

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

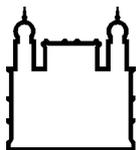
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM *TRYPANOSOMA CRUZI*:
ANÁLISE E CORRELAÇÃO COM A FISIOPATOLOGIA DA
DOENÇA DE CHAGAS**

DANIEL AFONSO DE MENDONÇA TOLEDO

**Rio de Janeiro
2013**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DANIEL AFONSO DE MENDONÇA TOLEDO

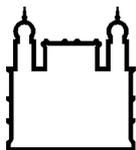
**Corpúsculos Lipídicos em *Trypanosoma cruzi*: análise e correlação
com a fisiopatologia da doença de Chagas**

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

Orientador (es): Prof. Dra. Rossana Corrêa Netto de Melo
Prof. Dra. Heloisa D'Ávila da Silva Bizarro

RIO DE JANEIRO

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Daniel Afonso de Mendonça Toledo

**Corpúsculos Lipídicos em *Trypanosoma cruzi*: análise e correlação
com a fisiopatologia da doença de Chagas**

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

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Nome - **Presidente**
Prof. Dr. Nome
Prof. Dr. Nome
Prof. Dr. Nome
Prof. Dr. Nome

Rio de Janeiro, de de 20

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

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

À Deus, que durante os momentos mais difíceis da minha vida foi onde encontrei conforto e força para aceitar os fatos e seguir a diante.

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

À minha orientadora Dra. Rossana Corrêa Netto de Melo, pelos ensinamentos ao longo dos anos e fundamental participação para o desenvolvimento desta dissertação. 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 dissertação.

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

Ao Dr. Ruben Menna Barreto por permitir meu treinamento em seu laboratório.

Às Dra(s). Suzana Côrte-Real e Helene Barbosa da plataforma de microscopia eletrônica da FIOCRUZ pelo auxílio e orientação no desenvolvimento de parte desse trabalho. Gostaria de agradecer também aos técnicos que me auxiliaram durante esse processo.

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

À Livia Teixeira pela contribuição na elaboração desse trabalho.

Ao Jaime pela amizade e companheirismo durante minha estadia no Rio.

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

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

À amiga Juliana e Aline , 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 namorada, 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 sim, seria possível.

Ao 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.

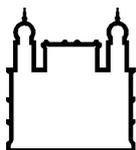
À Amelinha, noiva do meu Pai, por ajudar minha família no momento em que mais precisamos.

À meu Pai, a melhor pessoa que já conheci e à quem devo tudo, literalmente tudo que construí.

Lovely Cruzi



Esta foto foi obtida a partir da observação em microscopia de luz após marcação de tripomastigotas com tetróxido de ósmio. É possível observar corpúsculos lipídicos no citoplasma dos parasitos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

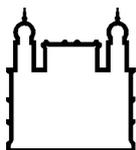
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Corpúsculos Lipídicos em *Trypanosoma cruzi*: análise e correlação com a fisiopatologia da doença de Chagas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniel Afonso de Mendonça Toledo

Corpúsculos Lipídicos (CLs) são organelas complexas, ricas em lipídios, presentes em todas as células eucariotas e muitas bactérias. Diferente de todas as outras organelas as quais se apresentam envoltas por uma bicamada lipídica, os CLs são delimitados apenas por uma monocamada de fosfolipídios. Os CLs apresentam diversas funções como metabolismo de lipídios, sinalização celular e é sítio de produção de mediadores da inflamação. O aumento do número de CLs é documentado em diversas doenças infecciosas e inflamatórias. O acúmulo de CLs no citoplasma de patógenos, em resposta a interações com células do hospedeiro, vem também despertando grande interesse, mas o significado funcional deste acúmulo ainda não é compreendido. Nesse trabalho, investigou-se a formação de CLs no parasito intracelular *Trypanosoma cruzi*, em diferentes situações de interações com células hospedeiras e sua possível correlação com a produção do mediador inflamatório Prostaglandina E₂ (PGE₂). Análises por microscopia de luz (marcação com tetróxido de ósmio, BODIPY e Oil red O) e microscopia eletrônica de transmissão, mostraram que os CLs são comumente observados em formas tripomastigotas e amastigotas do parasito. Foram estudados, por microscopia eletrônica de transmissão, diferentes aspectos (número, tamanho, elétron-densidade) dos CLs de *T. cruzi* em dois tipos de macrófagos infectados: macrófagos peritoneais isolados de camundongos C57/Bl6 em infecção *in vitro* (24 h) e macrófagos de ratas *Holtzman* infectadas *in vivo* (12 dias). O tráfego de vesículas entre parasito e hospedeiro também foi avaliado. Os CLs dos parasitos da infecção *in vivo* mostraram-se significativamente maiores e mais elétron-densos em comparação com os CLs formados em resposta à infecção *in vitro*. Observou-se aumento significativo do número de CLs quando tripomastigotas foram cultivados na presença de macrófagos, em comparação com tripomastigotas cultivados na ausência destas células. Tripomastigotas de cultura foram estimulados com ácidos graxos: Ácido araquidônico (AA) e Ácido oléico (AO) e verificado o número dos CLs e a liberação de PGE₂ pelo parasito. Nossos resultados demonstraram que ambos AA e AO induziram a formação de CLs e produção de PGE₂ num mecanismo dependente da dose e do tempo de estímulos. Foi analisado também, o sítio de produção de PGE₂ através da técnica do Eicosacell, onde observamos que o parasito produz e libera PGE₂, e que essa produção ocorre nos CLs. Esses estudos demonstraram que os CLs são organelas aptas a responderem a estímulos e com funções potenciais no processo de infecção e manutenção do parasito na célula hospedeira. Dessa forma, um novo campo para estudo da doença de Chagas se abre, onde organelas específicas do parasito podem ser exploradas como possíveis alvos terapêuticos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Corpúsculos Lipídicos em *Trypanosoma cruzi*: análise e correlação com a fisiopatologia da doença de Chagas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniel Afonso de Mendonça Toledo

Lipid bodies (LBs) are complex organelles, rich in lipids, present in all eukaryotic cells and many bacteria. Unlike all other organelles which are surrounded by a lipid bilayer, LBs are delimited only by a monolayer of phospholipids. LBs have different functions such as lipid metabolism, signaling, and they are sites for synthesis of inflammatory mediators. The increase LBs is documented in several infectious and inflammatory diseases. The accumulation of LBs 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 *Trypanosoma cruzi*, during different situations of interactions with host cells and its possible correlation with the production of inflammatory mediators Prostaglandin E₂ (PGE₂). Analyses by light microscopy (staining with osmium tetroxide, BODIPY and oil red O) and TEM showed that LBs are commonly observed in trypomastigotes and amastigotes forms of the parasite. Parasite LBs were studied by transmission electron microscopy (TEM) (number, size, electron density) in two types of infected macrophages: peritoneal macrophages isolated from C57/BL6 mice infection *in vitro* (24 hours) and heart macrophages from infected Holtzman rats *in vivo* (12 days). The traffic between parasite and host vesicles was also evaluated. 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. Moreover, 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 trypomastigotes from culture with fatty acids: arachidonic acid (AA) and oleic acid (OA) induced the formation of LBs and PGE₂ production in a mechanism dependent on dose and time of stimuli. Remarkably, sites of PGE₂ production analysed by the Eicosacell technique revealed labeling at LBs. Our data indicate that the parasite produces and releases PGE₂ and that 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 study of Chagas disease opens where specific organelles of the parasite can be explored as possible therapeutic targets.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Ciclo selvagem e doméstico da doença de Chagas	02
Figura 1.2	Distribuição do número de casos da doença de Chagas no mundo de 2006 - 2009	05
Figura 1.3	<i>Conorhinus megistus</i> , espécie de barbeiro transmissor da doença de Chagas	07
Figura 1.4	Diferentes formas do parasito durante o ciclo de vida	09
Figura 1.5	Ciclo de vida do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
Figura 1.6	Aspectos morfológicos da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
Figura 1.7	Estruturas do <i>Trypanosoma cruzi</i> observadas por microscopia eletrônica de transmissão e varredura	18
Figura 1.8	Principais moléculas de superfície celular envolvidas na interação parasito-célula hospedeira	21
Figura 1.9	Aspectos morfológicos de corpúsculos lipídicos (CLs)	23
Figura 4.1	Corpúsculos Lipídicos (CLs) em formas tripomastigotas e amastigotas do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> observados por microscopia de luz	37
Figura 4.2	Corpúsculos lipídicos (CLs) no citoplasma de forma tripomastigota do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> após marcação com Oil Red O (ORO)	38
Figura 4.3	Corpúsculos Lipídicos no citoplasma de formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> observadas no interior de macrófagos	39
Figura 4.4	Dados morfométricos ultraestruturais de corpúsculos lipídicos (CLs) do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> observados no citoplasma de macrófagos	41
Figura 4.5	Elétron-densidade de corpúsculos lipídicos (CLs) de parasitos presentes no citoplasma de macrófagos peritoneais em cultura (A) e em tecido cardíaco (B)	42
Figura 4.6	Macrófago inflamatório do coração de rata mostrando formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> no citoplasma, aos 12 dias de infecção	44
Figura 4.7	Ultraestrutura de formas amastigotas do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> no citoplasma de macrófagos murinos peritoneais, após 24 h de infecção	45
Figura 4.8	Formação de corpúsculos lipídicos (CLs) em formas tripomastigotas do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> após estímulo com ácido araquidônico (AA)	47

Figura 4.9 Formação de corpúsculos lipídicos (CLs) em formas tripomastigotas do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> após estímulo com ácido oléico (AO)	48
Figura 4.10 A interação parasito-hospedeiro induz formação de corpúsculos lipídicos no parasito <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
Figura 4.11 Níveis de Prostaglandina E ₂ (PGE ₂) liberados pelo parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> após estímulo com ácido araquidônico (AA) e ácido oléico (AO)	51
Figura 4.12 Imunomarcção para ADRP e Prostaglandina E ₂ (PGE ₂) em formas tripomastigotas do parasito <i>T. cruzi</i> estimuladas ou não com ácido araquidônico (AA)	53
Figura 6.1 Mecanismos propostos para formação de corpúsculos lipídicos a partir de estímulos e formação de prostaglandina E ₂ (PGE ₂) no <i>Trypanosma cruzi</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
ADRP	Proteína Relacionada à Diferenciação de Adipócitos
AO	Ácido Oléico
BCG	Bacillus Calmette Guérin
BCRD	Bloqueio Completo do Ramo Direito
Ca ⁺⁺	Cálcio
CEUA	Comitê de Ética Animal
CL	Corpúsculo Lipídico
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxigenase
CO ₂	Dióxido de Carbono
Célula NK	Célula Natural Killer
DGAT	Diacilglicerol Aciltransferase
GIPL	Glicoinositolfosfolipídio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
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
kDa	kiloDáton
LXA ₄	Lipoxina A ₄
LO-5 e 15	Lipoxigenases 5 e 15
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
MAP-quinases	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
μL	Microlitro
μM	Micromolar
NO	Óxido Nítrico

Onda T	Repolarização Ventricular
ORO	Oil Red O
PH	Potencial Hidrogeniônico
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PAT	Perilipina, Adipofilina e TIP-47
PPAR- γ	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxixomos gamma
RANTES	Regulador de Ativação Expressa e Secretada por Células T Normais
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

1- INTRODUÇÃO	01
1.1 A doença de Chagas – Dados Históricos	01
1.2 Epidemiologia da doença de Chagas	03
1.3 Vetores da doença de Chagas	05
1.4 <i>Trypanosoma cruzi</i>	08
1.4.1 Aspectos Gerais	08
1.4.2 Ciclo de Vida	10
1.4.3 Aspectos clínicos na infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
1.4.4 Ultraestrutura do <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.4.5 Interação Parasito X Hospedeiro	19
1.5 Corpúsculos Lipídicos	22
1.5.1 Estrutura e Composição	22
1.5.2 Composição de corpúsculos em células do sistema imune	25
1.5.3 Indução da formação de corpúsculos lipídicos por patógenos	25
1.5.4 Corpúsculos Lipídicos em Parasitos	27
2- OBJETIVOS E METAS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3- MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Animais	30
3.2 Obtenção de tripomastigotas	30
3.3 Infecção de ratas Holtzman <i>in vivo</i>	30
3.4 Infecção de macrófagos <i>in vitro</i>	31
3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão	31
3.6 Análises Morfométricas Ultraestruturais	32
3.7 Estímulo de tripomastigotas com AA e AO	32
3.8 Colorações para Corpúsculos Lipídicos	32

3.9 Dosagem de Prostaglandina E ₂	33
3.10 Quantificação de Corpúsculos lipídicos	34
3.11 Eicosacell	34
3.12 Análises Estatísticas	35
4 – RESULTADOS	36
4.1 - Diferentes técnicas de microscopia revelam a presença de corpúsculos lipídicos no citoplasma do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
4.2 – Corpúsculos lipídicos de <i>Trypanosoma cruzi</i> são organelas dinâmicas que variam em tamanho e elétron-densidade mediante interação com o hospedeiro	40
4.3 - Sinais de tráfego lipídico entre o parasito e o hospedeiro	43
4.4 - Ácido Araquidônico, ácido oléico e a interação com o hospedeiro induzem a formação de corpúsculos lipídicos em formas tripomastigotas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
4.5 - <i>Trypanosoma cruzi</i> é capaz de liberar PGE ₂ quando estimulado com ácido araquidônico	50
4.6 - Corpúsculos Lipídicos de <i>Trypanosoma cruzi</i> são sítios de formação de PGE ₂	52
5 – DISCUSSÃO	55
6 – CONCLUSÕES	60
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. Introdução

1.1 A doença de Chagas – Dados Históricos

Conhecida há mais de 100 anos, a doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada no Brasil e outros países (Hotez e cols., 2007; Yacoub e cols., 2008), pois acomete populações de baixa renda e tem pouco interesse público e econômico, com investimentos deficientes 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 sabe uma medida de cura efetiva. Além disso, ainda não são bem conhecidos os mecanismos celulares e moleculares os quais fazem com que o parasito causador da doença se mantenha, evadindo-se do sistema imunológico do hospedeiro.

A história da doença de Chagas é bem difundida no Brasil, e tem como pivô o lendário Carlos Chagas, cujo sobrenome caracterizou a nomenclatura da doença (Chagas, 2008; Lewinsohn, 1979). 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 em laboratório na prática de atividades relacionadas ao estudo da malária, o que foi importante para sua formação e trabalho como médico sanitário. Concluiu o curso de medicina em 1903, com orientação de Oswaldo Cruz (Chagas, 1922b; Kropf e Sa, 2009; Lewinsohn, 1979).

Após sua formação, Carlos Chagas adquiriu várias experiências e práticas 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, a trabalhar no controle da malária em Lassance - MG, local onde havia a construção de uma estrada de ferro, onde ocorria alta incidência de trabalhadores acometidos por várias doenças tropicais (Chagas, 1922a; Chagas, 1911; Chagas, 1909; Chagas, 1935). 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 (Chagas, 1922a; Chagas, 1911; Chagas, 1909).

Carlos Chagas se interessou e analisou o inseto, identificando no tubo digestivo do

mesmo, protozoários do gênero *Trypanosoma* (Chagas, 1922a; Chagas, 2008; Chagas, 1911; Chagas, 1909; Chagas, 1935). Intitulou o nome específico do protozoário de *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao seu mestre, Oswaldo Cruz (Chagas, 1922a; Chagas, 2008; Chagas, 1922b; Kropf e Sa, 2009; Lewinsohn, 1979). Através de testes com macacos, Carlos Chagas percebeu que esse protozoário era um parasito de células de mamíferos (Chagas, 1922a; Chagas, 2008; Chagas, 1911; Chagas, 1909; Chagas, 1935; Coura e Borges-Pereira, 2010). 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 se tornou grande, 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 (Kropf e Sa, 2009) (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 (Coura e Borges-Pereira, 2010).

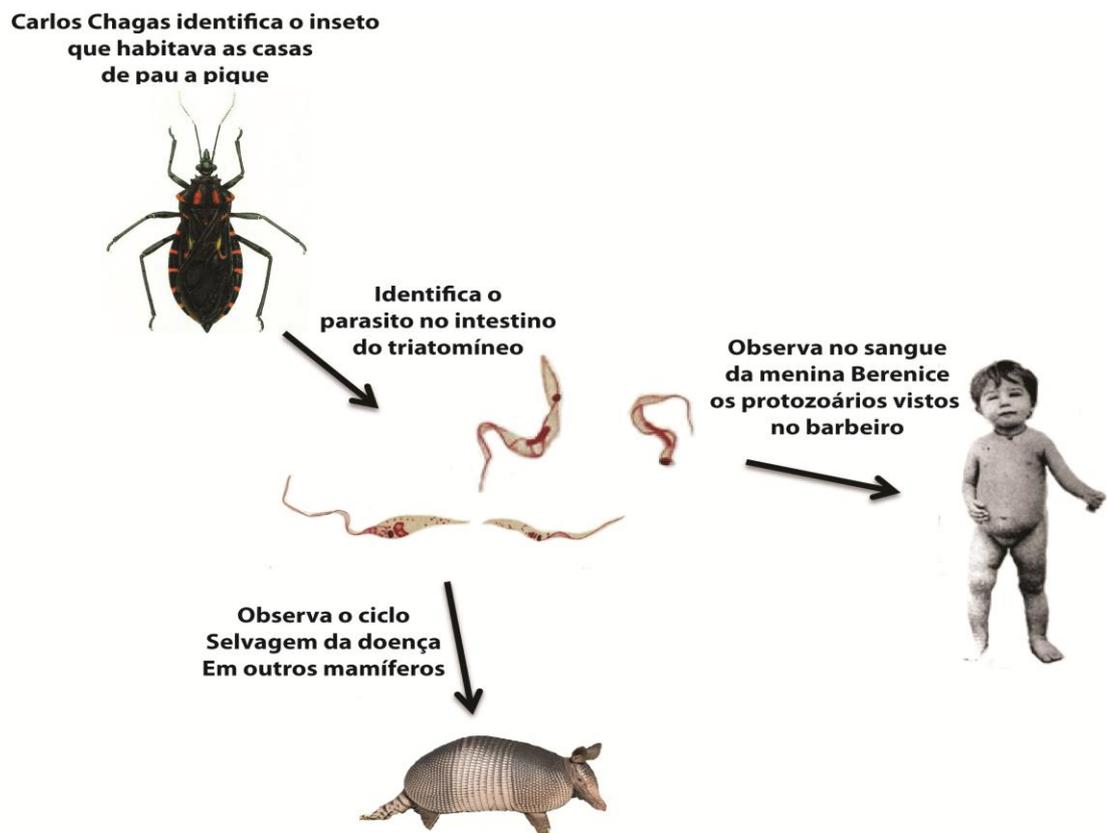


Figura 1.1 – Ciclo selvagem e doméstico da doença de Chagas. Descoberta por Carlos Chagas em (1909-1912) em Lassance - MG. Os hospedeiros definitivo (homem e “tatu”) e intermediário (barbeiro) do parasito são indicados. Modificado de (Chagas, 1909).

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 malária, por exemplo, (Dye e cols., 2013; Hotez e cols., 2007; Mecaskey e cols., 2003; Molyneux e cols., 2005; Molyneux e Zagaria, 2002). 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 (Hotez e cols., 2007).

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 (Coura e Borges-Pereira, 2010). 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 (Briceno-Leon, 2009). Hoje em dia, de 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas pela doença de Chagas principalmente em países continentais, sendo poucos casos descritos na América do Norte (Yacoub e cols., 2008) (Fig. 1.2).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) distribuiu, em sua maioria, em 21 países da América Latina o número de casos de ocorrência da doença de Chagas. No Brasil, estima-se que dois a três milhões de pessoas estejam infectadas. Em 2009, 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 por conta desta doença. 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 (Dias e Laranja, 1948; Laranja e cols., 1948). A partir destes estudos

iniciais, o número de publicações, controle e levantamento acerca da doença cresceu exponencialmente após a década de 1950 (Dias, 1958; Dias, 1955).

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) (Dias e cols., 2002; Rassi e cols., 2008). 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 essa que vem sendo utilizada desde as décadas de 40 e 50, o que contribuiu bastante para erradicação da doença. Alguns autores caracterizam o controle da doença em cinco estágios numa determinada região: estágio 0 (Inatividade), estágio 1 (Atividade inicial), estágio 2 (Eliminação da transmissão doméstica), estágio 3 (Controle da transmissão acidental) e estágio 4 (Estágio final) (Dias e cols., 2002).

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 (Coura, 2006; Valente e cols., 2009).

O indivíduo, quando infectado, apresenta algumas características de acordo com os diferentes estágios da doença e ciclo biológico do parasito no hospedeiro, apresentando um quadro clínico agudo caracterizado por manifestações imediatas e posteriormente um crônico caracterizado por manifestações estabelecidas a longo prazo como problemas cardíacos graves.

O tratamento da doença de Chagas é ainda controverso (Urbina e Docampo, 2003). 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 (Rodrigues Coura e de Castro, 2002; Viotti e cols., 1994).

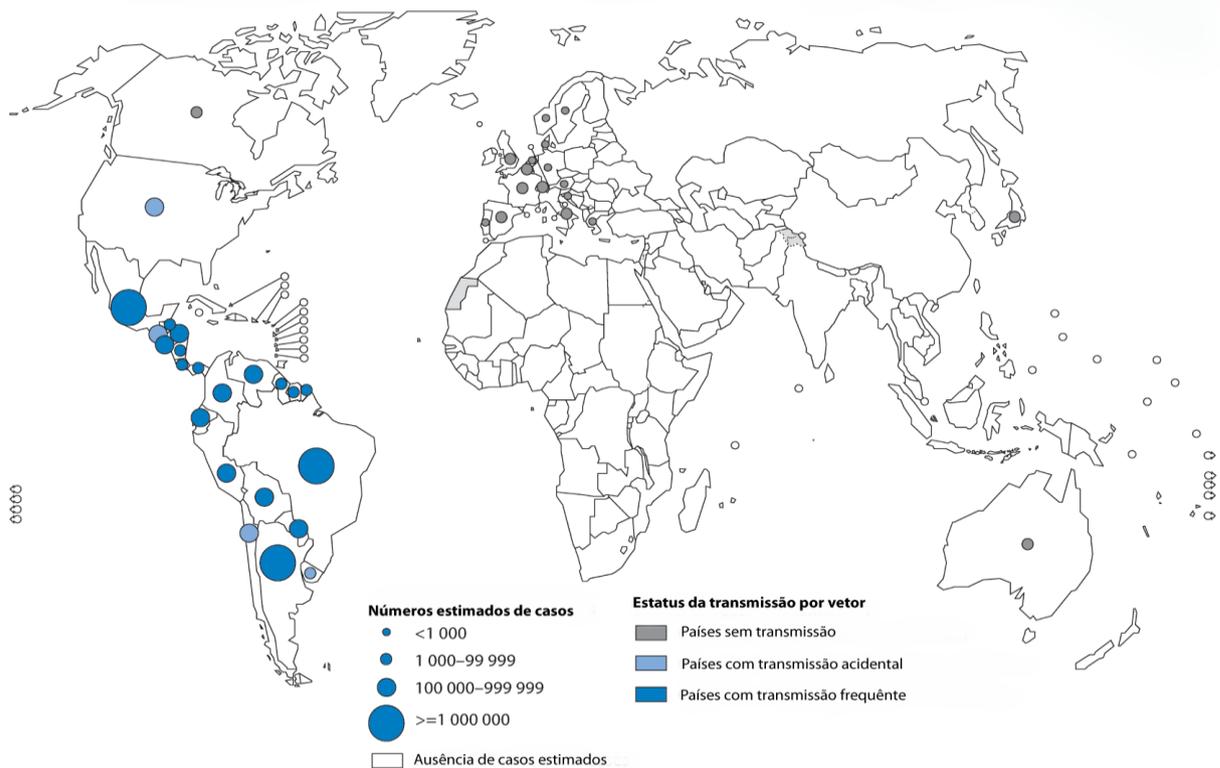


Figura 1.2 - Distribuição do número de casos da doença de Chagas no mundo de 2006 - 2009. Região das Américas do Sul e Central apresentam a maioria da incidência da doença de Chagas no mundo. Figura adaptada (WHO, 2010).

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” (Chagas, 1922a; Chagas, 1911; Chagas, 1909; Kropf e Sa, 2009) (Fig. 1.3). Trata-se de um grupo de insetos pertencentes à ordem hemíptera, caracterização 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 (Fig. 1.3-2). Estes insetos são constituintes da família Reduviidae e subfamília – Triatominae – a qual engloba os hemípteros hematófagos transmissores da doença de Chagas (Chagas, 1935; Jurberg e cols., 1997; Rebelo e cols., 1998).

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 (Bargues e cols., 2006; Noireau, 2009). 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 (Chagas, 1909). 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 14 gêneros, com aproximadamente 115 espécies (Jurberg e cols., 1997; Rebelo e cols., 1998). Dentro da subfamília Triatominae encontram-se três gêneros principais (*Panstrongylus*, *Triatoma*, *Rhodnius*), capazes de transmitir a doença de Chagas (Rebelo e cols., 1998). No Brasil existem cerca de nove espécies responsáveis pela transmissão da doença de Chagas humana, pois são capazes de colonizar dentro das cafuas, moradas características de regiões de baixa renda, o que torna essas espécies domesticadas e em maior contato com os humanos, favorecendo as infecções. As principais espécies são: *T. infestans*, *P. megistus*, *T. sórdida*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* (Correa, 1968). 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 à infecções em outros animais.

A espécie de “barbeiro” mais comum e de maior relevância é a espécie *Triatoma infestans*, devido a características que favorecem a infecção em hospedeiros humanos. Esta espécie possui características como: 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 (Bargues e cols., 2006; Noireau, 2009). 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 (Bryan e cols., 1994).

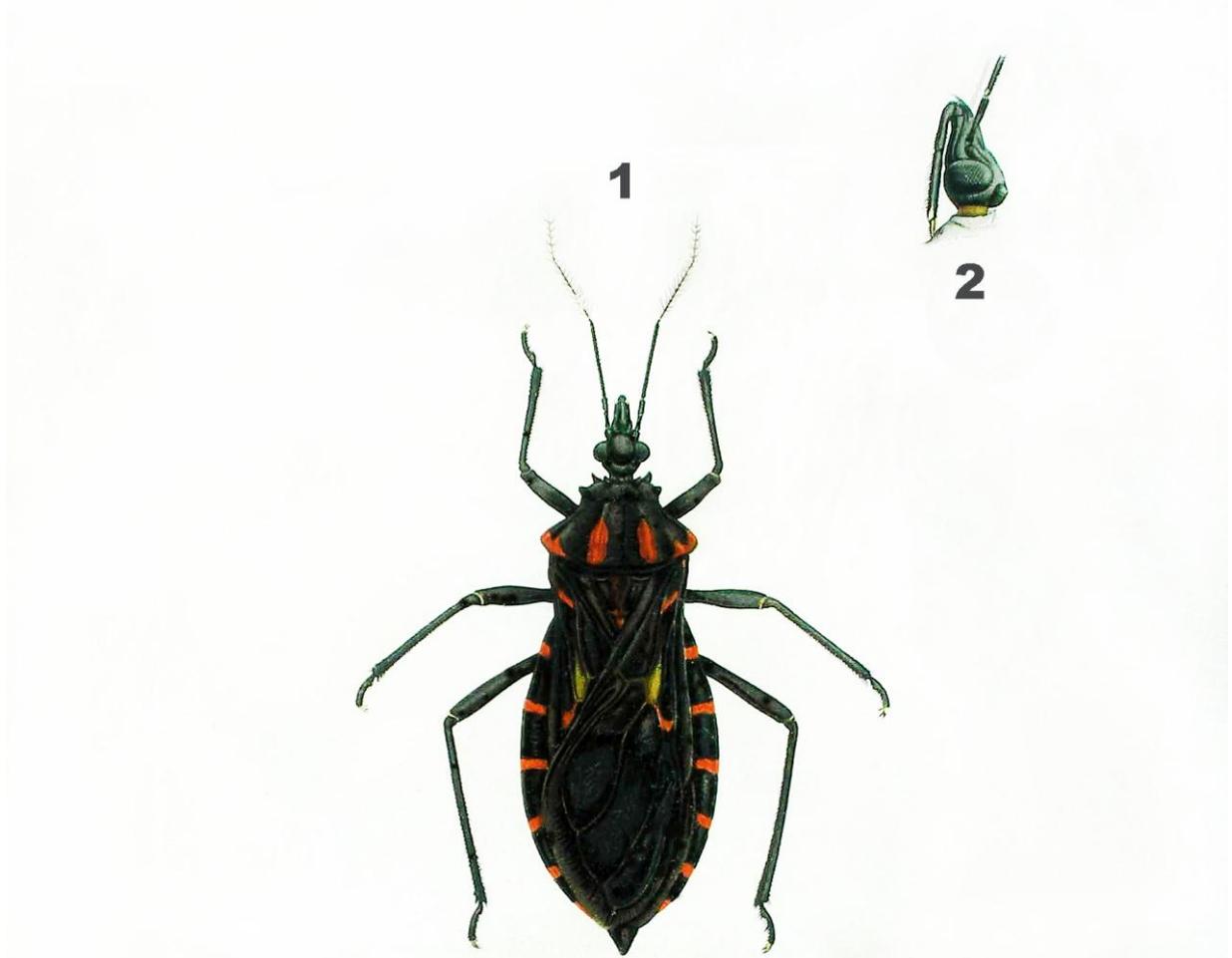


Figura 1.3 - *Conorhinus megistus*, espécie de barbeiro transmissor da doença de Chagas (1). Em 2 é possível visualizar o aparelho bucal tipo picador-sugador. Figura modificada de (Chagas, 1909).

1.4 *Trypanosoma cruzi*

1.4.1 Aspectos Gerais

O agente etiológico da doença de Chagas ou tripanossomíase americana, consiste no protozoário *Trypanosoma 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. 1.4 B), estrutura essa formada por um tipo especial de DNA, o chamado kDNA, localizado na base da célula do protozoário (De Souza, 2009). Possui apenas um núcleo e um flagelo (Fig. 1.4 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. 1.4 B) que em associação ao flagelo auxilia nos movimentos celulares.

O *T. cruzi*, apresenta diversas formas durante seu ciclo de vida (Fig. 1.4 A), caracterizadas pela perda de algumas estruturas celulares como, por exemplo, do flagelo em amastigotas e aquisição de outras estruturas, como por exemplo, membrana ondulante em tripomastigotas. Pode haver variações na constituição molecular e no tamanho celular, como ocorre quando o parasito muda de formas durante o ciclo de vida. Todos esses processos estão associados à necessidade de adaptação do parasito ao meio no qual está inserido e fase do ciclo de vida (Contreras e cols., 1993; Tyler e Engman, 2001).

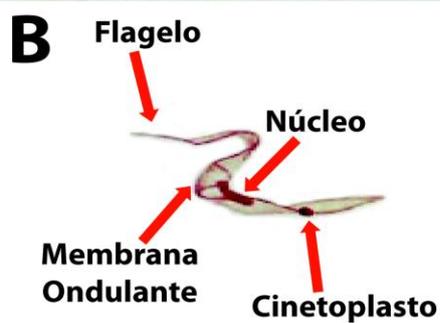
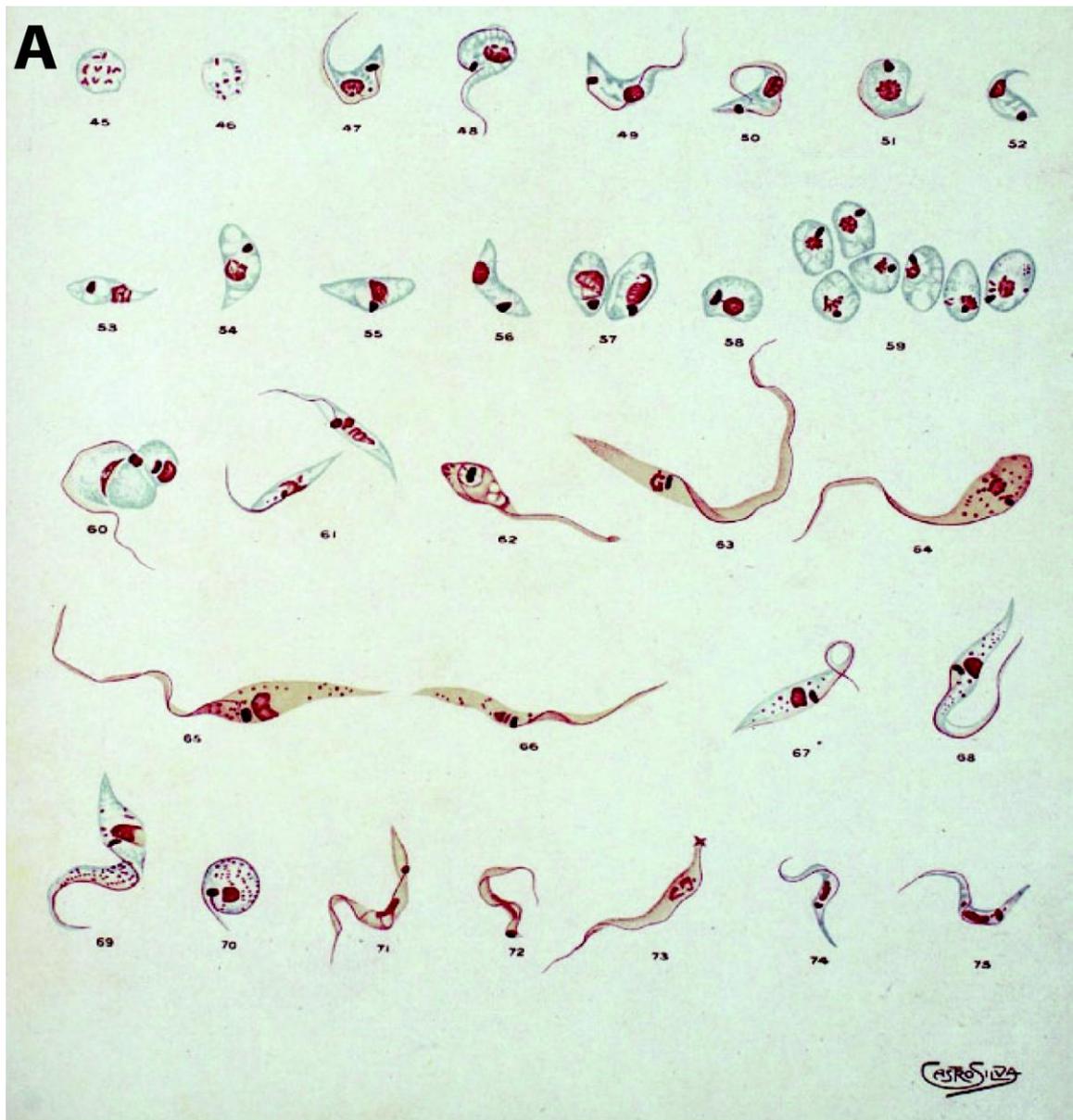


Figura 1.4 – Diferentes formas do parasito durante o ciclo de vida. Em (A) desenho feito por Carlos Chagas durante pesquisa com o parasito *Trypanosoma cruzi* em 1909, destacando as várias formas observadas do parasito durante parte do ciclo de vida. Em (B) estruturas importantes do parasito são indicadas pelas setas vermelhas. Modificado de (Chagas, 1909).

1.4.2 Ciclo de Vida

O ciclo de vida do *Trypanosoma 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 *Trypanosoma 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 sobre a ferida já na forma tripomastigota metacíclica infectante, 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 nesse hospedeiro (Burleigh e Andrews, 1995; Tyler e Engman, 2001) (Fig. 1.5).

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 (Burleigh e Andrews, 1995) (Fig. 1.5). 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 (Chagas, 1909) (Fig. 1.4).

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 microscópicos. Os amastigotas encontram-se imóveis, produzindo grandes quantidades de moléculas. Amastigotas constituem a forma replicativa do parasito, apresentando-se caracteristicamente no interior das células hospedeiras dos organismos infectados, principalmente macrófagos e células musculares cardíacas (Burleigh e Andrews, 1995) (Fig. 1.4 A, formas numeradas de 57-59).
- Epimastigota: forma transitória entre a amastigota e tripomastigota. 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 mais especificamente. Quando o barbeiro suga os tripomastigotas sanguícolas através de seu aparelho bucal, estas formas do parasito migram para o intestino do inseto onde se transformam em epimastigotas. Quando caem no reto do inseto e estão prontos para infectar um vertebrado, os epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos. A forma epimastigota, é uma forma evolutiva de hospedeiros invertebrados, sendo as formas

tripomastigotas tanto sanguícola quanto metacíclicas, e a forma amastigota, formas evolutivas de hospedeiros vertebrados (Fig. 1.4 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 1.4 A formas numeradas de 74 e 45).

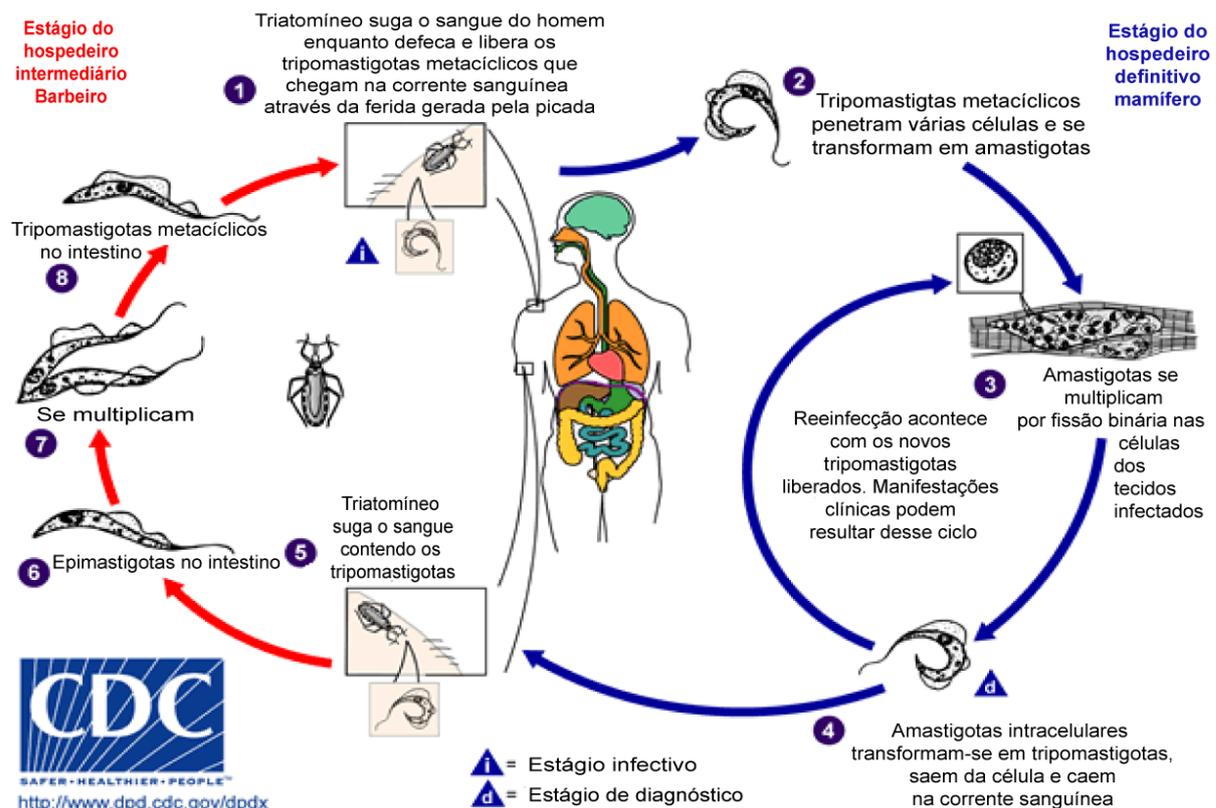


Figura 1.5 – Ciclo de vida do parasito *Trypanosoma cruzi*. As principais formas do ciclo de vida do parasito e os respectivos locais onde se encontram nos hospedeiros intermediário e definitivo são indicados. Esquema adaptado do Centro de Controle e Prevenção de Doenças do governo Americano - CDC.

1.4.3 Aspectos clínicos na infecção pelo *Trypanosoma 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 fase aguda, pode haver ou não os sintomas que correspondem aos fenômenos clínicos que se estabelecem nos primeiros dias ou meses da infecção, sendo diagnosticada pelo encontro do parasito no sangue periférico. Pode-se também encontrar tripomastigotas circulando periféricamente no líquido cefalorraquidiano, no leite e no sêmen (Calabrese e cols., 1994; Chimelli e Scaravilli, 1997).

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. 1.6). 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 (Calabrese e cols., 1994; Chimelli e Scaravilli, 1997).

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. 1.6). Essa disposição nos tecidos, e a grande característica proliferativa do *Trypanosoma 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 hepatoesplenomegalia (Laranja e cols., 1948). Às vezes se agrava numa forma meningoencefálica, principalmente nos primeiros meses ou anos de vida (Laranja e cols., 1948; Teixeira e cols., 2006).

Quando existem sinais de infecção, estes podem ser oculares (Sinal de Romaña) ou cutâneos (Chagoma de Inoculação) (Chagas, 1930; Laranja e cols., 1948). 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 (Laranja e cols., 1948). 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 (Laranja e cols., 1948).

As alterações eletrocardiográficas encontradas na fase aguda estão na dependência do maior ou menor acometimento do coração. As principais alterações são: alargamento do espaço PR (intervalo entre o processo de despolarização atrial e ventricular), alterações primárias de onda T (correspondente a repolarização ventricular), e extrassístoles ventriculares (Chagas, 1930; Morris e cols., 1990; Yacoub e cols., 2008). A fase aguda é o passo inicial para o agravamento da doença que posteriormente se instala na fase crônica. É, muitas 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 (Duffy e cols., 2013; Pierimarchi e cols., 2013; Verissimo da Costa e cols., 2012).

A fase crônica pode ser sintomática e oferecer ao portador indícios como: palpitação, dispnéia, edema, dor precordial, tosse, tonturas, desmaios, acidentes embólicos, extrassistolias. 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 (Borges-Pereira e cols., 1998). O raio-x de tórax pode revelar cardiomegalia global discreta, moderada ou acentuada, aumento isolado de ventrículo esquerdo, aumento biventricular e congestão vascular pulmonar (Laranja e cols., 1948).

Alterações no trato gastrointestinal são muito comuns na 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 (Bassotti e Villanacci, 2013; Kamiji e De Oliveira, 2005; Matsuda e cols., 2009; Teixeira e cols., 2006). O megacólon se caracteriza por constipação intestinal (instalação lenta e insidiosa), meteorismo, distensão abdominal e fecaloma (Florez e cols., 2010; Matsuda e cols., 2009). 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 paracardíaca direita ao simples exame de tórax (Kamiji e De Oliveira, 2005; Matsuda e cols., 2009; Rassi e cols., 2012).

A doença de Chagas pode ser amenizada caso o portador esteja atento aos sintomas e detecte imediatamente seu problema (Chamond e cols., 2002). 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.

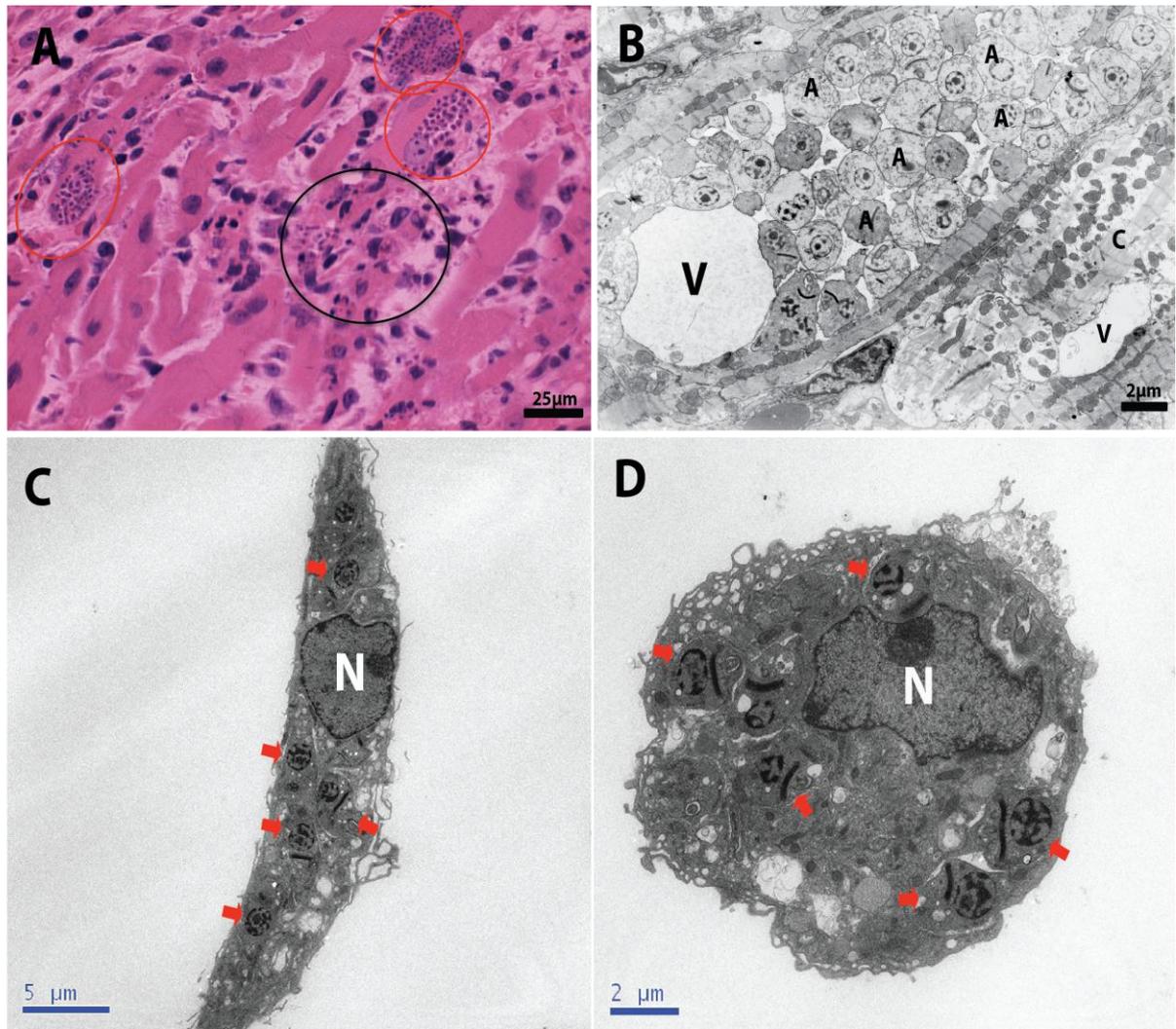


Figura 1.6 – Aspectos morfológicos da infecção por *Trypanosoma cruzi*. (A, B) Secções de tecido muscular cardíaco de rata infectada, observadas através de microscopia de luz (A) ou microscopia eletrônica de transmissão (B). Em (A), diversos ninhos de amastigotas (círculos vermelhos) e infiltrado inflamatório 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 caracterizado 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 com técnicas histológicas (A, coloração hematoxilina-eosina) e/ou para microscopia eletrônica de transmissão (B-D). V, vacúolo; N, núcleo dos macrófagos. A e B: imagens modificadas de (D'Avila e cols., 2012); C e D (Toledo e cols., imagens não publicadas).

1.4.4 Ultraestrutura do *Trypanosoma 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. 1.7 A) (Barrias e cols., 2010; De Souza e cols., 2010; Rocha e cols., 2008; Souto-Padron e cols., 1984a). 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 (Souto-Padron e cols., 1984a).
- Flagelo único e basal: 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. 1.7 B) (De Souza, 2009; Rocha e cols., 2008). Nesses estágios do ciclo, o parasito necessita de mobilidade, para ir de encontro às células hospedeiras e ou “nadar” pelo sangue até ser sugado novamente por um barbeiro e recomeçar o ciclo de vida no invertebrado. A forma amastigota retrai o flagelo para uma bolsa denominada bolsa flagelar devido a seu modo de vida intracelular e estático (De Souza, 2009).
- Citoesqueleto: tem papel importante na função celular do parasito. Tem aspecto de organização helicoidal sub-pelicular com microtúbulos associados à membrana (Barbosa e Meirelles, 1995; De Souza, 2009). Microfilamentos se organizam num sistema actina-miosina sendo responsável pela mobilidade no citóstomo, por exemplo (Fig. 1.7 F) (De Souza, 2009).
- Complexo cinetoplasto-mitocondrial: é uma estrutura que varia com a forma do parasito, formada por uma mitocôndria de tamanho avantajado responsável por praticamente toda respiração celular do parasito. Possui DNA próprio, conhecido como kDNA (Fig. 1.7 E) (De Souza, 2009). 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.
- Glicosomos: são estruturas esféricas de matriz homogênea, onde podem ser encontradas proteínas de alto ponto isoelétrico semelhantes a catalases por exemplo (De Souza, 2009). 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 glicosomos são provenientes do genoma do núcleo e transferidas através do citosol para os glicosomos, onde são armazenadas, (revisto em (De Souza, 2009; Penha e cols., 2009)).

- 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 (Correa e cols., 2002; Docampo e Moreno, 2011; Miranda e cols., 2000; Moreno e Docampo, 2009). Através de análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET), pode haver certa dúvida em relação à morfologia dos acidocalcisomas, confundindo-os com alguns corpúsculos lipídicos elétron-densos. Porém a caracterização ultraestrutural da membrana tira qualquer dúvida existente, já que corpúsculos lipídicos apresentam uma monocamada lipídica o que difere das demais organelas que possuem uma bicamada lipídica como os acidocalcisomas (Fig. 1.7 D).

- Vacúolo contrátil: comum no controle da osmorregulação, pode estar associando à acidocalcisomas em vias de metabolismo interno (De Souza, 2009).

- Retículo endoplasmático, complexo de Golgi, bolsa flagelar, citóstoma e reservossomos: compõem basicamente a via endocítica do parasito (De Souza, 2009; Sant'Anna e cols., 2004). Os reservossomos estão associados a diversas funções, e tem como principal papel o armazenamento de moléculas como lipídios (Pereira e cols., 2011). Várias proteínas, que possuem papel na *metacicloogênese* do parasito, também estão associadas à reservossomos (Fig. 1.7 C) (Pereira e cols., 2011; Sant'Anna e cols., 2009; Sant'Anna e cols., 2008; Soares, 1999).

- Núcleo: se enquadra como outra estrutura fundamental da célula, de função semelhante aos núcleos de outras células eucariotas (Fig. 1.7 C, E) (De Souza, 2009).

- Corpúsculos lipídicos: estas organelas são descritas na literatura como inclusões com funções energéticas. São, portanto, relacionadas com reserva lipídica, o que posteriormente poderia ser utilizado pelo parasito para manutenção energética da célula (Fig. 1.7 D) (Miranda e cols., 2000).

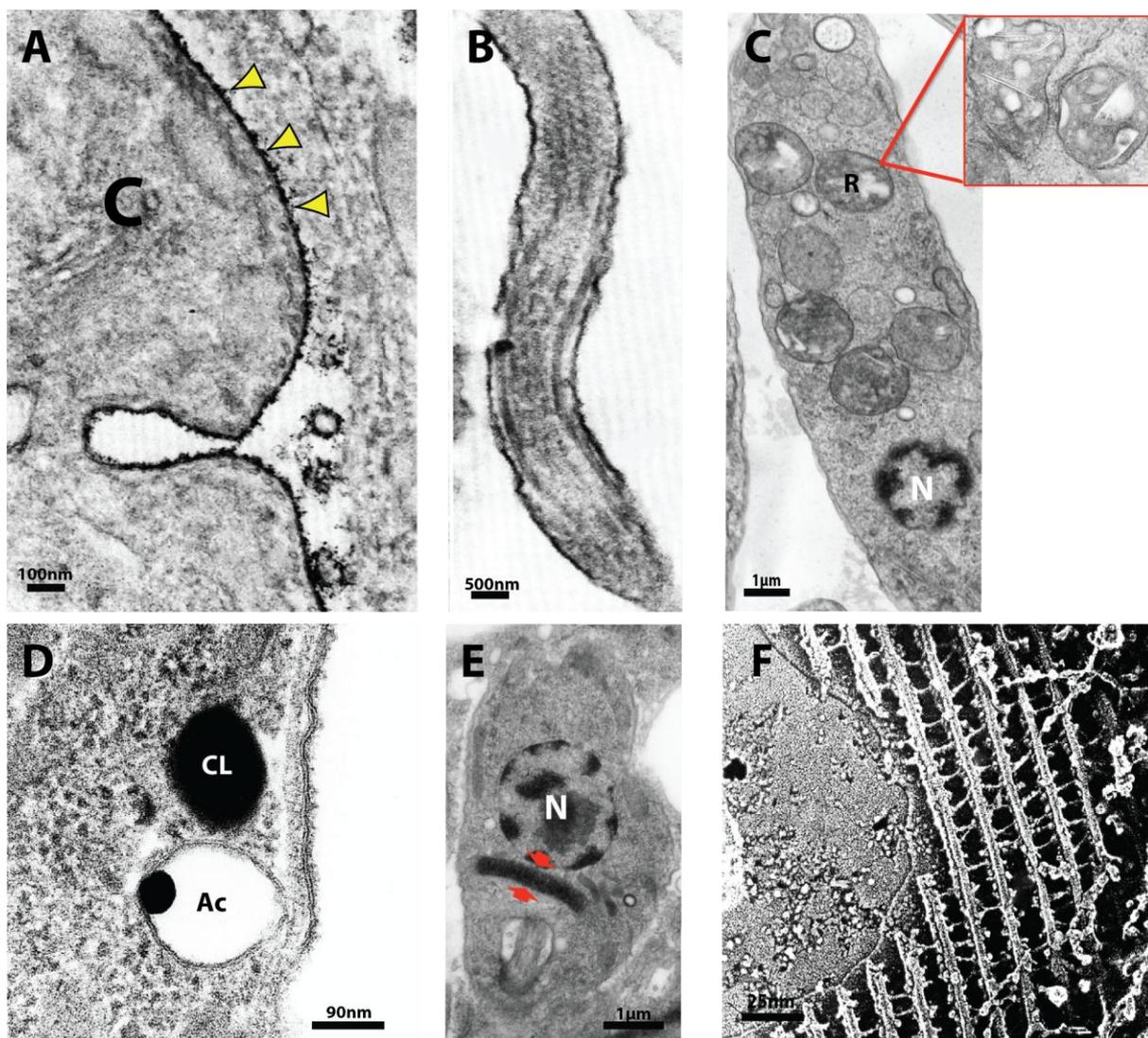


Figura 1.7 – Estruturas do *Trypanosoma cruzi* observadas por microscopia eletrônica de transmissão e varredura. (A) Superfície celular evidenciando moléculas de carboidratos (cabeças de setas amarelas). (B) Flagelo longo e afilado. (C) Reservossomos (R). (D) Acidocalcisoma (Ac) e corpúsculo lipídico (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 (De Souza e Meyer, 1975); C (Sant'Anna e cols., 2009); D (Miranda e cols., 2000); F (Souto-Padron e cols., 1984b); 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 (Barbosa e Meirelles, 1993; Crane e Dvorak, 1982). A superfície do *Trypanosoma cruzi* é totalmente recoberta por mucinas, açúcares de extrema importância para proteção contra a ação de moléculas degradantes do hospedeiro e interação com o hospedeiro (Buscaglia e cols., 2006).

Na superfície das células hospedeiras, lectinas e integrinas funcionam como receptores nesse processo e auxiliam na invasão do parasito (De Souza e cols., 2010). Outras moléculas na superfície da célula hospedeira também são reconhecidas e têm papel chave nesse processo, como os receptores semelhantes a Toll - 4 e 9 que são, por exemplo, reconhecidos pela ceramida GIPL de epimastigotas (De Souza e cols., 2010). Outro receptor, o receptor semelhante a Toll 2, expresso pelas células hospedeiras durante a infecção por *T. cruzi*, age durante a interação protegendo a célula hospedeira contra os mecanismos de apoptose gerados durante um processo de infecção (Ponce e cols., 2012).

Um processo de invasão é algo extremamente complexo envolvendo várias moléculas que estão diretamente ligadas a inúmeras vias de sinalização celular, tanto no parasito quanto no hospedeiro (Bambino-Medeiros e cols., 2011; Fernandes e cols., 2007; Ruiz e cols., 1998). Em (Ruiz e cols., 1998), 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 (Freire-de-Lima e cols., 2012). O ácido siálico é importante molécula da superfície da célula hospedeira, participando no reconhecimento celular, como alvo de ligação de várias moléculas. 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. Desta forma o parasito adquire capacidade de evadir-se do sistema imunológico e de formar gliconjugados importantes para eventos de interação e proteção (Freire-de-Lima e cols., 2010; Freire-de-Lima e cols., 2012).

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 *Trypanosoma cruzi* (Cuevas e

cols., 2003; De Souza e cols., 2010; Ruiz e cols., 1998) (Fig. 1.8). Outras moléculas participantes na proteção do parasito à ação tripanocida incluem as proteases, alguns açúcares e glicoproteínas. Estas moléculas protegem as formas tripomastigotas contra peptídeos antimicrobianos e contra ação de células Natural Killer do hospedeiro, além de protegerem os amastigotas no interior da célula hospedeira depois da internalização (Cuevas e cols., 2003; Yao, 2010).

Seguido o processo de reconhecimento e adesão, o parasito utiliza a via endocítica da própria célula hospedeira para penetrá-la, com o auxílio dos lisossomos da célula hospedeira, formando o vacúolo parasitóforo no citoplasma dessa célula e, posteriormente, evadindo-se para continuar o processo de infecção no citoplasma da célula hospedeira (Barrias e cols., 2010).

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 (Charron e Sibley, 2002; Coppens, 2006; Jackson e cols., 2004; Nishikawa e cols., 2005). Vários trabalhos mostraram em parasitos intracelulares como *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum*, por exemplo, tráfego de lipídios entre parasito e hospedeiro (Charron e Sibley, 2002; Palacpac, 2004). A endocitose de lipídios e proteínas provenientes do meio de cultura, foi demonstrada em *Trypanosoma cruzi*, tendo sido proposta uma possível troca de vesículas lipídicas entre parasito e hospedeiro num processo de infecção (Soares e De souza, 1991).

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 (DosReis, 2000). Algumas moléculas produzidas pelo hospedeiro podem ter ação inibitória no sistema imune, como por exemplo, mediadores lipídicos com perfis anti-inflamatórios como prostaglandina E₂ (PGE₂) e algumas citocinas como interleucina 10 (IL-10). Essas moléculas podem estar sendo produzidas por parasitos como foi demonstrado em cercárias de *Schistosoma mansoni* (Ramaswamy e cols., 2000).

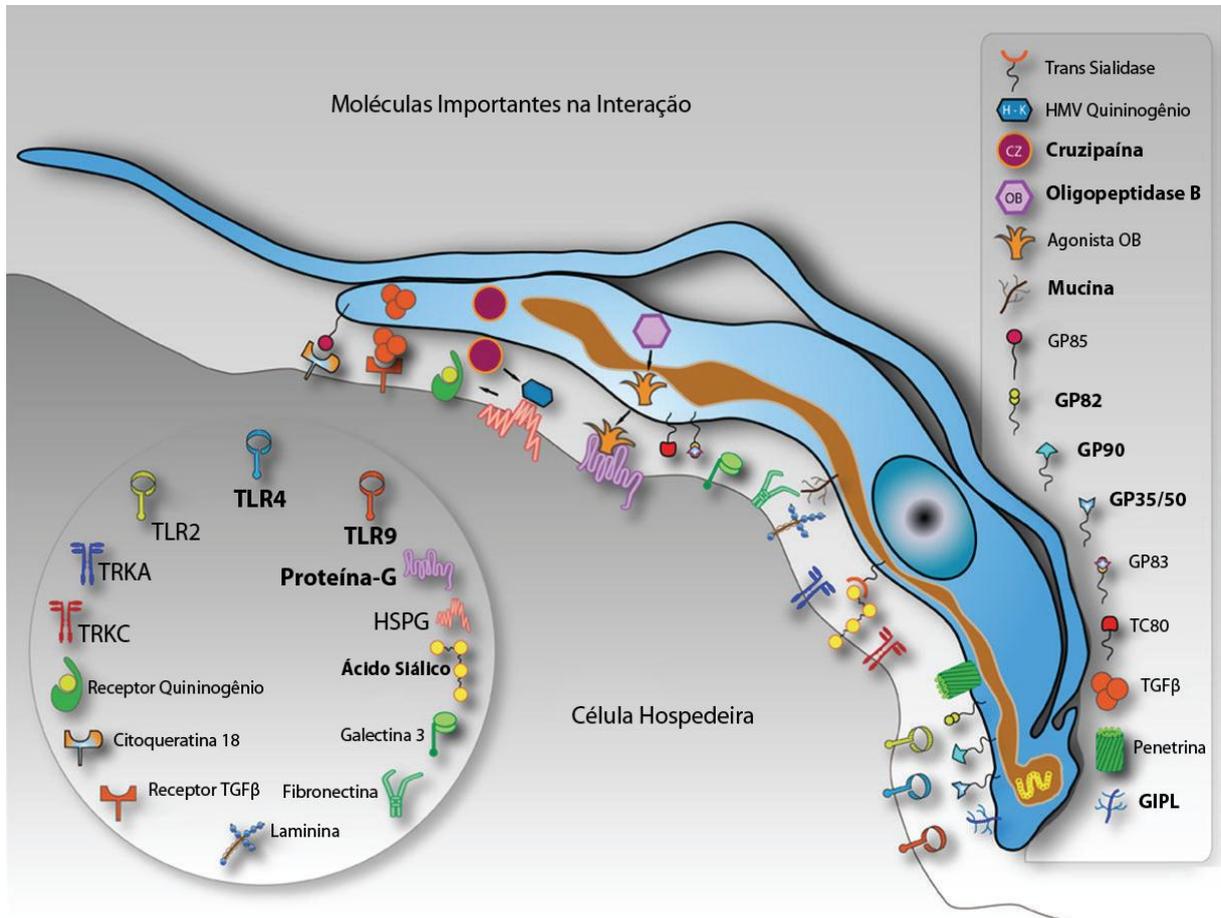


Figura 1.8 - Principais moléculas de superfície celular envolvidas na interação parasito-célula hospedeira. Em negrito estão destacadas as moléculas descritas no texto. Figura modificada de (De Souza e cols., 2010).

1.5 Corpúsculos Lipídicos

Corpúsculos lipídicos, gotas lipídicas ou inclusões lipídicas, são todas denominações para uma organela intracelular presente no citoplasma dos diversos tipos de células, que vão desde organismos extremamente complexos como mamíferos e plantas, a organismos mais simples como algas, fungos, protozoários e bactérias (revisto em (Murphy, 2001; Murphy, 2012)).

1.5.1 Estrutura e Composição

A estrutura dos corpúsculos lipídicos, em contraste às demais organelas celulares as quais mostram-se revestidas por membrana clássica, constituída por bicamada lipídica, possui uma única camada anfipática de fosfolipídios (revisto em (Bozza e cols., 2007; Melo e cols., 2011b; Murphy, 2012)) (Fig. 1.9 A). Portanto, pelo fato não apresentarem uma membrana envoltória verdadeira, os corpúsculos lipídicos são facilmente identificáveis à microscopia eletrônica de transmissão (Melo e cols., 2011b) (Fig. 1.9 B).

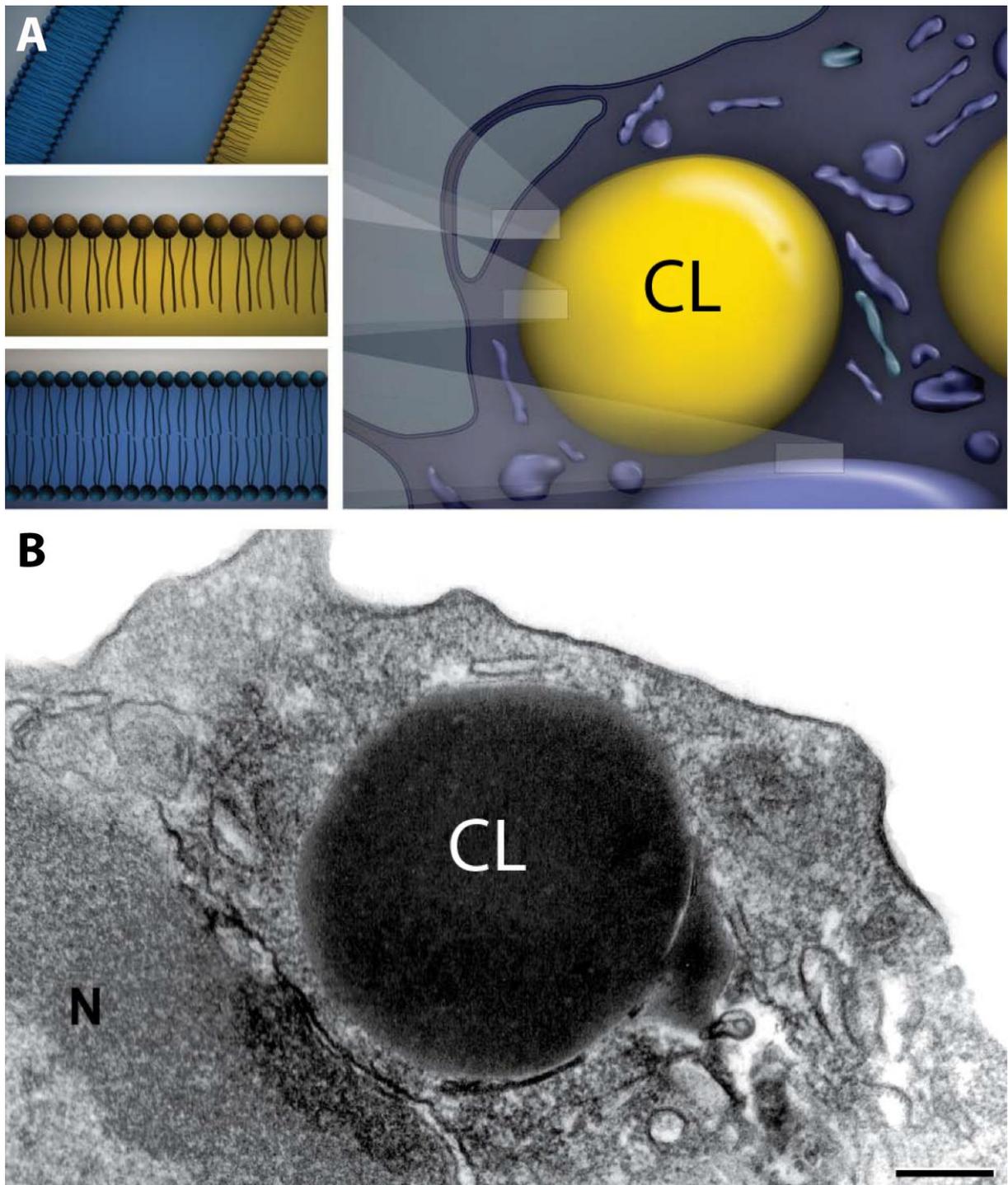


Figura 1.9 – Aspectos morfológicos de corpúsculos lipídicos (CLs). (A) Desenho esquemático ilustrando a estrutura de CLs. Estas organelas encontram-se delimitadas apenas por uma monocamada de fosfolipídios diferindo da organização estrutural de todas as outras organelas, vesículas citoplasmáticas e membrana plasmática, as quais apresentam uma bicamada lipídica. (B) CL elétron-denso observado no citoplasma de um eosinófilo de sangue humano através de microscopia eletrônica de transmissão. N, núcleo. Barra = 500nm. Figura modificada de (Melo e cols., 2011b).

Os corpúsculos lipídicos são geralmente arredondados e, dependendo de sua composição, podem se apresentar bastante elétron-densos ou elétron-lúcidos, ou mesmo em contrastes intermediários quando analisado em microscopia eletrônica de transmissão, após contrastação com tetróxido de ósmio (Dvorak e cols., 1983; Melo e cols., 2011b; Weller e cols., 1991). Quando elétron-densos, os corpúsculos lipídicos apresentam-se ricos em fosfolipídios devido à forte impregnação pelo tetróxido de ósmio, metal pesado que tem forte afinidade e por isso cora fosfolipídios. Quando elétron-lúcidos sua constituição está rica em lipídios neutros, pois indica que o tetróxido de ósmio impregnou pouco durante a marcação. A quantidade, o tamanho, e a elétron-densidade de corpúsculos lipídicos no interior de uma célula vai depender das condições às quais a célula está submetida e dos estímulos externos que agem sobre a célula influenciando em sua constituição (revisto (Melo e Dvorak, 2012; Melo e cols., 2011b). Acredita-se que corpúsculos lipídicos se formam a partir do retículo endoplasmático, porém os mecanismos celulares e moleculares de formação ainda não são totalmente esclarecidos (Murphy, 2001; Wan e cols., 2007).

Quanto à composição, os corpúsculos lipídicos apresentam um número elevado de moléculas. De maneira geral, corpúsculos lipídicos 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 (Bozza e cols., 2007)).

São encontradas nos corpúsculos lipídicos 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 membrana como as proteínas da família Rab de pequenas GTPases, e proteínas envolvidas na sinalização celular como proteínas-quinases, (Brasaemle e cols., 2004; Fujimoto e cols., 2004). As proteínas estruturais de corpúsculos lipídicos mais conhecidas em células de mamíferos constituem a chamada família PAT, denominada recentemente como perilipinas (Kimmel e cols., 2010). 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 (Digel e cols., 2010; Fujimoto e cols., 2004). Proteínas envolvidas no metabolismo e transporte celular como 17- β hidroxisteróide desidrogenase, Acyl CoA sintase também estão presentes em grandes quantidades nos corpúsculos lipídicos. Outras proteínas como tubulina-1 e caveolina, também podem ser encontradas em corpúsculos lipídicos (Brasaemle e cols., 2004; Fujimoto e cols., 2004; Londos e cols., 1999).

1.5.2 Composição de corpúsculos em células do sistema imune

Em células do sistema imune, corpúsculos lipídicos são sítios de formação de mediadores inflamatórios (eicosanóides) e contêm moléculas específicas relacionadas a síntese desses mediadores. Corpúsculos lipídicos 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 eicosanóides (revisto em (Bozza e cols., 2007; Melo e cols., 2011b)).

As principais enzimas presentes em corpúsculos lipídicos relacionadas à formação de eicosanóides são ciclooxigenases (COXs) (D'Avila e cols., 2011; Dvorak e cols., 1994; Dvorak e cols., 1993) 5 e 15- lipooxigenases (5-LO e 15-LO) e leucotrieno C₄ sintase (Bozza e cols., 1997). Além disso, corpúsculos lipídicos apresentam enzimas como fosfolipases e MAP-quinases (Yu e cols., 1998).

Os corpúsculos lipídicos, são sítios de produção de eicosanóides a partir do ácido araquidônico, onde é formado e liberado rapidamente mediante à estimulação celular. Um exemplo desses mediadores é Prostaglandina E₂ (PGE₂), um potente mediador inflamatório que têm o papel de inibir o sistema imune do hospedeiro. A PGE₂ é encontrada sendo formada em corpúsculos lipídicos de macrófagos infectados com *Mycobacterium bovis* BCG, causador da tuberculose bovina ou com *Trypanosoma cruzi* (D'Avila e cols., 2011). Foi demonstrado leucotrieno C₄ em corpúsculos lipídicos de eosinófilos e basófilos estimulados com as quimiocinas, eotaxina/CCL11 e RANTES/CCL5 e também em eosinófilos de modelos murinos em ensaios de alergia e inflamação. Foi encontrado também, leucotrieno B₄ em neutrófilos e macrófagos durante sepse (Pacheco e cols., 2007).

O processo desencadeado em células do sistema imune por situações, como descritas acima, levam corpúsculos lipídicos à mudar em composição e em resposta à ativação das células imunológicas, sendo uma organela intimamente relacionada à processos inflamatórios.

1.5.3 Indução da formação de corpúsculos lipídicos por patógenos

A maioria das células possui um número pequeno de corpúsculos lipídicos no citoplasma, mas a formação destas organelas pode ser rapidamente estimulada quando ocorre interação com diferentes patógenos como parasitas, bactérias e vírus (revisto em (Melo e Dvorak, 2012)). Em doenças por protozoários, como a doença de Chagas, é bem documentado o aumento expressivo do número e diâmetro de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados do hospedeiro (D'Avila e cols., 2012; Melo e cols., 2003; Melo e cols., 2011b). Na

infecção por *Leishmania amazonensis*, observa-se um aumento numérico de corpúsculos lipídicos em macrófagos. Nesse caso, a relação com o processo de autofagia é bastante evidente. O crescimento parasitário é favorecido pela indução de autofagia, seguida pelo aumento do número de corpúsculos lipídicos, produção de PGE₂ e diminuição de Óxido Nítrico (NO) (Pinheiro e cols., 2009).

Os corpúsculos lipídicos são sítios de compartimentalização de ciclooxigenases e lipooxigenases, estando diretamente relacionado à produção de eicosanóides (Bozza e cols., 1997). Desta forma, inibidores de ciclooxigenases, como indometacina, agem diretamente nos corpúsculos lipídicos inibindo as enzimas localizadas nesta organela, diminuindo a produção de mediadores inflamatórios imunossupressores, com isso há uma redução da carga parasitária em camundongos (BALB/c) infectados na leishmaniose experimental (Pinheiro e cols., 2009).

Durante a infecção por *Toxoplasma gondii*, é evidente também a produção de mediadores inflamatórios lipídicos em macrófagos como PGE₂ e LXA₄, resultado de ação de ciclooxigenases sobre o ácido araquidônico nos corpúsculos lipídicos (Aliberti e Bafica, 2005). Também nota-se a produção de lipoxina por macrófagos, que tem importante atuação anti-inflamatória e contribui na evasão do parasito *Toxoplasma gondii* (Aliberti e Bafica, 2005).

Em estágio avançado, durante a malária causada por *Plasmodium berguei*, nota-se a presença de grande quantidade de corpúsculos lipídicos no citoplasma de hepatócitos, o que provavelmente se trata de uma resposta inflamatória da célula em relação à infecção pelo parasito (Rodríguez-Acosta A, 1998). Embora hepatócitos não sejam células do sistema imune, este mecanismo pode indicar uma estratégia envolvida na imunidade, já que corpúsculos lipídicos e seus produtos são importantes durante o processo de defesa do organismo.

Os corpúsculos lipídicos 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 corpúsculos lipídicos é observado nestas células, sendo estas organelas utilizadas pelo parasito como fonte de lipídios e proteínas (Kumar e cols., 2006).

Foi demonstrado também que durante infecção por *Mycobacterium bovis* BCG, tanto em infecção *in vivo* quanto *in vitro*, ocorre um aumento do número de corpúsculos lipídicos no citoplasma de macrófagos e de outros leucócitos (Almeida e cols., 2009; D'Avila e cols., 2006).

Nas infecções bacterianas, também é possível destacar alterações na dinâmica dos corpúsculos lipídicos nas células envolvidas com o processo inflamatório. A infecção por *Mycobacterium bovis* BCG leva a produção de corpúsculos lipídicos em macrófagos, mecanismo que depende tanto de via de sinalização do receptor semelhante a toll 2 (TLR-2) como também da via de sinalização relacionada com a ativação do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxisomos-gamma (PPAR γ) (Almeida e cols., 2009; D'Avila e cols., 2006). Paralelamente ao aumento do número de corpúsculos lipídicos, a produção de PGE₂ pelos macrófagos também é aumentada. Os autores também mostraram que sob a inibição de PPAR γ , ocorre um maior potencial microbicida dos macrófagos (Almeida e cols., 2009). Na infecção por *Mycobacterium leprae* também é evidente o aumento da produção de corpúsculos lipídicos, acompanhada pela liberação de PGE₂ (Mattos e cols., 2010), tanto por macrófagos quanto por células de Schwann (Mattos e cols., 2011).

É evidente a formação de corpúsculos lipídicos durante infecções causadas por diferentes patógenos. O papel destas organelas, no entanto, ainda não se encontra esclarecido, podendo atuar tanto na resistência do hospedeiro como favorecendo a sobrevivência do parasito (revisto em (Melo e Dvorak, 2012)). Diversos trabalhos vêm ressaltando que os corpúsculos lipídicos 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 (Jackson e cols., 2004). No entanto, mais estudos devem ser realizados para entender o papel dos corpúsculos lipídicos na imunidade e inflamação, durante infecções.

1.5.4 Corpúsculos Lipídicos em Parasitos

A presença de corpúsculos lipídicos em protozoários é conhecida por várias décadas. 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 (Chang, 1956). Hoje sabe-se que são organelas evidentes nesse parasito e trata-se de corpúsculos lipídicos (Flaspohler e cols., 1997). Foi mostrada também a ocorrência de corpúsculos lipídicos em parasitos do gênero *Plasmodium* e *Trypanosoma* (revisto em (Coppens e Vielemeyer, 2005)).

A observação de corpúsculos lipídicos em protozoários tem sido classicamente associada ao papel desta organela como fonte de carbono para a sobrevivência do patógeno (De Souza, 2009). No entanto, estudos vêm demonstrando que corpúsculos lipídicos em parasitas podem estar relacionados com outras funções nestes organismos (Flaspohler e cols.,

2010). 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 (Charron e Sibley, 2002). É interessante também observar que em corpúsculos lipídicos de *T. gondii*, estão presentes enzimas importantes no metabolismo lipídico como diacilglicerol aciltransferase (DGAT), enzima importante para o processo de formação do corpúsculos lipídicos (Quittnat e cols., 2004).

A captura de lipídios do hospedeiro para benefício próprio, para formação das suas próprias organelas lipídicas, tem sido mostrada recentemente (Charron e Sibley, 2002; van der Meer-Janssen e cols., 2010). Em *Trypanosoma brucei*, o processo de formação de corpúsculos lipídicos também é evidente, e dependente de proteína quinase (Flaspohler e cols., 2010).

Na malária, durante infecção pelo *Plasmodium falciparum*, o parasito utiliza lipídios dos eritrócitos para formação de seus próprios corpúsculos lipídicos com a finalidade de se proteger contra os radicais *heme* liberados durante destruição de hemoglobina e que são extremamente tóxicos para parasito (Coppens e Vielemeyer, 2005; Jackson e cols., 2004; Vielemeyer e cols., 2004).

Observando a grande quantidade de funções com as quais os corpúsculos lipídicos estão envolvidos em células de mamíferos, bem como sua presença em parasitos protozoários, investigou-se a ocorrência e função dessa organela em *Trypanosoma cruzi*.

Apesar de já se ter notada a ocorrência de corpúsculos lipídicos 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.

Assim, o objetivo do presente trabalho é entender a dinâmica dos corpúsculos lipídicos no citoplasma do parasito *Trypanosoma cruzi* quando o mesmo estiver presente em diferentes condições. Pretendemos também avaliar os corpúsculos lipídicos do parasito quando estimulados com outros lipídios, tais como ácido araquidônico e ácido oléico e se mediadores inflamatórios lipídicos (como a PGE₂) estão sendo formados e liberados pelo parasito em associação com o aumento na produção dos corpúsculos lipídicos, o que indicará se o parasito influencia o hospedeiro mamífero durante um processo infeccioso.

2. Objetivos e Metas

2.1 Objetivo Geral

Investigar a formação de corpúsculos lipídicos no parasita *Trypanosoma cruzi* e a correlação desta organela com a fisiopatologia da doença de Chagas e com a síntese de mediadores inflamatórios.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar corpúsculos lipídicos no parasito (formas amastigotas e tripomastigotas) por microscopia de luz e eletrônica de transmissão (MET);
- Analisar a morfometria dos corpúsculos lipídicos por microscopia eletrônica de transmissão (número, área, elétron-densidade) em diferentes situações de infecção *in vivo* e *in vitro* em macrófagos;
- Quantificar corpúsculos lipídicos, nas formas tripomastigotas, mediante estímulo com precursores lipídicos: Ácido araquidônico (AA) e Ácido oleico (AO), em diferentes tempos e em co-cultura com macrófagos;
- Avaliar se o parasito produz e libera PGE₂ mediante estímulos com precursores da formação desse mediador inflamatório (AA e AO);
- Avaliar o papel de corpúsculos lipídicos como sítio de produção de PGE₂ por técnica de Eicosacell;

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 UFMG (CEBIO), apresentando 26 a 29 dias de idade e 60 a 75 g de peso corporal. Todos os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Morfologia da UFMG, recebendo ração comercial e água à vontade. 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 (CEUA/FIOCRUZ # 57/11-4).

3.2 Obtenção de Tripomastigotas

Culturas de *T. cruzi* foram crescidas em meio de infusão de triptose hepática (LIT) à 27°C contendo cerca de 100% de epimastigotas. Os epimastigotas foram centrifugados a 10000 g durante 15 min a 10°C. Posteriormente os parasitos foram ressuspensos em meio artificial que simula a urina de triatomíneo (TAU) (190 mM NaCl, 8 mM de tampão de fosfato pH 6,0, 17 mM KCl, 2 mM de CaCl₂, 2 mM MgCl₂), e incubado durante 2 h à temperatura ambiente. Os parasitos foram diluídos para uma concentração final de 5 x 10⁶ parasitos/mL em meio TAU suplementado com 2,5% (v / v) de bicarbonato de sódio a 1,4%, 500 UI de penicilina mL e 10 mM de L-prolina (tornando-se meio TAUP) e incubadas a 27°C. Os parasitos incubados em TAUP foram centrifugados a 12000 g durante 3 min à temperatura ambiente e lavadas em TAU. A *metaciclogênese* do parasito foi realizada no laboratório de Biologia Imunitária da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ e os parasitos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Célio Freire-de-Lima.

3.3 Infecção de ratas Holtzman *in vivo*

Ratas Holtzman com 26 a 29 dias de idade foram infectadas com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (L.H.P. Silva, 1953), mantidas em camundongos adultos através de passagens regulares no sangue a cada sétimo dia de infecção, conforme estudos prévios. Cada rata recebeu 3 x 10⁶ tripomastigotas do parasito, por via intraperitoneal. 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 11º dia após a inoculação do parasito.

3.4 Infecção de macrófagos *in vitro*

Para análise de microscopia eletrônica de transmissão, macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram plaqueados sobre lamínula (1 x 10⁶/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%. Os macrófagos foram mantidos a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ pelo período de 16 h. Posteriormente, os macrófagos foram infectados com a cepa dm28c do parasito (MOI 3:1) durante 1 e 24 h. Para análise de microscopia de campo claro, 1 h após a infecção, foram retirados 200 µL de meio de cultura de cada poço contendo parasitos não internalizados e foram confeccionados os citoesfregaços em lâmina de vidro para contagem de corpúsculos lipídicos 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 microscopia eletrônica, 24 h após a infecção, 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. Todos os procedimentos experimentais seguiram as recomendações dadas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FIOCRUZ mediante o protocolo L – 02/08.

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 microscopia eletrônica foram realizados de acordo com trabalhos prévios do grupo (Fabrino e cols., 2011; Melo e cols., 2010; Melo e Weller, 2010; Ueki e cols., 2013). O material foi fixado em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) modificada, constituída de paraformaldeído e glutaraldeído a 1% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3, durante 16 h, 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 (Polysciences). Os cortes semifinos obtidos foram corados com azul de toluidina/borato de sódio para a seleção de áreas adequadas à ultramicrotomia, realizada em ultramicrótomo Sorvall MT 2-B. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de

uranila a 3% e citrato de chumbo a 1% e analisados em microscópio eletrônico de transmissão EM-10 (Zeiss).

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 por centrifugação a 1000 g. Os pellets foram posteriormente incluídos em ágar a 2% e processados rotineiramente para MET.

3.6- Análises Morfométricas Ultraestruturais

Para análise morfométrica dos corpúsculos lipídicos dos parasitos, fotomicrografias 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® para a realização das medidas comparativas de área e densidade. As análises foram feitas através das fotomicrografias a partir da MET realizada. 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 corpúsculos lipídicos respectivamente. As comparações foram feitas com o auxílio do programa estatístico Graphpad Prism 5®.

3.7 Estímulo de tripomastigotas com AA e AO

Foram utilizados tripomastigotas obtidos da *metaciclogênese* 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). Foram utilizados 4 tempos diferentes (1 h, 2 h, 12 h e 24 h), três doses de ácido araquidônico (1,5 μ M, 7,5 μ M e 15 μ M) e duas de ácido oleico (1 μ M e 5 μ M) (Sigma Aldrich). 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 1×10^5 parasitas/lâmina em Cytospin (550 rpm por 5 min).

3.8 Colorações para Corpúsculos Lipídicos

Para análise dos corpúsculos lipídicos nos parasitos através de marcação com tetróxido de ósmio, lamínulas contendo parasitas e/ou células infectadas foram fixadas em formalina a

3,7%, lavadas em tampão cacodilato 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). As análises para a quantificação dos corpúsculos lipídicos foram feitas em 50 células consecutivas em microscópio de luz. Para marcação com BODIPY®, suspensão celular do parasito foi incubada com 1 μ M de BODIPY® (Molecular Probes) por 1 h a 37°C. Posteriormente, as células foram centrifugadas 1800 rpm por 5 min para formação do pellet e ressuspendidas em tampão fosfato à 0,1 M. Foram confeccionados os citoesfregaços dos parasitos estimulados com os ácidos graxos. Posteriormente, as lâminas foram fixadas em formalina 3,7% e lavadas em tampão fosfato à 0,1 M. Após esse procedimento as lâminas foram montadas com lamínulas de vidro. Para coloração com Oil Red O (Sigma Aldrich), as lâminas confeccionadas como descrito acima devidamente fixadas, receberam propileno glicol 100% por 5 min. Depois foram incubadas com solução de Oil Red O 0,5% por 10 min à 60°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas e montadas com meio aqua polymountig com lamínulas de vidro.

3.9 Dosagem de Prostaglandina E₂

Os sobrenadantes das culturas de parasitos controles e estimulados com AA e AO no tempo de 24 h, foram coletados para análise dos níveis de PGE₂. A dosagem de PGE₂ foi realizada por ensaio imunoenzimático (EIA) com o kit Prostaglandin E₂ EIA – Monoclonal, segundo instruções do fabricante (Cayman Chemical). Foram utilizadas placas pré-revestidas com IgG de cabra anti-camundongo. Primeiramente, as placas foram lavadas 1x com tampão de lavagem. A curva padrão foi feita utilizando alíquota de PGE₂ em diluições seriadas, em tampão EIA (diluições de 1 a 0,016 ng/mL). Os poços correspondentes à amostra receberam 50 μ L de sobrenadante das culturas e o controle (branco) foi utilizado 50 μ L de tampão EIA. Todos os poços foram simultaneamente incubados com 50 μ L de anticorpo monoclonal PGE₂ e 50 μ L de tracer (PGE₂ conjugada com colinesterase), exceto no branco. A placa foi incubada pelo período de 16 h 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 2 h. Em seguida foi realizada a leitura da placa em leitora de Elisa, utilizando o programa Soft Max Pro®.

3.10 Quantificação de Corpúsculos Lipídicos

Para quantificação dos corpúsculos lipídicos nos tripomastigotas, os parasitos foram cultivados nas placas de 24 poços, divididos em grupos controle ou estimulados pelos tempos de 1, 2, 12, e 24 h, tratados ou não com AA e AO (doses 1 e 5 μM de AO ou 1,5, 7,5 e 15 μM de AA). Foram confeccionados citoesfregaços em lâminas de vidro, que foram posteriormente coradas com tetróxido de ósmio como descrito em 3.8. As análises para quantificação dos corpúsculos lipídicos foram feitas em microscópio de luz (objetiva de 100X). A quantificação dos corpúsculos lipídicos foi realizada fazendo-se a contagem de 50 células consecutivas por lâmina.

3.11 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 2 h e 12 h. As amostras contendo os parasitos em suspensão, posteriormente foram fixadas e permeabilizadas com EDAC (Sigma-Aldrich) a 1% por 15 min. O EDAC é utilizado para fazer uma ligação cruzada entre o grupamento carboxil dos eicosanóides com os grupamentos aminas das proteínas adjacentes. Posteriormente, foram confeccionados citoesfregaços contendo cerca de 1×10^5 parasitos por lâmina. As lâminas foram lavadas 2 vezes por 10 min em PBS e incubadas por 1 h com os anticorpos primários os quais foram diluídos em solução contendo 0,1% soro normal de burro, anticorpo murino anti-PGE₂ – Cayman Chemical (diluição 1:50) e anticorpo de porco da índia anti-adipofilina (ADRP) murino (diluição 1:1000) (RDI Research). Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes por 10 min em PBS e incubadas com os anticorpos secundários para PGE₂ e ADRP, anticorpo de cabra anti-camundongo conjugado com CY3 e anticorpo de burro anti-porco da índia conjugado com CY2 (Jackson Laboratories), respectivamente, ambos na proporção de 1:1000. Como controle, foram utilizadas lâminas incubadas somente com os anticorpos secundários. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes por 10 min em PBS e montadas com meio de montagem contendo o DAPI (Vectashield Vector).

3.12 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 2 vezes.

4. Resultados

4.1 – Diferentes técnicas de microscopia revelam a presença de corpúsculos lipídicos no citoplasma do parasito *Trypanosoma cruzi*

A presença de corpúsculos lipídicos em formas tripomastigotas e amastigotas do parasito *Trypanosoma cruzi* foi investigada utilizando-se diferentes técnicas de microscopia. Utilizaram-se três técnicas para observação dos corpúsculos lipídicos em microscopia de luz: coloração com tetróxido de ósmio, um metal pesado que cora fosfolipídios em marron e coloração com dois marcadores fluorescentes – BODIPY® e Oil Red O (ORO), específicos para lipídios neutros, os quais marcam corpúsculos lipídicos em verde e vermelho, respectivamente. Ressalta-se que o ORO é um fluoróforo que tem a característica de ser visualizado tanto em microscopia de campo claro como em microscopia de fluorescência (Melo e cols., 2011a).

A utilização das três técnicas de microscopia de luz mostrou claramente a presença de corpúsculos lipídicos tanto em formas tripomastigotas como em formas amastigotas de culturas, estimuladas ou não com ácido araquidônico (Fig. 4.1 e 4.2). O estímulo com ácido araquidônico induziu a formação de corpúsculos lipídicos (compare a Fig. 4.1 A com a Fig. 4.1 B). A quantificação de corpúsculos lipídicos nos grupos estimulados será descrita no item 4.4.

Formas amastigotas do parasito no interior de macrófagos foram também analisadas por MET para observação de corpúsculos lipídicos. Para esta finalidade, foram utilizados dois tipos de macrófagos: macrófagos inflamatórios do coração de ratas infectadas aos 12 dias, pico do parasitismo neste modelo, e macrófagos peritoneais murinos infectados em cultura durante 24 h. As micrografias eletrônicas de macrófagos contendo amastigotas no citoplasma foram então cuidadosamente analisadas.

Corpúsculos lipídicos foram observados ultraestruturalmente como organelas arredondadas, de diferentes tamanhos e elétron-densidades (Fig. 4.3).

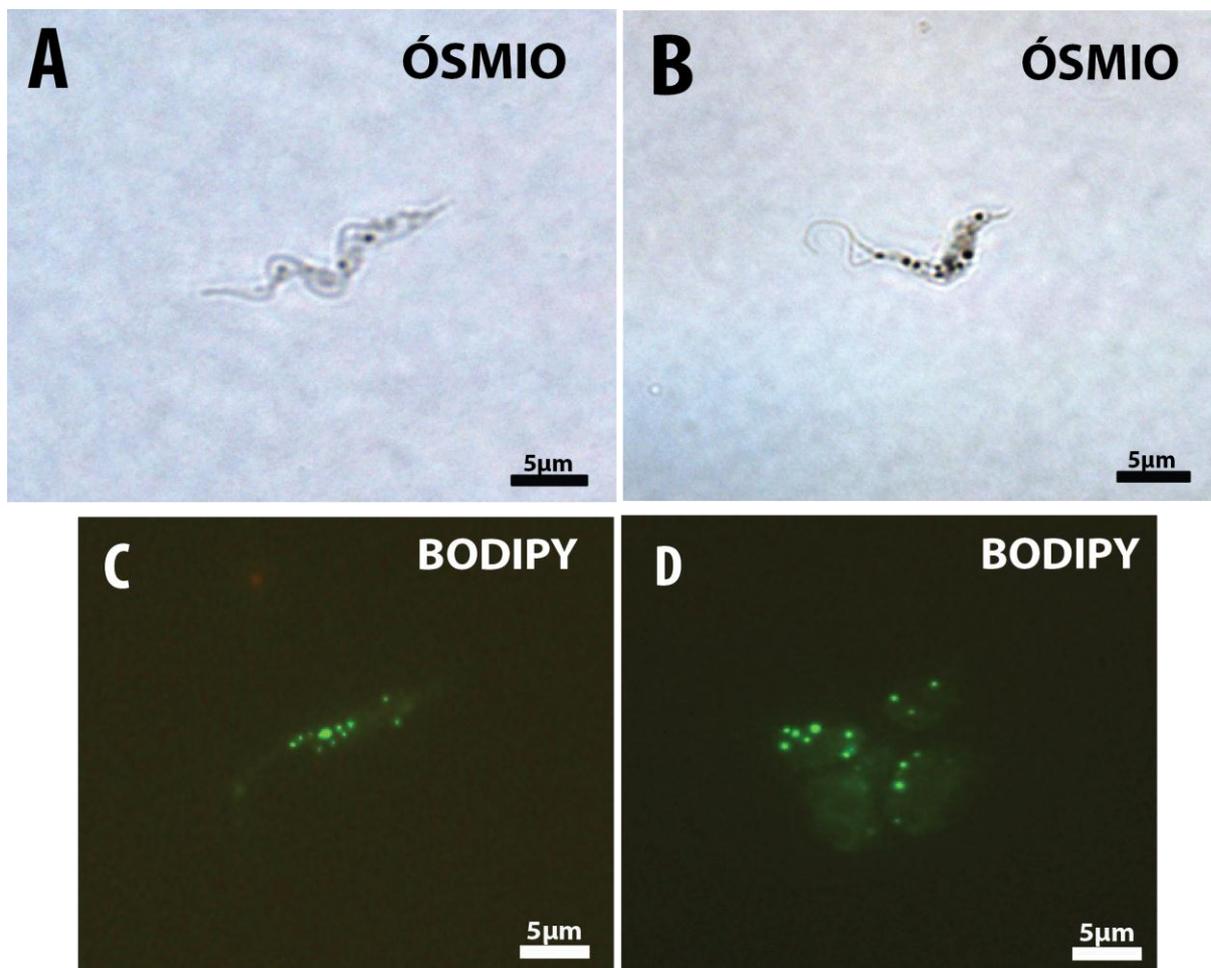


Figura 4.1 – Corpúsculos Lipídicos (CLs) em formas tripomastigotas e amastigotas do parasito *Trypanosoma cruzi* observados por microscopia de luz. (A, B) CLs aparecem como estruturas arredondadas e escuras no citoplasma de tripomastigotas após coloração com tetróxido de ósmio. Note que, após estímulo com ácido araquidônico (B), o número de CLs aumentou em comparação com o parasito não estimulado (A). (C, D) Marcação com a sonda fluorescente para lipídios neutros BODIPY® revela inúmeros CLs em verde no citoplasma de formas tripomastigota (C) e amastigotas (D) previamente estimuladas com ácido araquidônico. Células em cultura foram estimuladas ou não com ácido araquidônico (7.5 µM) durante 1 h e processadas para coloração com tetróxido de ósmio ou marcados com BODIPY® conforme material e métodos.

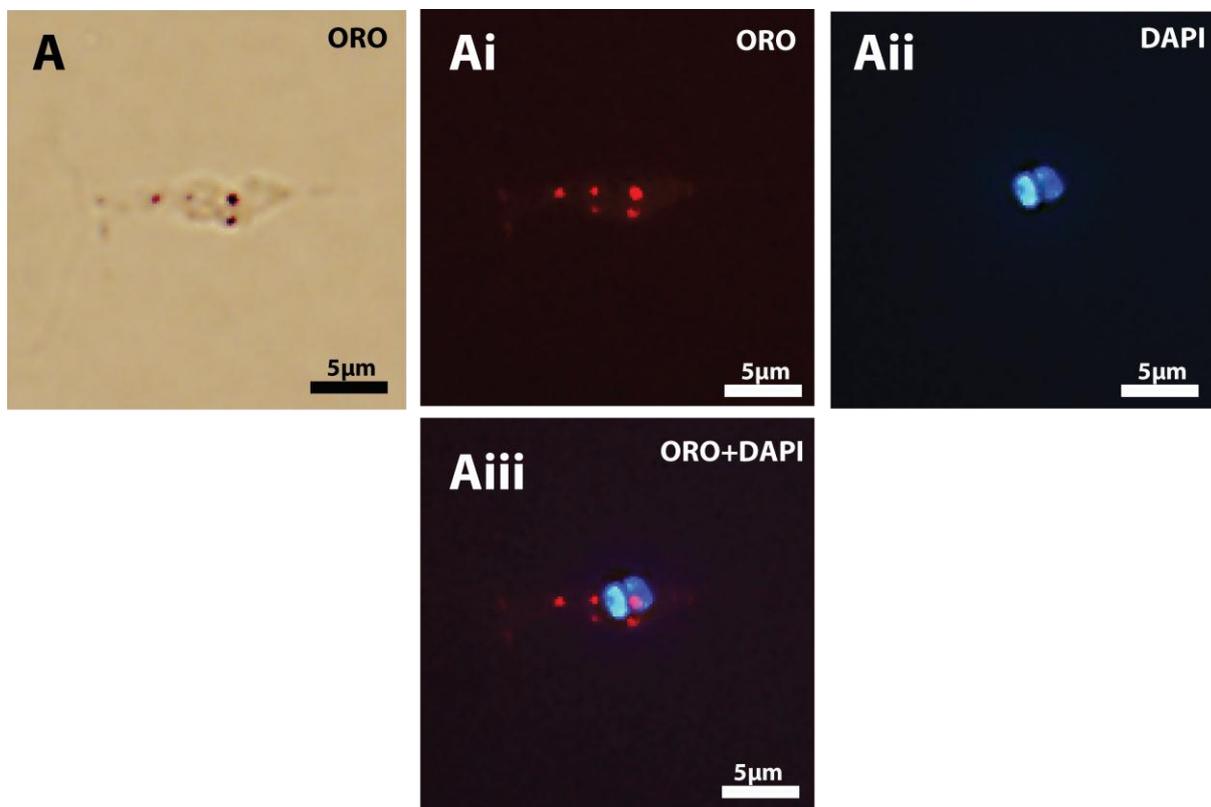


Figura 4.2 – Corpúsculos lipídicos (CLs) no citoplasma de forma tripomastigota do parasito *Trypanosoma cruzi* após marcação com Oil Red O (ORO). (A) Tripomastigota observada em microscopia de campo claro após marcação com ORO. CLs aparecem como pontos vermelhos no citoplasma do parasito. Em (Ai-Aii), a mesma célula é observada por microscopia de fluorescência em diferentes filtros para evidenciar os CLs (pontos vermelhos) e DNA (em azul, marcado pelo DAPI). Em (Aiii), as imagens obtidas em (Ai) e (Aii) foram sobrepostas. Células em cultura foram estimuladas com ácido araquidônico (7.5 μ M) durante 1 h e processadas para marcação com ORO e DAPI.

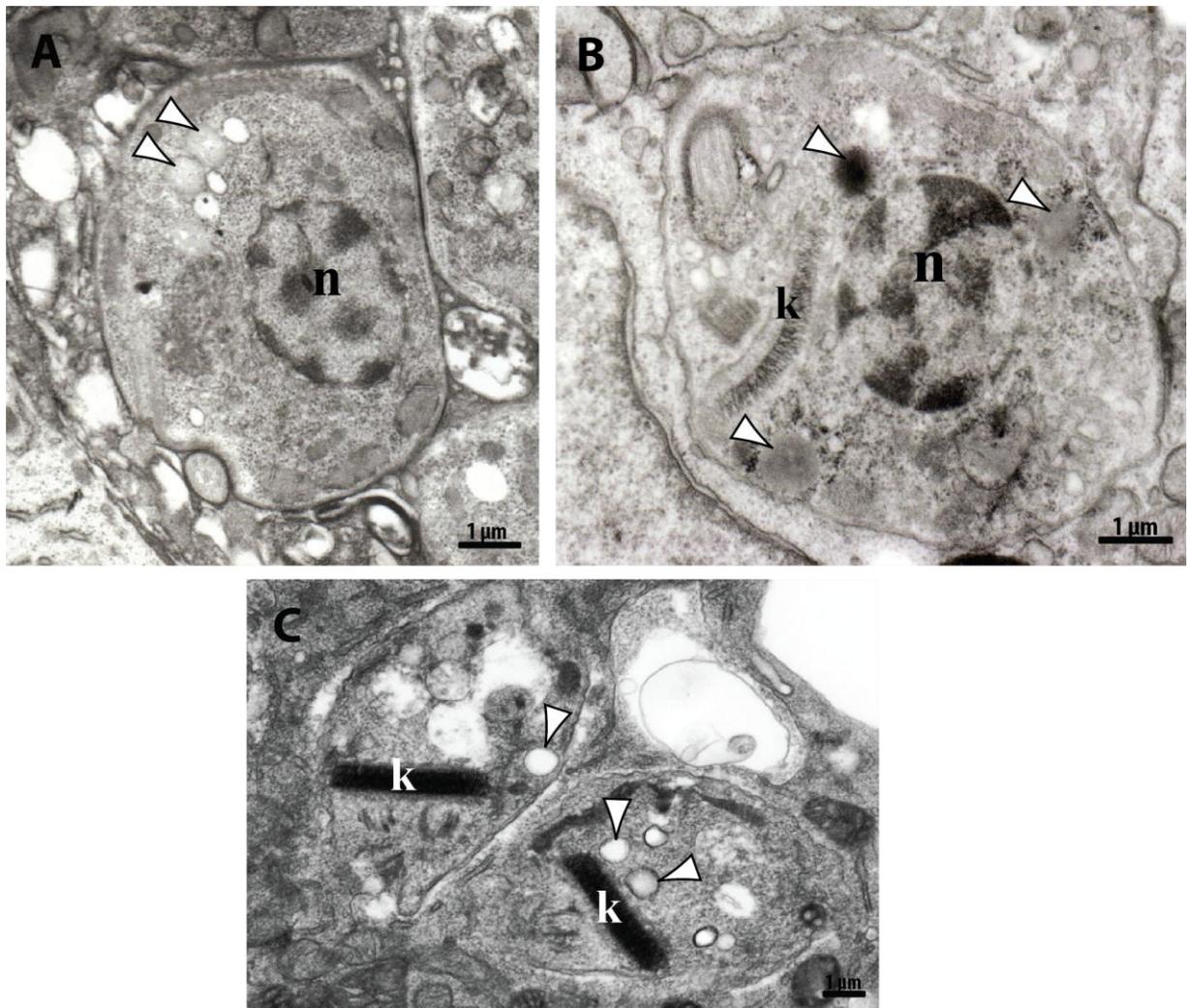


Figura 4.3 – Corpúsculos Lipídicos no citoplasma de formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* observadas no interior de macrófagos. (A, B, C) Corpúsculos lipídicos com diferentes elétrons-densidades são indicados (cabeças de setas) em amastigotas presentes no citoplasma de macrófagos inflamatórios do coração de ratas com 12 dias de infecção (A e B) e em macrófagos peritoneais murinos após 24 h de infecção em cultura (C). Fragmentos do átrio de ratas Holtzman ou macrófagos murinos infectados foram processados para microscopia eletrônica de transmissão. n, núcleo; k, cinetoplasto.

4.2 – Corpúsculos lipídicos de *Trypanosoma cruzi* são organelas dinâmicas que variam em tamanho e elétron-densidade mediante interação com o hospedeiro

Tendo em vista a observação de corpúsculos lipídicos ultraestruturalmente diferentes em formas amastigotas de macrófagos infectados, análises morfométricas foram realizadas em micrografias eletrônicas. O número e área dos corpúsculos lipídicos em amastigotas assim como a variação de elétron-densidade destas organelas foram analisados e quantificados com o uso do programa de computador ImageJ®.

O número de corpúsculos lipídicos dentro de amastigotas não variou entre macrófagos infiltrados no coração (modelo *in vivo*) e macrófagos peritoneais murinos (modelo *in vitro*) (Fig. 4.4 A). No entanto, quando a área dos corpúsculos lipídicos foi comparada, observou-se que no modelo *in vivo*, os corpúsculos lipídicos mostraram-se significativamente maiores em amastigotas de macrófagos inflamatórios do coração em comparação com corpúsculos lipídicos de amastigotas de macrófagos murinos de culturas (Fig. 4.4 B).

Para a análise de elétron-densidade foram considerados três parâmetros: corpúsculos lipídicos fortemente elétron-densos, elétron-densos e elétron-lúcidos, de acordo com (Melo e cols., 2006). Observou-se uma variação de elétron-densidade quando os corpúsculos lipídicos de amastigotas foram comparados (Fig. 4.5). Parasitos de macrófagos do coração de ratas infectadas exibiram maior proporção de corpúsculos lipídicos elétron-densos, em comparação com corpúsculos lipídicos de amastigotas de macrófagos peritoneais de culturas (Fig. 4.5).

O conjunto de dados morfométricos aqui apresentados indica que os corpúsculos lipídicos do parasito não são organelas estáticas, mas variam morfologicamente em resposta à interação com células do hospedeiro e com os estímulos do meio.

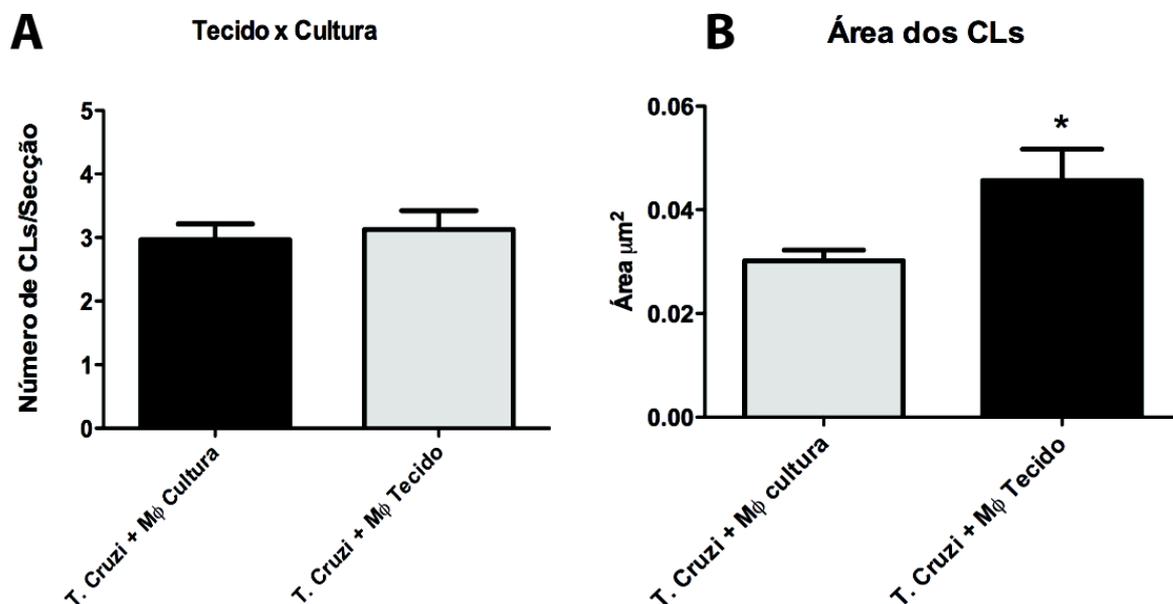


Figura 4.4 – Dados morfométricos ultraestruturais de corpúsculos lipídicos (CLs) do parasito *Trypanosoma cruzi* observados no citoplasma de macrófagos. (A) O número de CLs por secção do parasito não variou quando amastigotas de macrófagos inflamatórios do coração (modelo *in vivo*) foram comparados com amastigotas de macrófagos murinos em cultura (modelo *in vitro*). (B) O tamanho dos CLs, no entanto, foi significativamente maior (*) em macrófagos do modelo *in vivo*. Fragmentos do átrio de ratas Holtzman ou macrófagos murinos infectados foram processados para microscopia eletrônica de transmissão aos 12 dias ou após 24 h de infecção, respectivamente. A análise foi realizada utilizando-se o programa imageJ® e os gráficos projetados a partir do Graphpad prism 5®, utilizando o *test t de student*. Asterisco (*) indica diferença significativa $p \leq 0,05$. Foi analisado um total de 36 micrografias de macrófagos infectados e um total de 45 parasitos e 122 corpúsculos lipídicos.

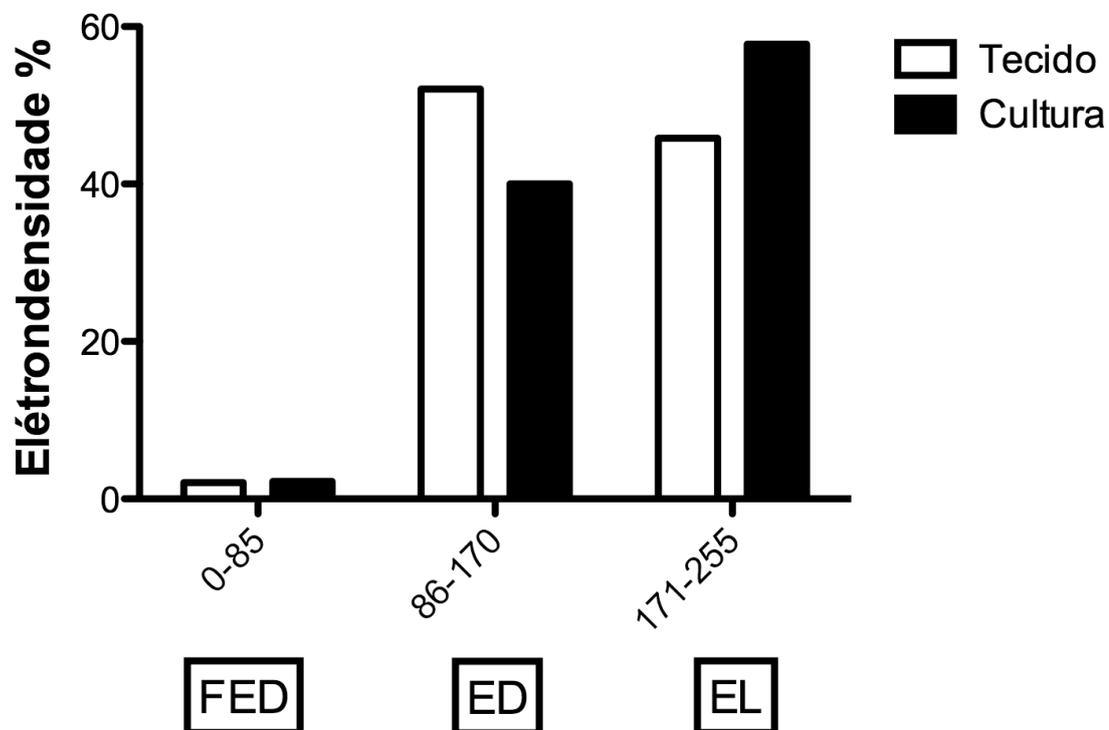


Figura 4.5 – Elétron-densidade de corpúsculos lipídicos (CLs) de parasitos presentes no citoplasma de macrófagos peritoneais em cultura (A) e em tecido cardíaco (B). As porcentagens de CLs elétron-densos e elétron-lúcidos dentro de amastigotas variaram quando os dois tipos de macrófagos infectados foram comparados. Fragmentos do átrio de ratas Holtzman ou macrófagos murinos infectados foram processados para microscopia eletrônica de transmissão aos 12 dias ou após 24 h de infecção, respectivamente. A análise de elétron-densidade foi feita usando-se o programa ImageJ®. Considerando a média de cinza estabelecida pelo programa, os CLs foram classificados em **FED** – Fortemente elétron-denso, média de cinza entre 0-85. **ED** – Elétron-denso, média de cinza entre 86-170. **EL** – Elétron-lúcido, media de cinza entre 171-255. Foi analisado um total de 36 micrografias de macrófagos infectados e um total de 45 parasitos e 122 corpúsculos lipídicos.

4.3 – Sinais de tráfego lipídico entre o parasito e o hospedeiro

Conforme demonstrado em outros parasitos, a interação parasito-hospedeiro gera um tráfego de moléculas lipídicas entre estes organismos (Charron e Sibley, 2002; Vielemeyer e cols., 2004). Desta forma, e também considerando o fato de termos observado variação morfológica de corpúsculos lipídicos em função dessa interação, micrografias eletrônicas foram detalhadamente analisadas com o objetivo de identificação de sinais indicativos desse tráfego.

Observou-se que, principalmente em macrófagos do tecido cardíaco, um número expressivo de corpúsculos lipídicos presentes no citoplasma destas células mostrou-se disposto ao redor ou em contato com amastigotas livres no citoplasma (Fig. 4.6, cabeças de setas). Estes corpúsculos lipídicos próximos ao parasita mostravam-se íntegros, com forma arredondada característica (Fig. 4.6, cabeças de setas brancas) ou parcialmente mobilizados, em forma de meia lua (Fig. 4.6, cabeças de setas amarelas).

Além disso, chamou atenção a presença de diversas vesículas dispostas entre as formas amastigotas e a matriz citoplasmática do macrófago. Estas vesículas foram identificadas aparentemente como vesículas de transporte e pareciam caracterizar um tráfego de moléculas entre o parasito e o citoplasma da célula hospedeira. Foram vistas vesículas tanto em contato direto com o parasito como no espaço circundante do mesmo (Fig. 4.7 Ai, B e C, cabeças de setas vermelhas).

Estes dados indicam uma troca de moléculas entre os macrófagos e os parasitos amastigotas. Esse tráfego pode estar relacionado à necessidade do parasito por lipídios, favorecendo assim a formação de seus próprios corpúsculos lipídicos.

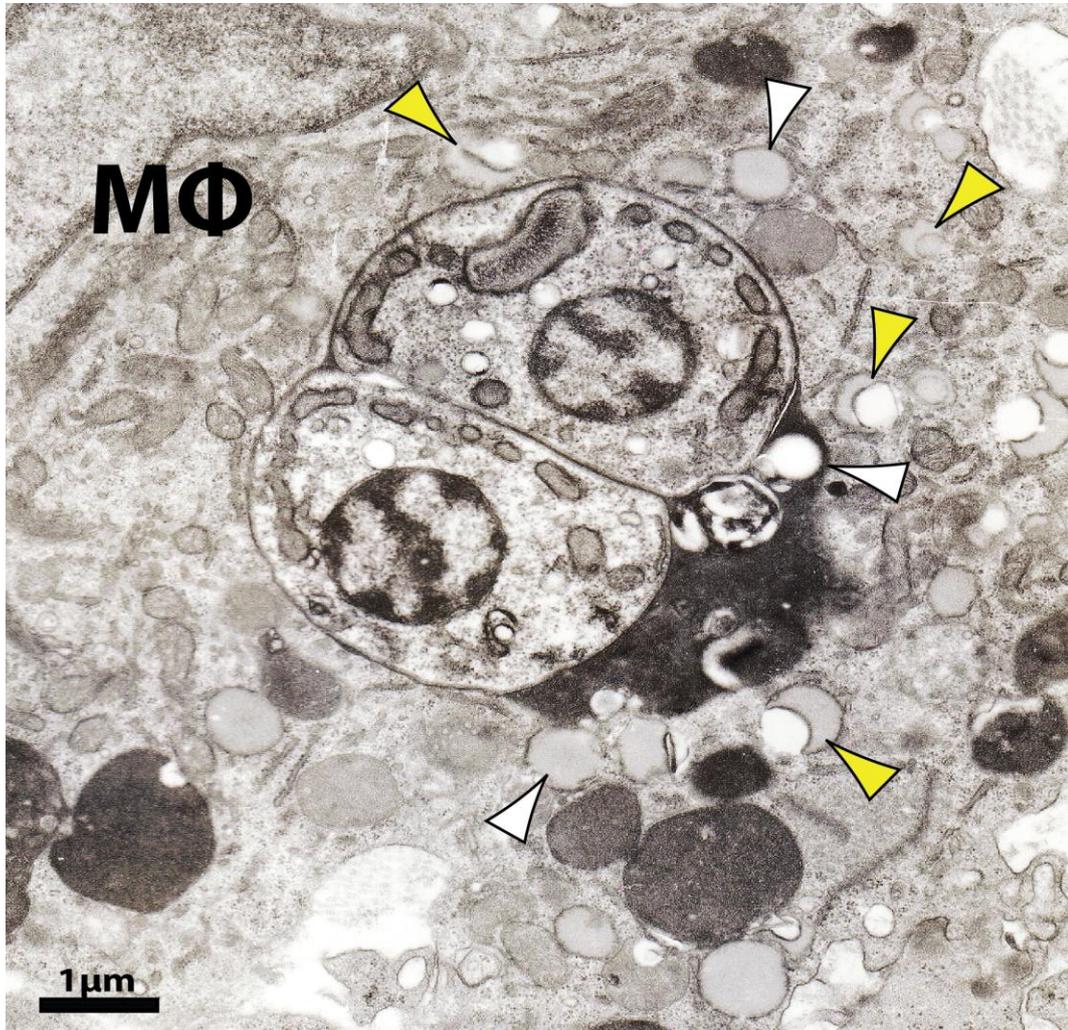


Figura 4.6 - Macrófago inflamatório do coração de rata mostrando formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* no citoplasma, aos 12 dias de infecção. Diversos corpúsculos lipídicos (CLs) no citoplasma do macrófago (M ϕ) (cabeças de setas) apresentam-se em contato ou ao redor do parasito. As cabeças de setas brancas indicam CLs íntegros, enquanto as cabeças de setas amarelas apontam CLs mobilizados. Fragmentos do átrio de ratas Holtzman infectadas foram processados para microscopia eletrônica de transmissão.

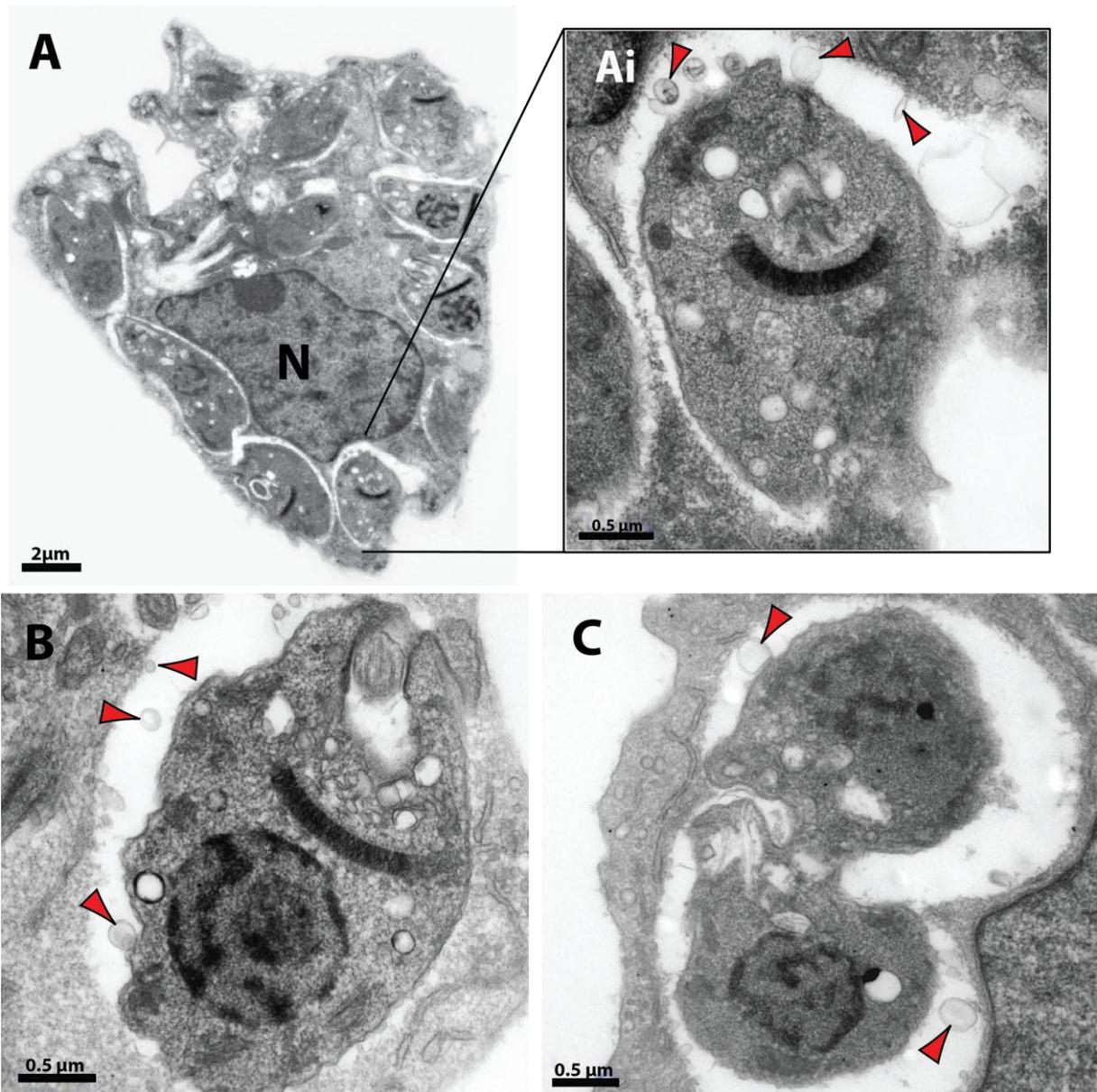


Figura 4.7 – Ultraestrutura de formas amastigotas do parasito *Trypanosoma cruzi* no citoplasma de macrófagos murinos peritoneais, após 24 h de infecção. (A) Visão panorâmica de um macrófago parasitado por vários amastigotas. (Ai, B, C) Em maior aumento, observam-se vesículas de transporte (cabeças de setas) dispostas entre o parasito e o citoplasma do macrófago. Macrófagos murinos de culturas foram processados para microscopia eletrônica de transmissão. N, núcleo do macrófago.

4.4 – Ácido araquidônico, ácido oléico e a interação com o hospedeiro induzem a formação de corpúsculos lipídicos em formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*

Ácido araquidônico (AA) e Ácido oléico (AO) são ácidos graxos que induzem a formação de corpúsculos lipídicos em células de mamíferos, pois são armazenados nessas organelas e atuam como substrato para enzimas envolvidas na síntese de mediadores da inflamação (Bozza e cols., 2007). A capacidade de formação de corpúsculos lipídicos a partir do estímulo com AA e AO foi avaliada em formas tripomastigotas do parasito. Para isso, tripomastigotas em cultura foram incubadas com AA ou AO por diferentes tempos (1 h, 2 h, 12 h e 24 h) em diferentes doses (1 ou 5 μM para AO e 1.5, 7.5 e 15 μM para AA). Estas doses foram baseadas em doses utilizadas para estímulo em células de mamíferos (Bozza e cols., 1996)

Quando estimulados com AA, os parasitos apresentaram um aumento considerável do número de corpúsculos lipídicos no citoplasma em comparação com parasitos não estimulados. No tempo mais inicial, 1 h, o perfil do aumento foi dependente da dose e foi mais evidente quando comparado aos outros tempos analisados. Nas doses de 7.5 μM e 15 μM de AA ocorreu um aumento significativo no número de corpúsculos lipídicos em relação ao controle (Fig. 4.8 A). A dose de 7.5 μM induziu a maior formação de corpúsculos lipídicos, sendo o número destas organelas aproximadamente 2 vezes maior do que o encontrado no grupo controle (Fig. 4.1 A e B e Fig. 4.8). No tempo de 12 h, não foram observados aumentos significativos do número de corpúsculos lipídicos (Fig. 4.8 B). Após 24 h, ocorreu aumento significativo do número destas organelas para a dose de 7.5 μM em relação ao controle (Fig. 4.8 C). Com relação ao estímulo com AO, observou-se um aumento significativo do número de corpúsculos lipídicos em tripomastigotas incubadas com esta molécula, em todos os tempos e doses analisados (Fig. 4.9 A-C).

Investigou-se também se a interação do parasito com o hospedeiro levaria a uma indução na formação de corpúsculos lipídicos nos parasitos. Para tal, formas tripomastigotas do parasito foram cultivadas na presença de macrófagos peritoneais murinos durante o tempo de 1 h e posteriormente o número de corpúsculos lipídicos foi quantificado nos parasitos não internalizados. Para controle, o número de corpúsculos lipídicos foi quantificado em formas tripomastigotas mantidas pelo mesmo tempo apenas em meio de cultura. As análises quantitativas mostraram um aumento significativo do número de corpúsculos lipídicos em tripomastigotas mantidas em contato com macrófagos após 1 h em comparação com tripomastigotas mantidas apenas em meio pelo mesmo tempo (Fig. 4.10). Isso significa que

apenas a interação inicial (contato) parasito-célula hospedeira é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos no citoplasma do parasito.

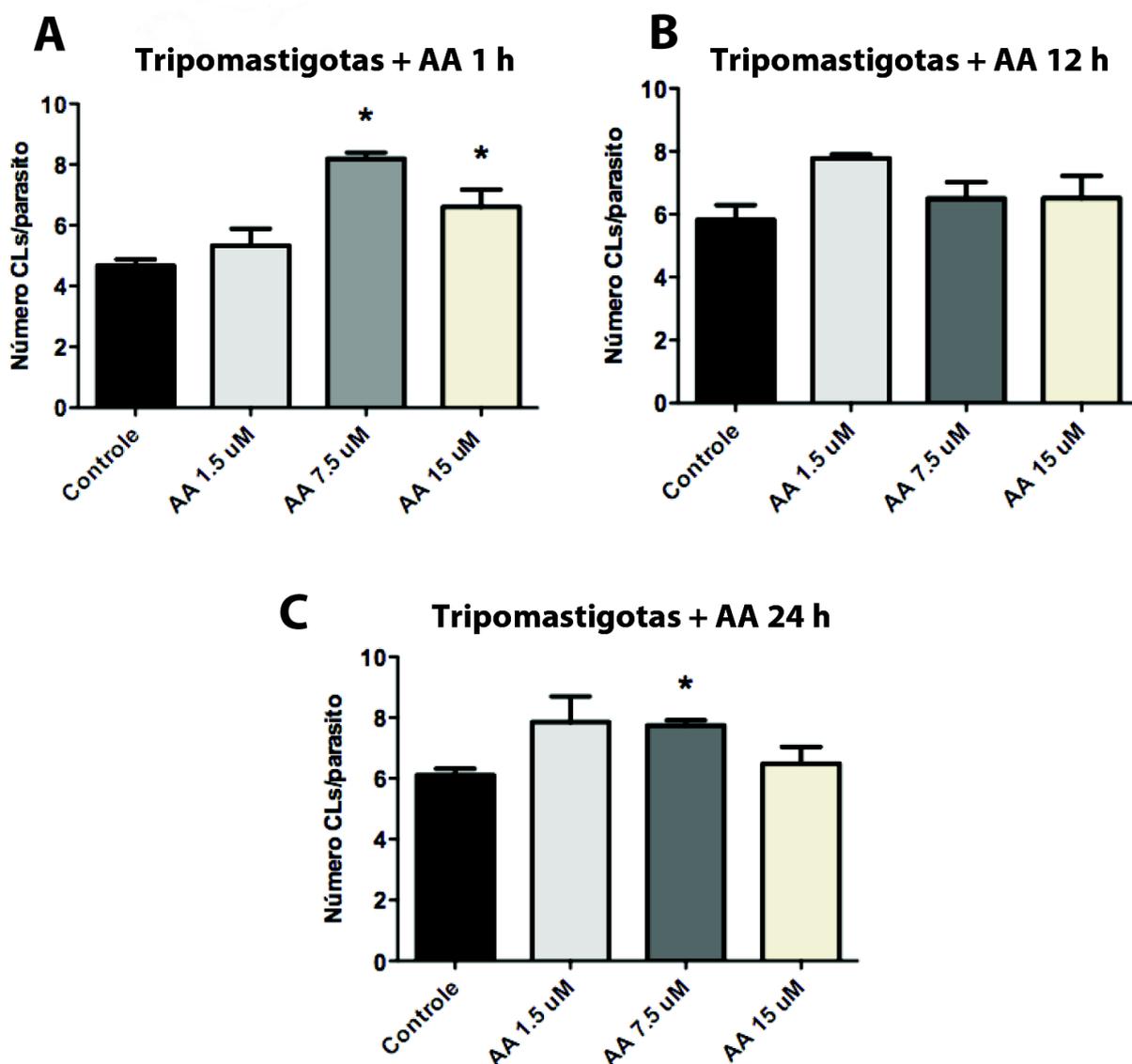


Figura 4.8 – Formação de corpúsculos lipídicos (CLs) em formas tripomastigotas do parasito *Trypanosoma cruzi* após estímulo com ácido araquidônico (AA). Formas tripomastigotas do parasito foram estimuladas em cultura com AA nas doses de 1.5, 7.5 e 15 μM em diferentes tempos 1 h (A) 12 h (B) e 24 h (C) e o número de CLs quantificado a partir de coloração com tetróxido de ósmio. Os controles receberam veículo (etanol a 0,1%). Asterisco (*) indica diferença significativa $p \leq 0,05$. Gráficos foram projetados a partir do Graphpad prism 5®, utilizando o *test t de student*.

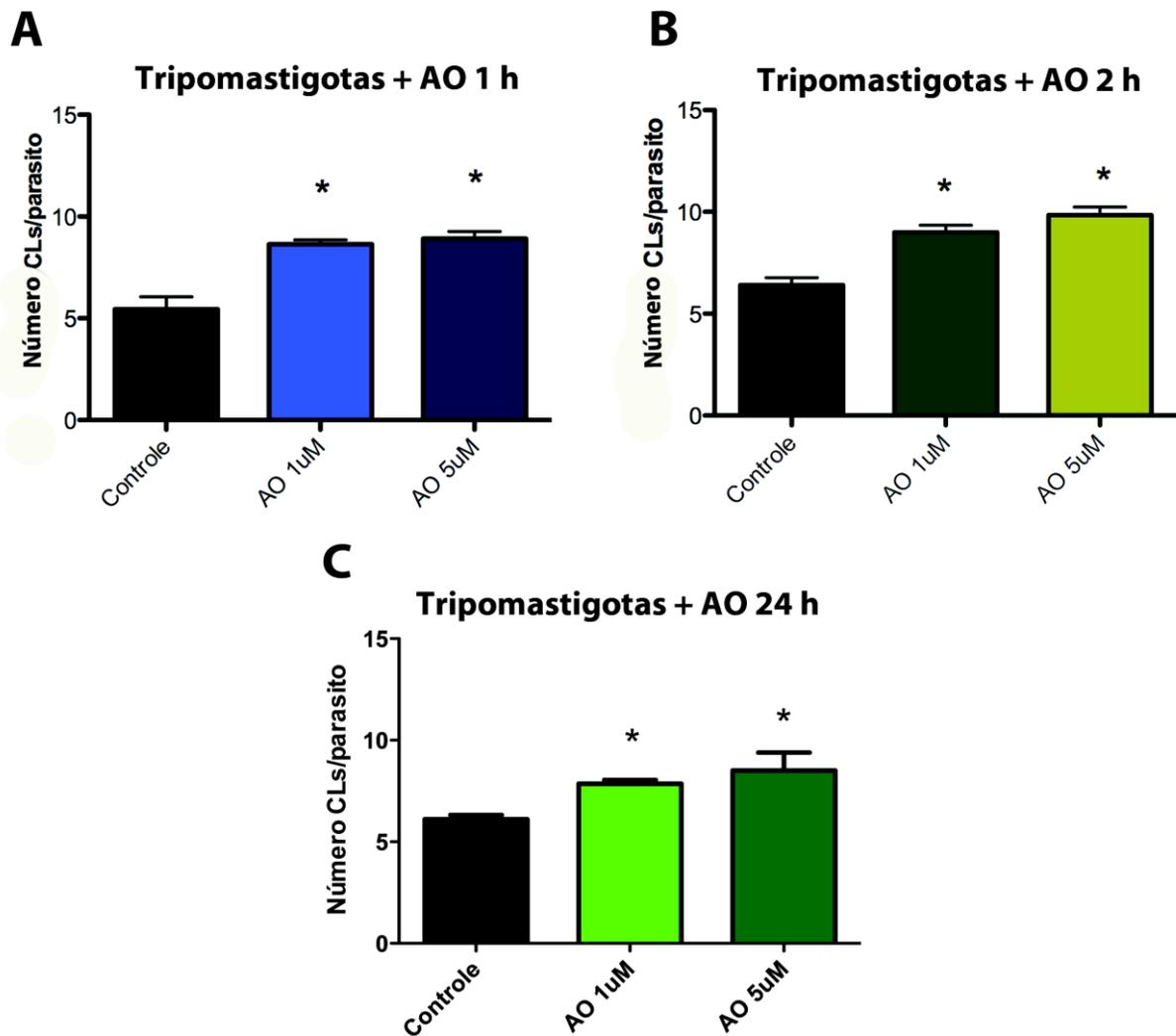


Figura 4.9 – Formação de corpúsculos lipídicos (CLs) em formas tripomastigotas do parasito *Trypanosoma cruzi* após estímulo com ácido oléico (AO). Formas tripomastigotas do parasito foram estimuladas em cultura com AO nas doses de 1 ou 5 μ M em diferentes tempos 1 h (A) 2 h (B) e 24 h (C) e o número de CLs quantificado a partir de coloração com tetróxido de ósmio. Os controles receberam veículo (etanol a 0,1%). Asterisco (*) indica diferença significativa $p \leq 0,05$. Gráficos foram projetados a partir do Graphpad prism 5®, utilizando o *test t de student*.

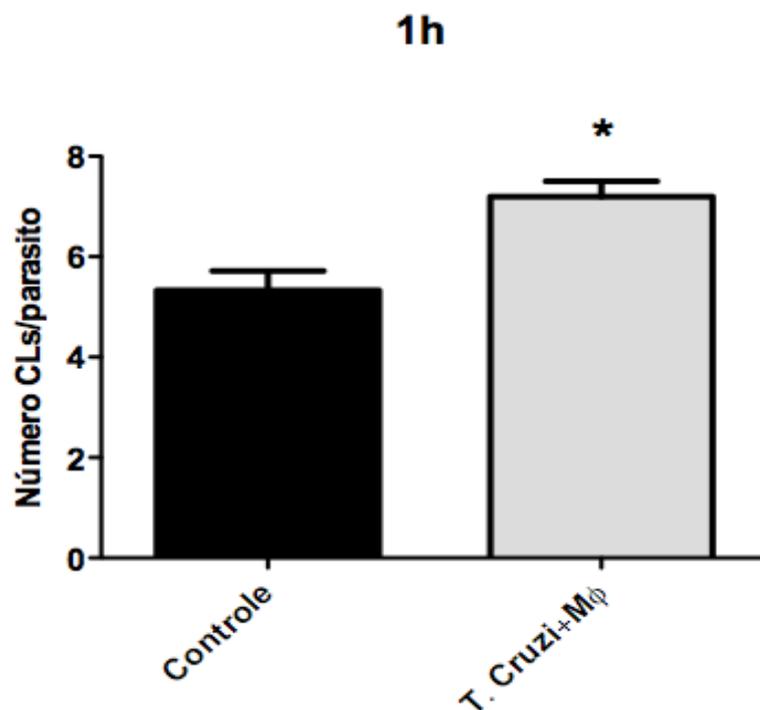


Figura 4.10 – A interação parasito-hospedeiro induz formação de corpúsculos lipídicos no parasito *Trypanosoma cruzi*. Tripomastigotas do parasito foram co-cultivados com macrófagos peritoneais murinos por 1 h e o número de corpúsculos lipídicos quantificado após marcação com tetróxido de ósmio em parasitos não internalizados. Como controle, foram utilizados tripomastigotas mantidos em meio TAUP. Ocorreu aumento no número de corpúsculos lipídicos no citoplasma do parasito após interação. Asterisco (*) indica diferença significativa $p \leq 0,05$. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5®, utilizando o *test t de student*.

4.5 – *Trypanosoma cruzi* é capaz de liberar PGE₂ quando estimulado com ácido araquidônico

É bem documentado que o AA e AO são precursores na formação de PGE₂ em células de mamíferos e, conforme já mencionado, estes ácidos graxos são depositados nos corpúsculos lipídicos onde são metabolizados por enzimas como a PGE sintase para produção desse mediador inflamatório. Foi demonstrado no presente trabalho que, quando formas tripomastigotas são incubadas com AA ou AO, há um aumento no número de corpúsculos lipídicos no citoplasma do parasito. A capacidade de produção de PGE₂ pelo parasito foi então analisada em resposta ao estímulo com estas moléculas. Tripomastigotas em cultura foram estimuladas com AA (1.5 µM e 7.5 µM) ou com AO (1 µM e 5 µM) por 24 h, doses que obtiveram maior grau de estímulos na formação de corpúsculos lipídicos. O tempo de 24 h foi definido pois toda a PGE₂ liberada ao longo desse tempo seria acumulada no sobrenadante. Posteriormente os níveis de PGE₂ foram dosados no sobrenadante.

Quando estimulado com AA, o parasito apresentou grande aumento na produção de PGE₂. Na dose de 1.5 µM de AA, o aumento dos níveis de PGE₂ foi de aproximadamente 6 vezes em relação ao controle (16,02 pg/mL ± 3,76 no controle e 101,5 pg/mL ± 10,52 no estimulado, média ± erro padrão da média) (Fig. 4.11 A). Na dose de 7.5 µM de AA, o aumento foi ainda mais acentuado alcançando níveis aproximadamente 65 vezes maiores do que os observados no controle (16,02 pg/mL ± 3,76 no controle e 1035,44 pg/mL ± 34,88 para o estimulado, média ± erro padrão da média). Quando estimulados com AO, não foi observado aumento significativo nos níveis de PGE₂. Na dose de 1 µM, notou-se uma tendência ao aumento, mas esse dado não foi estatisticamente significativo (Fig. 4.11 B).

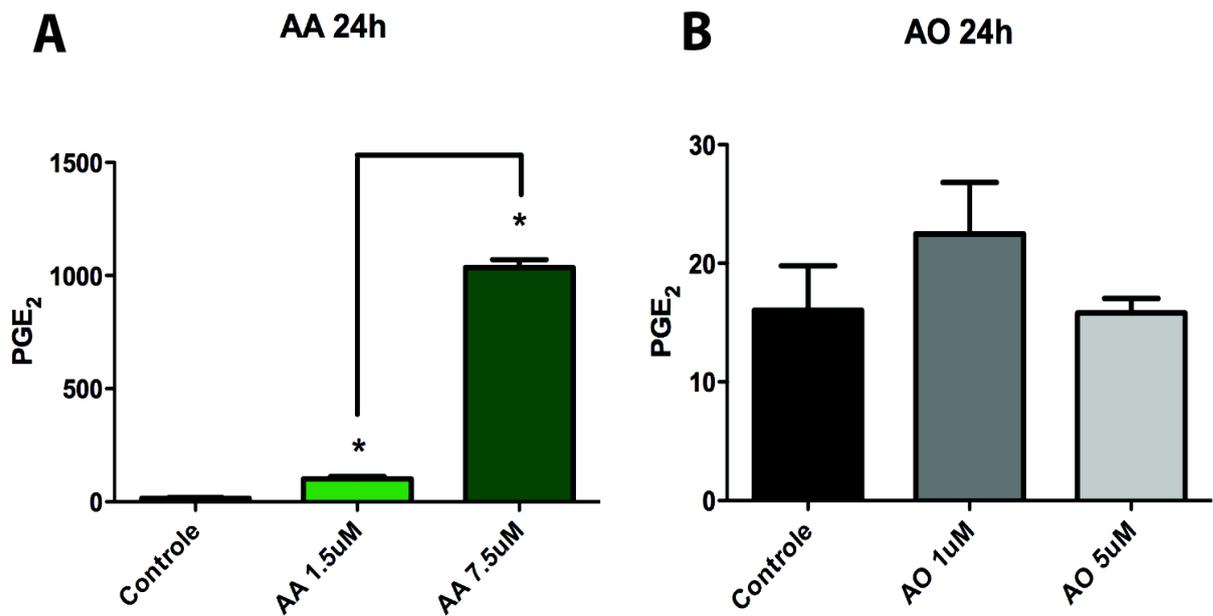


Figura 4.11 – Níveis de Prostaglandina E₂ (PGE₂) liberados pelo parasito *Trypanosoma cruzi* após estímulo com ácido araquidônico (AA) e ácido oléico (AO). Formas tripomastigotas do parasito foram estimuladas com 1,5 ou 7,5 µM de AA (A) e 1 e 5 µM de AO (B) por 24 h e os níveis de PGE₂ foram dosadas no sobrenadante por ensaio imunoenzimático. Nos grupos controles, as formas tripomastigotas foram incubadas apenas com o mesmo veículo usado para diluição dos ácidos (etanol a 0,1%). Os níveis de PGE₂ apresentados nos gráficos estão em pg/mL. Asterisco (*) indica diferença significativa $p \leq 0,05$. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5®, utilizando o *test t de student*.

4.6 – Corpúsculos Lipídicos de *Trypanosoma cruzi* são sítios de formação de PGE₂

A PGE₂ é um conhecido mediador inflamatório lipídico que age no sistema imune de mamíferos e são produzidos principalmente por células envolvidas na inflamação (Abdalla e cols., 2008; Van Elssen e cols., 2011). Corpúsculos lipídicos formados nestas células são capazes de sintetizarem PGE₂ em resposta à infecção com diferentes patógenos (D'Avila e cols., 2011; D'Avila e cols., 2006).

Tendo em vista os dados do presente trabalho mostrando que parasito é capaz de produzir e liberar PGE₂ no meio, foi investigado se esse mediador inflamatório tem sua produção relacionada com os corpúsculos lipídicos do parasito, como ocorre em células de mamíferos. Para isto, foi realizada uma técnica de imunolocalização em formas tripomastigotas do parasito, através de fixação da PGE₂ em seu local de síntese usando-se a técnica de Eicosacell (Bandeira-Melo e cols., 2011). Esta técnica utiliza o fixador EDAC, que permite fixar o eicosanóide no seu sítio de síntese, através de ligações cruzadas com proteínas adjacentes presentes nos corpúsculos lipídicos (Bandeira-Melo e cols., 2011).

A imunomarcção para ADRP, proteína considerada um marcador para corpúsculos lipídicos, associada à imunomarcção para PGE₂ demonstrou que, de fato, os corpúsculos lipídicos são sítios de compartimentalização da síntese de PGE₂ em *T. cruzi*, uma vez que ocorreu co-localização destas duas moléculas (Fig. 4.12 Bii). Enquanto as células controles não estimuladas mostraram uma imunomarcção difusa e pouco evidente (Fig. 4.12 A, Ai, Aii), o estímulo com AA revelou a presença de uma imunomarcção pontual e intensa tanto para ADRP (Fig. 4.12 B, C) como para PGE₂ (Fig. 4.12 Bi). A Substituição do anticorpo primário para PGE₂ por um anticorpo irrelevante (IgG) mostrou imunomarcção negativa para este mediador inflamatório (PGE₂) (Fig. 4.12 Ci).

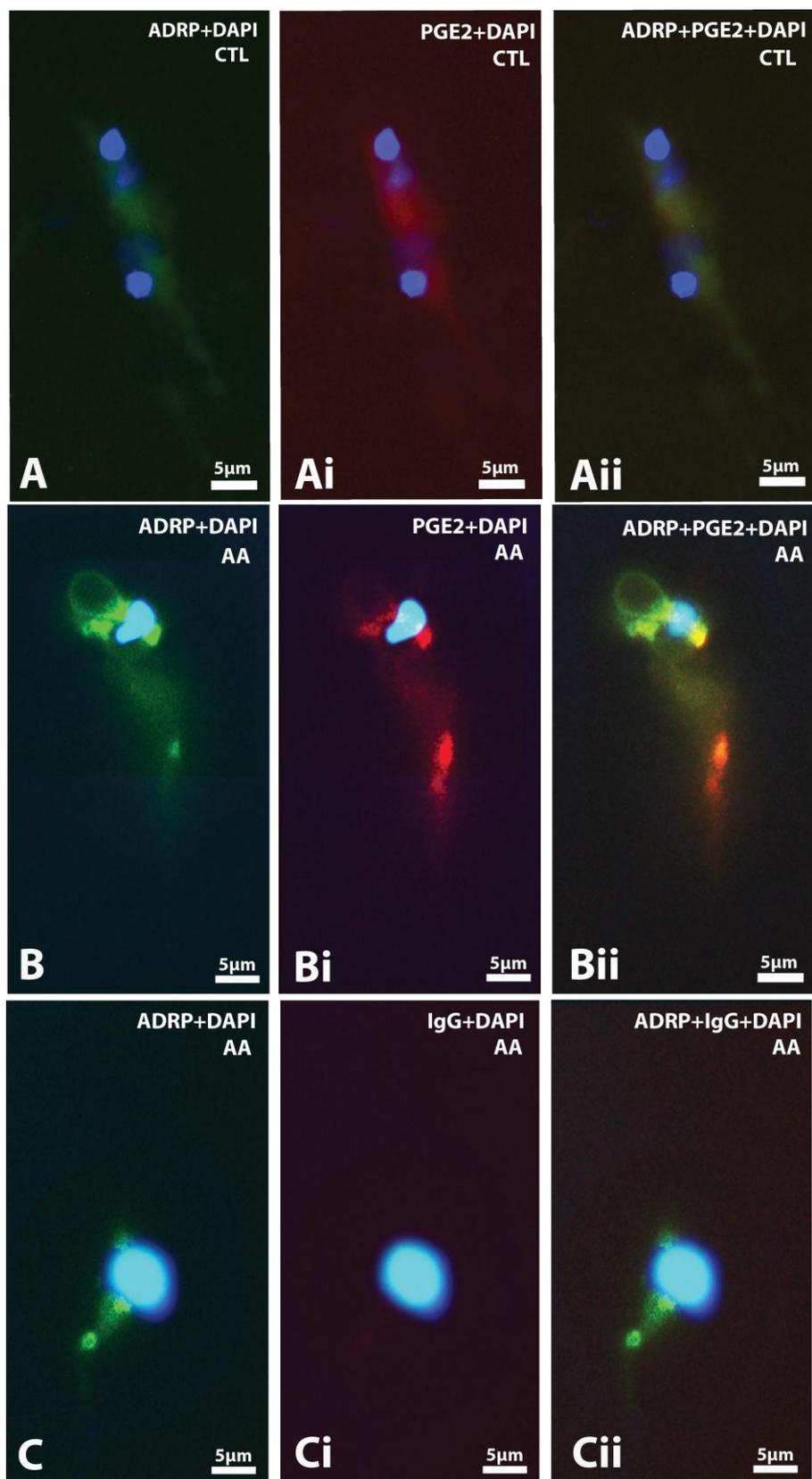


Figura 4.12 – Imunomarcção para ADRP e Prostaglandina E₂ (PGE₂) em formas tripomastigotas do parasito *T. cruzi* estimuladas ou não com ácido araquidônico (AA). (A-Aii) Células não estimuladas controles mostram imunomarcção difusa e pouco evidente

para ADRP (A) e PGE₂ (Ai). (Aii) mostra a co-localização destas duas moléculas. (B-Bii) O estímulo com AA levou à formação de corpúsculos lipídicos e imunomarcção intensa destes tanto para ADRP (B) como para PGE₂ (Bi). Observe em (Bii) a co-localização destas duas marcações. Em (C-Cii) são mostradas imagens representativas do controle do anticorpo primário para PGE₂. Enquanto (C) mostra imunomarcção clara para ADRP, em (Ci), onde foi usada uma IgG irrelevante, a imunomarcção é negativa para PGE₂. (Cii) mostra a sobreposição de (C) e (Ci). Áreas de DNA do parasito foram marcadas em azul pelo DAPI. Tripomastigotas foram estimulados ou não com AA (7.5 µM) por 24 h e as células processadas para a técnica de Eicosacell (Bandeira-Melo e cols., 2011).

5. Discussão

Os corpúsculos lipídicos são organelas virtualmente presentes em todos os organismos, podendo ser encontradas em plantas, protozoários e bactérias (Murphy, 2001; Murphy, 2012). São comumente presentes e bem descritas em células de mamíferos, nas quais participam de vários processos celulares como metabolismo lipídico, tráfego de vesículas, estocagem de citocinas e receptores de citocinas (revisado em (revisado em (Bozza e cols., 2007; D'Avila e cols., 2006; Melo e Dvorak, 2012))).

Em células do sistema imune, os corpúsculos lipídicos são sítios de produção de mediadores inflamatórios, como os eicosanóides, que são produzidos a partir da atuação de várias enzimas, como COXs, LOs, e PGE sintase (Bozza e cols., 1996; Weibel e cols., 2009), (revisado em (Bandeira-Melo e cols., 2002; Bozza e cols., 2011)). Desta forma, corpúsculos lipídicos exercem papel importante em células do sistema imune por serem sítios reconhecidos de produção de mediadores inflamatórios de origem lipídica (Bozza e cols., 1996; Bozza e cols., 1997). A formação de corpúsculos lipídicos é tão expressiva em resposta à doenças inflamatórias, incluindo doenças infecciosas, que estas organelas são consideradas marcadores estruturais de inflamação (revisado (Melo e cols., 2011b)).

Na última década, um número acentuado de estudos sobre corpúsculos lipídicos vem sendo realizados em células de mamíferos, porém este número é ainda bastante limitado quando se trata de patógenos. Trabalhos iniciais focados em aspectos morfológicos de vários patógenos, incluindo *T. cruzi* descrevem os corpúsculos como inclusões lipídicas arredondadas relacionadas com reserva lipídica (De Souza, 2009; Soares e cols., 1987). Mais recentemente, corpúsculos lipídicos em patógenos vem ganhando destaque, uma vez que estas organelas parecem ter funções não apenas de reserva energética, mas também ligadas à sobrevivência do patógeno dentro da célula hospedeira (Coppens, 2006; Quittnat e cols., 2004). De fato, em *P. falciparum*, por exemplo, são formados corpúsculos lipídicos a partir de lipídios extraídos do hospedeiro como mecanismo de escape. Interessantemente, o parasito se utiliza de lipídios das células hospedeiras (eritrócitos) que se acumulam próximo ao vacúolo parasitóforo (Jackson e cols., 2004).

Os resultados do presente trabalho ampliam o conhecimento sobre corpúsculos lipídicos em patógenos, demonstrando que estas organelas parecem também envolvidas com a modulação da resposta imune do hospedeiro e evasão do parasito em infecção por *Trypanosoma cruzi*.

Os resultados obtidos mostraram que o parasito *T. cruzi* possui corpúsculos lipídicos no seu citoplasma nas formas amastigota e tripomastigota, observação constatada após

identificação específica para essa organela com três marcadores de corpúsculos lipídicos – tetróxido de ósmio, BODIPY[®] e Oil Red O, à microscopia de luz e por microscopia eletrônica de transmissão. Conforme ressaltado anteriormente, a microscopia eletrônica de transmissão permite a identificação precisa de corpúsculos lipídicos, visto que estas organelas não apresentam membrana envoltória com estrutura trilaminar típica (revisto em (Melo e cols., 2011b)). Desta forma, corpúsculos lipídicos no parasito podem ser diferenciados de outras organelas, como por exemplo, acidocalcisomo e reservossomo que são delimitadas por membrana verdadeira (Miranda e cols., 2000; Sant'Anna e cols., 2004).

Observamos que, dependendo do estímulo, ou do meio no qual o parasito está inserido, o número e morfologia dos corpúsculos lipídicos alteram no citoplasma do *T. cruzi*. Isto significa que corpúsculos lipídicos 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 corpúsculos lipídicos, com aumento significativo do número destas organelas em comparação com tripomastigotas mantidas sem a presença de macrófagos. Esse fato reforça a idéia de que os estímulos gerados pelo hospedeiro influenciam na formação de corpúsculos lipídicos do parasito e que a interação do parasito com o 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 (De Souza e cols., 2010)).

Outro dado interessante do presente trabalho foi a comparação de aspectos morfológicos de corpúsculos lipídicos 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 corpúsculos lipídicos 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 encontra-se dentro do organismo hospedeiro, os estímulos gerados durante o processo de infecção, assim como a resposta do hospedeiro, são capazes de influenciar diretamente os corpúsculos lipídicos. Ou seja, corpúsculos lipídicos 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 corpúsculos lipídicos do *Trypanosoma 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 corpúsculos lipídicos, é bem documentado em células de mamíferos. Durante estudo por infecção por patógenos como *Trypanosoma cruzi* e *Mycobacterium bovis* BCG, corpúsculos lipídicos de macrófagos mostraram diferenças entre elétron-densidades dependendo do tempo de infecção e da carga parasitária (D'Avila e cols., 2006) e (revisto em (Melo e cols., 2006)). Esta diferença de elétron-densidade de corpúsculos lipídicos 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 (Melo e cols., 2006). Além disso, sugere que corpúsculos lipídicos são de fato modulados no citoplasma a partir de estímulos sofridos pela célula.

As análises de microscopia eletrônica também revelaram a presença corpúsculos lipídicos no citoplasma do macrófago claramente dispostos na proximidade do parasito (Fig. 4.6) e de vesículas de transporte aparentemente transitando entre as formas amastigotas do parasito e o citoplasma do macrófago (Fig. 4.7). Estas observações chamaram a atenção porque é documentado na literatura que corpúsculos lipídicos 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 (Melo e Dvorak, 2012)). 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 (Coppens, 2006; Jackson e cols., 2004; Vielemeyer e cols., 2004). Interessantemente, as observações ultraestruturais do presente trabalho mostraram corpúsculos lipídicos, dispostos na proximidade do parasito, parcialmente mobilizados (Fig. 4.6). Isso sugere, uma perda de conteúdo nos corpúsculos lipídicos e, em conjunto com a observação das vesículas de transporte, conseqüentemente um tráfego de material lipídico dos corpúsculos lipídicos do macrófago para os amastigotas. Sendo assim, essa troca de material, mais especificamente ganho de lipídios pelo parasito, permite que estes lipídios sejam utilizados como matéria prima para o metabolismo celular do parasito. 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 (Charron e Sibley, 2002; Coppens, 2006; Palacpac, 2004).

A capacidade de AA e AO modular a formação de corpúsculos lipídicos no *T. cruzi* na forma tripomastigota foi investigada. Esses lipídios são conhecidos como precursores da formação de eicosanóides e indutores da formação de corpúsculos lipídicos em células de mamíferos (Bozza e cols., 1996).

Quando os parasitos foram estimulados com AA e AO foram observados aumentos significativos de corpúsculos lipídicos no parasito em relação ao controle não estimulado, dependendo da dose utilizada de cada ácido graxo e dos tempos. Uma importante constatação foi de que o parasito apresenta um maior perfil de indução quando estimulados em tempos menores, tanto com AA quanto em AO. Isso significa uma resposta aguda e rápida dos parasitos aos estímulos na produção dos corpúsculos lipídicos. Assim como acontece em células de mamíferos, corpúsculos lipídicos do parasito são rapidamente formados em respostas a agentes indutores. Foi observado também, que parasitos estimulados nos tempos mais tardios (12 h e 24 h), apesar de apresentarem um perfil de indução no número de corpúsculos lipídicos menor que nos tempos mais recentes (1 h e 2 h), mostraram aumento no tamanho dos corpúsculos lipídicos no citoplasma (dado não mostrado), o que pode ser atribuído a uma deposição consistente de ácidos graxos nos corpúsculos lipídicos já formados e/ou coalescência desses corpúsculos lipídicos. Estes perfis de aumento na quantidade de corpúsculos lipídicos provavelmente se devem ao mesmo processo conhecido em mamíferos, quando demonstrou-se que esses ácidos graxos são indutores na formação de corpúsculos lipídicos e podem ser incorporados nestas organelas e futuramente utilizados no metabolismo celular (Dvorak e cols., 1983; Weller e Dvorak, 1985).

O aumento no número de corpúsculos lipídicos induzido por AA foi acompanhado por um grande aumento na liberação de PGE₂ (Fig. 4.11). Além disso, demonstrou-se no presente trabalho que corpúsculos lipídicos do parasito são sítios da produção deste mediador inflamatório (Fig. 4.12).

A PGE₂ é um potente eicosanóide que age no organismo como um mediador inflamatório inibitório do sistema imune, pois tem seu papel relacionado ao controle da resposta imune, proporcionando inibição na produção de citocinas pró inflamatórias, restringindo a ação de células importantes para imunidade como macrófagos, células NK, linfócitos T entre outras (Goodwin e cols., 1977; Minakuchi e cols., 1990; Van Elsen e cols., 2011). A PGE₂ está, por exemplo, associada aos danos ocasionados aos tecidos dos hospedeiros durante a doença de Chagas, devido à sua ação sistêmica e de contenção (Abdalla e cols., 2008). 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 PGE₂/parasito pode ser importante durante a infecção por *T.cruzi*. Considerando que o parasitismo é muito acentuado na fase aguda da doença (Fig. 1.6), quantidades consideráveis de PGE₂ 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 se interiorizam numa única célula hospedeira (Fig. 1.6), torna possível a liberação de grande quantidade de mediador (PGE₂) no tecido local. A PGE₂ liberada pelos parasitos, cai no 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 PGE₂. 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 PGE₂ 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 PGE₂ foi liberada, contribuindo para o crescimento parasitário (D'Avila e cols., 2011; Freire-de-Lima e cols., 2000). A inibição do sistema imune pela PGE₂ gerada pelas células do hospedeiro, associada à produção de PGE₂ diretamente por *T. cruzi* podem beneficiar a sobrevivência deste parasito. Desta forma, sugere-se que a síntese de PGE₂ pelo *T. cruzi* possa ser um mecanismo de evasão desenvolvido pelo parasito.

Estudos futuros são importantes para entender melhor as implicações da formação de corpúsculos lipídicos no *T.cruzi* e o papel da PGE₂ neste parasito com vistas de se alcançar um melhor controle desta infecção.

6. Conclusões

- O parasito *Trypanosoma cruzi* possui corpúsculos lipídicos 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 corpúsculos lipídicos não são organelas estáticas no parasito, mas sim organelas que respondem prontamente a condições em que este patógeno se encontra.
- A formação de corpúsculos lipídicos no *Trypanosoma cruzi* pode ser modulada pela interação com o organismo hospedeiro. Além disso, a composição destas organelas também parece ser influenciada por esta interação. Portanto, corpúsculos lipídicos do parasito podem ser consideradas organelas dinâmicas as quais encontram-se provavelmente envolvidas na fisiopatologia da doença de Chagas.
- As análises ultraestruturais sugerem a ocorrência de um tráfego de lipídios do hospedeiro para o parasito. Estas moléculas poderiam ser usadas pelo próprio *Trypanosoma cruzi* na formação de seus corpúsculos lipídicos.
- O *T. cruzi* é capaz de produzir PGE₂, um potente inibidor do sistema imune hospedeiro. Quando estimulados com AA, os parasitos produziram quantidades elevadas deste mediador inflamatório quando comparado com os parasito não estimulados. Essa observação, corrobora com a ideia de que esse ácido graxo, precursor na formação de PGE₂ em corpúsculos lipídicos de mamíferos, age da mesma forma no parasito. Essa pode ser uma estratégia de evasão utilizada pelo parasito.
- A produção de PGE₂ ocorre nos corpúsculos lipídicos do parasito. Esse fato é de extrema importância pois nos permite concluir que os corpúsculos lipídicos do parasito estão agindo semelhantemente aos corpúsculos lipídicos de células inflamatórias de mamíferos. Desta forma, pode-se fazer uma analogia funcional entre essa organela nas células dos mamíferos e de parasitos. Isso torna os corpúsculos lipídicos de *Trypanosoma cruzi*, um possível alvo para estudos mais detalhados futuramente.
- Em conjunto, os resultados do presente trabalho (sumarizados na Fig. 6.1), mostram que o parasito *T. cruzi* possui corpúsculos lipídicos em seu citoplasma, os quais

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_2 o que pode agir na célula hospedeira e ser de extrema importância para a evasão do parasito. Os corpúsculos lipídicos no parasito podem ser importantes alvos de controle no curso da doença de Chagas.

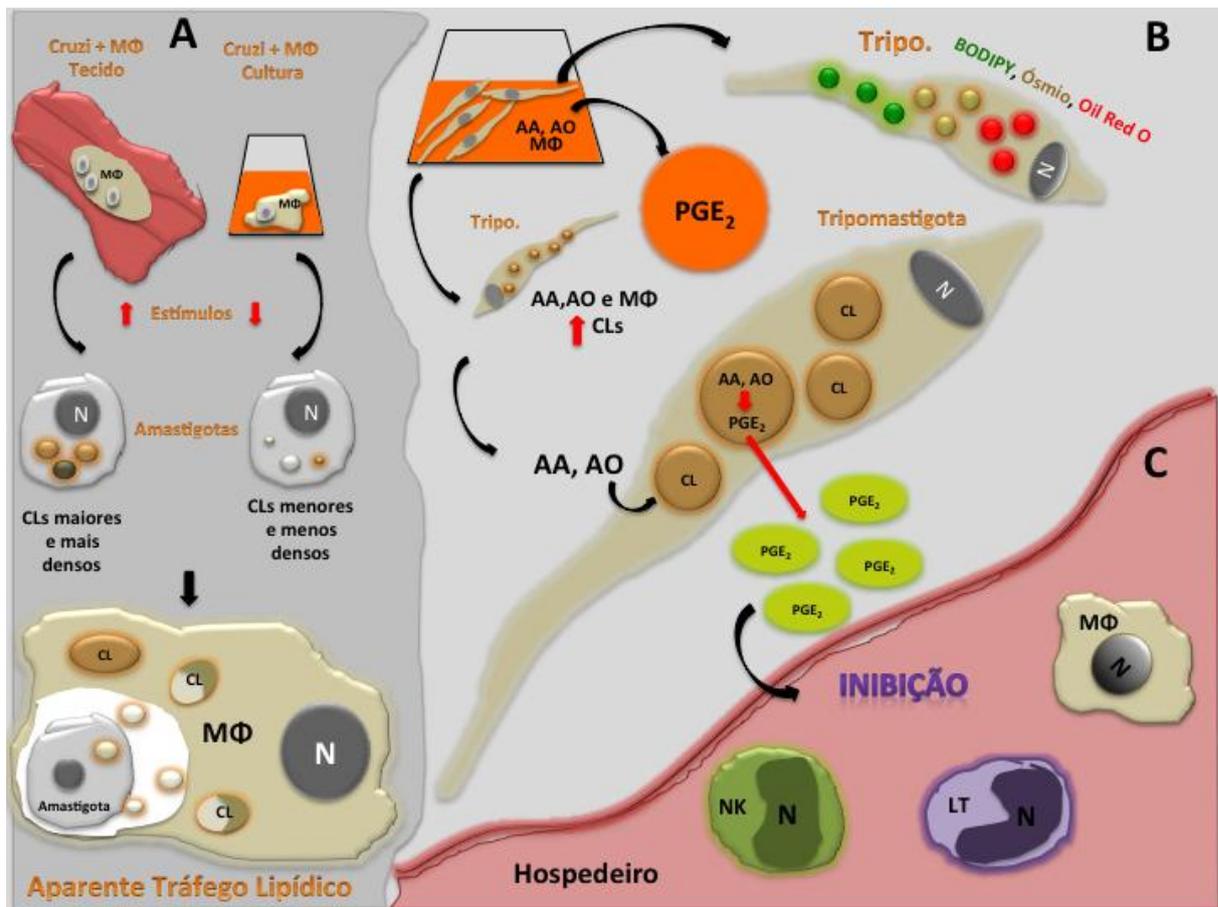


Figura 6.1 – Mecanismos propostos para formação de corpúsculos lipídicos a partir de estímulos e formação de prostaglandina E₂ (PGE₂) no *Trypanosma cruzi*. Em (A), a sequência indica o processo no qual parasitos amastigotas são mantidos de diferentes formas, em macrófagos no tecido cardíaco de ratas e macrófagos murinos em cultura. Foram demonstradas as diferenças morfológicas dos corpúsculos lipídicos. Em (A) também se observa o aparente tráfego de vesículas existente entre os amastigotas e o macrófago. Na sequência, em (B) tripomastigotas em cultura foram estimulados com ácidos graxos em diferentes tempos e doses e em presença de macrófagos. Lâminas foram confeccionadas com diferentes marcações específicas para corpúsculos lipídicos. O sobrenadante da cultura foi analisado dosando os níveis de PGE₂. Os parasitos estimulados tanto com ácidos graxos quanto com presença de macrófagos mostraram perfil de aumento no numero de corpúsculos lipídicos no citoplasma. Foi observado também que há a produção de PGE₂ pelo parasito. Através do Eicosacell foi co-localizado corpúsculos lipídicos e PGE₂ recém sintetizadas, mostrando que PGE₂ é produzida em corpúsculos lipídicos do parasito. Em (C) é mostrado que a PGE₂ produzida nos corpúsculos lipídicos e liberada pelo parasito pode agir sobre o sistema imune do hospedeiro de forma inibitória.

7. Referências Bibliográficas

- Abdalla GK, Faria GE, Silva KT, Castro EC, Reis MA and 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.
- Aliberti J and Bafica A. Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2005;73(3-4):283-8.
- Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Torocsik D, D'Avila H, Dezso B e cols. 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.
- Bambino-Medeiros R, Oliveira FOR, Calvet CM, Vicente D, Toma L, Krieger MA e cols. Involvement of host cell heparan sulfate proteoglycan in Trypanosoma cruzi amastigote attachment and invasion. *Parasitology* 2011;138(5):593-601.
- Bandeira-Melo C, Bozza PT and Weller PF. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109(3):393-400.
- Bandeira-Melo C, Weller PF and Bozza PT. EicosaCell - an immunofluorescent-based assay to localize newly synthesized eicosanoid lipid mediators at intracellular sites. *Methods Mol Biol* 2011;689:163-81.
- Barbosa HS and 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.
- Barbosa HS and Meirelles MNL. Evidence of Participation of Cytoskeleton of Heart-Muscle Cells during the Invasion of Trypanosoma-Cruzi. *Cell Structure and Function* 1995;20(4):275-84.
- Bargues MD, Klisiowicz DR, Panzera F, Noireau F, Marcilla A, Perez R e cols. 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.
- Barrias ES, Reignault LC, De Souza W and Carvalho TMU. Dynasore, a Dynamin Inhibitor, Inhibits Trypanosoma cruzi Entry into Peritoneal Macrophages. *Plos One* 2010;5(1).
- Bassotti G and Villanacci V. The pathophysiology of chagasic megacolon: beyond ICC. *Virchows Arch* 2013;462(1):125.
- Borges-Pereira J, Xavier SS, Pirmez C and 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.

- Bozza PT, Bakker-Abreu I, Navarro-Xavier RA and Bandeira-Melo C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011;85(5):205-13.
- Bozza PT, Melo RCN and Bandeira-Melo C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther* 2007;113(1):30-49.
- Bozza PT, Payne JL, Morham SG, Langenbach R, Smithies O and 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.
- Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM and Weller PF. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med* 1997;186(6):909-20.
- Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L and 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.
- Briceno-Leon R. Chagas disease in the Americas: an ecohealth perspective. *Cad Saude Publica* 2009;25 Suppl 1:S71-82.
- Bryan RT, Balderrama F, Tonn RJ and Dias JC. Community participation in vector control: lessons from Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50(6):61-71.
- Burleigh BA and Andrews NW. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:175-200.
- Buscaglia CA, Campo VA, Frasch AC and Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol* 2006;4(3):229-36.
- Calabrese KS, Lagrange PH and da Costa SC. *Trypanosoma cruzi*: histopathology of endocrine system in immunocompromised mice. *Int J Exp Pathol* 1994;75(6):453-62.
- Chagas C. Descoberta do *Tripanozoma Cruzi* e verificação da *Tripanozomíase Americana*: retrospecto historico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1922a;15(1):67-76.
- Chagas C. A new disease entity in man: a report on etiologic and clinical observations. *Int J Epidemiol* 2008;37(4):694-5.
- Chagas C. Nova entidade morbida do homem: rezumo geral de estudos etiolojicos e clinicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1911;3(2):219-75.
- Chagas C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1909;1(2):159-218.
- Chagas C. Traços de Oswaldo Cruz. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1922b;15(1):5-57.
- Chagas E. Forma cardiaca da *Trypanosomíase Americana*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1930;24(3):89-125.

- Chagas E. Summula dos conhecimentos actuaes sobre a Trypanosomiasis americana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1935;30(3):387-416.
- Chamond N, Coatnoan N and Minoprio P. Immunotherapy of Trypanosoma cruzi infections. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2002;2(3):247-54.
- Chang PC. The ultrastructure of Leishmania donovani. J Parasitol 1956;42(2):126-36.
- Charron AJ and Sibley LD. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite Toxoplasma gondii. J Cell Sci 2002;115(15):3049-59.
- Chimelli L and Scaravilli F. Trypanosomiasis. Brain Pathol 1997;7(1):599-611.
- Contreras VT, Araque WH and Delgado VS. Biological properties of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigotes: usefulness for studying Chagas' disease. Biol Res 1993;26(1-2):315-6.
- Coppens I. Contribution of host lipids to Toxoplasma pathogenesis. Cellular Microbiology 2006;8(1):1-9.
- Coppens I and 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.
- Correa AF, Andrade LR and Soares MJ. Elemental composition of acidocalcisomes of Trypanosoma cruzi bloodstream trypomastigote forms. Parasitology Research 2002;88(10):875-80.
- Correa RR. [Report on Chagas' disease in Brasil and especially in the State of Sao Paulo]. Rev Bras Malariol Doencas Trop 1968;20(1):39-81.
- 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.
- Coura JR and Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. Acta Tropica 2010;115(1-2):5-13.
- Crane MS and 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.
- Cuevas IC, Cazzulo JJ and Sanchez DO. gp63 homologues in Trypanosoma cruzi: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. Infection and Immunity 2003;71(10):5739-49.
- D'Avila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR e cols. 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. Journal of Infectious Diseases 2011;204(6):951-61.
- D'Avila H, Melo RCN, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC and 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.
- D'Avila H, Toledo DA and Melo RCN. Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-Trypanosoma cruzi interplay during innate immune responses. *Mediators Inflamm* 2012;2012:478601.
- De Souza W. Structural organization of Trypanosoma cruzi. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 Suppl 1:89-100.
- De Souza W, de Carvalho TM and Barrias ES. Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol* 2010;2010.
- De Souza W and 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.
- 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.
- 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.
- Dias E and Laranja FS. Chagas' disease and its control. *Abstr Int Congr Trop Med Malar* 1948;56:91.
- Dias JC, Silveira AC and Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97(5):603-12.
- Digel M, Eehalt R and Fullekrug J. Lipid droplets lighting up: insights from live microscopy. *Febs Letters* 2010;584(11):2168-75.
- Docampo R and Moreno SN. Acidocalcisomes. *Cell Calcium* 2011;50(2):113-9.
- 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.
- Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R e cols. 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).
- Dvorak AM, Dvorak HF, Peters SP, Shulman ES, MacGlashan DW, Jr., Pyne K e cols. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J Immunol* 1983;131(6):2965-76.
- Dvorak AM, Morgan ES, Tzizik DM and Weller PF. Prostaglandin endoperoxide 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.

- Dvorak AM, Weller PF, Harvey VS, Morgan ES and 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. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;101(2):136-42.
- Dye C, Mertens T, Hirnschall G, Mpanju-Shumbusho W, Newman RD, Raviglione MC e cols. WHO and the future of disease control programmes. *Lancet* 2013;381(9864):413-8.
- Fabrino DL, Leon LL, Genestra M, Parreira GG and Melo RC. Rat models to investigate host macrophage defense against *Trypanosoma cruzi*. *J Innate Immun* 2011;3(1):71-82.
- Fernandes MC, Cortez M, Geraldo Yoneyama KA, Straus AH, Yoshida N and Mortara RA. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. *Int J Parasitol* 2007;37(13):1431-41.
- Flaspohler JA, Jensen BC, Saveria T, Kifer CT and Parsons M. A Novel Protein Kinase Localized to Lipid Droplets Is Required for Droplet Biogenesis in Trypanosomes. *Eukaryotic Cell* 2010;9(11):1702-10.
- Flaspohler JA, Rickoll WL, Beverley SM and 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.
- Florez O, Esper J, Higuera S, Barraza MF, Cabrera HB, Mantilla JC e cols. Chagasic megacolon associated with *Trypanosoma cruzi* I in a Colombian patient. *Parasitology Research* 2010;107(2):439-42.
- Freire-de-Lima CG, O. ND, Soares MBP and *al. e*. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature Communications* 2000;403(6766):199-203.
- Freire-de-Lima L, Alisson-Silva F, Carvalho ST, Takiya CM, Rodrigues MM, DosReis GA e cols. *Trypanosoma cruzi* subverts host cell sialylation and may compromise antigen-specific CD8+ T cell responses. *J Biol Chem* 2010;285(18):13388-96.
- Freire-de-Lima L, Oliveira IA, Neves JL, Penha LL, Alisson-Silva F, Dias WB e cols. Sialic acid: a sweet swing between mammalian host and *Trypanosoma cruzi*. *Front Immunol* 2012;3:356.
- Fujimoto Y, Itabe H, Sakai J, Makita M, Noda J, Mori M e cols. 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.
- Goodwin JS, Bankhurst AD and 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.
- Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD e cols. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med* 2007;357(10):1018-27.

- Jackson KE, Klonis N, Ferguson DJP, Adisa A, Dogovski C and Tilley L. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology* 2004;54(1):109-22.
- Jurberg J, Galvao C, Bowers WS, Garcia ES and 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.
- Kamiji MM and 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.
- Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 1965;27:137-8.
- Kimmel AR, Brasaemle DL, McAndrews-Hill M, Sztalryd C and Londos C. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J Lipid Res* 2010;51(3):468-71.
- Kropf SP and 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.
- Kumar Y, Cocchiari J and Valdivia RH. The Obligate Intracellular Pathogen *Chlamydia trachomatis* Targets Host Lipid Droplets. *Current Biology* 2006;16(16):1646-51.
- 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.
- Laranja FS, Dias E and Nobrega G. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1948;46(2):473-529.
- 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.
- Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP and Kimmel AR. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 1999;10(1):51-8.
- Matsuda NM, Miller SM and Evora PR. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clinics (Sao Paulo)* 2009;64(12):1219-24.
- Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VG, Sarno EN, Atella GC e cols. 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.
- Mattos KA, Lara FA, Oliveira VGC, Rodrigues LS, D'Avila H, Melo RCN e cols. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cellular Microbiology* 2011;13(2):259-73.

- Mecaskey JW, Knirsch CA, Kumaresan JA and Cook JA. The possibility of eliminating blinding trachoma. *Lancet Infect Dis* 2003;3(11):728-34.
- Melo RC and Dvorak AM. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog* 2012;8(7):e1002729.
- Melo RCN, D'Avila H, Bozza PT and Weller PF. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. *Methods Mol Biol* 2011a;689:149-61.
- Melo RCN, D'Avila H, Fabrino DL, Almeida PE and 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.
- Melo RCN, D'Avila H, Wan HC, Bozza PT, Dvorak AM and Weller PF. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *J Histochem Cytochem* 2011b;59(5):540-56.
- Melo RCN, Dvorak AM and Weller PF. Contributions of Electron Microscopy to Understand Secretion of Immune Mediators by Human Eosinophils. *Microscopy and Microanalysis* 2010;16(6):653-60.
- Melo RCN, Fabrino DL, Dias FF and Parreira GG. Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflammation Research* 2006;55(8):342-8.
- Melo RCN and Weller PF. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histology and Histopathology* 2010;25(10):1341-54.
- Minakuchi R, Wacholtz MC, Davis LS and Lipsky PE. Delineation of the mechanism of inhibition of human T cell activation by PGE₂. *J Immunol* 1990;145(8):2616-25.
- Miranda K, Benchimol M, Docampo R and de Souza W. The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research* 2000;86(5):373-84.
- Molyneux DH, Hotez PJ and 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.
- Molyneux DH and Zagaria N. Lymphatic filariasis elimination: progress in global programme development. *Ann Trop Med Parasitol* 2002;96 Suppl 2:S15-40.
- Moreno SN and Docampo R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2009;56(3):208-13.
- Morris SA, Tanowitz HB, Wittner M and Bilezikian JP. Pathophysiological Insights into the Cardiomyopathy of Chagas-Disease. *Circulation* 1990;82(6):1900-9.
- Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 2001;40(5):325-438.

- Murphy DJ. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma* 2012;249(3):541-85.
- Nishikawa Y, Quittnat F, Stedman TT, Voelker DR, Choi J-Y, Zahn MM e cols. Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. *Cellular Microbiology* 2005;7(6):849-67.
- Noireau F. Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 2009;104:60-4.
- Pacheco P, Vieira-de-Abreu A, Gomes RN, Barbosa-Lima G, Wermelinger LB, Maya-Monteiro CM e cols. 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.
- 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.
- Penha LL, Sant'Anna CB, Mendonca-Previato L, Cunha-e-Silva NL, Previato JO and Lima APCA. Sorting of phosphoglucomutase to glycosomes in *Trypanosoma cruzi* is mediated by an internal domain. *Glycobiology* 2009;19(12):1462-72.
- Pereira MG, Nakayasu ES, Sant'Anna C, De Cicco NN, Atella GC, de Souza W e cols. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservosome lipid inclusions. *Plos One* 2011;6(7):e22359.
- Pierimarchi P, Cerni L, Alarcon de Noya B, Nicotera G, Diaz-Bello Z, Angheben A e cols. Rapid Chagas diagnosis in clinical settings using a multiparametric assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013.
- Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM e cols. 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.
- Ponce NE, Cano RC, Carrera-Silva EA, Lima AP, Gea S and Aoki MP. Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection. *Med Microbiol Immunol* 2012;201(2):145-55.
- Quittnat F, Nishikawa Y, Stedman TT, Voelker DR, Choi JY, Zahn MM e cols. 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.
- Ramaswamy K, Kumar P and He YX. A role for parasite-induced PGE₂ in IL-10-mediated host immunoregulation by skin stage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 2000;165(8):4567-74.
- Rassi A, Dias JCP and Marin-Neto JA. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart* 2008;95(7):524-34.

- Rassi A, Rezende JM and 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.
- Rebello JMM, Barros VLL and Mendes WA. Triatominae species. *Cad Saude Publica* 1998;14(1):187-92.
- Rocha GM, Miranda K, Weissmuller G, Bisch PM and de Souza W. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* revisited by atomic force microscopy. *Microsc Res Tech* 2008;71(2):133-9.
- 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.
- Rodrigues Coura J and de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97(1):3-24.
- Ruiz RC, Favoreto S, Dorta ML, Oshiro MEM, Ferreira AT, Manque PM e cols. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochemical Journal* 1998;330:505-11.
- Sant'Anna C, de Souza W and Cunha-e-Silva N. Biogenesis of the reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal* 2004;10(5):637-46.
- Sant'Anna C, Nakayasu ES, Pereira MG, Lourenco D, de Souza W, Almeida IC e cols. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. *Proteomics* 2009;9(7):1782-94.
- Sant'Anna C, Pereira MG, Lemgruber L, de Souza W and Silva NLCE. New insights into the morphology of *Trypanosoma cruzi* reservosome. *Microscopy Research and Technique* 2008;71(8):599-605.
- 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.
- Soares MJ, De Souza MF and De Souza W. Ultrastructural visualization of lipids in trypanosomatids. *J Protozool* 1987;34(2):199-203.
- Soares MJ and De souza W. Endocytosis of Gold-Labeled Proteins and Ldl by *Trypanosoma-Cruzi*. *Parasitology Research* 1991;77(6):461-8.
- Souto-Padron T, de Carvalho TU, Chiari E and de Souza W. Further studies on the cell surface charge of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 1984a;41(3):215-25.
- Souto-Padron T, De Souza W and Heuser JE. Quick-freeze, deep-etch rotary replication of *Trypanosoma cruzi* and *Herpetomonas megaseliae*. *J Cell Sci* 1984b;69:167-78.
- Teixeira ARL, Nascimento RJ and Sturm NR. Evolution and pathology in Chagas disease - A review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 2006;101(5):463-91.

- Tyler KM and Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 2001;31(5-6):472-81.
- Ueki S, Melo RC, Ghiran I, Spencer LA, Dvorak AM and Weller PF. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion competent eosinophil granules. *Blood* 2013.
- Urbina JA and Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 2003;19(11):495-501.
- Valente SAS, Da Costa Valente V, Das Neves Pinto AY, De Jesus Barbosa César M, Dos Santos MP, Miranda COS e cols. 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.
- van der Meer-Janssen YP, van Galen J, Batenburg JJ and Helms JB. Lipids in host-pathogen interactions: pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Prog Lipid Res* 2010;49(1):1-26.
- Van Elssen CH, Vanderlocht J, Oth T, Senden-Gijsbers BL, Germeraad WT and 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.
- Verissimo da Costa GC, Lery LM, da Silva ML, Moura H, Peralta RH, von Kruger WM e cols. The identification and characterization of epitopes in the 30-34kDa *Trypanosoma cruzi* proteins recognized by antibodies in the serum samples of chagasic patients. *J Proteomics* 2012;80C:34-42.
- Vielemeyer O, McIntosh MT, Joiner KA and Coppens I. Neutral lipid synthesis and storage in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 2004;135(2):195-207.
- Viotti R, Vigliano C, Armenti H and 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.
- Wan HC, Melo RCN, Jin Z, Dvorak AM and Weller PF. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J* 2007;21(1):167-78.
- Weibel GL, Joshi MR, Wei C, Bates SR, Blair IA and Rothblat GH. 15(S)-Lipoxygenase-1 associates with neutral lipid droplets in macrophage foam cells: evidence of lipid droplet metabolism. *J Lipid Res* 2009;50(12):2371-6.
- Weller PF and Dvorak AM. Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. *Blood* 1985;65(5):1269-74.
- Weller PF, Monahan-Earley RA, Dvorak HF and Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. *Am J Pathol* 1991;138(1):141-8.

- Yacoub S, Mocumbi AO and Yacoub MH. Neglected tropical cardiomyopathies: I. Chagas disease: myocardial disease. *Heart* 2008;94(2):244-8.
- Yao CQ. Major Surface Protease of Trypanosomatids: One Size Fits All? *Infection and Immunity* 2010;78(1):22-31.
- Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, Gray JP, Cassara J, Dvorak AM e cols. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol* 1998;152(3):759-69.
- Who, Working to overcome the global impact neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases Health Organization, Geneva, Switzland, 2010.