski C, Tilley L. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2004; 54(1):109–22. Epub 2004/10/02. PMID: [15458409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15458409/).

12. Nishikawa Y, Quittnat F, Stedman TT, Voelker DR, Choi JY, Zahn M, et al. Host cell lipids control cholesterol ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. *Cell Microbiol*. 2005; 7(6):849–67. Epub 2005/05/13. doi: [10.1111/j.1462-5822.2005.00518.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00518.x) PMID: [15888087](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15888087/).
13. Daniel J, Maamar H, Deb C, Sirakova TD, Kolattukudy PE. *Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PLoS Pathog*. 2011; 7(6):e1002093. Epub 2011/07/07. doi: [10.1371/journal.ppat.1002093](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002093) PMID: [21731490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21731490/); PubMed Central PMCID: PMC3121879.
14. Araujo-Santos T, Rodriguez NE, Moura-Pontes S, Dixt UG, Abanades DR, Bozza PT, et al. Role of prostaglandin F2alpha production in lipid bodies from *Leishmania infantum chagasi*: insights on virulence. *J Infect Dis*. 2014; 210(12):1951–61. Epub 2014/05/23. doi: [10.1093/infdis/jiu299](https://doi.org/10.1093/infdis/jiu299) PMID: [24850789](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24850789/).
15. Mackey TK, Liang BA, Cuomo R, Hafen R, Brouwer KC, Lee DE. Emerging and reemerging neglected tropical diseases: a review of key characteristics, risk factors, and the policy and innovation environment. *Clin Microbiol Rev*. 2014; 27(4):949–79. Epub 2014/10/04. doi: [10.1128/CMR.00045-14](https://doi.org/10.1128/CMR.00045-14) PMID: [25278579](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25278579/); PubMed Central PMCID: PMC4187634.
16. Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest*. 2001; 108(1):15–23. Epub 2001/07/04. doi: [10.1172/JCI13416](https://doi.org/10.1172/JCI13416) PMID: [11435451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11435451/); PubMed Central PMCID: PMC209346.
17. Michelin MA, Silva JS, Cunha FQ. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol*. 2005; 111(2):71–9. Epub 2005/07/13. doi: [10.1016/j.exppara.2005.05.001](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.05.001) PMID: [16009364](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16009364/).
18. Walker C, Kristensen F, Bettens F, deWeck AL. Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. I. Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production. *J Immunol*. 1983; 130(4):1770–3. Epub 1983/04/01. PMID: [6601136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6601136/).
19. Luna-Gomes T, Filardy AA, Rocha JD, Decote-Ricardo D, LaRocque-de-Freitas IF, Morrot A, et al. Neutrophils increase or reduce parasite burden in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages, depending on host strain: role of neutrophil elastase. *PLoS One*. 2014; 9(3):e90582. Epub 2014/03/07. doi: [10.1371/journal.pone.0090582](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090582) PMID: [24599360](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24599360/); PubMed Central PMCID: PMC3944110.
20. Melo RCN, Machado CRS. *Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. *Exp Parasitol*. 2001; 97(1):15–23. Epub 2001/02/24. doi: [10.1006/expr.2000.4576](https://doi.org/10.1006/expr.2000.4576) PMID: [11207110](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11207110/).
21. Contreras VT, Morel CM, Goldenberg S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 1985; 14(1):83–96. Epub 1985/01/01. PMID: [3885031](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3885031/).
22. Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol*. 1985; 16(3):315–27. Epub 1985/09/01. PMID: [3903496](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3903496/).
23. Melo RCN. Depletion of immune effector cells induces myocardial damage in the acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: ultrastructural study in rats. *Tissue Cell*. 1999; 31(3):281–90. Epub 1999/09/11. doi: [10.1054/tice.1999.0040](https://doi.org/10.1054/tice.1999.0040) PMID: [10481300](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10481300/).
24. Fabrino DL, Leon LL, Genestra M, Parreira GG, Melo RCN. Rat models to investigate host macrophage defense against *Trypanosoma cruzi*. *J Innate Immun*. 2011; 3(1):71–82. Epub 2010/11/06. doi: [10.1159/000320641](https://doi.org/10.1159/000320641) PMID: [21051863](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21051863/).
25. Melo RCN, Spencer LA, Perez SA, Neves JS, Bafford SP, Morgan ES, et al. Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein. *Lab Invest*. 2009; 89(7):769–81. Epub 2009/04/29. doi: [10.1038/labinvest.2009.40](https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.40) PMID: [19398958](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19398958/); PubMed Central PMCID: PMC2702460.
26. Melo RCN, D'Avila H, Bozza PT, Weller PF. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. *Methods Mol Biol*. 2011; 689:149–61. Epub 2010/12/15. doi: [10.1007/978-1-60761-950-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-950-5_9) PMID: [21153791](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21153791/).
27. Brasaemle DL, Wolins NE. Isolation of lipid droplets from cells by density gradient centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006; Chapter 3:Unit 3 15. doi: [10.1002/0471143030.cb0315s29](https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0315s29) PMID: [18228483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18228483/).
28. Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet-laser desorption mass-spectrometry of organic-molecules. *Anal Chemistry*. 1985; 57(14):2935–9. doi: [10.1021/ac00291a042](https://doi.org/10.1021/ac00291a042)
29. Karas M, Bachman K, Bahr U, Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of nonvolatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Processes*. 1987; 78:53–68. doi: [10.1016/0168-1176\(87\)87041-6](https://doi.org/10.1016/0168-1176(87)87041-6)
30. D'Avila H, Melo RCN, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol*. 2006; 176(5):3087–97. Epub 2006/02/24. 176/5/3087. PMID: [16493068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16493068/).

31. Bandeira-Melo C, Weller PF, Bozza PT. EicosaCell—an immunofluorescent-based assay to localize newly synthesized eicosanoid lipid mediators at intracellular sites. *Methods Mol Biol.* 2011; 689:163–81. Epub 2010/12/15. doi: [10.1007/978-1-60761-950-5](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-950-5) PMID: [21153792](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21153792/).
32. Bolte S, Cordelieres FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc.* 2006; 224(Pt 3):213–32. Epub 2007/01/11. doi: [10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x) PMID: [17210054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17210054/).
33. Melo RCN, D'Avila H, Fabrino DL, Almeida PE, Bozza PT. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell.* 2003; 35(1):59–67. Epub 2003/02/19. doi: [10.1016/S0040-8166\(02\)00105-2](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(02)00105-2) PMID: [12589730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12589730/).
34. Melo RCN, Fabrino DL, Dias FF, Parreira GG. Lipid bodies: Structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflamm Res.* 2006; 55(8):342–8. Epub 2006/09/16. doi: [10.1007/s00011-006-5205-0](https://doi.org/10.1007/s00011-006-5205-0) PMID: [16977381](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16977381/).
35. D'Avila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, et al. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E generation and increased parasite growth. *J Infect Dis.* 2011; 204(6):951–61. Epub 2011/08/19. doi: [10.1093/infdis/jir432](https://doi.org/10.1093/infdis/jir432) PMID: [21849292](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21849292/).
36. D'Avila H, Toledo DA, Melo RCN. Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-*Trypanosoma cruzi* interplay during innate immune responses. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012:478601. Epub 2012/05/24. doi: [10.1155/2012/478601](https://doi.org/10.1155/2012/478601) PMID: [22619483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22619483/); PubMed Central PMCID: [PMC3350868](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3350868/).
37. Melo RCN. Acute heart inflammation: ultrastructural and functional aspects of macrophages elicited by *Trypanosoma cruzi* infection. *J Cell Mol Med.* 2009; 13(2):279–94. Epub 2008/07/16. doi: [10.1111/j.1582-4934.2008.00388.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00388.x) PMID: [18624767](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18624767/).
38. Dias FF, Zarantonello VC, Parreira GG, Chiarini-Garcia H, Melo RCN. The intriguing ultrastructure of lipid body organelles within activated macrophages. *Microsc Microanal.* 2014; 1–10. Epub 2014/05/03. doi: [10.1017/S143192761400066X](https://doi.org/10.1017/S143192761400066X) PMID: [24786359](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24786359/).
39. Dias FF, Chiarini-Garcia H, Parreira GG, Melo RCN. Mice spermatogonial stem cells transplantation induces macrophage migration into the seminiferous epithelium and lipid body formation: high-resolution light microscopy and ultrastructural studies. *Microsc Microanal.* 2011; 1–13. Epub 2011/11/04. doi: [10.1017/S1431927611012098](https://doi.org/10.1017/S1431927611012098) PMID: [22047748](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22047748/).
40. Weller PF, Ryeom SW, Picard ST, Ackerman SJ, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *J Cell Biol.* 1991; 113(1):137–46. Epub 1991/04/01. PMID: [1901065](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1901065/); PubMed Central PMCID: [PMC2288908](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2288908/).
41. Bozza PT, Payne JL, Morham SG, Langenbach R, Smithies O, Weller PF. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(20):11091–6. Epub 1996/10/01. PMID: [8855314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8855314/); PubMed Central PMCID: [PMC38289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC38289/).
42. Weller PF, Dvorak AM. Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. *Blood.* 1985; 65(5):1269–74. Epub 1985/05/01. PMID: [3922452](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3922452/).
43. Weller PF, Monahan-Earley RA, Dvorak HF, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. *Am J Pathol.* 1991; 138(1):141–8. Epub 1991/01/01. PMID: [1846262](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1846262/); PubMed Central PMCID: [PMC1886053](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC1886053/).
44. Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, Gray JP, Cassara J, Dvorak AM, et al. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol.* 1998; 152(3):759–69. Epub 1998/03/21. PMID: [9502418](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9502418/); PubMed Central PMCID: [PMC1858398](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC1858398/).
45. Manoharan R, Wang Y, Feld MS. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A.* 1996:215–49. doi: [10.1016/0584-8539\(95\)01573-6](https://doi.org/10.1016/0584-8539(95)01573-6)
46. Czamara K, Majzner K, Pacia MZ, Kochan K, Kaczor A, Baranska M. Raman spectroscopy of lipids: a review. *J Raman Spect.* 2015; 46:4–20. doi: [10.1002/jrs.4607](https://doi.org/10.1002/jrs.4607)
47. Majzner K, Kochan K, Kachamakova-Trojanowska N, Maslak E, Chlopicki S, Baranska M. Raman imaging providing insights into chemical composition of lipid droplets of different size and origin: in hepatocytes and endothelium. *Anal Chem.* 2014; 86(13):6666–74. doi: [10.1021/ac501395g](https://doi.org/10.1021/ac501395g) PMID: [24936891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24936891/).
48. Martins JS, Borges BGAL, Machado RC, Carpanez AG, Graziul RM, Zappa F, et al. Evaluation of chemical kinetics in positive photoresists using laser desorption ionization. *Eur Polymer J.* 2014; 59:1–17. doi: [10.1016/j.eurpolymj.2014.07.005](https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.005)
49. Yaqoob P. Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. *Trends Immunol.* 2003; 24(12):639–45. Epub 2003/12/03. S1471490603003077. PMID: [14644137](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14644137/).

50. Abdalla GK, Faria GE, Silva KT, Castro EC, Reis MA, Michelin MA. *Trypanosoma cruzi*: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. *Exp Parasitol*. 2008; 118(4):514–21. Epub 2008/01/01. doi: [10.1016/j.exppara.2007.11.003](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.11.003) PMID: [18163990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18163990/).
51. Shibata Y, Henriksen RA, Honda I, Nakamura RM, Myrvik QN. Splenic PGE2-releasing macrophages regulate Th1 and Th2 immune responses in mice treated with heat-killed BCG. *J Leukoc Biol*. 2005; 78(6):1281–90. Epub 2005/10/06. doi: [10.1189/jlb.0605321](https://doi.org/10.1189/jlb.0605321) PMID: [16204627](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16204627/).
52. Liu LX, Buhlmann JE, Weller PF. Release of prostaglandin E2 by microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. *Am J Trop Med Hyg*. 1992; 46(5):520–3. Epub 1992/05/01. PMID: [1599045](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1599045/).
53. Toledo DAM, D'Avila H, Melo RCN. Host Lipid Bodies as Platforms for Intracellular Survival of Protozoan Parasites. *Front Immunol*. 2016. doi: [10.3389/fimmu.2016.00174](https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00174) PMID: [27199996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27199996/).
54. Cheng J, Fujita A, Ohsaki Y, Suzuki M, Shinohara Y, Fujimoto T. Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets. *Histochem Cell Biol*. 2009; 132(3):281–91. Epub 2009/06/27. doi: [10.1007/s00418-009-0615-z](https://doi.org/10.1007/s00418-009-0615-z) PMID: [19557427](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19557427/).
55. Hayes TL, Lindgren FT, Gofman JW. A Quantitative Determination of the Osmium Tetroxide-Lipoprotein Interaction. *J Cell Biol*. 1963; 19:251–5. Epub 1963/10/01. PMID: [14069797](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14069797/); PubMed Central PMCID: [PMC2106851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2106851/).
56. Adams CW, Abdulla YH, Bayliss OB. Osmium tetroxide as a histochemical and histological reagent. *Histochemie Histochemistry Histochimie*. 1967; 9(1):68–77. Epub 1967/01/01. PMID: [4869962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4869962/).
57. Kubata BK, Duszenko M, Martin KS, Urade Y. Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites. *Trends Parasitol*. 2007; 23(7):325–31. Epub 2007/05/29. doi: [10.1016/j.pt.2007.05.005](https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.05.005) PMID: [17531535](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17531535/).
58. Longworth DL, Monahan-Earley RA, Dvorak AM, Weller PF. *Brugia malayi*: arachidonic acid uptake into lipid bodies of adult parasites. *Exp Parasitol*. 1988; 65(2):251–7. Epub 1988/04/01. PMID: [3350105](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3350105/).
59. Longworth DL, King DC, Weller PF. Rapid uptake and esterification of arachidonic acid and other fatty acids by microfilariae of *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1987; 23(3):275–84. Epub 1987/04/01. PMID: [3110617](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3110617/).
60. Talari ACS, Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Raman spectroscopy of biological tissues. *Appl Spectroscop*. 2015; 50(1):46–111. doi: [10.1080/05704928.2014.923902](https://doi.org/10.1080/05704928.2014.923902)
61. Matthaus C, Krafft C, Dietzek B, Brehm BR, Lorkowski S, Popp J. Noninvasive imaging of intracellular lipid metabolism in macrophages by raman microscopy in combination with stable isotopic labeling. *Anal Chemistry*. 2012; 84:8549–56. doi: [10.1021/ac3012347](https://doi.org/10.1021/ac3012347)
62. Naemat A, Elsheikha HM, Al-Sandaqchi A, Kong K, Ghita A, Notingher I. Analysis of interaction between the apicomplexan protozoan *Toxoplasma gondii* and host cells using label-free Raman spectroscopy. *The Analyst*. 2015; 140(3):756–64. Epub 2014/11/26. doi: [10.1039/c4an01810a](https://doi.org/10.1039/c4an01810a) PMID: [25422831](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25422831/).
63. Kubata BK, Kabututu Z, Nozaki T, Munday CJ, Fukuzumi S, Ohkubo K, et al. A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*. 2002; 196(9):1241–51. Epub 2002/11/06. PMID: [12417633](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12417633/); PubMed Central PMCID: [PMC2194105](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2194105/).



# Host Lipid Bodies as Platforms for Intracellular Survival of Protozoan Parasites

Daniel A. M. Toledo, Heloísa D'Ávila and Rossana C. N. Melo\*

Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Institute of Biological Sciences (ICB), Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Alexandre Morrot,  
Federal University of Rio de Janeiro,  
Brazil

### Reviewed by:

M. Victoria Delpino,  
National Scientific and Technical  
Research Council (CONICET),  
Argentina  
Patricia Talamás-Rohana,  
The Center for Research and  
Advanced Studies of the  
National Polytechnic Institute  
(CINVESTAV-IPN), Mexico

### \*Correspondence:

Rossana C. N. Melo  
rossana.melo@uff.edu.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Microbial Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 20 March 2016

**Accepted:** 19 April 2016

**Published:** 03 May 2016

### Citation:

Toledo DAM, D'Ávila H and  
Melo RCN (2016) Host Lipid Bodies  
as Platforms for Intracellular Survival  
of Protozoan Parasites.  
*Front. Immunol.* 7:174.  
doi: 10.3389/fimmu.2016.00174

Pathogens induce several changes in the host cell signaling and trafficking mechanisms in order to evade and manipulate the immune response. One prominent pathogen-mediated change is the formation of lipid-rich organelles, termed lipid bodies (LBs) or lipid droplets, in the host cell cytoplasm. Protozoan parasites, which contribute expressively to the burden of infectious diseases worldwide, are able to induce LB genesis in non-immune and immune cells, mainly macrophages, key players in the initial resistance to the infection. Under host–parasite interaction, LBs not only accumulate in the host cytoplasm but also relocate around and move into parasitophorous vacuoles. There is increasing evidence that protozoan parasites may target host-derived LBs either for gaining nutrients or for escaping the host immune response. Newly formed, parasite-induced LBs may serve as lipid sources for parasite growth and also produce inflammatory mediators that potentially act in the host immune response deactivation. In this mini review, we summarize current knowledge on the formation and role of host LBs as sites exploited by intracellular protozoan parasites as a strategy to maintain their own survival.

**Keywords:** infectious diseases, lipid droplets, inflammation, phagocytosis, lipid mediators, parasite survival, parasitophorous vacuole

## INTRODUCTION

Protozoan parasitic infections comprise devastating infectious diseases, such as malaria, visceral leishmaniasis, toxoplasmic encephalitis, and trypanosomiasis, which still account for a large proportion of death and disability worldwide (1). Many protozoan parasites have an obligate intracellular existence. The infection is initiated when the parasite enter the host target cell and is internalized within a plasma membrane-derived vacuole, the parasitophorous vacuole (PV) (2). Within the host, protozoan parasites that are mainly intracellular will only cause infectious disease if they are able to survive and multiply within the PV (2, 3).

The events of the PV formation and progression generally occur in parallel with accentuated genesis of lipid-rich organelles, termed lipid bodies (LBs) or lipid droplets, in the host cell cytoplasm [reviewed in Ref. (4, 5)]. It is now well documented that experimental and clinical infections with a range of protozoan parasites trigger LB accumulation (Table 1) and an intriguing interaction with the PV [reviewed in Ref. (5)]. Other pathogens, such as bacteria and viruses, also induce LB formation within different cell types, indicating that LB accumulation in response to infectious diseases is a broad event and may have implications for microbial pathogenesis (5–8).

**TABLE 1 | Protozoan parasite-induced lipid body formation in host cells.**

Parasite	Cell type	Organism/ model	Reference
<i>Leishmania amazonensis</i>	Peritoneal macrophages	Mouse	(9)
	Dendritic leukocytes	Mouse	(10)
<i>Leishmania major</i>	Blood-marrow-derived macrophages	Mouse	(11, 12)
<i>Plasmodium berghei</i>	Hepatocytes	Mouse	(13)
	Renal tubular cells	Mouse	(14)
<i>Plasmodium chabaudi</i>	Hepatocytes	Mouse	(15)
<i>Toxoplasma gondii</i>	Fibroblasts	Human	(16)
	Skeletal muscle cells	Mouse	(17)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Heart macrophages	Rat	(18, 19)
	Peritoneal macrophages	Rat	(18, 19)
	Uterine macrophages	Rat	(19)
	Peritoneal macrophages	Mouse	(20)
	Placental cells	Human	(21)

While the successful replication within the PV is under influence of several factors, there is increasing evidence that LB organelles are important for the rapid intracellular reproduction of protozoan parasites (5). Protozoan parasites require large amounts of lipids necessary for membrane biogenesis of new progenies [reviewed in Ref. (22, 23)] and may take advantage of these organelles as high-energy substrate sources. LBs within infected cells are also able to produce inflammatory mediators that potentially can inhibit the host Th1 response, thus, favoring parasite growth [reviewed in Ref. (4)]. In this mini review, we will discuss the role of host LBs as organelles modulated by intracellular protozoan parasites for survival.

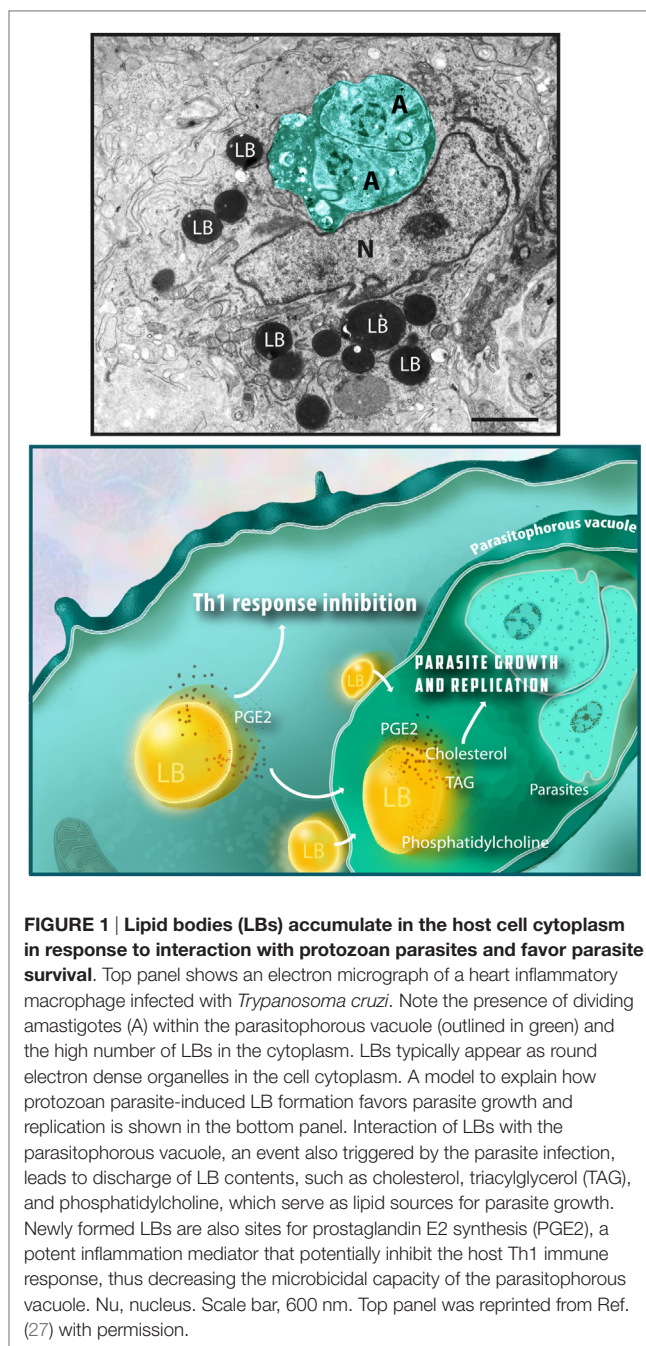
## LB STRUCTURE AND VISUALIZATION

Lipid bodies are common organelles distributed in the cytoplasm of prokaryotic and eukaryotic cells (5). As a general feature, LBs contain a core rich in neutral lipids, surrounded by a monolayer of phospholipids with structural proteins – the perilipin (PLIN) family proteins (5). Proteins are not restricted to the LB surface. It is documented that many types of proteins are present in the LB internum depending on the cell type (24–26).

In spite of variations in the LB composition, these organelles are seen in the cell cytoplasm as compartmentalized round sites by light microscopy or transmission electron microscopy (TEM). While LB imaging under light microscopy usually requires the use of specific lipid probes, ultrastructural observation does not need any additional labeling because LBs lack a true delimiting unit membrane structure, which enables unambiguous identification by TEM (Figure 1) (4, 8, 26).

## PROTOZOAN PARASITES INDUCE LB ACCUMULATION IN HOST CELLS

Several protozoan parasites induce LB formation in a variety of host immune and non-immune cells (Table 1). Under host–parasite



interaction, LBs not only accumulate but also increase in size and undergo ultrastructural changes in the host cell cytoplasm. These structural modifications of LBs have been well demonstrated during *in vitro* and *in vivo* studies with *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas' disease (18, 19). This pathology elicits a strong inflammatory response characterized by elevated infiltration of macrophages in the target organs, mainly the heart (28). Histopathological studies conducted during the acute phase of this disease showed that increased myocardial parasitism is paralleled by increased size of LBs within inflammatory macrophages in which LBs can reach up to 4  $\mu$ m in diameter (19).

Moreover, LBs show varied electron-density in response to the *T. cruzi* infection, a morphological change likely associated with mobilization and/or *in situ* synthesis of lipid mediators [reviewed in Ref. (8)]. The capability of host LBs to generate these compounds will be discussed later.

Increase of LB size in parallel with augmented number of these organelles was also found in dendritic leukocytes hosting live *Leishmania amazonensis* amastigotes (10). Overall, as noted in diverse cell types (Table 1), it is clear that protozoan parasites are able to trigger LB formation in host cells. But how is the mechanism leading to LB genesis? Similar to other studies with mycobacteria (29, 30), it has been demonstrated that parasite uptake potentiates LB formation within host cells but is not essential for triggering this event. After 24 h of infection with *T. cruzi*, peritoneal macrophages with internalized parasites as well as non-parasitized cells show increased number of LBs compared to control, non-infected cells, suggesting a bystander amplification of the cell response (20). Accordingly, inhibition of parasite phagocytosis did not abolish LB genesis during infection with *Leishmania major* (11). These authors have recently showed that while phagocytosis of latex beads by macrophages did not trigger LB formation, this phenomenon is equally induced by both live and heat-killed parasites (11). Altogether, these results imply that soluble factors in parasitized cells may act in a paracrine manner to produce LB in non-parasitized bystander cells (11). While LB formation occurs through a toll-like receptor-2 (TLR2)-dependent mechanism as documented during *T. cruzi* infection in macrophages (20), the identification of downstream signaling pathways involved in this event during parasitic infections awaits further investigation.

## NEWLY FORMED LBs ARE RECRUITED TO THE PROXIMITY OF PARASITES

Interestingly, protozoan parasites trigger a redistribution of the newly formed LBs around parasite-containing phagosomes. As documented by studies with *T. cruzi* (18, 19), *L. major* (11, 12), *L. amazonensis* (10), and *Toxoplasma gondii* (17, 31), LBs accumulate in close proximity to PVs or even move into these vacuoles, suggesting that these pathogens take advantage of these organelles.

Indeed, TEM analyses have enabled the identification of intimate contact between LBs and the PV membrane (10, 17–20, 31, 32). In 2003, our group was the first to observe that during an *in vivo* experimental infection with a pathogen (*T. cruzi*), LBs were internalized into parasite-containing phagosomes (18). Following studies found the same event for infections with different species of bacteria [reviewed in Ref. (5)] and with the protozoan parasites *T. gondii* (17) and *L. major* (11).

How LBs translocate across the phagosome membrane? This mechanism has been mainly addressed in studies with bacteria. LB-associated proteins, secreted by bacteria seem to be involved in capturing LB into bacteria-containing vacuoles, while LB translocation seems to involve displacement of the LB structural protein PLIN2/adipose differentiation-related

protein (ADRP), which is constitutively associated with the surface of LBs (33). Although studies of membrane sites between pathogen-containing compartments and intracellular host organelles has been gaining more attention in the literature [reviewed in Ref. (34)], the mechanistic details underlying the intriguing LB–phagosome interaction remains to be fully defined.

## HOST LIPIDS, LBs, AND INTRACELLULAR PARASITE GROWTH

Lipid metabolic pathways have been demonstrated as major networks modulated by protozoan parasites in host cells. Numerous studies with *T. gondii*, malaria parasites (*Plasmodium berghei*, *Plasmodium falciparum*, and *Plasmodium yoelii*), *L. amazonensis*, *Cryptosporidium parvum*, and *Eimeria bovis* have documented that these parasites are able to (i) induce accumulation of lipids, such as neutral lipids [triacylglycerol (TAG), diacylglycerol, and cholesterol esters], cholesterol, and/or phospholipids, especially phosphatidylcholine in host cells (10, 12, 35–37); (ii) acquire lipid resources, such as cholesterol and phospholipids from their host environment into the PV (16, 36, 38–40), and/or (iii) use host lipids to synthesize complex own lipids or even own LBs (16, 38, 41).

Thus, although the nutritional requirements of these parasites are intricate, overall it is believed that host lipids are central to support successful parasite replication within the PV (16, 32, 37, 38, 42, 43). Host lipid acquisition is also considered crucial to PV maturation. This vacuole undergoes a pronounced membranous remodeling associated with formation of an internal network of tubules and vesicles as observed during the infection with *T. gondii* (42, 44). By using different approaches, including fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) microscopy, Caffaro and Boothroyd demonstrated that host cells are major lipid contributors to the PV remodeling and that lipids are transferred in a continuous way from the host into the PV (42).

How is the contribution of host LBs as lipid sources for protozoan parasites? Consistent with parasite-induced host LB formation (Table 1), LB genesis in parallel to host lipid reprogramming/accumulation (10, 12) and host LB–PV interaction (10–12, 17–19, 31), it is believed that these organelles act as important lipid sources for parasite growth.

Several classes of lipids, including neutral lipids, cholesterol, and phospholipids, make up LBs (45). Because protozoan parasites are not competent or have limited ability to synthesize lipids [reviewed in Ref. (22, 46)], LBs could be an essential source of both TAG and cholesterol for these parasites (10). These molecules are important as precursors for membrane neogenesis for newly formed parasites [reviewed in Ref. (22, 46)]. Moreover, the phospholipid monolayer of LBs consists of numerous phospholipid species of which phosphatidylcholine is the most abundant (47). Thus, it is likely that LB-derived lipids are transferred from host to the PV and taken up by replicating parasites. Indeed, by using a fluorescent probe (BODIPY-phosphatidylcholine) and live imaging microscopy, Charron and Sibley showed that this

probe moved from host plasma membrane and/or host LBs, seen as dispersed puncta in the host cytoplasm, to LBs formed within the parasite (16). However, the potential relocation of other lipids from host LBs to the parasite still needs to be better explored in future studies.

Does depletion of host lipids and/or LBs impact protozoan parasites development within host cells? In *T. gondii* infection, inhibition of cholesterol esterification in the host cell blocks parasite growth (38). Exposure to cholesterol esterification inhibitors led to reduction of cholesteryl ester synthesis, morphological changes in parasite LBs, and deformations of the parasite plasma membrane with discharge of parasite content into the PV (38). Accordingly, the use of inhibitors targeting the host cellular cholesterol *de novo* synthesis and processing repressed both *E. bovis* proliferation and LB formation within host endothelial cells (43). On the other hand, depletion of cholesterol content did not impact malaria parasites (*P. berghei* and *P. yoelii*) development within hepatocytes (39). In this case, the authors consider that the parasite may exploit alternative sources in these cells to sustain infectivity (39). In fact, protozoan parasites can divert lipids from other sources than the intracellular environment. *C. parvum*, the causal agent of cryptosporidiosis, a life-threatening diarrheal disease in immunocompromised individuals (48), scavenges cholesterol from plasma low-density protein (LDL) and micelles, and to a lesser extent from the cholesterol pathway within enterocytes (40). Removal of cholesterol from the media, and to lesser extent from host intracellular pools, obstructs parasite reproduction (40).

During the experimental infection with *T. cruzi*, our group demonstrated that the use of C75, an inhibitor of fatty acid synthase, led to both inhibition of LB formation and parasite division within macrophages (20). While C75 had no direct cytotoxic effect on the parasite, intracellular parasite replication was likely affected by an accentuated reduction of the LB numbers (around 66%) after cell treatment with C75 (20).

## HOST LBs PRODUCE PGE2 IN RESPONSE TO INFECTION WITH PROTOZOAN PARASITES

One interesting aspect of LBs is that they are able to change their composition in response to inflammatory events as documented in cells from the immune system [reviewed in Ref. (49)]. LBs contain stores of arachidonic acid (AA), indicating that these organelles are potentially able to initiate cascades that culminate in the formation of inflammatory mediators (eicosanoids) (50, 51). Eicosanoid-generating enzymes (52–55), and *in situ* synthesis of eicosanoids (prostaglandins and leukotrienes) were indeed documented in these organelles within activated leukocytes and other cells from the immune system during inflammatory conditions [for example, see Ref. (29, 56–58)].

During the infection with *T. cruzi* (18), *T. gondii* (17, 31), and *L. amazonensis* (9), significant correlations between LB

formation and enhanced generation of eicosanoids, specifically prostaglandin E2 (PGE2), by host cells have been observed. Moreover, *T. gondii* infection also elicited a time-dependent increase of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA levels, indicating that the PGE2 may be a product of an active COX pathway within host cells (17).

By investigating the intracellular specific localization of both COX-2 and PGE2 within *T. cruzi*-infected macrophages, we found that both molecules were immunolocalized in LBs, indicating that LBs act as sources of PGE2 (20). Interestingly, cell treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibited both LB formation and LB-derived PGE2 synthesis in a mechanism independent of COX inhibition (20), as previously documented (59). Therefore, accumulation of LBs in infected host cells may modulate the production of an innate immune response with production of PGE2, which in turn may contribute to a permissive environment for pathogen proliferation. For example, during the infection with *T. gondii*, the increased numbers of LBs within macrophages correlated with high PGE2 levels, decreased nitric oxide (NO) production and parasite survival (31). In fact, high concentrations of PGE2 potentially inhibit the Th1 response, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and/or NO production (60–62). This scenario is also detected during infections with mycobacteria (29, 30), demonstrating that pathogen-induced LB formation associated with PGE2 synthesis is a broader event that can potentially support intracellular pathogen survival. Taken together, these data suggest a model by which LBs are acting as potential stations for the survival of protozoan parasites within host cells, as depicted in **Figure 1**.

## FINAL REMARKS AND FUTURE DIRECTIONS

Several key issues remain to be addressed to better understand the link between LBs and parasite survival within host cells during infections with intracellular parasitic protozoans. It is now clear that host LBs interact with PVs and that the parasite has a remarkable ability to sequester host lipids. What are the molecular mechanisms involved in LB translocation into the PV and how the LB content is extracted by the parasite? In patients with chronic mycobacterial infection (*Mycobacterium leprae*), round classical LBs are observed in contact with pathogen-containing phagosomes and intact bacteria are seen completely enmeshed in accumulated lipid content within the vacuole (63). Are LBs important for pathogen survival in chronic parasitic infections? Considering that LBs are sources for parasite development, could these organelles be target by therapeutic treatment? How significant is the contribution of host LBs and/or parasite LBs to parasite development? Moreover, the mechanisms by which new molecules, including natural products, can affect pathways of the parasite lipid metabolism and both host and parasite LB formation have yet to be fully appreciated.



## AUTHOR CONTRIBUTIONS

RM prepared the manuscript. All authors contributed in part to writing and editing the manuscript and approved the final version.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank present and past members of the Laboratory of Cellular Biology (UFJF, Brazil), Centro de Microscopia (Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG) and Centro de Aquisição e Processamento de Imagens-CAPI (ICB-UFMG) for the use of their facilities. We acknowledge Kennedy Bonjour

for careful assistance with the illustration (**Figure 1**) used in this paper. We apologize to investigators whose relevant work has not been cited because of space constraints.

## FUNDING

This work was supported by from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil-477475/2013-2; 469995/2014-9, 311083/2014-5; 308291-2012-3), Brazilian Ministry of Health and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil-CBB-APQ-02239-14; CBB-APQ-02477-14). DT is a PhD student supported by a CNPq fellowship.

## REFERENCES

- Bar AK, Phukan N, Pinheiro J, Simoes-Barbosa A. The interplay of host microbiota and parasitic protozoans at mucosal interfaces: implications for the outcomes of infections and diseases. *PLoS Negl Trop Dis* (2015) **9**(12):e0004176. doi:10.1371/journal.pntd.0004176
- Sibley LD. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev* (2011) **240**(1):72–91. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00990.x
- Liévin-Le Moal V, Loiseau PM. *Leishmania* hijacking of the macrophage intracellular compartments. *FEBS J* (2015) **282**(4):598–607. doi:10.1111/febs.13601
- Melo RCN, D'Avila H, Wan HC, Bozza PT, Dvorak AM, Weller PF. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *J Histochem Cytochem* (2011) **59**(5):540–56. doi:10.1369/0022155411404073
- Melo RCN, Dvorak AM. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog* (2012) **8**(7):e1002729. doi:10.1371/journal.ppat.1002729
- Saka HA, Valdivia R. Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2012) **28**:411–37. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-153958
- Nicolaou G, Goodall AH, Erridge C. Diverse bacteria promote macrophage foam cell formation via toll-like receptor-dependent lipid body biosynthesis. *J Atheroscler Thromb* (2012) **19**(2):137–48. doi:10.5551/jat.10249
- Dias FF, Zarantonello VC, Parreira GG, Chiarini-Garcia H, Melo RCN. The intriguing ultrastructure of lipid body organelles within activated macrophages. *Microsc Microanal* (2014) **20**(3):869–78. doi:10.1017/S143192761400066X
- Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, et al. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect* (2009) **11**(2):181–90. doi:10.1016/j.micinf.2008.11.006
- Lecoer H, Giraud E, Prevost MC, Milon G, Lang T. Reprogramming neutral lipid metabolism in mouse dendritic leucocytes hosting live *Leishmania amazonensis* amastigotes. *PLoS Negl Trop Dis* (2013) **7**(6):e2276. doi:10.1371/journal.pntd.0002276
- Rabhi S, Rabhi I, Trentin B, Piquemal D, Regnault B, Goyard S, et al. Lipid droplet formation, their localization and dynamics during *Leishmania* major macrophage infection. *PLoS One* (2016) **11**(2):e0148640. doi:10.1371/journal.pone.0148640
- Rabhi I, Rabhi S, Ben-Othman R, Rasche A, Daskalaki A, Trentin B, et al. Transcriptomic signature of *Leishmania* infected mice macrophages: a metabolic point of view. *PLoS Negl Trop Dis* (2012) **6**(8):e1763. doi:10.1371/journal.pntd.0001763
- Rodríguez-Acosta A, Finol HJ, Pulido-Méndez M, Márquez A, Andrade G, González N, et al. Liver ultrastructural pathology in mice infected with *Plasmodium berghei*. *J Submicrosc Cytol Pathol* (1998) **30**(2):299–307.
- Pulido-Méndez M, Finol HJ, Girón ME, Aguilar I. Ultrastructural pathological changes in mice kidney caused by *Plasmodium berghei* infection. *J Submicrosc Cytol Pathol* (2006) **38**(2–3):143–8.
- Dumont ME, Dei-Cas E, Maurois P, Slomianny C, Prensier G, Houcke-Lecomte M, et al. [Histopathology of the liver and kidney during malaria: relation to malaria-induced dyslipoproteinemia]. *Ann Parasitol Hum Comp* (1988) **63**(3):171–83.
- Charron AJ, Sibley LD. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* (2002) **115**(Pt 15):3049–59.
- Gomes AF, Magalhaes KG, Rodrigues RM, de Carvalho L, Molinaro R, Bozza PT, et al. *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN- $\gamma$  and PGE<sub>2</sub>. *Parasit Vectors* (2014) **7**:47. doi:10.1186/1756-3305-7-47
- Melo RCN, D'Avila H, Fabrino DL, Almeida PE, Bozza PT. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell* (2003) **35**(1):59–67. doi:10.1016/S0040-8166(02)00105-2
- Melo RCN, Fabrino DL, Dias FF, Parreira GG. Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflamm Res* (2006) **55**(8):342–8. doi:10.1007/s00011-006-5205-0
- D'Avila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, et al. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E generation and increased parasite growth. *J Infect Dis* (2011) **204**(6):951–61. doi:10.1093/infdis/jir432
- Fabro AE, Calzolari G. [Increase of lipids in human chagasic placentas: cytochemical and biochemical study]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* (1990) **48**(1–2):25–32.
- Helms JB, Kaloyanova DV, Strating JR, van Hellemond JJ, van der Schaar HM, Tielens AG, et al. Targeting of the hydrophobic metabolome by pathogens. *Traffic* (2015) **16**(5):439–60. doi:10.1111/tra.12280
- Coppens I. Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis. *Cell Microbiol* (2006) **8**(1):1–9. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00647.x
- Welte MA. Proteins under new management: lipid droplets deliver. *Trends Cell Biol* (2007) **17**(8):363–9. doi:10.1016/j.tcb.2007.06.004
- Wan HC, Melo RCN, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J* (2007) **21**(1):167–78. doi:10.1096/fj.06-6711.com
- Melo RCN, Weller PF. Unraveling the complexity of lipid body organelles in human eosinophils. *J Leukoc Biol* (2014) **96**(5):703–12. doi:10.1189/jlb.3RU0214-110R
- Melo RCN, Machado CRS. *Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. *Exp Parasitol* (2001) **97**(1):15–23. doi:10.1006/expr.2000.4576
- Melo RCN. Acute heart inflammation: ultrastructural and functional aspects of macrophages elicited by *Trypanosoma cruzi* infection. *J Cell Mol Med* (2009) **13**(2):279–94. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00388.x
- D'Avila H, Melo RCN, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol* (2006) **176**(5):3087–97. doi:10.4049/jimmunol.176.5.3087
- Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VG, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol* (2010) **87**(3):371–84. doi:10.1189/jlb.0609433

31. Mota LA, Roberto Neto J, Monteiro VG, Lobato CS, Oliveira MA, Cunha M, et al. Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associate with the parasitophorous vacuole and decrease their microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2014) **109**(6):767–74.
32. Combs TP, Nagaiyothi, Mukherjee S, de Almeida CJ, Jelicks LA, Schubert W, et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem* (2005) **280**(25):24085–94. doi:10.1074/jbc.M412802200
33. Cocchiari JL, Kumar Y, Fischer ER, Hackstadt T, Valdivia RH. Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the *Chlamydia trachomatis* parasitophorous vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) **105**(27):9379–84. doi:10.1073/pnas.0712241105
34. Dumoux M, Hayward RD. Membrane contact sites between pathogen-containing compartments and host organelles. *Biochim Biophys Acta* (2016). doi:10.1016/j.bbali.2016.01.018
35. Simoes AP, Roelofsen B, Op den Kamp JA. Incorporation of free fatty acids can explain alterations in the molecular species composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in human erythrocytes as induced by *Plasmodium falciparum*. *Cell Biol Int Rep* (1992) **16**(6):533–45. doi:10.1016/S0309-1651(05)80052-9
36. Itoe MA, Sampaio JL, Cabal GG, Real E, Zuzarte-Luis V, March S, et al. Host cell phosphatidylcholine is a key mediator of malaria parasite survival during liver stage infection. *Cell Host Microbe* (2014) **16**(6):778–86. doi:10.1016/j.chom.2014.11.006
37. Hamid PH, Hirzmann J, Kerner K, Gimpl G, Lochnit G, Hermosilla CR, et al. *Eimeria bovis* infection modulates endothelial host cell cholesterol metabolism for successful replication. *Vet Res* (2015) **46**:100. doi:10.1186/s13567-015-0230-z
38. Nishikawa Y, Quittnat F, Stedman TT, Voelker DR, Choi JY, Zahn M, et al. Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. *Cell Microbiol* (2005) **7**(6):849–67. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00518.x
39. Labaied M, Jayabalasingham B, Bano N, Cha SJ, Sandoval J, Guan G, et al. Plasmodium salvages cholesterol internalized by LDL and synthesized de novo in the liver. *Cell Microbiol* (2011) **13**(4):569–86. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01555.x
40. Ehrenman K, Wanyiri JW, Bhat N, Ward HD, Coppens I. *Cryptosporidium parvum* scavenges LDL-derived cholesterol and micellar cholesterol internalized into enterocytes. *Cell Microbiol* (2013) **15**(7):1182–97. doi:10.1111/cmi.12107
41. Jackson KE, Klonis N, Ferguson DJ, Adisa A, Dogovski C, Tilley L. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* (2004) **54**(1):109–22. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04284
42. Caffaro CE, Boothroyd JC. Evidence for host cells as the major contributor of lipids in the intravacuolar network of *Toxoplasma*-infected cells. *Eukaryot Cell* (2011) **10**(8):1095–9. doi:10.1128/EC.00002-11
43. Hamid PH, Hirzmann J, Hermosilla C, Taubert A. Differential inhibition of host cell cholesterol de novo biosynthesis and processing abrogates *Eimeria bovis* intracellular development. *Parasitol Res* (2014) **113**(11):4165–76. doi:10.1007/s00436-014-4092-5
44. Sibley LD, Niesman IR, Parmley SE, Cesbron-Delauw MF. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* (1995) **108** (Pt 4):1669–77.
45. Farese RV Jr, Walthers TC. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* (2009) **139**(5):855–60. doi:10.1016/j.cell.2009.11.005
46. Wenk MR. Lipidomics of host-pathogen interactions. *FEBS Lett* (2006) **580**(23):5541–51. doi:10.1016/j.febslet.2006.07.007
47. Penno A, Hackenbroich G, Thiele C. Phospholipids and lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* (2013) **1831**(3):589–94. doi:10.1016/j.bbali.2012.12.001
48. Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect* (2002) **4**(10):1047–58. doi:10.1016/S1286-4579(02)01629-5
49. Melo RCN, Weller PF. Lipid droplets in leukocytes: organelles linked to inflammatory responses. *Exp Cell Res* (2016) **340**(2):193–7. doi:10.1016/j.yexcr.2015.10.028
50. Weller PF, Dvorak AM. Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. *Blood* (1985) **65**(5):1269–74.
51. Weller PF, Monahan-Earley RA, Dvorak HF, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. *Am J Pathol* (1991) **138**(1):141–8.
52. Dvorak AM, Morgan E, Schleimer RP, Ryeom SW, Lichtenstein LM, Weller PF. Ultrastructural immunogold localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to non-membrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human lung mast cells, alveolar macrophages, type II pneumocytes, and neutrophils. *J Histochem Cytochem* (1992) **40**(6):759–69. doi:10.1177/40.6.1316915
53. Dvorak AM, Morgan ES, Tzizik DM, Weller PF. Prostaglandin endoperoxidase synthase (cyclooxygenase): ultrastructural localization to nonmembrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human eosinophils and 3T3 fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol* (1994) **105**(3):245–50. doi:10.1159/000236764
54. Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med* (1997) **186**(6):909–20. doi:10.1084/jem.186.6.909
55. Bozza PT, Yu W, Cassara J, Weller PF. Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. *J Leukoc Biol* (1998) **64**(4):563–9.
56. Bandeira-Melo C, Phoofolo M, Weller PF. Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. *J Biol Chem* (2001) **276**(25):22779–87. doi:10.1074/jbc.M101436200
57. Vieira-de-Abreu A, Assis EF, Gomes GS, Castro-Faria-Neto HC, Weller PF, Bandeira-Melo C, et al. Allergic challenge-elicited lipid bodies compartmentalize in vivo leukotriene C4 synthesis within eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2005) **33**(3):254–61. doi:10.1165/rcmb.2005-0145OC
58. Pacheco P, Vieira-de-Abreu A, Gomes RN, Barbosa-Lima G, Wermelinger LB, Maya-Monteiro CM, et al. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B4-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. *J Immunol* (2007) **179**(12):8500–8. doi:10.4049/jimmunol.179.12.8500
59. Bozza PT, Payne JL, Morham SG, Langenbach R, Smithies O, Weller PF. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) **93**(20):11091–6. doi:10.1073/pnas.93.20.11091
60. Renz H, Gong J-H, Schmidt A, Nain M, Gemsa D. Release of tumor necrosis factor- $\alpha$  from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. *J Immunol* (1988) **141**(7):2388–93.
61. Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol* (1991) **146**(1):108–13.
62. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* (2012) **188**(1):21–8. doi:10.4049/jimmunol.1101029
63. Mattos KA, Oliveira VC, Berredo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LC, Melo RCN, et al. Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol* (2014) **16**(6):797–815. doi:10.1111/cmi.12279

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Toledo, D'Avila and Melo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.