

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

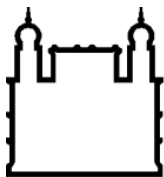
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ESTUDO DO PAPEL DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS DURANTE A INFECÇÃO
DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS PELO *Toxoplasma gondii***

Karina da Silva Oliveira

Rio de Janeiro

2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Karina da Silva Oliveira

**ESTUDO DO PAPEL DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS DURANTE A INFECÇÃO
DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS PELO *Toxoplasma gondii***

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biologia Celular e
Molecular – área de concentração:
Farmacologia e Imunologia

Orientadora: Patrícia Torres Bozza

Rio de Janeiro

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Karina da Silva.

Estudo do papel dos corpúsculos lipídicos durante a infecção de células dendríticas humanas pelo *Toxoplasma gondii* / Karina da Silva Oliveira. - Rio de Janeiro, 2019.

xv, 113 f.; il.

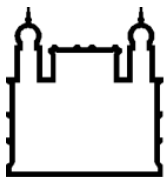
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientadora: Patrícia Torres Bozza.

Bibliografia: f. 84-94

1. corpúsculos lipídicos. 2. célula dendrítica. 3. toxoplasma gondii. 4. imunidade . I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Karina da Silva Oliveira

**ESTUDO DO PAPEL DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS DURANTE A INFECÇÃO
DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS PELO *Toxoplasma gondii***

Orientadora: Patrícia Torres Bozza

Aprovada em: 19/08/2019

Banca examinadora: Prof. Dr. Helene Santos Barbosa - FIOCRUZ (presidente)
Prof. Dr. Patrícia Elaine de Almeida - UFJF
Prof. Dr. Adriana César Bonomo - FIOCRUZ

Suplente: Prof. Dr. Christianne Bandeira de Melo - UFRJ
Prof. Dr. Tânia Zaverucha do Valle - FIOCRUZ (revisora)

Rio de Janeiro

Agosto de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço de forma infinita, e mesmo assim não suficiente, a Deus. Foi Ele quem planejou, me guiou e capacitou até aqui. Esperei nEle e nunca fiquei desamparada.

À Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, que não desistiu de mim nunca e me segurou pela mão sempre.

À Dra Patrícia Bozza, por toda orientação e oportunidade de fazer parte de um grupo tão enriquecedor e promissor.

À Dra Adriana Vallochi, que me fez crescer como profissional e, principalmente, como pessoa.

À Maria Rosania, minha mãe, pelo seu amparo, seu apoio, carinho e suprema dedicação. Você aguentou todas as minhas crises, não sei onde estaria sem você.

Ao meu pai, Luiz Henrique, por todo incentivo e orgulho que sente de mim.

Aos meus irmãos, Pedro e Giovanna, que mesmo agora longe de mim estão sempre me acompanhando.

Ao Paulo Henrique, meu esposo, por todo amor que me dá e toda a confiança que tem em mim. Você é minha força.

Aos pesquisadores do laboratório de Imunofarmacologia. Obrigada pelo incentivo, preocupação e sugestões.

Aos queridos alunos do Laboratório de Imunofarmacologia. Vocês me ensinaram muito! Agradeço a vocês por terem me acolhido de forma tão linda.

Ao grupo corpúsculo lipídico, companheiros diários nos momentos de alegria, de choro, de discussão e, principalmente, de trabalho.

Às minha “*wifes*” Ellen e Lívia, que dividiram comigo não só a casa, mas a experiência, os sofrimentos de cada dia e as conquistas. Vocês são uma inspiração para mim.

Aos amigos de caminhada que tive o prazer de conhecer: Érica, Filipe, Júlia Góes, Lohanna, Lucas, Maiara, Ester e Isaclaudia. Levarei a amizade e os ensinamentos de vocês para sempre comigo.

Aos alunos de iniciação científica Taynná, Felipe Ferraro e Victória, que tanto me ajudaram.

À Dra Patricia Reis, exemplo de profissional, e seus alunos, pessoas maravilhosas que tive o prazer de conhecer e conviver.

Aos meus amigos Cássia, Helena e Ramiro. Vocês foram minha válvula de escape para todo e qualquer problema. Estavam sempre presentes quando precisei, com todo o apoio que necessitava.

Aos funcionários do pavilhão 108. Pessoas maravilhosas sem as quais esse trabalho não poderia ser desenvolvido. Em especial à Rose Branco, com sua incrível capacidade de manter tudo organizado.

Aos funcionários do Serviço de Hemoterapia do Hospital Clementino Fraga Filho–UFRJ, sempre muito gentis e pacientes.

Aos integrantes da banca, pela gentileza de aceitarem o convite.

À CAPES e à FIOCRUZ, pelo apoio científico e financeiro.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	18
3. METODOLOGIA.....	19
3.1. Parasitos	19
3.1.1. Manutenção dos parasitos	19
3.1.2. Teste de viabilidade de taquizoítos de <i>T. gondii</i>	19
3.2. Soluções tamponadas para análise de diferenças na sensibilidade ao pH de CTFarRed e PKH-26.....	19
3.3. Obtenção de células dendríticas humanas (hDC)	20
3.4. Infecção de células dendríticas por taquizoítas de <i>Toxoplasma gondii</i>	21
3.5. Análise de corpúsculos lipídicos (CLs) durante a infecção de hDCs pelo <i>T. gondii</i>	21
3.5.1. Análise de CLs em hDC sem infecção e infectadas pelo <i>T. gondii</i>	21
3.5.2. Inibição de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico	22
3.5.3. Suplementação do meio de cultura com Ácidos Graxo.....	22
3.6. Dosagem de citocinas - ELISA.....	23
3.7. Citometria de Fluxo	23
3.7.1. Análise da viabilidade da hDC.....	23
3.7.2. Análise da expressão de moléculas de superfície	24
3.8. Análise Estatística.....	24

4. RESULTADOS	25
4.1. Obtenção de células dendríticas a partir de monócitos mononucleares de sangue periférico	25
4.2. Análise da viabilidade do <i>Toxoplasma gondii</i> e de Células Dendríticas humanas durante a infecção.	27
4.3. Perfil de infecção de células dendríticas humanas vivas e mortas ...	32
4.4. Biogênese de Corpúsculos Lipídicos e infectividade de células dendríticas humanas pelo <i>Toxoplasma gondii</i>.....	37
4.5. Impacto da taxa de infecção na biogênese de CLs e na viabilidade de hDCs.	41
4.6. Determinação da concentração dos inibidores da biogênese de CLs	44
4.7. Impacto da inibição da biogênese de CLs em hDCs infectadas pelo <i>T. gondii</i>.....	55
4.8. Efeitos da suplementação com Ácido Oleico na infecção de células Dendríticas infectadas pelo <i>Toxoplasma gondii</i>	63
4.9. Expressão de moléculas de superfície induzida pela infecção com <i>T. gondii</i>.....	69
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÃO.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXO I	95

LISTA DE ABREVIATURAS

AA = ácido Aracdônico

ACAT = acil-CoA:colesterol aciltransferase

ADRP = proteína relacionada à diferenciação de adipócitos (do inglês *adipose differentiation-related protein*)

AMA 1 = proteína Antígeno Apical de Membrana 1 (do inglês *Apical Membrane Antigen 1*).

AO = ácido oleico

ATG () = proteína relacionada a autofagia (do inglês *autophagy-related*)

ATGL = lipase de triacilglicerídeo do adipócito (do inglês *Adipose triglyceride lipase*)

BSA = albumina de soro bovino (do inglês *Bovine serum albumin*)

CCL () = ligante de quimiocina com motivo CC (do inglês *C-C motif chemokine ligand*)

CCR () = receptor de quimiocina CC (do inglês *C-C chemokine receptor*)

CD () = grupo de diferenciação (do inglês *cluster of differentiation*)

COX = Cicloxigenase

CLs = corpúsculos lipídicos

CTFarRed = marcador de proliferação celular (do inglês *Cell Tracer Far Red*)

CXCL () = ligante de quimiocina com motivo CXC (*do inglês C-X-C motif chemokine ligand*)

DC = células dendríticas (do inglês *Dendritic Cells*)

DC-SIGN = ligante de molécula de adesão intercelular não-integrina específica de célula dendrítica (do inglês *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*)

DGAT () = diacilglicerol aciltransferase (do inglês *diacylglycerol acyltransferase*)

DHFR = dihidrofolato redutase

DHPS = di-hidropteroato sintase

DMSO = dimetilsulfóxido (do inglês *Dimethyl Sulfoxide*)

EC = éster de colesterol

FAS = enzima ácido graxo sintase (do inglês *fatty acid synthase*)

FACS = citometria de fluxo (do inglês *fluorescence activated cell sorting*)

FSC = parâmetro na citometria de fluxo que indica tamanho do evento (do inglês *Forward Scatter*)

FVD = corante indicador de viabilidade (do inglês *Fixable Viability Dye*)

GBP = família de proteínas de ligação ao guanilato (do inglês *guanylate-binding protein*)

GM-CSF = fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (do inglês *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

GPI = glicosilfosfatidilinositol

hDC = célula dendrítica humana

iDGAT = Inibidor da enzima Diacilglicerol Aciltransferase

IFN γ = interferon gama

IL () = interleucina

IRG = GTPase relacionada a imunidade (do inglês *immunity-related GTPases*)

LDL = lipoproteína de baixa densidade (do inglês *Low-Density Lipoprotein*)

LO = lipoxigenase

LT () = leucotrieno

MHC = complexo de histocompatibilidade principal (do inglês *major histocompatibility complex*)

MIF = média de intensidade de fluorescência

MOI = multiplicidade de infecção (do inglês *multiplicity of infection*)

MVP = membrana do vacúolo parasitóforo

mTOR = proteína alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês *mammalian target of rapamycin*)

NK = célula matadora natural (do inglês *natural killer*)

NO = óxido nítrico

ORO = do inglês *Oil Red O*

PAT = família de proteínas estruturais dos corpúsculos lipídicos (perilipina, ADRP e TIP47).

PBMC = células mononucleares do sangue periférico (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PG () = prostaglandina

PLA₂ = fosfolipase A₂

PPAR () = receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor*)

PV = vacúolo parasitóforo

RE = retículo endoplasmático

ROS = espécie reativa de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)

SFB = soro fetal bovino

SFBd = soro fetal bovino delipidado

SSC = parâmetro na citometria de fluxo que indica granulosidade/complexidade do evento (do inglês *Side Scatter*)

STAT () = transdutor de sinal e ativador da transcrição (do inglês *Signal transducer and activator of transcription*)

TAG = triacilglicerol

TGF β = fator transformador de crescimento beta (do inglês *Transforming Growth Factor Beta*)

TIP47 = proteína de interação de cauda de 47 kDa

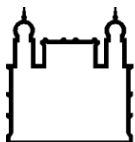
TLR = receptores do tipo Toll (do inglês *Toll-like receptor*)

TNF α = fator de necrose tumoral alfa (do inglês *tumor necrosis fator alpha*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da forma taquizoíta de <i>T. gondii</i>	1
Figura 2. Ciclo de vida do <i>T. gondii</i>	3
Figura 3. Resposta imune contra infecção pelo <i>T. gondii</i>	11
Figura 4. Destruição do <i>T. gondii</i> pelo sistema imune.....	12
Figura 5. A biogênese dos corpúsculos lipídicos.....	15
Figura 6. Caracterização fenotípica das células dendríticas humanas derivadas de monócitos.....	26
Figura 7. Taquizoítas duplo marcados com PKH-26 e Cell Tracer Far Red.	29
Figura 8. Análise da infectividade e viabilidade de Células Dendríticas humanas e viabilidade do <i>T. gondii</i> (continua).	30
Figura 9. Avaliação da viabilidade de células Dendríticas infectadas pelo <i>T. gondii</i> (continua).	33
Figura 10. Quantificação de citocinas nas culturas de DCs infectadas com taquizoítas de <i>T. gondii</i> ao longo do tempo.....	36
Figura 11. Análise da Biogênese de Corpúsculo Lipídicos em Células Dendrítica humanas infectadas com taquizoítas de <i>T. gondii</i> (continua).....	38
Figura 12. Influência da biogênese de CLs em hDC na infectividade e multiplicidade do <i>T. gondii</i>	40
Figura 13. Avaliação da biogênese de Corpúsculos Lipídicos e da viabilidade de Células Dendríticas infectadas por <i>T. gondii</i> , em diferentes MOI (continua).....	42
Figura 14. Determinação da concentração do inibidor C75, em células dendríticas humanas infectadas pelo <i>T. gondii</i> (continua).	45
Figura 15. Avaliação da viabilidade de células dendríticas humanas infectadas pelo <i>T. gondii</i> , tratadas com diferentes concentrações do inibidor C75.....	47
Figura 16. Determinação da concentração do inibidor da DGAT-1, em células dendríticas humanas infectadas pelo <i>T. gondii</i> (continua).	49
Figura 17. Avaliação da viabilidade do <i>T. gondii</i> e de células dendríticas humanas, tratadas com diferentes concentrações do inibidor da DGAT1 (continua).....	52
Figura 18. Tratamento com C75 (inibidor da FAS) e A922500 (inibidor da DGAT-1) em taquizoítas.	54

Figura 19. Efeitos da inibição farmacológica da biogênese de Corpúsculos Lipídicos na viabilidade durante a infecção de células dendríticas pelo <i>T. gondii</i> (continua).	57
Figura 20. Inibição farmacológica da biogênese de Corpúsculos Lipídicos durante a infecção de células dendríticas pelo <i>T. gondii</i> (continua).	60
Figura 21. Efeitos da inibição farmacológica da biogênese de Corpúsculos Lipídicos na infectividade e replicação do <i>T. gondii</i> durante a infecção de células dendríticas.	62
Figura 22. Influência da suplementação com Ácido Oleico na viabilidade de células dendríticas e do <i>T. gondii</i> (continua).	64
Figura 23. Efeitos da suplementação com ácido graxo na biogênese de CL e na replicação e infectividade do <i>T. gondii</i> (continua).	67
Figura 24. Expressão de moléculas de superfície de hDC infectadas com taquizoítas de <i>T. gondii</i> por 24 horas.	70
Figura 25 Resumo dos dados encontrados.	82



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

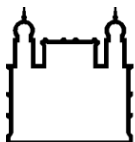
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DO PAPEL DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS DURANTE A INFECÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS PELO *Toxoplasma gondii*

RESUMO Dissertação

Karina da Silva Oliveira

O *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório, capaz de infectar vários tipos de células nucleadas, sendo compartimentalizado no vacúolo parasitóforo. Uma vez no vacúolo, o parasita é capaz de induzir diversas alterações na célula hospedeira que visam sua sobrevivência, dentre elas, a indução da biogênese de corpúsculos lipídicos (CLs). CLs são organelas presentes em todos os tipos celulares, com várias funções como, armazenamento de lipídios, regulação do metabolismo lipídico, tráfego de membranas e controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios. Porém, até o momento, pouco se sabe a respeito da função dos CLs na infecção pelo *T. gondii* em células humanas. Neste trabalho investigamos a participação dos CLs durante a infecção de células dendríticas humanas (hDC) por *T. gondii*. Nossos dados mostraram na cinética de infecção em hDC, pico de infecção e replicação em 24 horas (30%), seguidos de queda em 48 horas (10%). A infecção promoveu aumento de CD83 e MHC II na membrana, além da produção de TNF- α , IL-6, IL-8, IP-10 e MIF. A análise da viabilidade do parasita intracelular mostrou que as hDC foram capazes de destruir os parasitos intracelulares (60%). A infecção levou à perda da viabilidade da célula hospedeira em 48 horas de infecção (50%), ao mesmo tempo em que induziu a maior biogênese de CLs nessas células (30CL/cél). O aumento da taxa de infecção fez com que a biogênese de CLs e a perda da viabilidade das células hospedeiras ocorressem de forma mais precoce, já em 24 horas de infecção. Os tratamentos com o inibidor (C75) da enzima ácido graxo sintase (FAS) ou inibidor (A922500) da enzima diacilglicerol aciltransferase 1 (DGAT1) foram capazes de reduzir a biogênese de CLs (3 CL/cél) e diminuíram também o percentual de células infectadas e a taxa de replicação do parasito, fazendo com que ela ocorresse de forma mais lenta. O mesmo fenômeno pôde ser visto quando as células foram cultivadas em soro fetal bovino delipidado. Além disso, os tratamentos se mostraram protetivos para as células hospedeiras durante a infecção, mantendo sua viabilidade (~80%). O tratamento com o inibidor da DGAT1 ainda reduziu a presença de MHC I na membrana. A suplementação com ácido oleico em células tratadas com o inibidor da DGAT1, recuperou a taxa de infecção e, de forma parcial, auxiliou na replicação do parasita frente à ausência dos CLs. Em conclusão, nossos dados sugerem que os CLs possuem funções tanto como fonte de nutrientes para o *T. gondii*, quanto na modulação da resposta imune da hDC.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**STUDY OF THE LIPID DROPLET ROLE DURING HUMAN DENDRITIC CELL
INFECTION BY *Toxoplasma gondii***

**ABSTRACT
MSc THESIS**

Karina da Silva Oliveira

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite, capable of infecting several types of nucleated cells, being compartmentalized in the parasitophorous vacuole. Once in the vacuole, the parasite can induce several changes in the host cell aimed at its survival, among them the induction of lipid droplets biogenesis (LD). LDs are organelles present in all cell types, involved in the most diverse functions such as lipid storage, regulation of lipid metabolism, membrane traffic, and control of synthesis and secretion of inflammatory mediators. However, the role of LD during human cells infection by *T. gondii* is unknown. In this work, we investigated the participation of lipid droplets during the infection of human dendritic cells (hDC) by *T. gondii*. Our data showed the peak of infection and replication in 24 hours (30%), followed by a subsequent fall in 48 hours (10%) in hDC infection kinetics. The infection promoted an increase of CD83 and MHC II in the membrane, besides the production of TNF- α , IL-6, IL-8, IP-10, and MIF. Analysis of the intracellular parasite viability showed that (hDC) were able to destroy intracellular parasites (60%). The infection led to the loss of host cell viability within 48 hours (50%) and inducing the greater biogenesis of CLs in these cells at the same time (30 CL/cell). The infection rate increase caused the earlier LD biogenesis and the host cells viability loss. Treatments with the fatty acid synthase (FAS) enzyme inhibitor (C75) or the diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) enzyme inhibitor (A922500) was able to reduce the LD biogenesis, also decreased the percentage of infected cells and the replication rate of the parasite, slowing it down. The same could be seen when the cells were cultured in delipidated fetal bovine serum. Also, the treatments proved to be protective to the host cells during the infection, maintaining their viability. The DGAT1 inhibitor treatment further reduced the presence of MHC I in the membrane. Supplementation with oleic acid in DGAT1 inhibitor treated cells recovered the infection rate and, in a partial way, aided in the replication of the parasite in the absence of the LDs. In conclusion, our data suggest that CLs have functions in both as a source of nutrients for *T. gondii* and in modulating hDC immune response.

1. INTRODUÇÃO

Descrito pela primeira vez em 1909 (Nicolle and Manceaux, 1909), o *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório. Protozoário do filo Apicomplexa, exibe uma alta organização polarizada de suas estruturas subcelulares. Em particular, o sistema secretor contém organelas únicas orientadas apicalmente: os micronemas e as rôptrias, bem como os grânulos densos citosólicos mais dispersos, que são essenciais para a virulência do parasito e a invasão da célula hospedeira (Baum et al., 2006; figura 1).

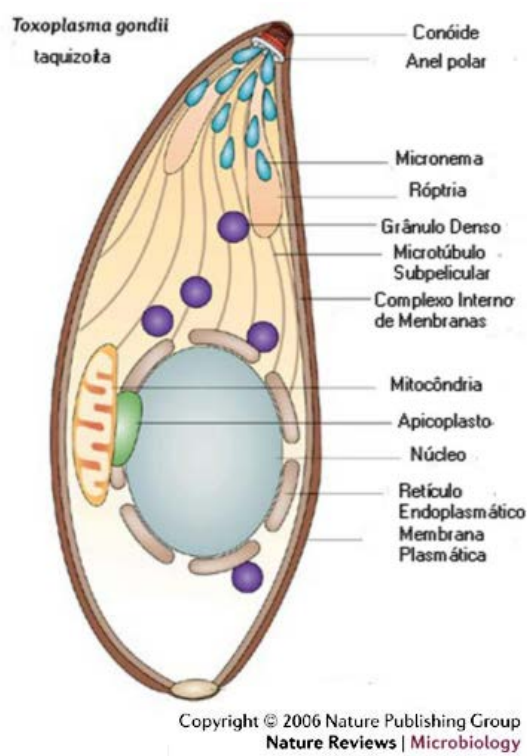


Figura 1. Estrutura da forma taquizoíta de *T. gondii*. Esquema apresentando, além das organelas características de células eucariotas, o complexo apical presente nos seres do filo Apicomplexa, além de outras estruturas característica, como o apicoplasto. (Adaptado de Baum et al. (2006).

O *T. gondii* pode infectar mais de 300 espécies de animais entre mamíferos e aves – domésticos ou silvestres. Os felídeos são os hospedeiros definitivos pois são os únicos onde ocorre a fase sexuada (coccídea) do seu ciclo biológico. Suas formas de vida são todas infectantes e incluem: taquizoítos, também chamados de forma proliferativa, forma livre ou trofozoíto; bradizoítos, alocados dentro dos cistos teciduais (principalmente no músculo esquelético e cardíaco e tecido nervoso, mas também no pulmão e fígado), e esporozoítos contidos em oocistos livres no ambiente, que

correspondem à forma de resistência, possuindo uma parede dupla bastante resistente às condições do meio ambiente (Rey, 2008). Membros da família Felidae, como os gatos, podem ser infectados diretamente pela ingestão de oocistos esporulados (liberados no ambiente) e por bradizoítos (ao se alimentarem de pequenos animais infectados, contendo cistos teciduais), denominadas de transmissão horizontal, ou ainda infectados por taquizoítos (durante a vida intrauterina pela via transplacentária), denominada de transmissão vertical.

Na fase sexuada, a replicação do parasita ocorre dentro das células intestinais do felídeo. Durante a fase sexuada do ciclo, alguns parasitas se diferenciam em microgametas flagelados e móveis (♂) ou em macrogametas imóveis (♀) e, ao se fundirem no processo de fecundação, dão origem ao zigoto. Deste processo, que ocorre somente nos hospedeiros definitivos, surgem os oocistos, contendo esporoblastos no interior. Durante uma infecção aguda, milhões de oocistos são liberados no ambiente através das fezes do animal, por um período de 7 a 21 dias. Ao fim do processo de esporulação, que ocorre em condições de umidade por 2 e 3 dias, os oocistos contendo esporozoítos se tornam infectivos, podendo ser ingeridos por aves e mamíferos (incluindo o homem) e, uma vez no ambiente intracelular, se diferenciar em taquizoíto (Figura 2) (Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

As diversas formas de transmissão do *T. gondii* e a grande gama de hospedeiros intermediários, fazem com que a toxoplasmose seja uma das zoonoses mais difundidas no mundo. O ser humano pode adquirir a infecção por três vias principais: pela ingestão de cistos encontrados em carne crua ou malcozida, que é considerada a causa mais comum; através da ingestão de oocistos presentes no solo, em alimentos ou água contaminada; e por transmissão vertical de forma congênita ou transplacentária. De forma menos comum também é possível ocorrer a transmissão por transplante de órgãos (Figura 2) (Wang et al., 2019). No que diz respeito a transmissão por ingestão, os parasitos emergem de oocistos ou cistos teciduais no estômago (Dubey et al., 1998). Os parasitas libertos então cruzam para o intestino delgado e acessam a lâmina própria, onde infectam e replicam dentro de uma ampla variedade de células, sendo mais abundantemente encontrados dentro de monócitos, macrófagos e células dendríticas. Essas células então são utilizadas pelo parasita para alcançar órgãos mais distantes como, cérebro, retina e tecido muscular (Figura 2B) (Lambert et al., 2006; Sanecka & Frickel, 2012; Gregg et al., 2013).

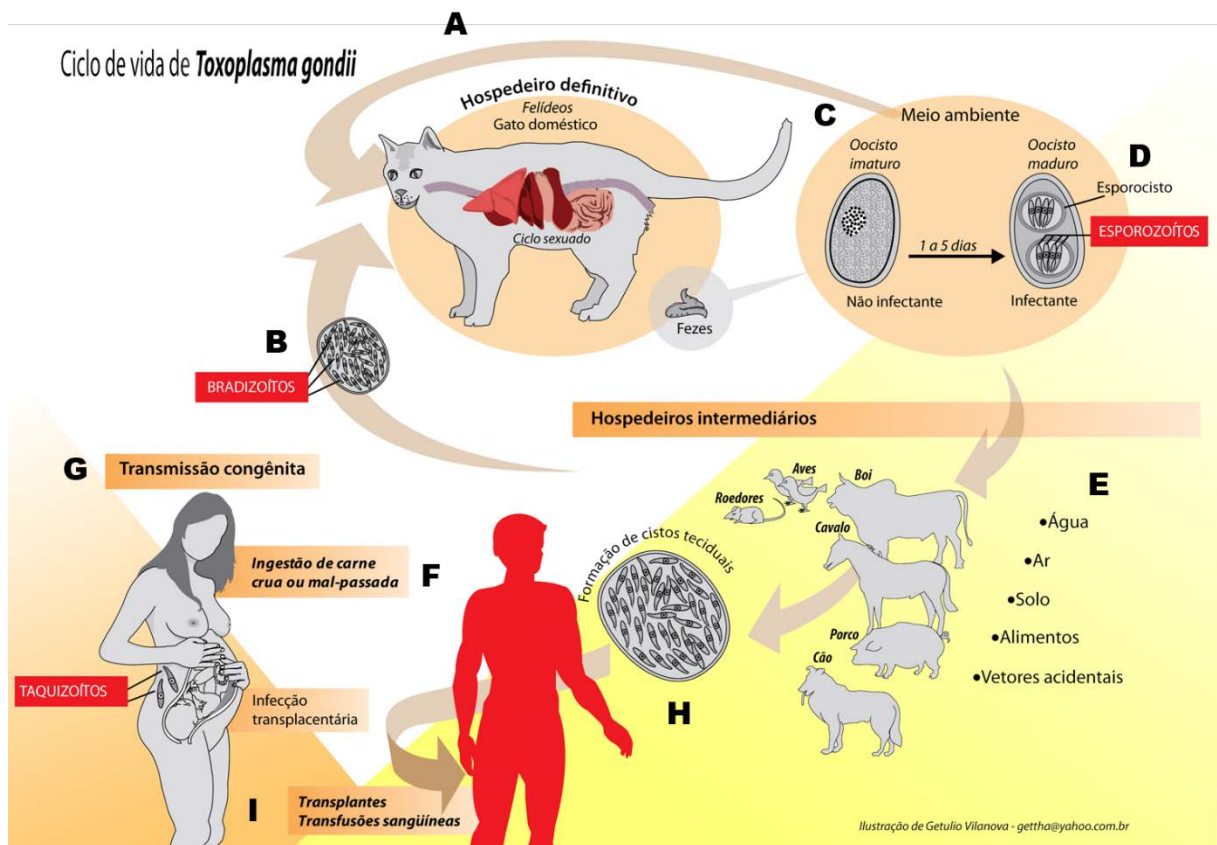


Figura 2. Ciclo de vida do *T. gondii*. Fase sexuada que ocorre no epitélio intestinal dos felídeos (A), que são infectados após a ingestão de cistos teciduais (B) a partir da qual são gerados os oocistos não-esporulados que são liberados no ambiente (C). Após processo de esporulação na fase ambiental do ciclo (D), hospedeiros intermediários e definitivos podem ser infectados. Os oocistos esporulados podem contaminar o solo, a água, os vegetais e as frutas (E), fornecendo uma rota de infecção para uma ampla gama de hospedeiros intermediários e felídeos. A infecção por *T. gondii* é iniciada em humanos pela ingestão de oocistos em alimentos ou água contaminados ou ingestão de cistos viáveis de tecidos em carne crua ou malcozida (F). Uma vez estabelecidos, esses parasitas podem promover a transmissão congênita durante a gravidez (G), e/ou formar cistos em diferentes órgãos, como: cérebro, retina e tecido muscular (H), possibilitando a transmissão por transplante de órgãos (I) (Adaptado de Moura et al., 2009).

A entrada do parasita na célula hospedeira ocorre de forma ativa. É um evento característico, que só é possível pelas das organelas do complexo apical que o *T. gondii* possui. Estas organelas contribuem para uma infinidade de funções que vão desde a ligação e invasão da célula hospedeira até o estabelecimento e manutenção do vacúolo parasitóforo (PV) à replicação e sobrevivência do parasita. Inicialmente, ocorre a adesão via região apical do parasito à membrana da célula hospedeira. As proteínas de micronemas proporcionam o contato firme do parasito com as células hospedeiras e são as primeiras a secretarem seu conteúdo, liberando uma série de adesinas cálcio-dependentes, as quais reconhecem receptores específicos na superfície celular promovendo a adesão. As roptrias participam do processo de invasão juntamente com a proteína de micronema AMA1, estabelecendo a junção móvel, uma estrutura adesiva transitória em forma de anel, que ajuda a propulsão do parasita na célula hospedeira (revisto em Venugopal & Marion, 2018). Enquanto as proteínas presentes no pescoço da roptria favorecem a invasão, aquelas presentes no bulbo da roptria e proteínas de grânulos densos desempenham um papel essencial na sobrevivência do parasita modulando respostas imunes e metabólicas do hospedeiro (Bougdour et al., 2014). A interação com os receptores presentes na superfície da célula hospedeira promove um movimento de invaginação da membrana plasmática ao redor do parasita, que é selada após a sua entrada, gerando um vacúolo denominado vacúolo parasitóforo (VP) (Saadatnia & Golkar, 2012; Dart et al., 2016). Esse processo permite a agregação de componentes da membrana plasmática do hospedeiro na membrana do recém-formado do VP (Drewry & Sibley, 2019). A membrana do VP é permeável de modo que, no interior desse vacúolo, o *T. gondii* é capaz de adquirir nutrientes da célula hospedeira e utilizá-los para sua própria sobrevivência. Após sua entrada, o parasita modifica o VP, secretando proteínas dentro do espaço vacuolar, gerando um compartimento metabolicamente ativo para favorecer o crescimento do parasito (Lige et al., 2013; Dou et al., 2014). A rápida replicação dos taquizoítas por multiplicação assexuada do tipo endodiogenia, promove a lise da célula hospedeira e disseminação dos novos parasitas para as células adjacentes.

A toxoplasmose é considerada uma das maiores infecções oportunistas existentes. Sua característica sintomatológica silenciosa, na maioria dos casos, contribui para que a toxoplasmose seja tida como uma doença negligenciada e para

que seus dados epidemiológicos atuais sejam subestimados. Estima-se que aproximadamente 25 a 30% da população humana mundial está infectada pelo *T. gondii* (Flegr et al., 2014). Na verdade, as prevalências variam amplamente entre os países (de 10 a 80%) e, muitas vezes, dentro de um determinado país ou entre diferentes comunidades na mesma região (Pappas et al., 2009). Baixas soroprevalências (10 a 30%) foram observadas na América do Norte, no sudeste da Ásia, no norte da Europa e nos países do Sahel na África. Prevalências moderadas (30 a 50%) foram encontradas em países da Europa Central e do Sul e altas prevalências foram encontradas na América Latina e em países tropicais africanos (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). Já no Brasil, considerado um dos países com maior soroprevalência, esta varia de 50% a 80% (Dubey et al., 2012).

Durante a forma aguda da doença, os taquizoítos são a forma evolutiva encontrada no hospedeiro, possuindo uma replicação bem rápida e infectando qualquer célula nucleada. Embora a maioria da população infectada seja assintomática, a infecção pode evoluir para latência com formação de cistos em alguns tecidos (como: cérebro, retina e músculos), que se diferenciam da forma taquizoítas para bradizoítas, caracterizando a toxoplasmose crônica (Dubey et al., 1970). No entanto, em pacientes imunocomprometidos, a infecção pode evoluir para sua forma grave resultando no desenvolvimento da toxoplasmose ocular ou cerebral (Garcia et al., 2015). Em mulheres grávidas, o parasita pode atravessar a placenta, infectar o feto e causar retinocoroidite, hidrocefalia, retardo mental, convulsões ou até mesmo a morte do feto. O risco de infecção congênita e a gravidade dos sintomas dependem da idade gestacional no qual a gestante adquire a infecção; quanto mais cedo a infecção ocorre durante a gravidez, maior a gravidade dos sintomas (Saadatnia & Golkar, 2012).

A maioria dos tratamentos eficazes e disponíveis contra *T. gondii* incluem antibióticos tipo Sulfonamida, como a Sulfadiazina e o Sulfametoxazol, combinados com Pirimetamina ou Trimetoprima. Além de não ser efetivo contra os bradizoítos, a forma infectante normalmente encontrada em indivíduos imuno competentes, trata-se de um tratamento com alto grau de toxicidade. A pirimetamina e a sulfadiazina, respectivamente, inibem as enzimas dihidrofolato redutase (DHFR) e di-hidropteroato sintase (DHPS), proporcionando um bloqueio sinérgico da via de biossíntese do folato, composto crucial para a sobrevivência, bem como a replicação do parasita. A inibição da síntese do folato pode levar depressão gradual da medula óssea, devendo ser feita

uma suplementação com ácido fólico durante o tratamento (Mitsuka-Bregano & Lopes-Mori, 2010). Além disso, sabe-se que Pirimetamina é uma substância teratogênica e que as Sulfonamidas são importantes antagonista de mTOR, uma serina/treonina - proteína-quinase, que regula crescimento, proliferação, motilidade e sobrevivência celular, além da síntese proteica e a transcrição (Khanfar et al., 2013; Mitsuka-bregano and Lopes-mori, 2010). A falha terapêutica no tratamento da toxoplasmose foi relatada tanto em casos de indivíduos imunocomprometidos, quanto em casos de transmissão congênita. Estas falhas acabam selecionando parasitas resistentes aos medicamentos e podem estar associados a fatores como: má absorção, ou intolerância da droga; e/ou fatores parasitários tais como variabilidade na suscetibilidade a drogas entre cepas geneticamente diferentes do parasita (Meneceur et al., 2008; Silva et al., 2019).

Mesmo sendo uma infecção bastante estudada, até o presente momento não foi desenvolvida uma vacina que previna a toxoplasmose. As vacinas em desenvolvimento até o momento, ainda se encontram da fase pré-clínica de testes, em modelos animais. Atualmente, existem vacinas baseadas em parasitas mortos e atenuados, antígenos lisados, proteínas secretadas durante o processo de infecção e DNA. Entre os antígenos testados, os estudos se concentraram nos antígenos de superfície do *T.gondii*, antígenos de proteínas da róptria, de micronemas, de grânulos densos e outros antígenos secretados por taquizoítas e bradizoítas (Wang et al., 2019). Muito embora hajam epitopos do *T. gondii* descritos, os resultados obtidos não são promissores (Assolini et al., 2017).

O *T. gondii* é um parasito altamente adaptado, sendo capaz de infectar com sucesso qualquer célula nucleada de modo que não é possível dizer que exista um tropismo, mas sim, uma preferência do parasito por alguns tipos celulares, como: células do sistema nervoso central, células da retina e miócitos (Sanecka & Fricke, 2012). A lâmina própria e as placas de Peyer são ricas em células dendríticas (DCs) e macrófagos. Uma vez que *T. gondii* atravessa a barreira intestinal, estas são as primeiras células imunes a reconhecer a infecção do parasita e iniciar a montagem da resposta imune do hospedeiro. Esse reconhecimento pode ocorrer através de pelo menos três rotas distintas: 1) as DCs e os macrófagos fagocitam diretamente parasitas opsonizados ao atravessarem a barreira epitelial; 2) ambas as células também fagocitam células intestinais apoptóticas infectadas; 3) ou as DCs, capazes de se alongar através das junções estreitas do epitélio, reconhecem o perfil de

antígeno de *T. gondii* solúvel no lúmen (revisto em Delgado Betancourt et al., 2019). No sangue, a frequência de infecção é maior em DCs, infectando-as rapidamente e despertando nelas um fenótipo hipermigratório, sugestivo de seu uso pelo parasita como cavalo de Troia para que possa chegar a tecidos distantes (Sanecka & Fricke, 2012; Weidner & Barragan, 2014).

As DCs atuam como reguladores das respostas imunológicas e são consideradas as células apresentadoras de antígeno mais eficientes, com a capacidade de ativar ou tolerizar células T *naïve* (revisto em Lewis & Reizis, 2012). DCs imaturas apresentam uma alta capacidade endocítica, o que as faz eficientes na captura do antígeno. O contato com produtos microbianos ou citocinas inflamatórias, promove nas DCs um processo denominado maturação, que as capacita para o processamento e apresentação dos antígenos para as células T *naïve* (Vargas et al., 2015).

No estado imaturo, as DCs são capazes de fagocitar e reconhecer padrões moleculares associados a patógenos através de receptores de reconhecimento de padrões, como os receptores do tipo Toll (TLRs). O reconhecimento desses padrões leva à maturação das DCs, um fenômeno muito importante para a resposta do hospedeiro, que ocorre paralelamente ao reconhecimento dos antígenos proteicos pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), que então migram para a superfície celular. Juntamente a esse processo ocorre a liberação das citocinas ativadoras IL-1 β e TNF α pelas células vizinhas. A maturação está correlacionada com a regulação positiva da expressão de moléculas MHC classe I e II na superfície celular e de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86 e CD83). Somados, esses sinais vão provocar mudanças funcionais e fenotípicas, gerando células com capacidade de ativar células T *naïve* (revisto em Al-Ashmawy, 2018).

A maturação das DCs leva a uma alteração do padrão de expressão dos receptores de quimiocinas, o que permite que as DCs migrem até os linfonodos. Durante esse processo, se observa a diminuição de receptores “homing”, como CCR2, enquanto aumenta a expressão de CCR7, tornando a célula mais responsiva às citocinas CCL19 e CCL21, que são co-expressas nos órgãos linfóides. Com isso, DCs CCR7+ são atraídas para os linfonodos, onde entrarão em contato com as células T *naïve* (Worbs et al., 2017).

Na infecção por *T. gondii* já foram descritos antígenos proteicos apresentados pelas moléculas MHC I, de modo que a ativação de linfócitos T CD8+ é descrita por

vários grupos como fundamental para a resposta imune protetora (Taylor et al., 2007; Zhao et al., 2009). Sendo um parasita intracelular obrigatório, os mecanismos pelos quais esses antígenos são processados e apresentados via MHC I ainda são desconhecidos pois, classicamente, antígenos complexos e armazenados em vesículas ou vacúolos (como o *T. gondii*), são associados às moléculas de MHC II e apresentados aos linfócitos TCD4+. A associação inesperada desses antígenos a moléculas de MHC I é chamada de Apresentação Cruzada e suas vias ainda são pouco conhecidas (Goldszmid et al., 2009). Existem trabalhos que sugerem a via vacuolar, com participação de lisossomos e fagossomos, enquanto outros sugerem a via citosólica, com transporte do antígeno para o citoplasma na indução da apresentação de antígenos (Bougnères et al., 2009; Haldar et al., 2013).

As interações entre microrganismos intracelulares e fagócitos do hospedeiro podem determinar a patogênese ou a resposta imunológica protetora. É consenso que a resposta imune celular específica é vital para controlar a infecção pelo *T. gondii*, contendo a proliferação dos parasitas, que passam a formar os cistos teciduais característicos da infecção crônica (Denkers & Butcher, 2005). Durante a infecção, as primeiras células hospedeiras a responder são as DCs. Conforme ilustrado na figura 3, a interação de proteínas do parasito, como a profilina, com os receptores TLR11 e também TLR12, de DCs murinas, estimulam estas células a produzir interleucina 12 (IL-12) (Tosh et al., 2016). Embora em humanos o TLR12 esteja totalmente ausente e o TLR11 seja aparentemente um pseudogene não funcional, monócitos humanos produzem citocinas pró-inflamatórias em resposta à infecção por *T. gondii* (Sasai et al., 2018), sugerindo que outros TLRs em humanos reconhecem diferentes compartimentos de *T. gondii* para produzir IL-12, ou que exista outro receptor não identificado que reconhece a infecção por *T. gondii* em humanos, independente de TLRs. Células dendríticas foram caracterizadas como o principal tipo celular produtor de IL-12, o que magnifica a importância desse tipo celular na resposta imune protetora contra o *T. gondii* (Tosh et al., 2016).

Em adição ao estímulo de IL-12, macrófagos aumentam a expressão do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) em resposta à detecção de proteínas de ancoragem do parasita, as glicosilfosfatidilinositol (GPI), reconhecidas através dos receptores *Toll-like* 2 e 4. Em conjunto, IL-12 e TNF- α promoverão a ativação das células *Natural Killer* (NK) e de células T, tornando-as células efetoras. Estas, por sua vez, passarão a produzir interferon gama (IFN- γ), responsável por ativar células que

controlam a infecção. A ligação de IFN- γ ao seu receptor, promoverá a ativação do transdutor de sinal e o ativador da transcrição (STAT) 1, culminando em grande produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), por monócitos e macrófagos, que irá colaborar para a morte dos parasitos, além da regulação positiva de duas famílias de proteínas de defesa, as IRGs (*immunity-related GTPases*) e as GBPs (*guanylate-binding proteins*). Ambas as famílias fazem parte do grupo de proteínas do tipo GTPases que são recrutadas, aderem especificamente ao vacúolo parasitóforo e estão envolvidas na eliminação do parasita (Hunter & Sibley, 2012; Yamamoto et al., 2012).

As proteínas IRGs são subdivididas em GKS e GMS. As GKS são proteínas capazes de se ligar a endomembranas da célula, levando a sua ruptura e destruição pela via autofágica. Conforme demonstrado na figura 4, em células ativadas por IFN- γ , as proteínas GKS efectoras são citosólicas e permanecem no estado inativo, reguladas pela presença das GMS. As proteínas GMS, por sua vez, estão fortemente associadas à endomembrana das organelas celulares e restritas a organelas específicas. Em camundongos existem 3 Irgm, que são proteínas da família GMS: a Irgm1 localiza-se principalmente na membrana do complexo de Golgi, no compartimento endolissossômico, nas mitocôndrias, nos peroxissomos e nos Corpúsculos Lipídicos (CLs); Irgm2 localiza-se com o Complexo Golgi e Irgm3 ao Retículo Endoplasmático (RE) e CLs. Desta forma, a ligação das GMS às endomembranas das organelas do hospedeiro previne o acúmulo de proteínas GKS ativadas, permitindo diferenciar entre membranas de organelas do hospedeiro das dos vacúolos de patógenos (revisto em Vallochi et al., 2018).

Vários membros da subfamília GKS podem reconhecer moléculas lipídicas hospedeiras específicas presentes na membrana dos vacúolos parasitóforos (MVPs), rotulando-as para ruptura ou fusão com lisossomos, a fim de inibir o crescimento de patógenos intracelulares. Desta forma, quando as proteínas GMS estão ausentes nas endomembranas, as proteínas GKS ativam-se espontaneamente e formam estruturas semelhantes a agregados, preferencialmente nas MVPs, resultando no rompimento do vacúolo e a liberação do patógeno no citosol, resultando em necroptose ou autofagia (Haldar et al., 2013). Enquanto isso, as proteínas GBPs são capazes de recrutar complexos de proteínas antimicrobianas, a maquinaria de autofagia e inflamossomas (Hunter & Sibley, 2012). A destruição do parasita pela via autofágica

tem sido implicada na indução da apresentação cruzada de antígenos vacuolares, derivados de vacúolos lisados, via MHC de classe I em DCs (Haldar et al., 2015).

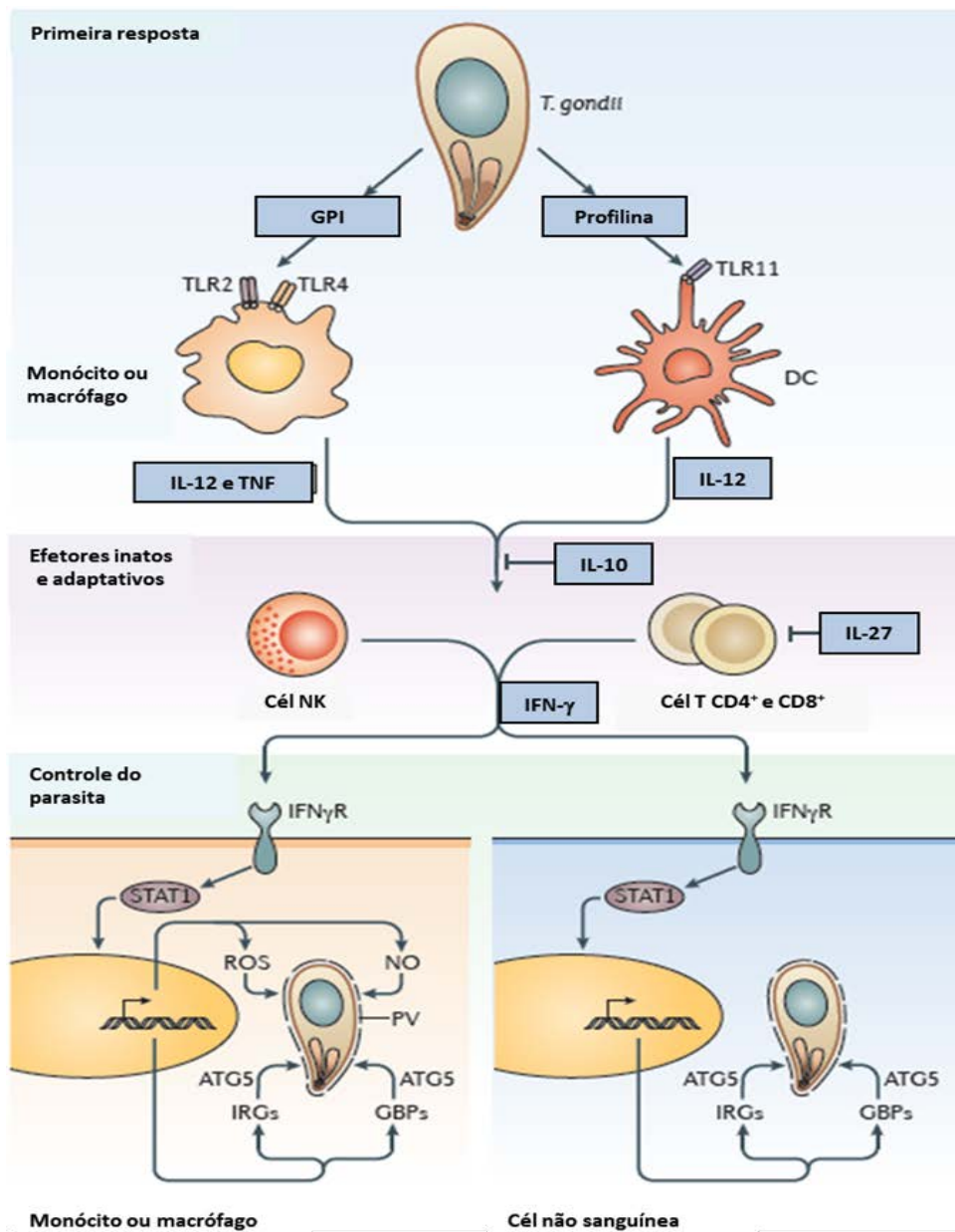


Figura 3. Resposta imune contra infecção pelo *T. gondii*. Resposta inicial pelas células do sistema imune, envolve diferentes antígenos como a âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI), ativando monócitos e macrófagos pelos receptores *Toll-like* 2 (TLR2) e 4 (TLR4), ou a Profilina ativando Células Dendríticas (DC) pela interação com o receptor *Toll-like* 11 (TLR11). Dessa interação resulta a produção das citocinas interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que iniciarão a resposta efetora do sistema imune intato e adaptativo. Nesta fase da resposta as células principais são as *Natural Killer* (cél NK) e os Linfócitos T (cél T) CD4+ e CD8+, que produzem o interferon gama (IFN- γ), fundamental para o controle e destruição do parasito. O Transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT1), induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), de óxido nítrico (NO), apenas por monócitos e macrófagos, e a expressão das proteínas IRGs e GBPs que, juntamente com as Proteínas de Autofagia 5 (ATG5) promovem a destruição do vacúolo parasitóforo (PV). (adaptado de Hunter & Sibley, 2012).

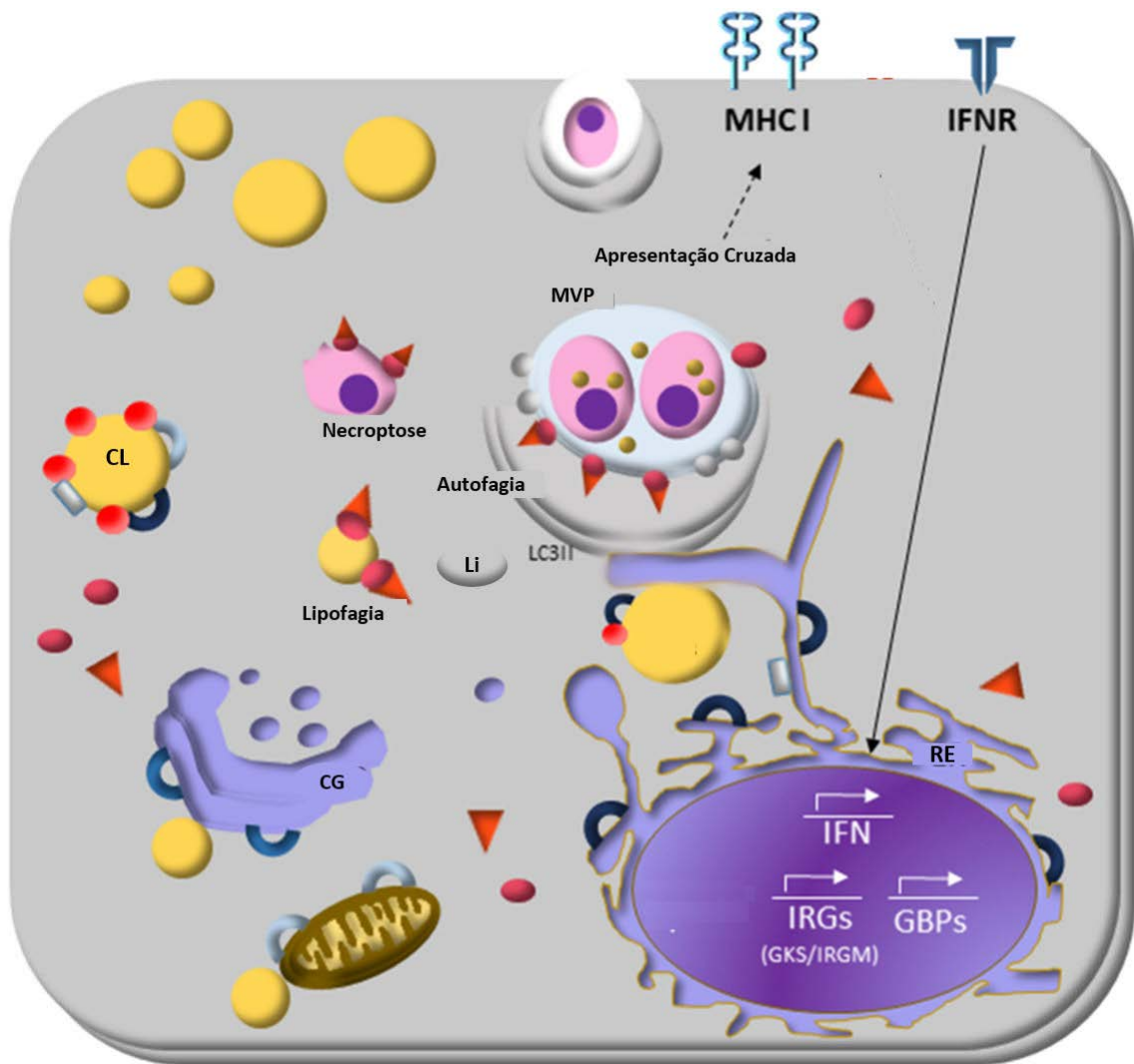


Figura 4. Destruição do *T. gondii* pelo sistema imune. A sinalização do receptor interferon (IFN) - γ induz a expressão de moléculas da família GTPases - GTPases relacionadas à imunidade (GKS e IRGM) e as GPBs - que desempenham papéis essenciais no tráfico vesicular de membrana, autofagia e respostas antimicrobiana. O IRGM é uma proteína presente em endomembranas de organelas da célula hospedeira como Complexo de Golgi (CG), Reticulo Endoplasmático (RE) e Corpúsculos Lipídicos (CL), protegendo-as da destruição via GKS e proteínas de ligação a guanilato (GBP), pela maquinaria de autofagia e fusão com lisossomos (Li). As proteínas inativas GKS e GBP presentes no citoplasma se ligam de maneira estável às membranas deficientes de IRGM, como a membrana do vacúolo parasitário e eventualmente os CLs, para direcioná-los à autofagia, ou lipofagia, respectivamente. Os CLs fornecem ácidos graxos para a formação da membrana do autofagossomo. Os antígenos dos parasitas processados via autofagia eventualmente são apresentados via moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe I (MHC I) (adaptado de Vallochi et al., 2018).

Ao longo dos anos a evolução do *T. gondii* com seus hospedeiros permitiu o desenvolvimento de estratégias para evadir com sucesso o sistema imunológico e estabelecer uma infecção ao longo da vida em hospedeiros infectados. Por exemplo, durante a infecção o *T. gondii* é capaz de decorar o PV com proteínas GMS, como Irgm1 e 3, evitando dessa forma a destruição pela maquinaria de autofagia, via proteínas GKS e GBP (Haldar et al., 2013). A resposta imune contra o *T.gondii* ocorre através da ação do fator de transcrição STAT 1, transdutor de sinal do IFN γ (figura 3) (revisto por Hunter & Sibley, 2012) . Durante a infecção de macrófagos murinos o *T. gondii* foi capaz de inibir as vias de sinalização relacionadas à imunidade, através do bloqueio de STAT 1 (revisto em Lima & Lodoen, 2019).

Além disso, o *T. gondii* é capaz de modificar importantes vias de sinalização durante a infecção de células imunes, como promover a ativação do transdutor de sinal e o ativador da transcrição 3 e 6 (STAT3 e STAT6) em células humanas e murinas, que são fosforiladas pela ROP16, diminuindo assim a produção IL-12 (Saeij et al., 2007). A apoptose também é um meio importante de eliminar os patógenos intracelulares e o *T. gondii* se mostrou capaz de deter tanto as vias de apoptose celular intrínsecas (mitocondriais) como extrínsecas (mediadas pelo receptor de morte) nas células hospedeiras (revisto em Lima & Lodoen, 2019). Isso pode ajudar o parasita a preservar seu nicho intracelular, replicar e evitar a depuração pela imunidade humoral.

Mesmo sem um entendimento completo a respeito dos mecanismos de sobrevivência do *T. gondii*, sabe-se que são várias as alterações que o parasito promove nas células hospedeiras e que a maioria ocorre com a finalidade de promover a proteção do parasito, aumentando sua sobrevivência no ambiente intracelular e possibilitando sua nutrição e replicação. Durante o processo de infecção ativa, ocorre a formação do VP não-fusogênico ao redor do *T. gondii*. De dentro do VP, o parasita é capaz de interagir com muitas estruturas do hospedeiro, como CLs, microtúbulos, endossomos, RE, mitocôndrias e vesículas de Golgi, que se mostram intimamente associadas ao vacúolo para a aquisição de nutrientes (Gomes et al., 2014; Dou et al., 2014; Nolan et al., 2017; Nolan et al., 2018). Logo após o processo de entrada, o parasita começa a secretar proteínas dentro do PV, como as proteínas do granulo denso GRA2, GRA4 e GRA6, que ajudam a formar uma rede de estruturas semelhantes a microtúbulos chamada de rede intravacuolar. Está rede ajuda o parasito a recrutar organelas para próximo do VP, a fim de adquirir nutrientes a partir

do hospedeiro (Magno et al., 2005). Por exemplo, através da rede intravacuolar o parasita é capaz de recrutar vesículas do sistema endolisossomal da célula hospedeira, utilizando de proteases aí presentes para ingerir e digerir proteínas citosólicas (Dou et al., 2014).

O *T. gondii* adquire os lipídios necessários para sua manutenção e replicação através de complexos mecanismos, sendo capaz de internalizar colesterol do plasma e esterificá-lo para armazenamento através das duas enzimas acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT) que possui. Tanto as lipoproteína de baixa densidade (LDL), quanto o colesterol sintetizado pelo hospedeiro são co-transportados para o VP do parasita, mas a via biossintética do esterol, ou linhas celulares defeituosas do LDL, não impedem o crescimento do parasita, sugerindo formas compensatórias de fornecer colesterol ao parasita (Nishikawa et al., 2005; Lige et al., 2013). Além disso, o parasita também é capaz de interceptar vesículas positivas para Rab 14, Rab 30 e Rab 43 derivadas do Complexo de Golgi, retirando o conteúdo de esfingolipídios (Romano et al., 2013). Recentemente foi mostrado um aumento da biogênese de CLs induzido pela infecção do *T. gondii*, em diferentes tipos celulares, e a associação dessas organelas com o VP (Gomes et al., 2014; Mota et al., 2014; Nolan et al., 2017, 2018). Essa indução também foi observada em DCs humanas infectadas pelo *T. gondii* (Vallochi, dados não publicados).

Os CLs são organelas presentes em virtualmente todos os tipos celulares. Possuem uma hemi-membrana (monocamada) composta por fosfolipídios, colesterol, sendo locais onde as células armazenam lipídios neutros, como triglicerídeos (TAG) e ésteres de colesterol (EC), que podem então ser usados em tempos de necessidade para gerar energia, suprir componentes de membrana e sinalização por mediadores lipídicos (Welte, 2015).

Não se sabe ao certo como ocorre a biogênese de CLs. A principal hipótese sugere que a organela é derivada do RE e diferentes modelos dessa biogênese são propostos. O mais amplamente aceito, apresentado na figura 5, baseia-se na formação de um núcleo hidrofóbico entre os folhetos do RE, onde ocorre o acúmulo de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico e são sintetizados os lipídios neutros. Neste local, ocorre o brotamento da membrana do RE, dando origem a uma organela independente contendo lipídios e proteínas; algumas delas características destas organelas, como as proteínas da família PAT (perilipina, ADRP e TIP47) (Martin & Parton, 2006; Bozza et al., 2009).

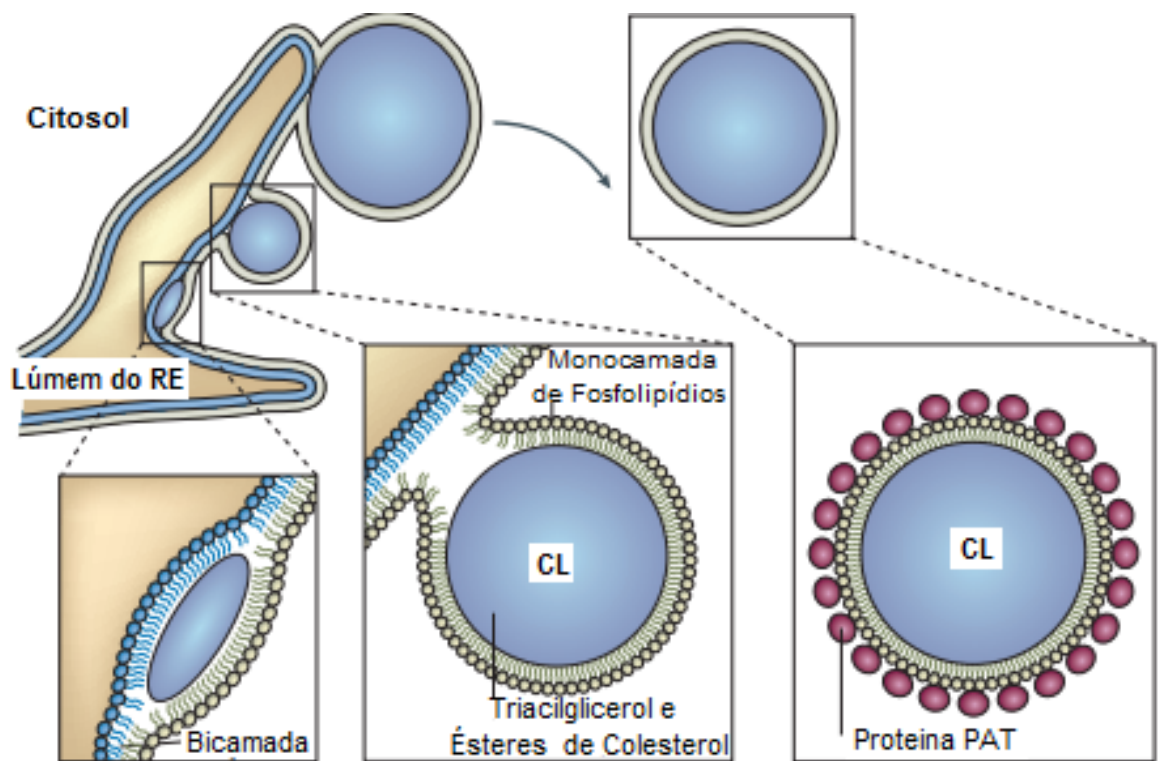


Figura 5. A biogênese dos corpúsculos lipídicos. No modelo atual, os lipídios neutros são sintetizados entre os folhetos da membrana do retículo endoplasmático (RE). A partir de um brotamento de membrana forma-se uma organela independente, o Corpúsculo Lipídico (CL) que é delimitada por uma monocamada de fosfolipídios e proteínas. Algumas das proteínas associadas ao CL caracterizam essa organela, são membros da família de proteínas PAT (perilipina, ADRP e proteína TIP47). (Adaptado de Martin & Parton, 2006)

As enzimas diacilglicerol aciltransferase 1 e 2 (DGAT2) e ACAT são responsáveis pela síntese dos principais lipídios que compõe os CLs (TAG e EC). A DGAT está presente exclusivamente no folheto externo da membrana do RE, podendo compor a superfície da membrana dos CLs durante sua formação, promovendo a síntese de TAGs e o crescimento dos CLs. Estas organelas também compartimentalizam as enzimas responsáveis pela lipólise, a lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL), bem como as perilipinas, que modulam tanto as atividades de lipase sensível a hormônio quanto as ATGL (Greenberg et al., 2011; Meyers et al., 2017).

Além do acúmulo de lipídios, os CLs compartimentalizam várias proteínas, relacionando-os às funções de sinalização e ativação celulares, regulação do metabolismo de lipídios, tráfego de membranas e controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios (D'Avila et al., 2008), também estando envolvidos na resposta imunológica, agindo tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (Bougnères et al., 2009).

Além do armazenamento de lipídios, uma das funções mais bem conhecidas dos CLs em leucócitos e outras células da resposta imune é a sua capacidade de atuar como plataformas para a síntese de eicosanóides (Bozza et al., 2011). Eicosanóides são lipídios não-armazenáveis derivados da oxigenação enzimática do ácido araquidônico (AA) através das vias da ciclooxigenase (COX) e da lipoxigenase (LO). São lipídios sinalizadores que desempenham papéis importantes tanto nas condições fisiológicas como patológicas, como homeostase tecidual, defesa do hospedeiro e inflamação (revisto em Vallochi et al., 2018; Pereira-Dutra et al., 2019).

Nos leucócitos, os CLs são um dos principais locais de armazenamento do AA, esterificados em fosfolipídios e nos triglicerídeos, de onde podem ser mobilizados por fosfolipases, como a fosfolipase A2 (PLA₂), ou pela ATGL, respectivamente. Somado a isso, os CLs compartimentam todo o aparato enzimático necessário para a síntese de eicosanóides, como ATGL, PLA₂, PGE₂ sintase e LTC₄ sintase. É possível verificar ainda uma correlação entre a biogênese de corpúsculos lipídicos e a geração de eicosanóides derivados de COX e LO durante condições inflamatórias, como prostaglandina E₂ (PGE₂) e D₂ (PGD₂), leucotrieno B₄ (LTB₄) e C₄ (LTC₄) (revisto por Vallochi et al., 2018).

Além da imunidade inata, os CLs tem sido implicados na imunidade adaptativa. A primeira observação de CLs em células dendríticas foi relatada na primeira descrição morfológica das células (Steinman & Cohn, 1973). Recentemente, um aumento no número de CLs em células dendríticas tem sido descrito durante a infecção por *Leishmania amazonensis*, *Nocardia brasiliensis*, no câncer e também após a estimulação por ligantes de TLR, IFN- γ ou adjuvantes baseados em saponina (Pereira-Dutra et al., 2019). Sabe-se que as GMS Irgm3 se encontram co-localizadas com o CLs, interagindo com a proteínas ADRP e sendo fundamental para evitar sua destruição por lipofagia. A inibição genética ou farmacológica da biogênese dos CL, ou na ausência de Irgm3, leva a um defeito na via de apresentação cruzada de

antígenos em modelo murino, utilizando beads revestidas por ovalbumina (Bougnères et al., 2010).

O aumento na biogênese de CLs em leucócitos e outras células não imunes, como fibroblastos e miócitos, é observado em doenças infecciosas causadas por parasitas, bactérias, vírus, fungos e protozoários. O acúmulo de CL no citoplasma de diferentes tipos de células hospedeiras foi relatado após a infecção por *Plasmodium berguei*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Leishmania* sp. e suas contribuições na patogênese da doença começam a ser reveladas (revisto em Pereira-Dutra et al. 2019). Os CLs dos hospedeiros são principal fonte de lipídios para muitos parasitas intracelulares. Além de atrair os CLs para próximo do PV o *Toxoplasma* também é capaz de internalizá-los no lúmen da VP e, através de mecanismos ainda não conhecidos, adquire lipídios, principalmente colesterol, importantes para sua replicação e manutenção (Gomes et al., 2014). As duas enzimas ACAT que o parasita possui, são capazes de esterificar o colesterol e orquestrar a formação de CLs nos parasitas (Nolan et al., 2017, 2018).

Não se sabe exatamente por quais vias o *T. gondii* é capaz de induzir a biogênese de CLs. Sabe-se que a infecção promove a expressão de alguns genes de síntese de triglicerídeos e transportadores de lipídios, além de inibir a expressão de genes lipolíticos, principalmente o ATGL, favorecendo o acúmulo de CLs na célula hospedeira (Nolan et al., 2018). O propósito da indução de CLs em leucócitos infectados ainda não é bem compreendido. Assim como descrito em outros tipos celulares, especula-se sua função como fonte de nutrientes e colesterol, uma vez que o *T. gondii* altera o metabolismo da célula durante a invasão e utiliza nutrientes derivados do hospedeiro para manutenção do seu metabolismo (Gomes et al., 2014; Nolan et al., 2017, 2018). Por outro lado, uma vez que o papel e importância dos CLs na imunidade contra patógeno vem sendo evidenciado com o passar dos anos, sua indução em leucócitos pode estar envolvida com a proteção da célula hospedeira, através de sua participação tanto em processos da imunidade inata quando da adaptativa.

Baseado nisso, a nossa hipótese é de que os corpúsculos lipídicos participam da manutenção da infecção de células dendríticas pelo *Toxoplasma gondii*, como fonte de lipídios para o parasita, sendo importantes para sua sobrevivência, ao mesmo tempo em que auxiliam na resposta imune pela produção de mediadores importantes para a ativação celular.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar o papel dos corpúsculos lipídicos durante a infecção de Células Dendríticas humanas pelo *Toxoplasma gondii*.

Objetivos específicos

- 1 Avaliar a viabilidade do parasito intracelular e da célula hospedeira durante a cinética de infecção de células dendríticas pelo *Toxoplasma gondii*.
- 2 Investigar a formação de corpúsculos lipídicos (CL) induzida pela infecção de *T. gondii* em DC.
- 3 Avaliar o impacto da inibição da biogênese de CLs na sobrevivência do parasito e na viabilidade das células hospedeiras.
- 4 Avaliar o impacto da inibição da biogênese de CLs na imunidade ao *T. gondii* caracterizando o fenótipo de células dendríticas humanas após infecção.

3. METODOLOGIA

3.1. Parasitos

3.1.1. Manutenção dos parasitos

Taquizoítas da cepa RH de *Toxoplasma gondii* foram mantidos por passagens sucessivas em camundongos susceptíveis *Swiss Webster* infectados com inóculos em diferentes concentrações (10^6 , $2,5 \times 10^6$, 5×10^6). Após 2 a 3 dias de infecção, o peritônio dos animais foi lavado com 5 mL de PBS 1x estéril. O lavado foi passado em filtro de 5 μ m (Millipore) para exclusão de células contaminantes e depois centrifugado para lavagem a 3.000g, por 10 min, 10 °C. O protocolo de manutenção e interação dos parasitas foi autorizado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da IOC sob a licença CEUA L-13/16.

3.1.2. Teste de viabilidade de taquizoítos de *T. gondii*

A fim de avaliar a viabilidade dos parasitos pós-infecção, eles foram previamente marcados com dois fluoróforos: o PKH-26 [3 μ M] (Sigma-Aldrich – Cat. MINI26) e o *Cell Tracer Far Red* [1 μ M] (CTFarRed) (Thermo Fisher Scientific – Cat. C34553). O CTFarRed foi diluído em 200 μ L de DMSO obtendo-se uma solução estoque com concentração de 5mM. Os parasitas recuperados de lavado peritoneal foram lavados uma vez com PBS antes da incubação em CTFarRed [1 μ M], durante 20 minutos a 37 °C. Após centrifugação a 4.000g, 10 min, a 15°C, os parasitas foram ressuspendidos em 1mL de SFB, seguido de incubação por 10 min, a 37°C, a fim de retirar o corante extracelular. Antes da marcação com PKH-26, os parasitas foram lavados duas vezes com PBS estéril. Para a marcação com PKH-26 os parasitas foram incubados durante 5 minutos com PKH-26 diluído em Diluente C ([3 μ M] reagente que acompanha o kit). A reação foi interrompida pela adição de 500 μ L de Soro Fetal Bovino. Após a marcação os parasitas foram lavados extensivamente em PBS, contados e ressuspendido em meio RPMI completo para infecção.

3.2. Soluções tamponadas para análise de diferenças na sensibilidade ao pH de CTFarRed e PKH-26

As soluções tamponadas em diferentes pHs foram feitas utilizando Tampão Citrato (para pH 3,0 a 6,2) e Tampão Fosfato (para pH 5,8 a 8,0) conforme

previamente descrito por McIlvaine (1921). Para obter as diferentes soluções de Tampão Citrato foram adicionadas diferentes proporções das soluções de Ácido Cítrico 0,1M (Sigma-Aldrich) e de Citrato de Sódio 0,1M (Sigma-Aldrich). Para obter as diferentes soluções de Tampão Fosfato foram utilizadas diferentes proporções das soluções de Fosfato de Sódio Monobásico 0,1M (Sigma-Aldrich) e de Fosfato de Sódio Dibásico 0,1M (Sigma-Aldrich).

3.3. Obtenção de células dendríticas humanas (hDC)

O concentrado de leucócitos (*buffy coat*) foi obtido através de bolsas doadas por voluntários sadios ao Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clemente Fraga Filho (HUCFF/UFRJ). Após processamento para retirada do concentrado de hemácias e do plasma rico em plaquetas, restaram aproximadamente 50mL de *Buffy coat*. Nosso protocolo de manipulação é autorizado pelo Comitê de Ética da Fiocruz, CEP 539/2009.

Células mononucleares (PBMC- *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), foram isoladas do *Buffy Coat*, através de gradiente de densidade em Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). Cada 5 mL de *Buffy Coat* foram diluídos em 25 mL de RPMI-1640 (Invitrogen). Os gradientes foram montados em tubos estéreis de polipropileno, contendo 15 mL de Ficoll, sobreposto de 30mL do *Buffy Coat* diluído em meio RPMI puro. Os gradientes foram centrifugados 900g, durante 20 min, a 25°C e os anéis de células mononucleares, formados na interface do gradiente, foram recolhidos e lavados 2 vezes com 40 mL de RPMI puro (400g/10min/10°C). Foi realizada a contagem do número de células no precipitado em câmara de Neubauer, com exclusão de células mortas por Azul de Tripán. As células foram plaqueadas em frascos de cultura de 150cm² (CORNING), na concentração de 5 x 10⁶ monócitos por mL, com volume final de 30mL de RPMI puro, por frasco de cultura. As células então foram mantidas na estufa, a 37°C com 5% de CO₂, durante duas horas, para enriquecimento da população de monócitos por adesão. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi recolhido e os frascos foram lavados vigorosamente três vezes, com DPBS estéril (Invitrogen), para remoção das células não aderentes. Após as lavagens foram adicionados 25mL de meio RPMI completo - suplementado com 10% de SFB (Gibco), penicilina [1.000ug/mL] e estreptomicina [1.000U/mL], L-Glutamina (Gibco; 2mM), piruvato de sódio (Gibco, 0,1mM), aminoácidos não essenciais

(HyClone, 0,1mM), 2-mercaptoetanol (Gibco, 2,5mM) e Vitaminas (Gibco, 0,1mM). As células foram mantidas a 37°C, 5% CO₂, durante 7 dias.

A fim de promover a derivação de células dendríticas humanas, monócitos enriquecidos a partir de sangue periférico foram cultivados em meio contendo interleucina-4 (IL-4) e o fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF – *granulocyte macrophage – colony factor*). Foram adicionados aos monócitos em cultura 50ng/mL das proteínas recombinantes IL-4 e GM-CSF humano (Peprotech), que foram repostos a cada 2-3 dias.

Após 7 dias de derivação as células foram recolhidas, centrifugadas 400g, 10 min, 10°C, ressuspensas em RPMI e contadas em câmara de Neubauer, com exclusão de células inviáveis por azul de Tripán. Foram plaqueadas 2,5x10⁵ por poço, em placa de 24 poços, em volume final de 500uL por poço, em meio RPMI completo com 2% de SFB e 25 ng/mL de cada citocinas recombinante.

3.4. Infecção de células dendríticas por taquizoítas de *Toxoplasma gondii*

Para infecção, os parasitas foram ressuspensos em meio RPMI, contados em câmara de Neubauer com Tripán Blue, com a exclusão de parasitas inviáveis. As células dendríticas obtidas foram plaqueadas em meio contendo 2% de SFB por 16-18h antes da infecção e receberam taquizoítas na proporção de um parasita para uma célula (MOI 1) ou dois parasitas para cada célula (MOI 2), ou apenas meio de cultura. Após 1, 12, 24 e/ou 48 horas de infecção, as células foram recolhidas e centrifugadas a 400g, por 10 min, a 10°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -80°C para posterior dosagem de citocinas e o precipitado celular seguiu para as análises por citometria de fluxo ou microscopia.

3.5. Análise de corpúsculos lipídicos (CLs) durante a infecção de hDCs pelo *T. gondii*

3.5.1. Análise de CLs em hDC sem infecção e infectadas pelo *T. gondii*

Após infecção, 2x10⁴ hDC, foram citocentrifugadas (4500 rpm/5 min) em lâmina de vidro e fixadas em formalina a 4% em PBS, durante 20 minutos. Para coloração das células, foi utilizada uma solução estoque de *Oil Red – O* (Sigma) diluído a 0,3% em isopropanol. A solução de trabalho foi diluída a 60% em água e filtrada 3 vezes antes do uso. As lâminas foram submergidas na solução de trabalho durante 2

minutos, mergulhadas 1 vez em isopropanol, lavadas 3 vezes em água e mergulhadas então em Hematoxilina de Meyer (Merck) durante 4 minutos. Após retirar todo o excesso de corante lavando em água, as lâminas foram montadas utilizando 5uL do meio de montagem Fluoromont G (Southern Biotech). Na análise de Corpúsculos Lipídicos vários campos das lâminas foram investigados no microscópio de luz convencional (Olympus, aumento de 100x) e 50 células por lâmina foram avaliadas nas triplicatas experimentais. A contagem de parasitas por vacúolo parasitóforo foi realizada pela análise de 100 vacúolos, em cada experimento. A área vermelha por células e o tamanho médio dos Corpúsculos Lipídicos foram avaliados através do software Image J e expressos em gráficos por número de pixels.

3.5.2. Inibição de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico

Nos experimentos de avaliação da importância dos CLs na infecção de hDCs por *Toxoplasma gondii*, as células foram tratadas 1 hora após infecção, ou receberam um pré-tratamento 30 minutos antes da infecção, com o inibidor da enzima ácido graxo sintase, (C75, Sigma-Aldrich) ou o inibidor da diacilglicerol aciltransferase 1 (A 922500, Sigma), em diferentes concentrações. Nos poços controles foi adicionado o veículo das drogas, DMSO.

A fim de privar as hDC de lipídios exógenos utilizamos o soro fetal bovino delipidado, que foi gentilmente cedido pela Dra Georgia Corrêa Atella, do Laboratório de Lipídios e Bioquímica de Lipoproteínas, do Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil. O soro foi delipidado conforme previamente descrito por Cham and Knowles (1976)

3.5.3. Suplementação do meio de cultura com Ácidos Graxo

Para avaliar a importância de lipídio na viabilidade e replicação do *Toxoplasma gondii*, as células tiveram o meio de cultura suplementado com Ácido oleico (AO [50uM]). Para a preparação, o AO (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em DMSO a uma concentração estoque de 400 mM, depois misturado cuidadosamente em meio de cultura contendo 5% de BSA, em uma concentração final de 10 mM. Para assegurar a formação de complexos BSA-AO e evitar a formação de micelas, a mistura foi incubada durante 20 minutos, a 37°C, em banho-maria, com sonificador (Nolan et al., 2018).

3.6. Dosagem de citocinas - ELISA

As dosagens das citocinas foram realizadas utilizando o kit DuoSet® ELISA da R&D Systems. Foram dosadas as citocinas IL-1-beta, TNF-alfa, IL-6, IL-8 e TGF-beta e as quimiocinas IP10 e MIF de acordo com o fabricante do kit. O anticorpo de captura diluído na concentração de trabalho, em PBS, foi utilizado para cobrir os poços (50uL) de uma placa de 96 poços, que foi selada e incubado *over night*, a temperatura ambiente. No dia seguinte a placa foi lavada cinco vezes com o tampão de lavagem (0,05 Tween 20 [Bio Rad] em PBS) e incubada com a solução de bloqueio (1% BSA em PBS), durante duas horas, a temperatura ambiente. Ao fim do período de bloqueio a placa foi lavada e as amostras foram plaqueadas (50uL), assim como a curva padrão que foi diluída no tampão de bloqueio, conforme recomendado pelo fabricante. Após duas horas de incubação, a temperatura ambiente, as placas foram lavadas e foi adicionado o anticorpo de detecção (50uL), diluído em PBS na concentração de trabalho e incubado por mais duas horas. A placa foi lavada por mais cinco vezes e foi feita a adição do complexo Streptavidina-HRP diluído (50uL), incubando por uma hora. Por fim, após lavagem, foi adicionado o substrato cromogênico 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB – Bio Rad), incubando por vinte minutos. A reação foi interrompida pela adição de 2N H₂SO₄. A leitura foi realizada na leitora de placas Spectramax 190, através do software SoftMax Pro versão 5.4.1, nos comprimentos de onda determinados pelo fabricante.

3.7. Citometria de Fluxo

3.7.1. Análise da viabilidade da hDC

As células foram lavadas e mantidas em 300uL de PBS, suplementado com 2mM EDTA e 2% SFB (Tampão FACS) para aquisição no citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Pharmingen). A viabilidade das células infectadas foi avaliada pelo marcador de morte celular fluorescente Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBioscience) na diluição de 1:15.000 em PBS, incubado durante 10 minutos, no escuro. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra e os dados foram analisados no programa FlowJo versão 10.5.3 (FlowJo LLC).

3.7.2. Análise da expressão de moléculas de superfície

As DC foram ressuspensas em solução de Tampão FACS + 10% soro humano inativado para bloqueio dos receptores da porção Fc de anticorpos, por 20 minutos, à 4°C. Terminado o período de bloqueio, as células foram centrifugadas (400g / 10 minutos / 4°C). O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em PBS e plaqueadas em placas de 96 poços com fundo em "U" (10⁵DC/100 µl).

A marcação foi realizada em 20uL finais com anticorpos diluídos em Tampão FACS, seguida de intervalo de 20 minutos de incubação à 4°C e lavagem (400g / 8 minutos). Foram utilizados os seguintes anticorpos:

DC-SIGN-PerCP-Cy5.5	BD Biosciences; 558263
CD14-FITC	SouthernBiotech; 9560-02
CD11c-PECy5	eBioscience; 12-0116-42
CD83-FITC	eBioscience; 11-0839-42
CD86-PE	eBioscience; 12-0869-42
CD273-PerCP-Cy5.5	BD Biosciences; 564256
CD197-PerCP-Cy5.5	BD Biosciences; 1505503
HLA ABC-AlexaFluor488	BioLegend; 311415
HLA DR-APC	BioLegend; 307610
Controle Isotipo FITC	eBioscience; 11-4031-81
Controle Isotipo PE	eBioscience; 25-4031-81
Controle Isotipo PerCP-Cy5.5	BD Biosciences; 550795
Controle Isotipo APC	eBioscience; 17-4724-42

Ao final das marcações as células foram fixadas com paraformaldeído 2% diluído em PBS, por 20 min e armazenadas à 4°C, para posterior aquisição no citômetro de fluxo.

3.8. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 8.0.1 para Windows (GraphPad Software Incorporation, San Diego, California USA). Foram utilizados o teste *t* de Student e os teste One-way e Two-way ANOVA. Valores de P<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção de células dendríticas a partir de monócitos mononucleares de sangue periférico

Células dendríticas humanas (hDCs) derivadas de monócitos foram geradas a partir da separação de monócitos presentes no concentrado de leucócitos de voluntários saudáveis. Para o processo de derivação, foram utilizados as citocinas humanas recombinantes IL-4 e GM-CSF. Após 7 dias de derivação, uma amostra das células foi recolhida para caracterização da cultura. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais ligados a fluoróforos. As hDCs se mostraram negativas para o marcador de monócito (CD14), e positiva para os marcadores padrões de células dendríticas humanas derivadas de monócito (DC-SIGN, CD11c, HLA-DR). As células apresentaram perfil de DCs imaturas (não ativadas), negativas para CD83. A cultura apresentou aproximadamente 90% de pureza e 3% de linfócitos residuais (figura 6).

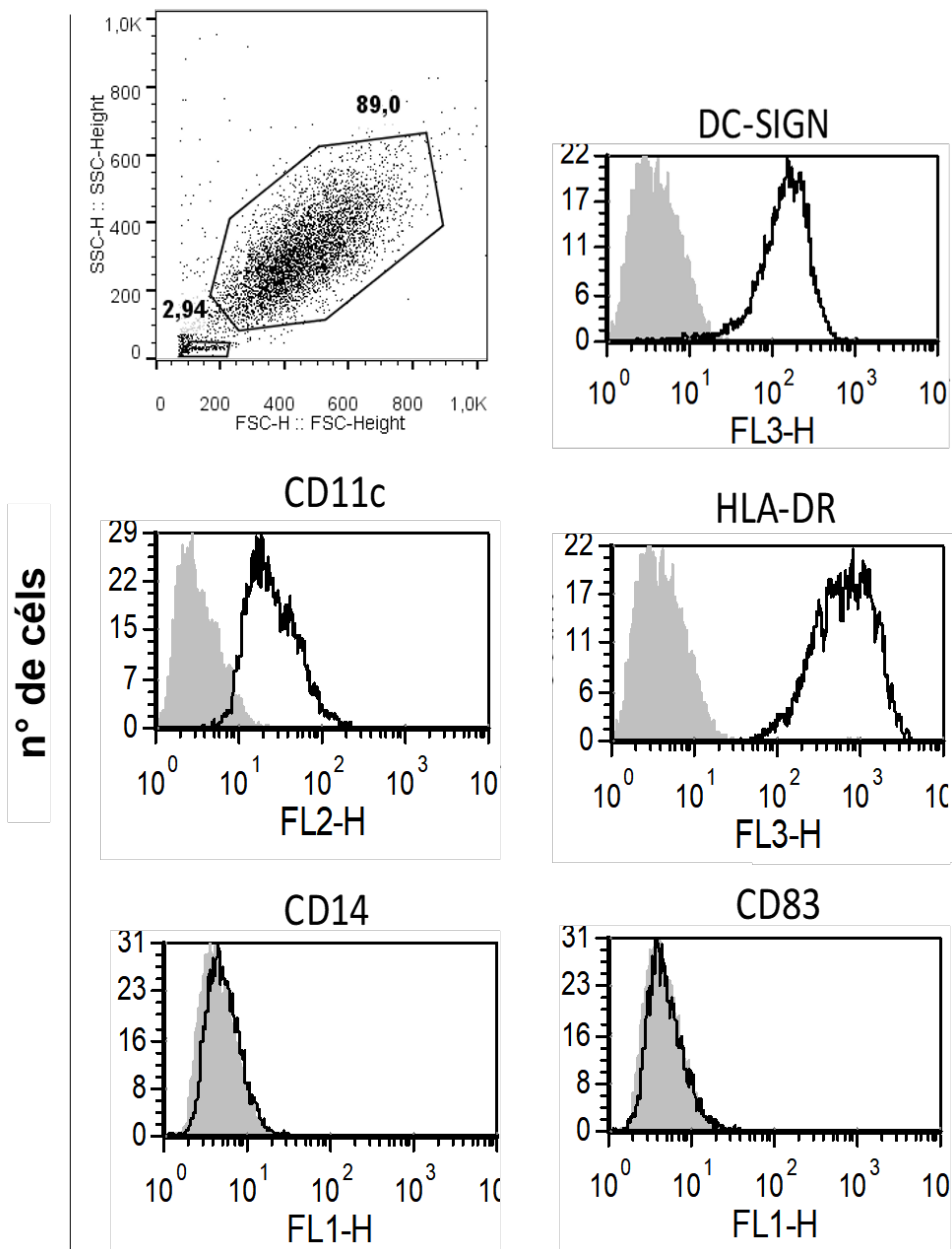


Figura 6. Caracterização fenotípica das células dendríticas humanas derivadas de monócitos. Após 7 dias de derivação sobre estímulo de GMCS-F e IL-4 humano recombinantes, as células dendríticas foram recolhidas e marcadas com os anticorpos. O fenótipo das células foi avaliado por citometria de fluxo e os dados são representados em gráfico de pontos por tamanho (FSC) e complexidade (SSC) e em histogramas, mostrando as marcações com os anticorpos. A figura mostra o perfil das células que são DC-SIGN⁺, CD11c⁺, HLA-DR⁺, CD14⁻, CD83⁻. Gráfico de pontos mostra a população de células dendríticas (~90%) e de linfócitos contaminantes (~3%).

4.2. Análise da viabilidade do *Toxoplasma gondii* e de Células Dendríticas humanas durante a infecção.

A fim de avaliar a cinética da viabilidade durante a infecção de hDCs pelo *T. gondii*, as células foram plaqueadas em meio contendo 2% SFB por 16-18h antes da infecção, a fim de diminuir a quantidade basal de CLs e, então, foram cultivadas com taquizoítas recuperados do lavado peritoneal de camundongos Swiss Webster. Após 1, 12, 24 e 48 horas de infecção, foram avaliadas por citometria de fluxo a viabilidade das hDCs, através do marcador Fixable Viability Dye (FVD), e da infectividade e viabilidade dos parasitas pela dupla marcação do *T. gondii* com os fluoróforos PKH-26 e Cell Tracer Far Red (CTFarRed), realizada antes da infecção.

A identificação dos parasitas mortos ocorreu pela perda da fluorescência do CTFarRed, quando exposto a pHs ácidos (menores que 4) (figura 7A), diferentemente do PKH-26 (figura 7B). Parasitas previamente marcados, podem entrar nas células por infecção ativa e se manterem vivos no meio intracelular, mantendo-se duplamente marcados. Por outro lado, esses parasitas podem ser detectados pela célula hospedeira ou fagocitados, sendo destruídos por fusão lisossomal com o VP, com posterior acidificação do meio. Desta forma, parasitas completamente destruídos ou em processo de destruição, perdem a fluorescência do CTFarRed, se mostrando positivos apenas para PKH-26. Mais do que isso, o PKH-26 consiste em um lipídio ligado a um fluoróforo com característica estável, o que faz com que, mesmo após destruição total do parasita, a célula previamente infectada se mantenha ainda positiva para o PKH-26 sendo possível detectar células que foram infectadas mesmo após longos tempos de infecção.

Taquizoítas marcados com CTFarRed e PKH-26 foram incubados *overnight* em soluções tamponadas com diferentes pHs (7,0; 6,0; 5,0; 4,0; 3,0). Como esperado, a fluorescência de CTFarRed diminuiu proporcionalmente à redução do pH (figura 7A), enquanto a de PKH-26 se manteve (figura 7B). Em seguida, foi avaliado se a marcação do *T. gondii* com PKH-26 (3uM) e CTFarRed (1uM) estaria causando a morte do parasita. O parasita duplamente marcado foi inicialmente avaliado por citometria de fluxo, apresentando marcação homogênea para ambos os fluoróforos (figura 7C). Posteriormente, os mesmos parasitas foram marcados com Fixable Viability Dye e Fluor780 (FVD), um indicador de morte celular. A população CTFarRed_{pos}PKH-26_{pos} se mostrou negativa para FVD, indicando que a dupla marcação com CTFarRed e PKH-26 não está induzindo a morte do parasita (figura 7D).

Na figura 8 apresentamos os dados de citometria de fluxo da viabilidade do parasita intracelular e das hDC durante a cinética de infecção. Em A, apresentamos a estratégia de análise com a definição da população de hDC para excluir linfócitos e debris celulares, gráficos de pontos da intensidade de fluorescência de PKH26 versus CTFarRed e histogramas da intensidade de fluorescência de FVD representativos de cada tempo avaliado e de células não infectadas. Em B temos a média e desvio padrão da porcentagem de hDC positivas para PKH-26 e negativas para CTFarRed de três voluntários avaliados em triplicata. Podemos observar o aumento da população infectada com parasitas mortos ao longo do tempo, com média aproximada de 5% após 1h de infecção ($P \geq 0,001$), 40% já em 12h, 50% em 24h e atingindo 58% em 48h. Em C temos a porcentagem de hDC duplo positivas para PKH26 e CTFarRed, representando hDC infectadas com parasitas vivos intracelularmente. Após 1h já observamos média aproximada de 10% de hDC infectadas, a população de células infectadas com parasitas vivos aumentou ao longo do tempo, com 21% em 12h, pico de infecção em 24h, correspondendo a 27% da população, e posterior diminuição para 10% da população em 48 horas ($P \leq 0,0008$).

As hDCs mantiveram-se viáveis ao longo do tempo, com mais de 87% da população FVD negativas, sem diferença com a população controle. Apenas após 48 horas de infecção a população diminuiu para 60% das células vivas (FVDneg), enquanto as células-controle não infectadas, mantiveram viabilidade de 87,7% (figura 8 A e D).

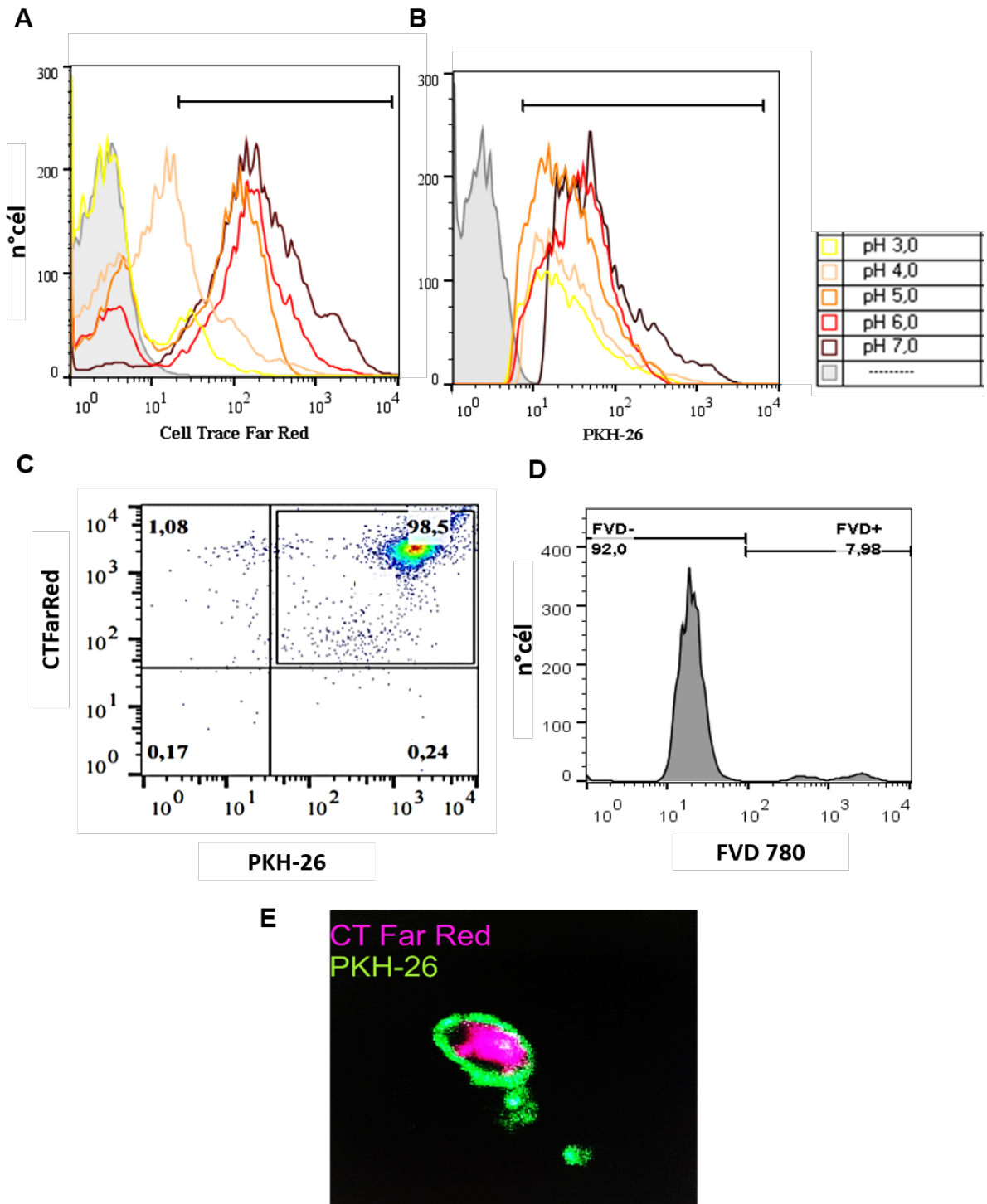


Figura 7. Taquizoítas duplo marcados com PKH-26 e Cell Tracer Far Red. Taquizoítas da cepa RH foram duplamente marcados com Cell Tracer Far Red (CTFarRed [1uM]) e PKH-26 [3uM]. Após marcação, os parasitas foram incubados, *over night*, em soluções tamponadas de pH 7, 6, 5, 4, e 3. Os parasitas também foram marcados com *Fixable Viability Dye 780* (FVD) e analisados por citometria de fluxo e microscopia confocal. (A) Histograma da intensidade de fluorescência de parasitas duplamente marcados com CTFarRed e (B) PKH-26 submetidos a diferentes pHs. As cores dos histogramas representam parasitas incubados em cada pH, de acordo com a legenda de cores. (C) DotPlot das duas fluorescências mostram a marcação homogênea em pH 7 (D) e o histograma de FVD eFluor 780 indica que estão vivos. (E) Taquizoíta duplo marcado analisado por microscopia e corado por software. Dados de um único experimento, representativo de 3 experimentos realizados.

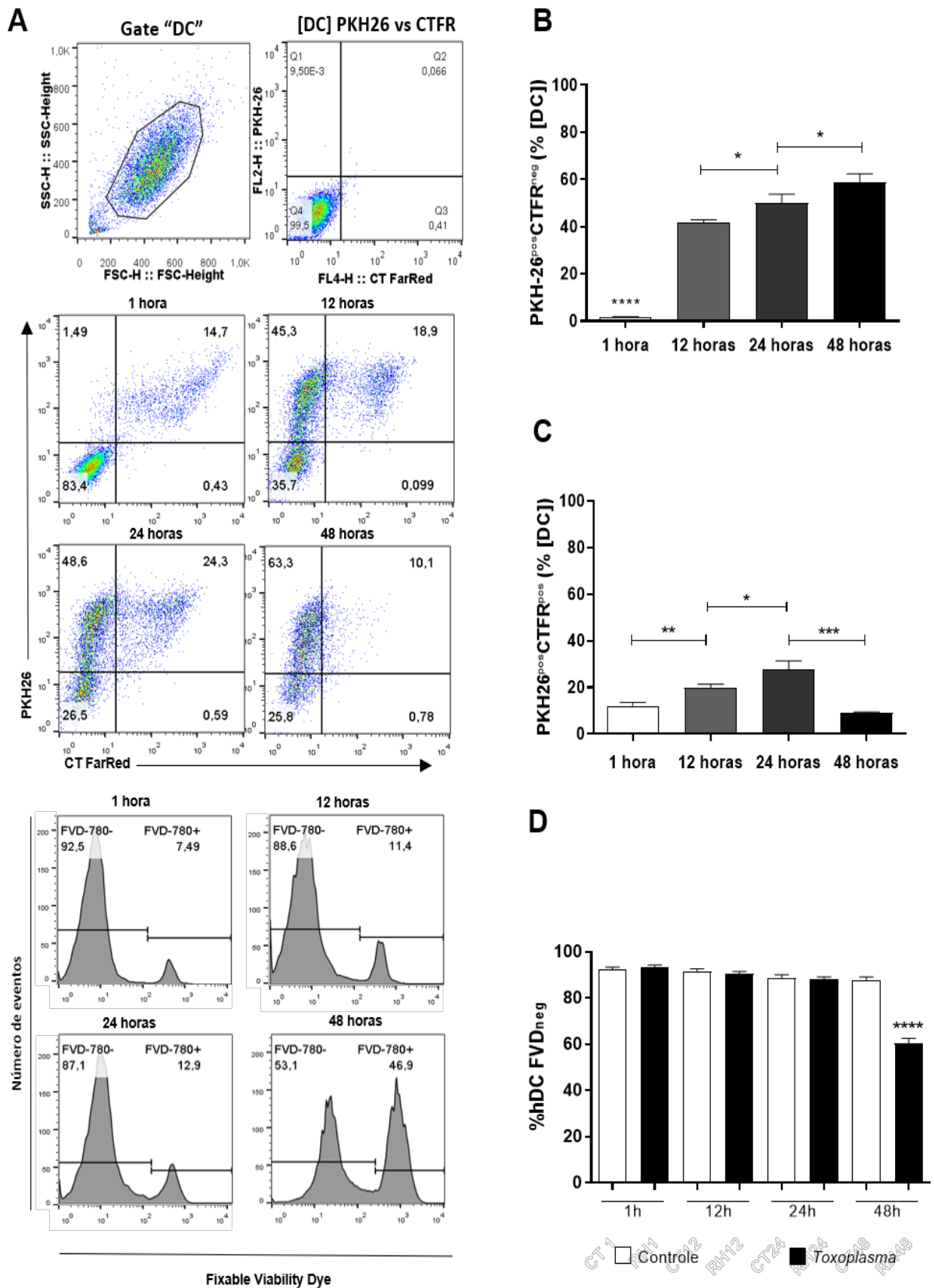


Figura 8. Análise da infectividade e viabilidade de Células Dendríticas humanas e viabilidade do *T. gondii* (continua).

Células Dendríticas Humanas (hDC) foram cultivadas em triplicata com taquizoítos duplamente marcados com PKH26 (3 μ M) e Cell Tracer Far Red [CTFarRed (1 μ M)] na MOI 1. A infectividade e a viabilidade das hDC e dos parasitas foram avaliadas por Citometria de Fluxo após 1h, 12h, 24h e 48h de cultura. (A-C) Avaliação da viabilidade dos parasitas intracelulares. (A) Estratégia da análise com a definição da população de hDC por tamanho e complexidade (gate "DC" em FSC x SSC), das populações de hDC negativas para PKH26 e CTFarRed ([DC] PKH26 x CTFarRed) em gráficos de pontos e das populações Fixable Viability Dye 780 positivas (FVD+) e negativas (FVD-) em histograma. (B) A frequência de hDC com parasitas mortos (PKH26^{pos}CTFarRed^{neg}) aumenta ao longo do tempo, enquanto (C) a frequência de hDC com parasitas vivos (PKH26^{pos}CTFarRed^{pos}) tem pico em 24 horas (27%) e decresce após 48 horas de cultura. Os resultados representam a média e DP de três experimento independentes, em triplicata (* P \leq 0,05; ** P \leq 0,003; *** P \leq 0,0008 **** P \leq 0,0001 One-way ANOVA). (D) A viabilidade das hDCs é representada pelo percentual de células Fixable Viability Dye 780 negativas (FVDneg). As hDC cultivadas na presença do parasita se mantém alta e apresenta diminuição expressiva após 48 horas (60%) em relação aos demais tempos e seu controle (87%). Os resultados representam a média e DP dos três experimentos independentes. (**** P \leq 0,0001 One-way ANOVA. Teste *t* Student).

4.3. Perfil de infecção de células dendríticas humanas vivas e mortas

Uma vez que o cultivo de hDCs com taquizoítas resultou na redução da viabilidade das células hospedeiras, foi avaliado qual seria o perfil de infecção e a viabilidade dos parasitas intracelulares, nas hDCs vivas e mortas que foram cultivadas com o parasita. As células cultivadas com parasitas duplamente marcados (PKH-26 e CTFarRed), MOI1, foram marcadas com FVD e tiveram sua viabilidade avaliada por citometria de fluxo após 24 horas e 48 horas de infecção.

Na figura 9A, apresentamos gráficos do controle do experimento representativos da população PKH26 negativa e positiva em hDCs não cultivadas (gráfico da esquerda) e cultivadas (direita) com o parasita marcado. As células cultivadas com o parasita por 24 ou 48 horas foram divididas em dois grupos de acordo com a sua positividade para PKH-26: células que foram infectadas (PKH-26pos) e células que não foram infectadas (PKH-26neg). Em seguida, avaliamos o percentual de células viáveis em cada população (FVD negativas). Em B podemos observar que as células que apresentaram ou apresentam o parasita em seu citoplasma (PKH-26pos) mostraram menor viabilidade em 24 horas (~80%) e 48 horas (58%) em comparação com as células que não foram infectadas (PKH-26 neg) (95% e 78%, respectivamente).

Após 48h de infecção, avaliamos a viabilidade dos parasitas intracelulares em hDCs vivas e mortas. Para isso, as células foram divididas em células vivas (FVDneg) e células mortas (FVDpos) (Figura 9C) e avaliadas quanto a positividade para PKH-26 e CTFarRed. Foi possível observar que as células mortas (FVDpos) se apresentaram majoritariamente positivas apenas para PKH-26 e não para CTFarRed, portanto infectadas com parasitas mortos (91%). Enquanto as células vivas (FVDneg) apresentam populações positivas tanto para ambos os marcadores (parasitas vivos: 13%), quanto apenas para PKH-26 (parasitas mortos: 72%) (figura 9 C e D).

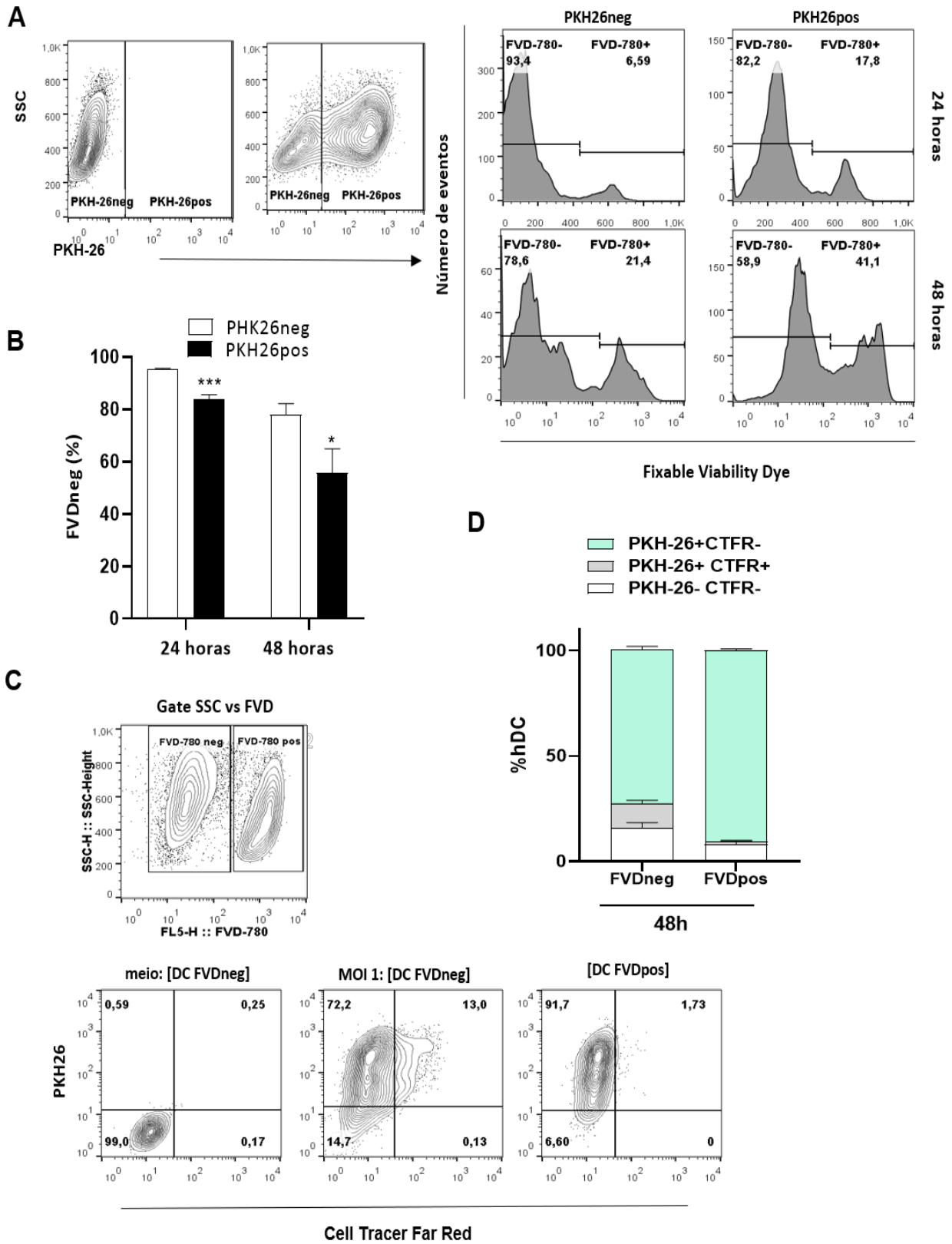


Figura 9. Avaliação da viabilidade de células Dendríticas infectadas pelo *T. gondii* (continua).

Células Dendríticas Humanas (hDC) foram cultivadas com taquizoítas duplamente marcadas com PKH26 (3uM) e Cell Tracer Far Red [CT FarRed (1uM)] na MOI 1. Após 24 horas ou 48 horas de infecção, as células foram marcadas com Fixable Viability Dye 780 (FVD-780). A viabilidade das hDC e dos parasitas foi avaliada por Citometria de Fluxo. (A) Estratégia de análise com a definição das populações positiva e negativa para PKH26 em gráfico de complexidade (SSC) versus PKH26, apresentado em curvas de densidade da frequência das populações (*contour plot*). Dessas populações foram construídos histogramas da fluorescência detectada para FVD-780 e definidas a viabilidade (FVDneg) das populações infectada (PKH26+) e não infectada (PKH26-). (B) Análise da viabilidade de células infectadas (PKH26pos) ou não infectadas (PKH26neg) através do percentual de Células dendríticas humanas negativas para FVD-780(FVDneg). Os resultados representam a média e DP de três experimento independentes, em triplicata (* $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,003$ teste t Student). (C) Estratégia de análise com a definição das populações de DC vivas (FVDneg) e mortas (FVDpos), a partir do gráfico de complexidade (SSC) e versus fluorescência para FVD-780. Dentre as DC vivas ou mortas, foram identificadas as populações positivas para PKH26 e CTFarRed em gráficos *contour plot* das duas fluorescências, definindo três populações quanto a positividade apenas para PKH-26 (PKH-26+CTFR-), para ambos os marcadores (PKH-26+CTFR+) ou para nenhum deles (PKH-26-CTFR-). (D) Análise do perfil de infecção das populações de células vivas (FVDneg) e mortas (FVDpos), após 48 horas de infecção pela frequência das populações infectadas com parasitas mortos (PKH-26+CTFR-), com parasitas vivos (PKH-26+CTFR+), ou não infectadas (PKH-26-CTFR-). Os resultados representam as médias e DP de três experimento independentes, em triplicata.

Avaliamos nos sobrenadantes das culturas de células dendríticas a produção de citocinas ao longo da infecção. Observamos um aumento da produção de TNF-alfa a partir do tempo de 12 horas, nas células cultivadas com o parasita. A produção de IL-6 também apresentou aumento, porém estatisticamente significativo apenas após 48 horas de infecção, em relação ao controle não infectado. A produção de IL-8 foi maior nas células infectadas a partir de 24 horas. Em 48 horas, identificamos uma maior secreção da citocina também no grupo controle, em relação aos demais tempos. Porém, a produção pelas células infectadas neste mesmo tempo, ainda se mostrou maior do que o controle não infectado. Não detectamos a produção de IL-1 beta e não houve alteração na produção de TGF-beta ao longo dos tempos de infecção (figura 10).

Detectamos uma alta produção da quimiocina Proteína induzida por IFN- γ (IP10/CXCL10) e do Fator inibidor de macrófagos (MIF). IP10 se mostrou aumentada a partir de 12 horas nas células cultivadas com *T. gondii* em relação ao controle não infectado; e foi maior nas células infectadas quando comparada ao tempo de 1 hora. Da mesma forma, a produção de MIF também apresentou aumento, porém apenas 24 horas após infecção, com relação ao controle não infectado, mantendo-se aumentada até 48 horas (figura 10).

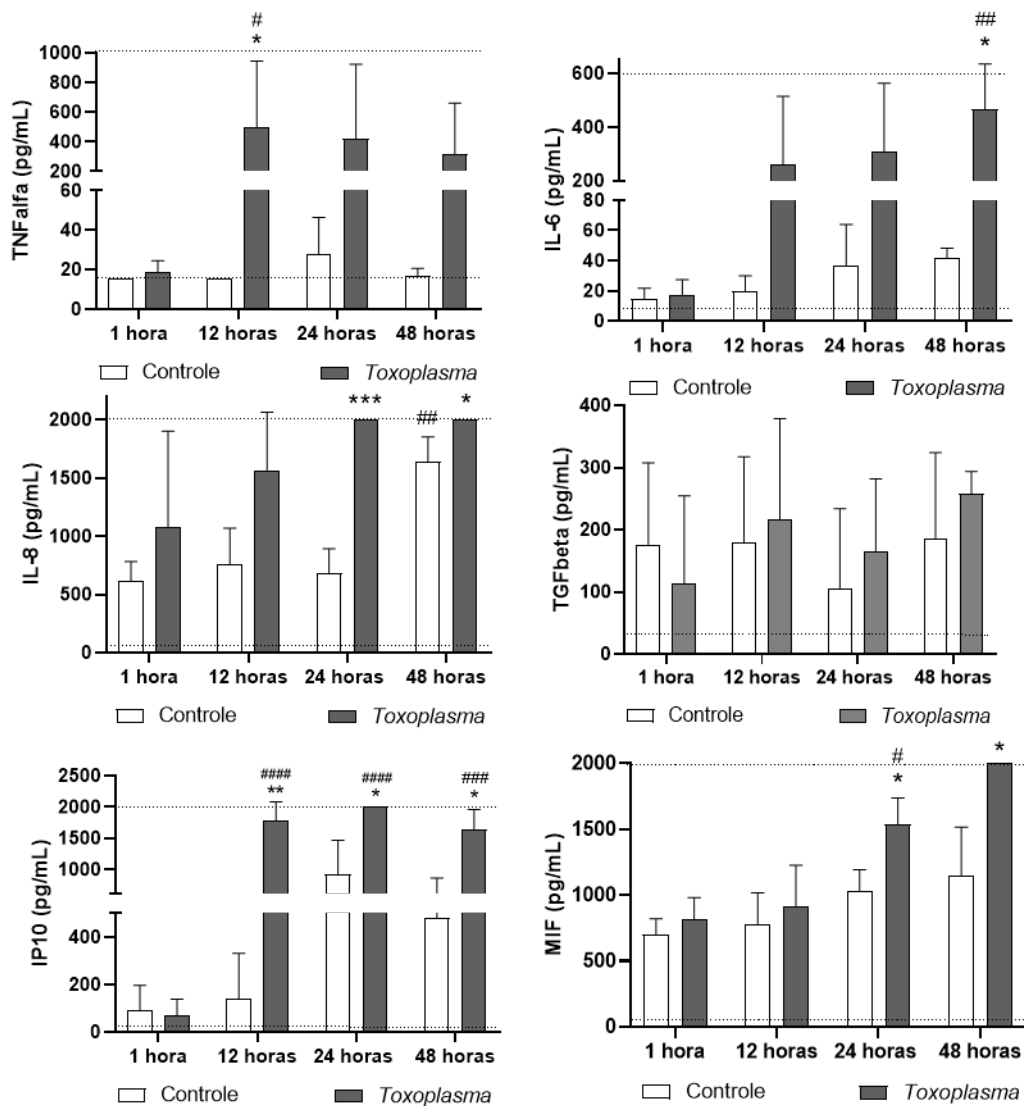


Figura 10. Quantificação de citocinas nas culturas de DCs infectadas com taquizoítas de *T. gondii* ao longo do tempo. Células dendríticas foram cultivadas com taquizoítas (MOI 1) por 1, 12, 24 e 48 horas. Ao fim do intervalo de infecção, os sobrenadantes foram coletados e armazenados à -80°C, até a realização do ensaio de detecção de citocinas por ELISA. As figuras apresentam a produção de citocinas e quimiocinas em relação ao controle não infectado (*) e aos demais tempos de infecção (#). Dados representam a média e DP de três experimentos independentes. (* P ≤ 0,03; ** P ≤ 0,001; *** P ≤ 0,0003 Teste t Student. # P ≤ 0,05; ## P ≤ 0,01; ### P ≤ 0,002; #### P ≤ 0,0001. One-way ANOVA).

4.4. Biogênese de Corpúsculos Lipídicos e infectividade de células dendríticas humanas pelo *Toxoplasma gondii*

A cinética da infecção e da biogênese de Corpúsculos Lipídicos foi avaliada pelo cultivo de células dendríticas humanas com taquizoítas (MOI 1), durante 1, 12, 24 e 48 horas. Após os tempos de infecção, as células foram citocentrifugadas, coradas com *Oil Red O* e hematoxilina e analisadas por microscopia de campo claro. A análise das lâminas permitiu observar que o percentual de células infectadas era o mesmo que o encontrado nas células infectadas com parasitas vivos, pela citometria de fluxo (figura 8C): pico em 24 horas (30%), seguido de decréscimo em 48 horas para 10% de células infectadas (figura 11A). O mesmo perfil pôde ser observado quanto ao número médio de parasitas por células. Ao calcularmos o número médio de parasitas por vacúolo parasitóforo (VP), observamos vacúolos com 2 a 4 parasitas em 12 horas e o surgimento de populações com 8 a 16 parasitas por VP em 24 horas. Após 48 horas da infecção, a grande maioria dos VPs apresentam 1 a 2 parasitas por células novamente.

A contagem do número de corpúsculos lipídicos por célula (figura 11B) e a determinação da área vermelha por célula (figura 11C) apresentaram aumento, com diferença estatística significativa no tempo de 24 horas pós-infecção, em relação ao controle não infectado e aos demais tempos. A biogênese de CLs foi maior após 48 horas de infecção quando comparado ao seu controle ($P \geq 0,001$) e ao tempo de 24 horas ($P \geq 0,0001$). O mesmo aumento pôde ser observado no percentual de células que apresentam CLs, chegando a 95% em 48 horas. O tamanho médio dos CLs se manteve o mesmo entre os tempos, exceto após 48 horas de infecção onde os CLs se mostram maiores em comparação ao seu controle não infectado ($P \geq 0,05$) e aos demais tempos de infecção ($P \geq 0,02$).

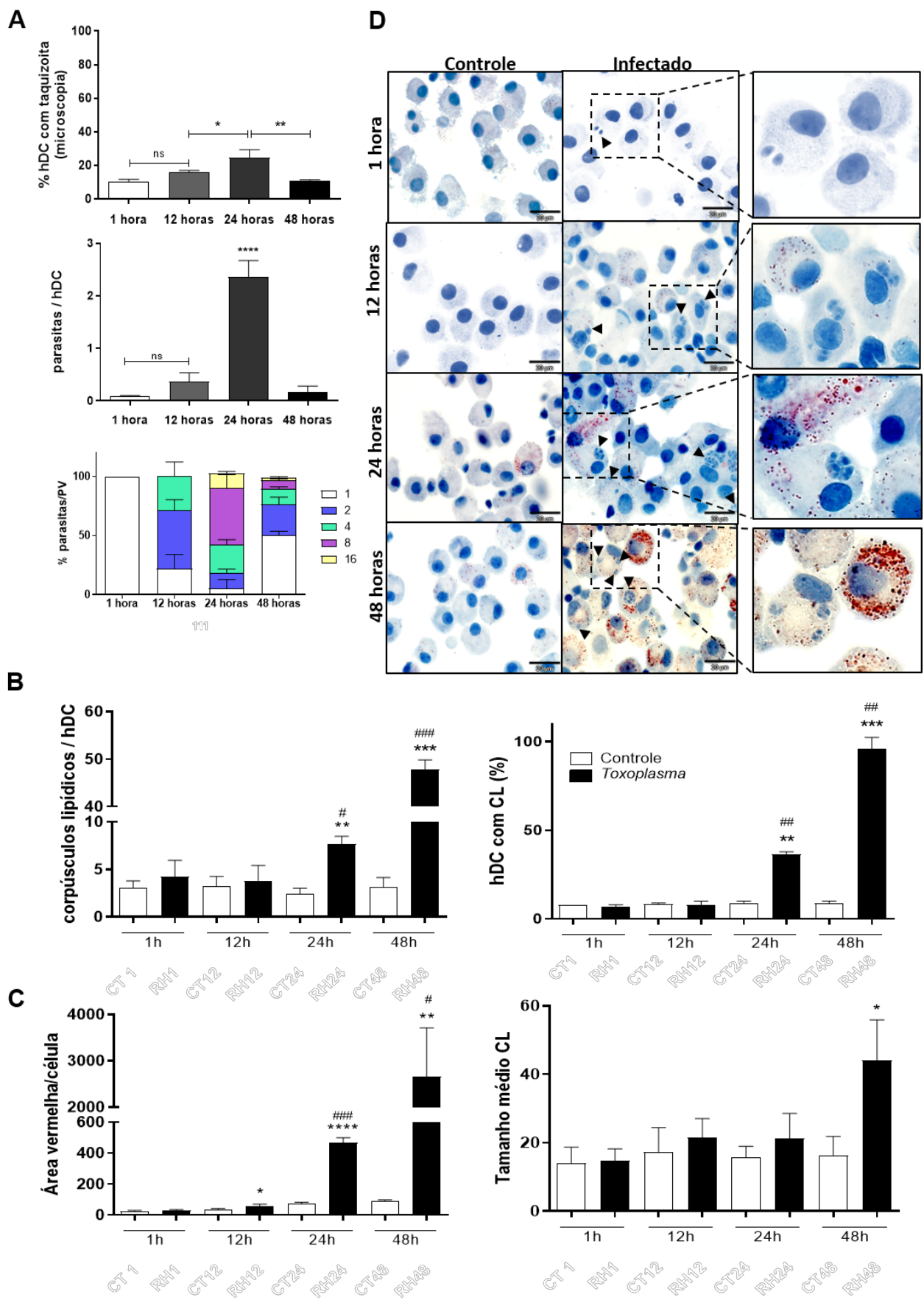


Figura 11. Análise da Biogênese de Corpúsculo Lipídicos em Células Dendrítica humanas infectadas com taquizoítas de *T. gondii* (continua).

Células Dendríticas Humanas (hDC) foram cultivadas com taquizoítas duplamente marcadas com PKH-26 (3 μ M) e Cell Tracer Far Red [CT FarRed (1 μ M)] naMOI 1. Após 1 hora, 12 horas, 24 horas e 48 horas, as células foram citocentrifugadas, fixadas com formalina 4%, coradas e avaliadas por microscopia. (A) O percentual de hDCs infectadas (figura superior) e o número de parasitas por células (figura do meio), foi mensurado pela contagem de 50 células de diferentes campos, em cada replicata. Os resultados representam as médias e os desvio padrão (DP) de três experimentos independentes, em triplicatas (* $P \leq 0,04$; ** $P \leq 0,008$; **** $P \leq 0,0001$; ns = não significativo, One-way ANOVA). A taxa de replicação do parasita (figura inferior) ao longo do tempo, foi mensurada pelo número de parasitas por vacúolo parasitóforo (PV). Os dados representam as médias e os DP de 100 vacúolos parasitóforos. (B) O número de CL por células (esquerda) e o percentual de células com CL ao longo do tempo (direita), correspondem à média e ao DP de três experimentos independentes, em triplicatas, em que foram contadas 50 células de diferentes campos, em cada replicata. Tanto o número de células com CL quanto a porcentagem de células com CL após 24 e 48h aumentaram nas células cultivadas com o parasita em comparação ao controle do mesmo tempo de cultura (*), e ao grupo infectado do tempo anterior (#). Os resultados representam as médias e DP de três experimentos independentes, em triplicata (** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,0008$ Teste t Student. # $P \leq 0,02$; ## $P \leq 0,001$; ### $P \leq 0,0001$ One-way ANOVA). (C) Biogênese de corpúsculos lipídicos avaliada pela área vermelha por células e pelo tamanho de cada área em número de pixels. Ao longo da infecção, em triplicatas de células infectadas e controles, 50 células em campos aleatórios por replicata foram analisadas utilizando o programa Image J. Há aumento da área vermelha por célula nas células infectadas quando comparados ao controle do mesmo tempo (*), e ao grupo infectado do tempo anterior (#). Os resultados representam as médias e DP de três experimento independentes. (* $P \leq 0,02$; ** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$, teste t Student. ## $P \leq 0,01$; ### $P \leq 0,008$ One-way ANOVA). (D) Imagens representativas. As células foram coradas com Hematoxilina de Mayer e Oil Red–O (ORO) e analisadas em microscópio de luz convencional, em objetiva de 100x. A barra corresponde a 20 μ m e as setas indicam taquizoítas intracelulares. Dados representativos de 3 experimentos independentes (n=3), feitos em triplicata.

As populações de células que apresentavam ou não taquizoítas intracelulares, foram avaliadas quanto a presença de CLs após 24 horas. Observamos que as células parasitadas (30%), em sua maioria, não apresentavam CLs em seu citoplasma (26%), e as células com CLs não apresentavam parasitas, o que inferiria um possível consumo dos CLs pelos parasitas (figura 12A). Avaliamos então, a quantidade de parasitas por PV, em células com e sem CLs. A contagem dos parasitas mostrou que nas células em que os CLs estão ausentes, há VPs com 4 a 8 parasitas e há também VPs com 16 parasitas. Já nas células com CLs, a maioria dos VPs apresentam de 1 a 4 parasitas e não há PV com mais de 4 parasitas (figura 12B).

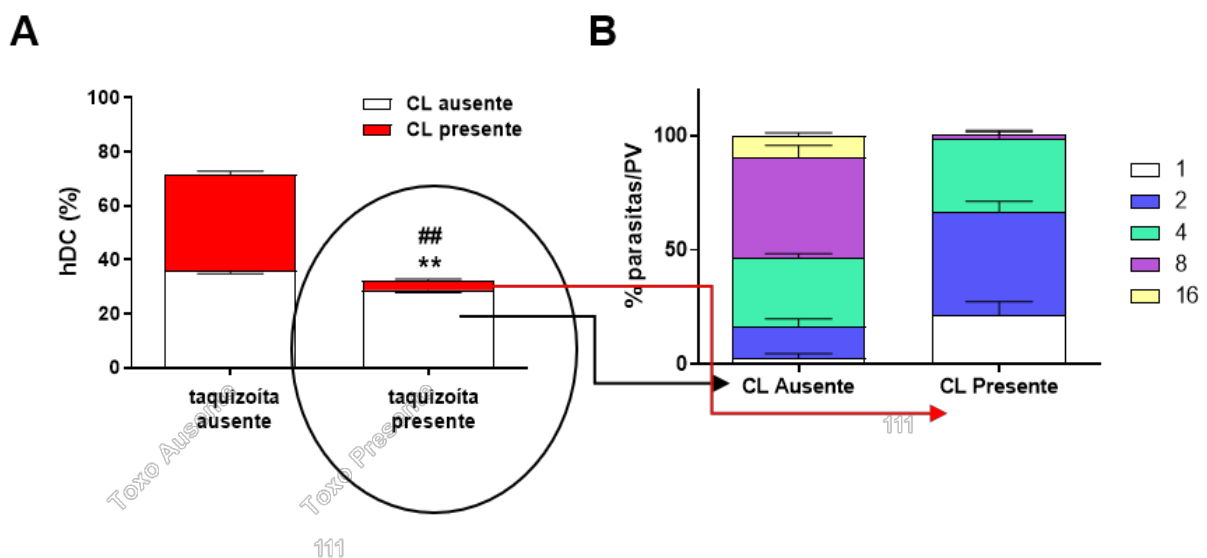


Figura 12. Influência da biogênese de CLs em hDC na infectividade e multiplicidade do *T. gondii*. Células Dendríticas Humanas (hDC) foram cultivadas com taquizoítas duplamente marcadas com PKH-26 (3uM) e Cell Tracer Far Red [CT FarRed (1uM)] na MOI 1. Após 24 horas de infecção, as células foram citocentrifugadas, fixadas com formalina 2%, coradas e avaliadas por microscopia. (A) Biogênese de CLs em hDC infectadas e não infectadas após cultivo com *T. gondii* por 24 horas. Os resultados representam as médias e DP de 50 células em campos aleatórios, de três experimentos independentes, em triplicata. As porcentagens de hDCs com CLs dentro as células infectadas ou não infectadas (**), são maiores do que nas hDC sem CLs. As porcentagens de células não parasitadas (taquizoítas ausentes), com ou sem CLs (**), são maiores do que as células parasitadas (taquizoítas presentes) (** $P \leq 0,005$ e ## $P \leq 0,005$ Two-way ANOVA). (B) Perfil do número de parasitas por vacúolo, ao longo do tempo, em células que apresentaram e não apresentaram corpúsculos lipídicos (CL) após 24h de infecção. Os dados representam as médias e os DP de 100 vacúolos parasitóforos, de três experimentos independentes, em triplicata.

4.5. Impacto da taxa de infecção na biogênese de CLs e na viabilidade de hDCs.

Com o objetivo de avaliar se o MOI utilizado altera a cinética da infecção, as Células Dendríticas humanas foram plaqueadas e cultivadas com *T. gondii* na proporção de 1 ou 2 parasitas para cada células hospedeira (MOI 1 e 2). Após 24 e 48 horas em cultura, as células foram marcadas com *Fixable Viability Dye* (FVD) para análise da viabilidade das células por citometria de fluxo, além da taxa de infecção e biogênese de CLs por microscopia de campo claro.

Por microscopia foi possível observar que a taxa de infecção é proporcional ao MOI utilizado. Células infectadas na proporção de 1 parasita para cada célula apresentaram pico de infecção de 30% das células em 24 horas. Em contrapartida, células cultivadas na proporção de 2 parasitas para cada célula mostraram taxa de infecção máxima de 60% em 24 horas. Em ambos os casos, temos a diminuição da taxa de infecção em 48 horas. Além disso, existe a interferência do MOI na média de parasitas por células (figura 13A). As hDCs infectadas na MOI 1 apresentam a média de 2 parasitas por célula em 24 horas, enquanto as infectadas na MOI 2 tem a média mais alta com pico de 6 parasitas por células em 24 horas. É possível observar a diminuição dessa média em 48 horas, em ambos os MOIs avaliados (figura 13B).

A análise da viabilidade através da população FVDneg mostrou que células infectadas com MOI 2 apresentam menor viabilidade em comparação às hDCs infectadas com MOI 1, tanto em 24 quanto em 48 horas. As hDCs infectadas com MOI 2 apresentaram diminuição da viabilidade em relação ao controle já em 24 horas (40%), enquanto as hDC infectadas com MOI 1 não apresentaram perda da viabilidade em 24 horas, apenas em 48 horas, com 50% das células vivas (figura 13C).

Quanto a indução de Corpúsculos Lipídicos, os dados mostraram a variação da biogênese de acordo com o MOI. A utilização da MOI 1 resultou no pico da biogênese em 48 horas, enquanto na MOI 2 o pico ocorreu de forma precoce, já em 24 horas. O mesmo fenômeno pôde ser visto quanto à porcentagem de hDCs apresentando CLs (figura 13 D e E).

Através da análise de correlação, foi possível observar que o pico da biogênese de CLs se relaciona inversamente com viabilidade das células hospedeiras. Em 24 horas, as células infectadas com MOI 1 ainda não sofreram perda da viabilidade e a produção de CLs é baixa. Porém, nas hDCs infectadas com MOI 2 podemos observar logo em 24 horas que a viabilidade das células se encontra ao redor de 50% e temos

o pico da biogênese de CLs (figura 13F). Conforme esperado, a taxa de infecção também se correlaciona com a perda da viabilidade. Quanto maior a taxa de infecção, mais precocemente se tem a diminuição da viabilidade (figura 13G).

Juntos os dados mostram que tanto a viabilidade das hDCs infectadas pelo *T. gondii*, quanto a taxa de infecção e a biogênese de CLs são dependentes do MOI utilizado para infecção. Deste modo, quanto maior a taxa de infecção, mais precocemente ocorre a perda viabilidade celular e, curiosamente, o pico da biogênese de CLs.

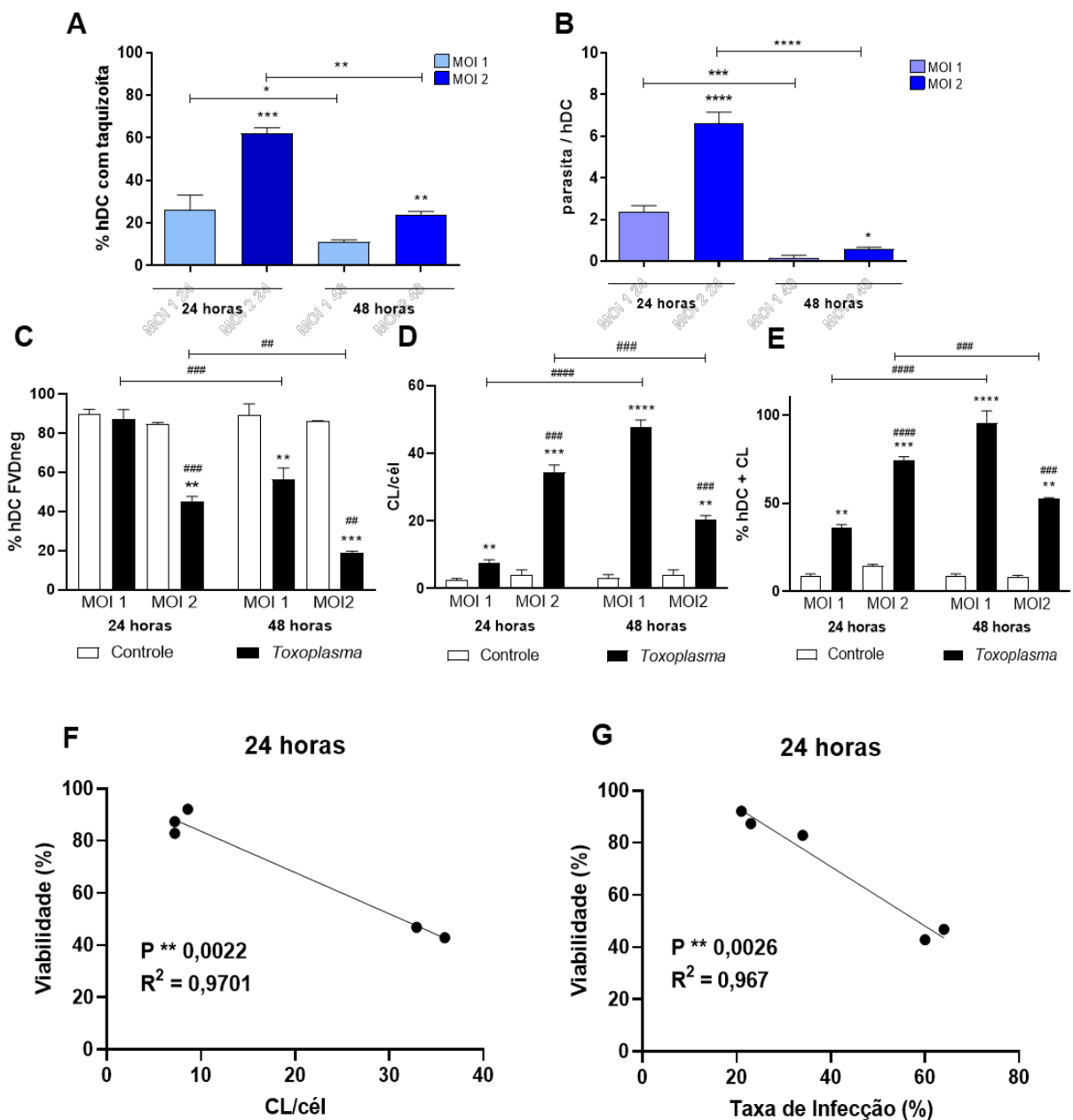


Figura 13. Avaliação da biogênese de Corpúsculos Lipídicos e da viabilidade de Células Dendríticas infectadas por *T. gondii*, em diferentes MOI (continua).

Células Dendríticas Humanas cultivadas com taquizoítas MOI 1 e 2 (RH), foram avaliadas por citometria de fluxo e microscopia de luz convencional, 24h e 48h pós-infecção. (A) Comparação da taxa de infecção (B) e do número de parasitas por células entre infecções com diferentes MOI, após 24 horas e 48 horas de infecção. Os dados apresentam média e DP de experimentos independentes. (* $P \leq 0,02$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,0003$; **** $P \leq <0,0001$, teste t Student). (C) Análise da viabilidade das hDCs controle ou cultivadas com *T. gondii*, representada pelo percentual de células Fixable Viability Dye negativas (FVDneg), em 24 horas e 48 horas pós-infecção. Dados apresentam análise estatística entre células cultivadas com o parasita em comparação ao controle (*) e entre células infectadas com diferentes MOI (#). Os dados apresentam média e DP de experimentos independentes. (** $P \leq 0,002$; *** $P \leq 0,0001$ teste t Student. ## $P \leq 0,002$; ### $P \leq 0,0004$ One-way ANOVA). (D) Média de CL por células (E) e o percentual de células com CL, em células dendríticas humanas cultivadas com *T. gondii* em diferentes MOI, após 24 horas e 48 horas de infecção. Dados correspondem à média da contagem de 50 células de diferentes campos, em cada replicata. Análise estatística entre células cultivadas com o parasita em comparação ao controle (*) e entre células infectadas com diferentes MOI (#). Resultados apresentam média e DP de experimentos independentes. (** $P \leq 0,003$; *** $P \leq 0,0008$; **** $P \leq <0,0001$ teste t Student. #### $P \leq 0,0004$; ##### $P \leq <0,0001$ One-way ANOVA). (F) Análise da correlação entre viabilidade das hDC infectadas e taxa de infecção em 24 horas (G) e do número de CL por células e a viabilidade em 24 horas. Gráficos foram montados utilizando valores de células dendríticas humanas que foram cultivadas com taquizoítas MOI 1 e 2. Dados correspondem à média da contagem de 50 células de diferentes campos, em cada replicata. Nos gráficos são apresentados média de três experimentos independentes (n=3) com MOI 1 e dois experimentos independentes (n=2) com MOI 2.

4.6. Determinação da concentração dos inibidores da biogênese de CLs

Uma vez que o cultivo de hDCs com o *T. gondii* levou ao aumento da biogênese de CLs, avaliamos qual seria o impacto da inibição da biogênese na sobrevivência do parasita intracelular. Para esse objetivo, utilizamos dois inibidores: o C75, que tem efeito inibitório sobre a enzima ácido graxo sintase (FAS), responsável pela síntese de ácidos graxos; ou o inibidor A922500 da diacilglicerol aciltransferase 1 (DGAT-1), que catalisa a formação de triacilglicerol a partir de diacilglicerol. Para isso, foi necessário determinar a melhor concentração a ser utilizada de ambos os inibidores.

Primeiramente, foi feito um experimento com o C75 em hDCs cultivadas com *T. gondii* MOI 2, a fim de se ter uma indução maior de CLs, após 24 horas de infecção. As células foram plaqueadas *overnight* em meio com 2% de SFB e, 30 minutos antes da infecção, receberam um pré-tratamento com C75 nas concentrações de 5, 2,5 e 1,25 µg/mL. Após 24 horas de infecção, as células foram recolhidas e marcadas com FVD para avaliação da viabilidade por citometria de fluxo. Além disso, foi realizada a citocentrifugação das células e a coloração com hematoxilina e ORO para análise da taxa de infecção, da replicação dos parasitas e da indução da biogênese de CLs por microscópio de luz. Os dados apresentados correspondem a dois experimentos realizados em duplicata.

As avaliações por microscopia mostraram que apenas a concentração de 5 µg/mL de C75 pareceu capaz de diminuir a biogênese de CLs após 24h de infecção. Tanto a concentração de 5 µg/mL quanto a de 2,5 µg/mL pareceram diminuir a porcentagem de hDCs que apresentaram CLs, porém, as células tratadas com 5 µg/mL mostraram um percentual aparentemente menor (figura 14A e C). O tratamento com a maior concentração de C75 também apresentou uma tendência de diminuição da taxa de infecção para 20%, em comparação com o controle apenas com o veículo, que apresentou taxa de 60% de células infectadas. Da mesma forma, também houve uma diminuição na média de parasitas por células, que reduziu de 8 parasitas por célula no grupo DMSO, para 2 parasita por célula no grupo tratado com 5 µg/mL. A concentração de 2,5 µg/mL também levou a diminuição, mas de forma aparentemente menos significativa, de ambos os parâmetros (figura 14B e C). Como foi realizado o pré-tratamento das hDCs antes do cultivo com os parasitas, não é possível afirmar que tal diminuição seja consequência da ausência de corpúsculos lipídicos, uma vez

que o inibidor pode ter tido um efeito direto no parasita, causando sua morte, ou de alguma forma interferido no processo de infecção.

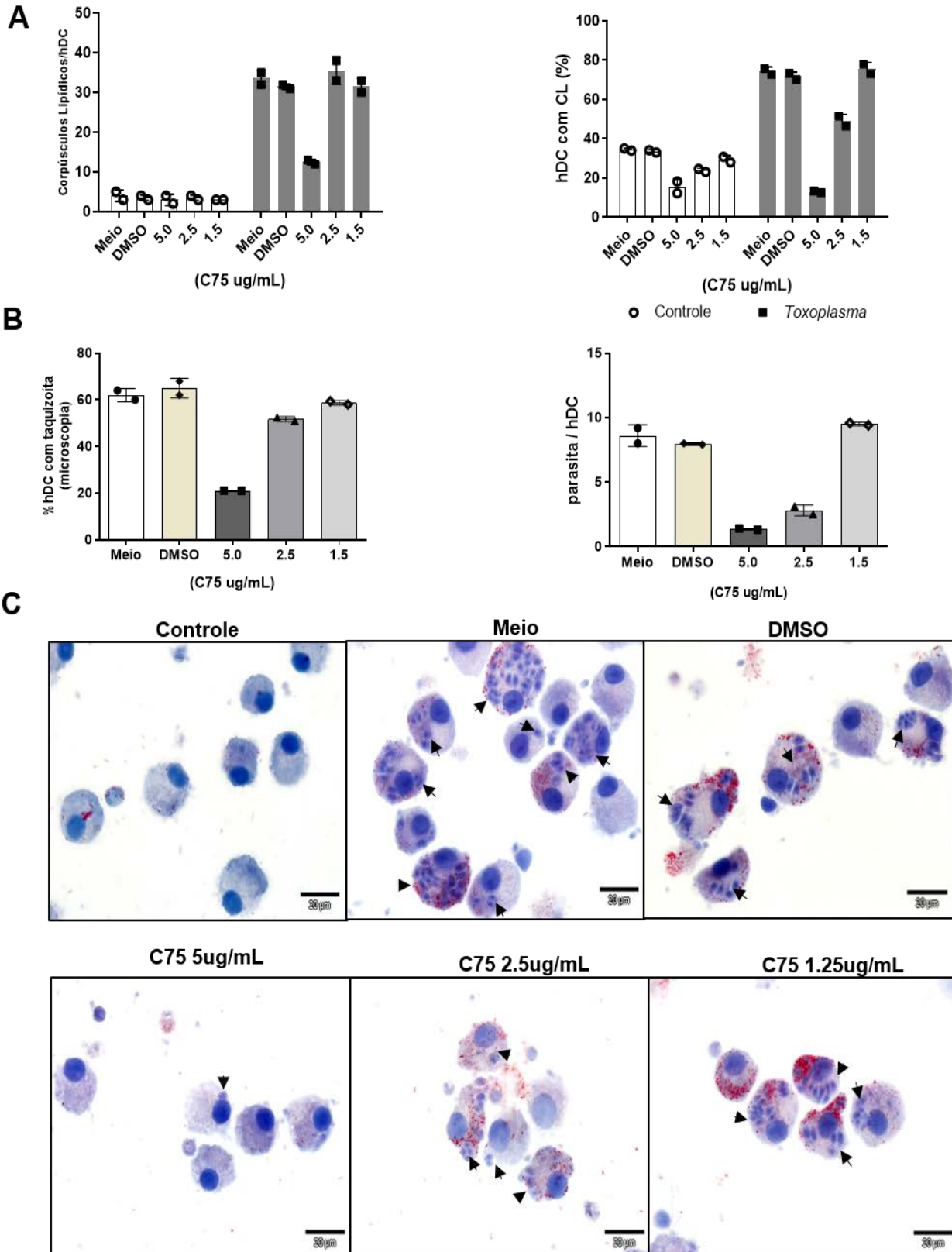
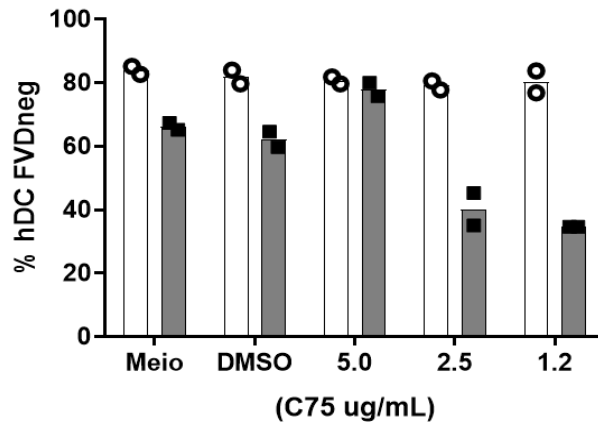


Figura 14. Determinação da concentração do inibidor C75, em células dendríticas humanas infectadas pelo *T. gondii* (continua).

Células Dendríticas humanas (hDC) foram cultivadas com taquizoítas na MOI 2. As células receberam pré-tratamento com C75, o inibidor da enzima Ácido Graxo Sintase, ou seu veículo (DMSO), 30 minutos antes da infecção, nas concentrações de 5ug/mL, 2,5ug/mL e 1,25ug/mL. Após 24 horas, as células foram citocentrifugadas, fixadas com Formalina 4%, coradas e avaliadas por microscopia. Dados correspondem à média da contagem de 50 células de diferentes campos. O pré-tratamento com C75 parece ter causado aparente redução na (A) média do número de corpúsculos lipídicos (CL) por célula (esquerda) e na porcentagem de células com CL (direita), nas células tratadas com 5ug/mL de C75. Além disso, quando pré-tratadas com C75, (B) a porcentagem de hDC que apresentam parasitas (esquerda [5uM]) e o número médio de parasitas por células (direita [5uM e 2.5uM]) também pareceram apresentar redução. (C) Imagens representativas. As células foram coradas com Hematoxilina de Mayer e Oil Red-O (ORO) e analisadas em microscópio de luz convencional, em aumento de 100x, barra de 20µm. Setas indicando taquizoítas intracelulares.

Para avaliar se o tratamento se mostrou citotóxico para as hDCs, as células foram marcadas com FVD e avaliadas por FACS. A partir dos dados da citometria de fluxo foi possível observar que o tratamento com inibidor não afetou a viabilidade das células controle e pareceu ser protetor para as células infectadas, na concentração de 5ug/mL, concluindo assim que o tratamento com o inibidor não causou a morte das hDCs (figura 15 A e B).

A



B

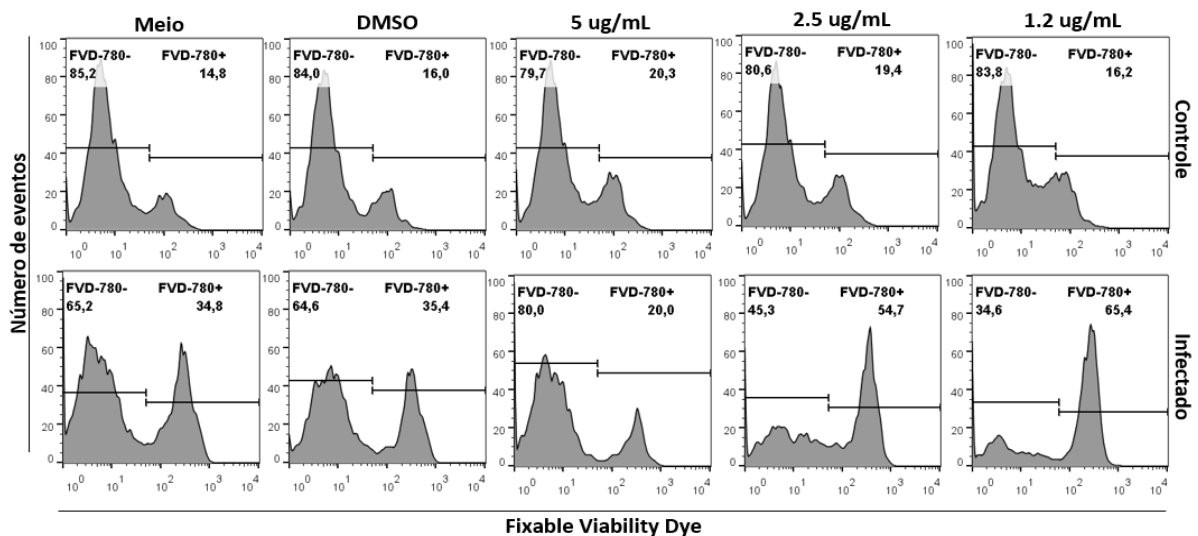


Figura 15. Avaliação da viabilidade de células dendríticas humanas infectadas pelo *T. gondii*, tratadas com diferentes concentrações do inibidor C75. Células Dendríticas humanas (hDC) foram cultivadas com taquizoítas na MOI 2. As células receberam pré-tratamento com C75, o inibidor da enzima Ácido Graxo Sintase, ou seu veículo (DMSO), 30 minutos antes da infecção, nas concentrações de 5ug/mL, 2,5ug/mL e 1,25ug/mL. Após 24 horas de infecção, as células tiveram sua viabilidade avaliada por citometria de fluxo. (A) Análise da viabilidade das hDCs controle, ou cultivadas com *T. gondii*, representada pelo percentual de células Fixable Viability Dye negativas (FVDneg), nas diferentes condições. (B) Histogramas representativo das populações Fixable Viability Dye 780 positivas (FVD+) e negativas (FVD-) em histograma. Dados representativos de 2 experimentos independentes, realizados em duplicata.

Também foi realizado um experimento para determinar a concentração a ser usada do inibidor da DGAT-1. As hDCs foram plaqueadas em meio com 2% de SFB e infectadas com *T. gondii* MOI 1, marcado com PKH-26 e CTFarRed, para avaliação do impacto da possível inibição dos CLs na sobrevivência do parasita. A fim de evitar efeitos diretos dos inibidores nos parasitas, os tratamentos foram realizados 1 hora após a infecção, nas concentrações de 10uM, 5uM e 2,5uM. Após 24 horas de infecção, foi realizada a análise por citometria de fluxo da viabilidade das hDCs, bem como da viabilidade dos parasitas. Pela coloração com hematoxilina e ORO foram avaliadas por microscopia de luz convencional a infectividade dos parasitas e a biogênese de CLs. Os dados apresentados correspondem a um único experimento feito em triplicata.

A contagem de CLs mostrou tendência de diminuição do número de corpúsculo por célula, em relação ao controle tratado apenas com o veículo, causada pelo tratamento com inibidor da DGAT na concentração de 5uM e, de forma mais acentuada, na concentração de 10uM, caindo de 13 CL/célula no grupo controle, para 6 CL/célula e 3 CL/cél, respectivamente. A aparente redução também foi observada por citometria de fluxo na porcentagem de células que apresentaram CLs, em ambas as concentrações (figura 16A e C).

Observamos a redução da taxa de infecção (em torno de 20%) nas células tratadas com 10uM do inibidor da DGAT-1, comparada a 29% nas células tratadas com veículo. Também parece ocorrer uma diminuição significativa no número de parasitas por célula, principalmente nas concentrações de 10uM e 5uM, em relação ao grupo controle (figura 16B e C).

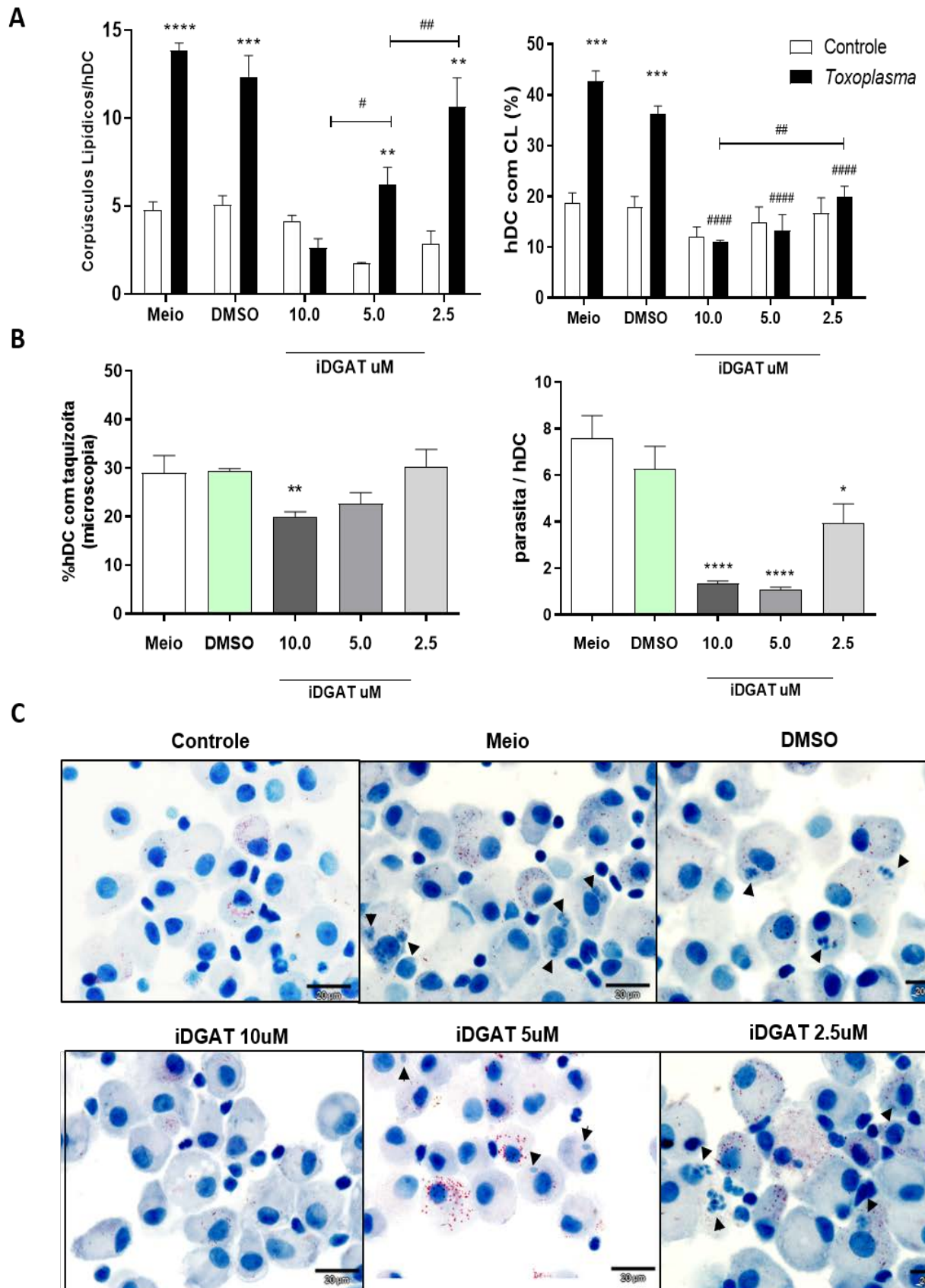


Figura 16. Determinação da concentração do inibidor da DGAT-1, em células dendríticas humanas infectadas pelo *T. gondii* (continua).

Células Dendríticas Humanas (hDC) foram cultivadas com taquizoítas duplamente marcados com PKH-26 (3uM) e Cell Tracer Far Red [CTFarRed (1uM)], na MOI 1 em triplicata. Após 1 hora, as células foram tratadas com o inibidor (A92500) da enzima Diacilglicerol Aciltransferase 1 (iDGAT) nas concentrações de 10uM, 5uM e 2,5uM, ou seu veículo (DMSO). Após 24 horas, as células foram citocentrifugadas, fixadas com formalina 4%, coradas e avaliadas por microscopia. Dados correspondem à média da contagem de 50 células de diferentes campos. O tratamento com iDGAT parece ter causado aparente redução na (A) média do número de corpúsculos lipídicos (CL) por célula (esquerda) e na porcentagem de células com CL (direita), nas células tratadas com 10uM de iDGAT em relação às células DMSO. Além disso, quando tratadas com iDGAT, (B) a porcentagem de hDC que apresentam parasitas (esquerda [10uM]) e o número médio de parasitas por células (direita [10uM e 5uM]) também pareceram apresentar redução em comparação com o grupo veículo (*). (C) Imagens representativas. As células foram coradas com Hematoxilina de Mayer e Oil Red-O (ORO) e analisadas em microscópio de luz convencional, em aumento de 100x, barra de 20µm. Setas indicando taquizoítas intracelulares. (*) em relação ao controle não infectado. (#) em relação ao controle infectado, tratado com o veículo. Média e DP, triplicata. # P <0,05; ## P <0,008 ### P <0,001; #### P <0.0001 ANOVA, Tukey. ** P 0,03; *** P <0,001; **** P <0,0001 Teste *t* Student. Dados de um experimento (n=1) realizado em triplicata.

Os dados de citometria de fluxo sugerem que o tratamento com o inibidor da DGAT 1 na concentração de 10uM aumentou a sobrevivência do parasita intracelular. O percentual de células dendríticas PKHposCTFarRedneg, que representam as células infectadas com parasita intracelular morto ou em processo de destruição, foi de 43% no grupo tratado enquanto no grupo controle (DMSO) foi de 35% (figura 17 A e B). Corroborando com os dados da taxa de infecção por microscopia, as hDCs infectadas tratadas com DMSO, que se encontram com parasita intracelular vivo (PKH-26posCTFarRedpos), apresentaram uma taxa de infecção de 30%, enquanto as células tratadas com inibidor da DGAT (10uM e 5uM) apresentaram uma porcentagem menor (22%) (figura 17 A e C) .

O tratamento com o inibidor da DGAT-1 não alterou a viabilidade das hDCs em relação ao controle, indicando assim, que o tratamento não foi tóxico para as células (figura 17, A e D).

Juntos esses dados inferem que o tratamento com o inibidor da DGAT-1 e C75 foi capaz de diminuir a biogênese de CLs, impactando na taxa de infecção e no número de parasitas por célula, sem de mostrar tóxicos para as hDCs.

Realizamos ainda um experimento para avaliar uma possível ação direta dos tratamentos sobre os taquizoítas. Para tal, os parasitas foram incubados durante 24 horas em meio suplementado com 2%SFB, contendo 10uM de A922500 ou 5ug/mL de C75. Após esse tempo os parasitas foram recolhidos e marcados com FVD para avaliação da viabilidade por citometria de fluxo. Os dados apresentados correspondem a um experimento único feito em triplicata. Os grupos experimentais apresentaram o mesmo percentual de parasitas vivos, em torno de 80%, inferindo assim que o tratamento não causou a morte dos parasitas (figura 18 A e B).

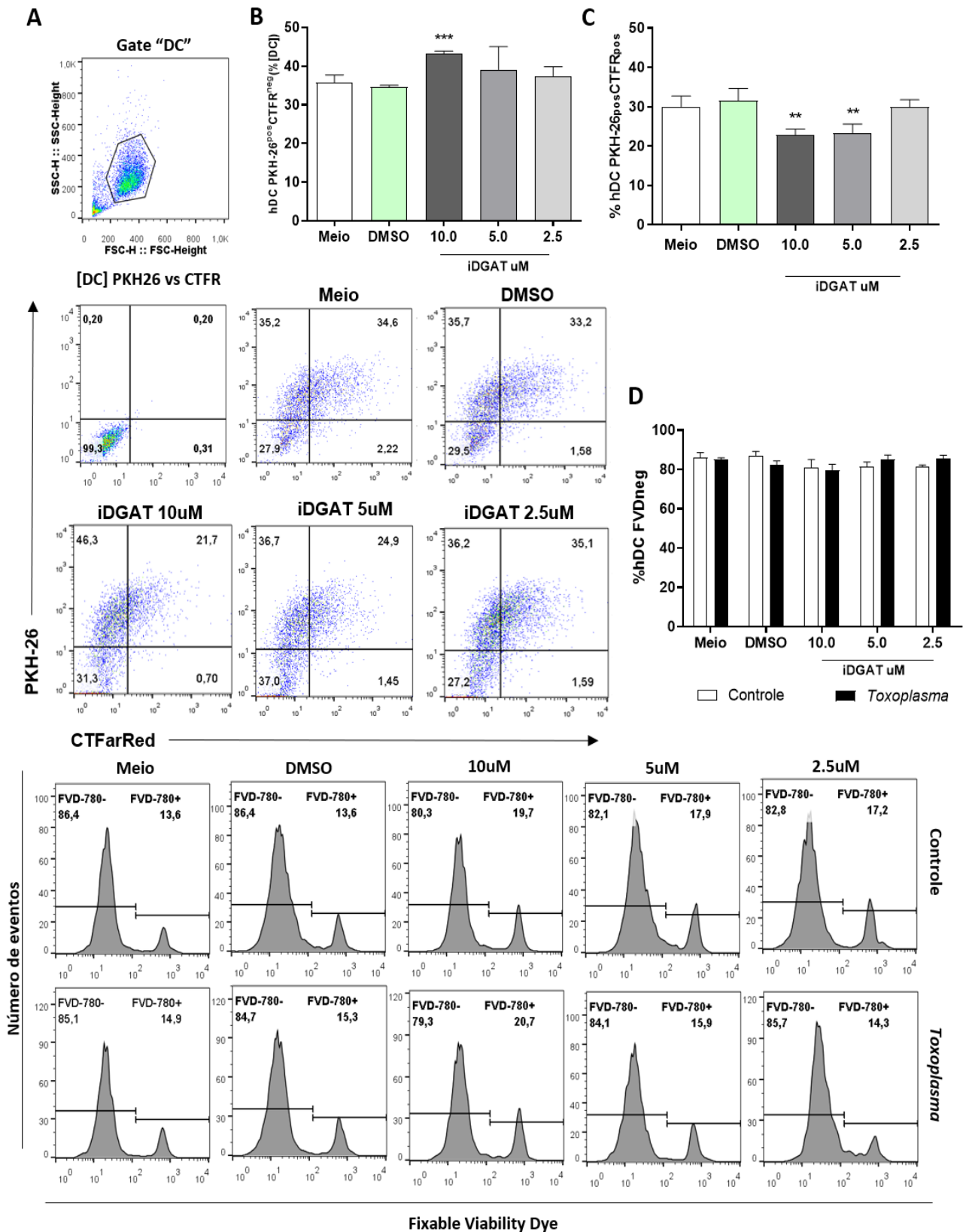


Figura 17. Avaliação da viabilidade do *T. gondii* e de células dendríticas humanas, tratadas com diferentes concentrações do inibidor da DGAT1 (continua).

Células Dendríticas Humanas (hDC) foram cultivadas com taquizoítas duplamente marcadas na MOI 1 e em triplicata. Após 1 hora, as células foram tratadas com o inibidor da enzima Diacilglicerol Aciltransferase 1 (iDGAT) nas concentrações de 10uM, 5uM e 2,5uM, ou seu veículo (DMSO). Após 24 horas de infecção, as células tiveram sua viabilidade avaliada por citometria de fluxo. (A) Estratégia da análise com a definição da população de hDC por tamanho e complexidade (gate "DC" em FSC x SSC), seguida das populações de hDC negativas para PKH26 e CTFarRed ([DC] PKH26⁻ x CTFarRed⁻) em gráficos de pontos e das populações Fixable Viability Dye 780 positivas (FVD+) e negativas (FVD-) em histograma. (B) Percentual de hDC com parasitas mortos (PKH26^{pos}CTFarRed^{neg}) e (C) a frequência de hDC com parasitas vivos (PKH26^{pos}CTFarRed^{pos}) ao longo do tempo. (D) Análise da viabilidade das hDCs representada pelo percentual de células FVDneg. Os resultados representam a média e o DP das triplicatas de um experimento (n=1). ** P≤ <0,008 *** P≤ <0,001 ANOVA, Tukey.

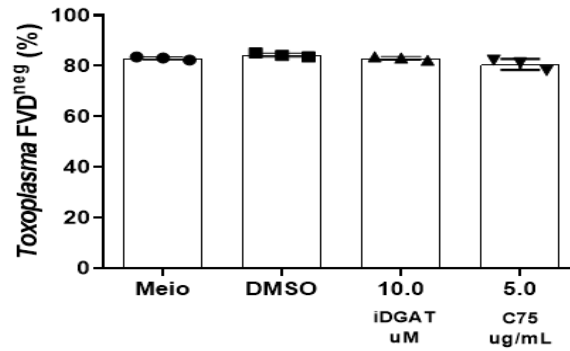
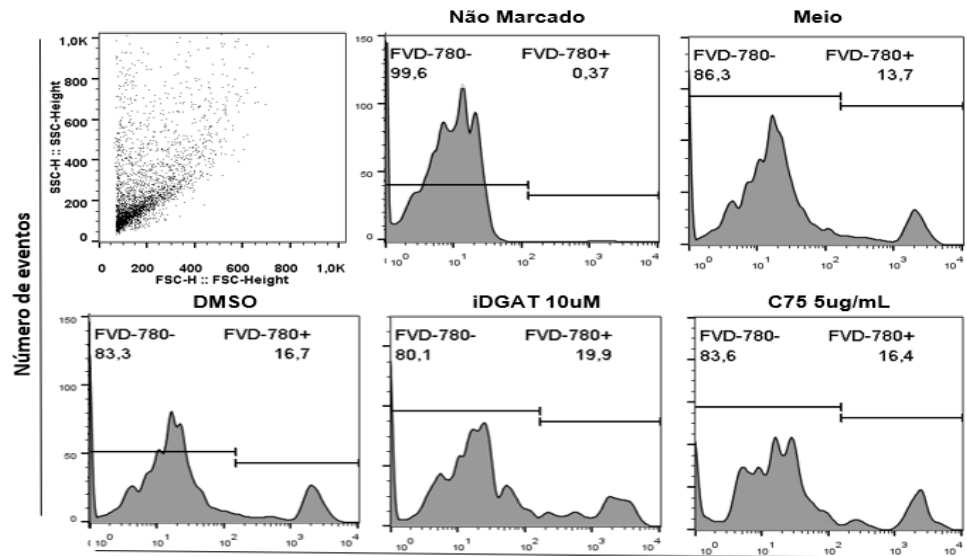
A**B**

Figura 18. Tratamento com C75 (inibidor da FAS) e A922500 (inibidor da DGAT-1) em taquizoítas. Parasitas foram mantidos em meio contendo o inibidor da enzima ácido graxo sintase, C75 [5ug/ml], ou o inibidor da enzima Diacilglicerol Aciltransferase 1 (A922500, iDGAT [10ug/ml]), ou seu veículo (DMSO). Após 24h de incubação, os parasitas foram marcados com o indicador de viabilidade Fixable Viability Dye e analisados por citometria de fluxo. (A) Análise da viabilidade dos parasitas representada pelo percentual de células FVD^{neg}, não apresentando diferença em relação aos parasitas não tratados (meio) e ao veículo (DMSO). (B) Histograma representativo do gráfico anterior, apresentando percentual da população FVD⁺ e FVD⁻. Dados de um único experimento (n=1) feito em triplicata.

4.7. Impacto da inibição da biogênese de CLs em hDCs infectadas pelo *T. gondii*

Para avaliar como a ausência de CLs impactaria a infecção de células dendríticas pelo *T. gondii*, hDCs foram plaqueadas 16-18 horas antes da infecção em meio contendo 2% de SFB ou de SFB delipidado (SFBd). A infecção das células foi realizada com taquizoítas duplamente marcados, na MOI 1 em triplicada. Após 1 hora de infecção, as células foram tratadas com o inibidor da FAS (C75 [5ug/mL]), ou com o inibidor da enzima DGAT 1 (A922500 [10uM]), ou seu veículo (DMSO). Após 24 e 48 horas pós-infecção, as células foram marcadas com FVD. Também foram feitos citoesfregaços em lâminas de vidro, corados com ORO e Hematoxilina, para análise da biogênese de CL, infectividade e replicação dos parasitas.

A avaliação da viabilidade e infectividade dos parasitas intracelulares por citometria de fluxo mostrou que o percentual de células com parasitas mortos (PKH-26^{pos}CTFarRed^{neg}) se manteve igual entre células tratadas e não tratadas, no tempo de 24 horas, com exceção do grupo tratado com C75 que apresentou redução estatisticamente significativa (22%) em relação ao veículo (32%). Após 48 horas de infecção, as células sem tratamento e as que receberam o veículo apresentaram um aumento na população de células com parasitas mortos (PKH-26^{pos}CTFarRed^{neg} aproximadamente 44%), enquanto as células tratadas com C75 se mantiveram semelhantes ao tempo de 24 horas, com 21% das células com parasitas vivos. Não houve diferença estatística entre as células tratadas com iDGAT ou SFBd (figura 19, A e C).

A frequência de células infectadas com parasitas vivos (PKH-26^{pos}CTFarRed^{pos}) foi menor nas células tratadas com C75 e iDGAT e nas células cultivadas com SFBd (em torno de 13%), em relação com o grupo DMSO e sem tratamentos (aproximadamente 26%). Após 48 horas de infecção, foi observada a redução do percentual de células PKH-26^{pos}CTFarRed^{pos} apenas nos grupos não tratado e veículo (10%), enquanto os grupos tratados não apresentaram alterações, comparados ao tempo de 24 horas (figura 19 B e C).

A viabilidade das células dendríticas não apresentou alterações no tempo de 24 horas, em nenhum dos grupos. Após 48 horas de infecção, as células cultivadas com *T. gondii* sem tratamento (62%), veículo (58%) e tratadas com C75 (79%) apresentaram redução da viabilidade em comparação com seu controle não infectado (aproximadamente 88%). Mesmo assim, o grupo SFBd (80%), iDGAT (78%) e C75

apresentaram viabilidade maior dentre as células infectadas em comparação com o grupo sem tratamento e veículo (figura 17, D e E).

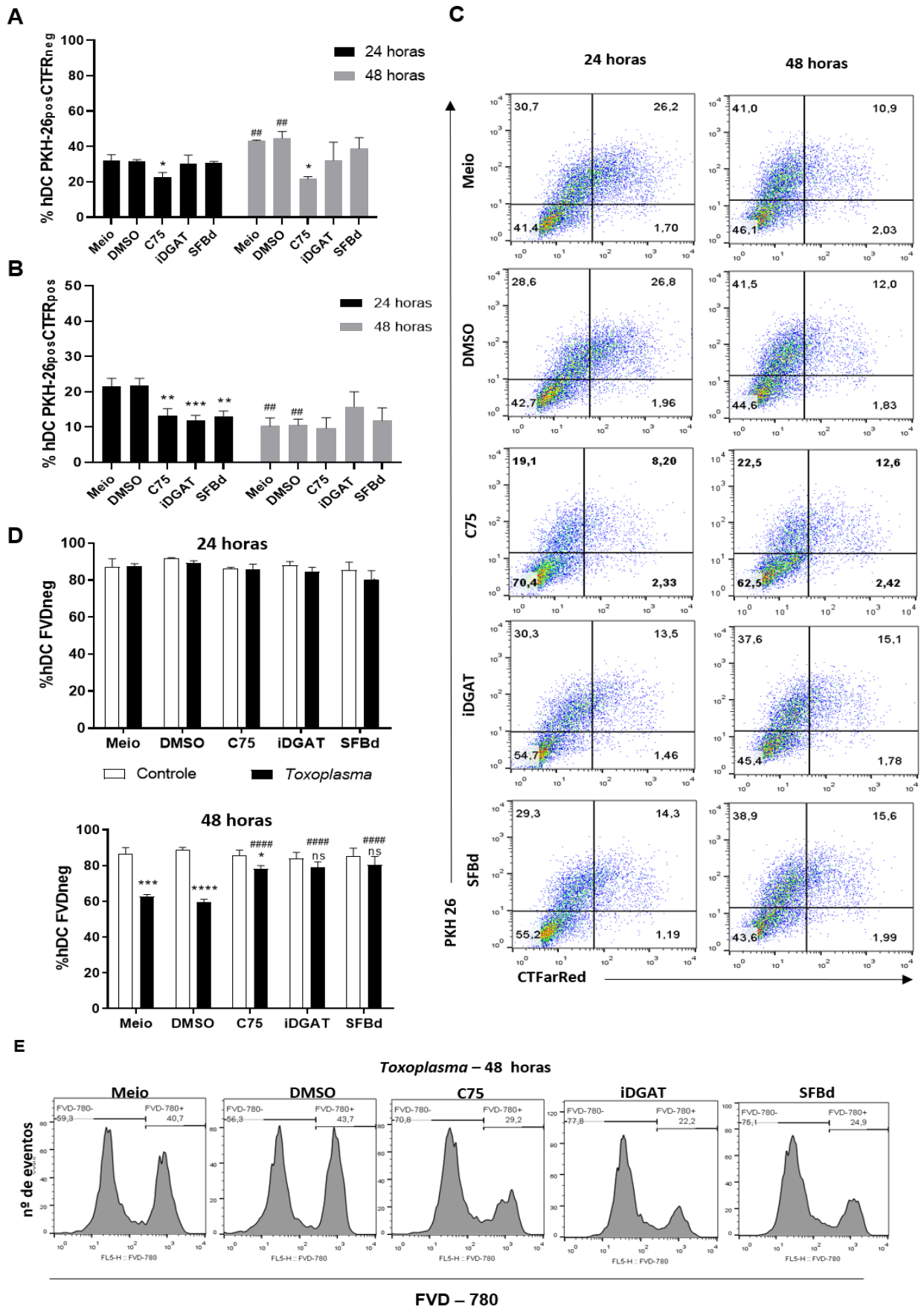


Figura 19. Efeitos da inibição farmacológica da biogênese de Corpúsculos Lipídicos na viabilidade durante a infecção de células dendríticas pelo *T. gondii* (continua).

Células Dendríticas humanas (hDC) foram cultivadas com taquizoítas duplamente marcadas com PKH-26 (3uM) e Cell Tracer Far Red [CT FarRed (1uM)] na MOI 1. As hDC foram mantidas *overnight* em meio contendo 2% de soro fetal bovino, ou soro fetal bovino delipitado (SFBd). Após 1 hora de infecção, as células foram tratadas com o inibidor da diacilglicerol aciltransferase 1 (A922500, iDGAT [10uM]) com o inibidor da enzima ácido graxo sintase (C75 [5ug/ml]), ou com o veículo (DMSO). (A-C) Avaliação da viabilidade dos parasitas intracelulares por citometria de fluxo, 24h e 48h pós-infecção. (A) A frequência de hDC com parasitas mortos (PKH-26posCTFarRedneg) se manteve semelhante entre os tratamentos em 24 horas, exceto pelo tratamento com C75 que mostrou redução do percentual em relação ao veículo (*). Em 48 horas os grupos meio e veículo apresentaram aumento do percentual quando comparado com 24 horas (#). O percentual de C75 se manteve menor que o do grupo veículo do mesmo tempo (*). (B) A frequência de hDC com parasitas vivos (PKH26posCTFarRedpos) em 24 horas se mostrou reduzida em todos os tratamentos em relação ao veículo, assim como no grupo SFBd em relação ao grupo meio (*). Em 48 horas, houve redução do percentual do grupo meio e veículo, quando comparado a 24 horas. Os resultados representam a média e DP de três experimentos independentes, em triplicata (* P ≤ 0,01; ** P ≤ 0,001; *** P ≤ 0,0004 One-way ANOVA. ## P ≤ 0,003 Teste t Student). (C) Gráficos de pontos representativos dos gráficos anteriores, apresentando as frequências das populações de hDC infectadas ([DC] PKH26 x CTFarRed), perante diferentes tratamentos, 24 horas e 48 horas pós infecção. (D) A viabilidade das hDCs é representada pelo percentual de células Fixable Viability Dye 780 negativas (FVDneg). Não houve diferença de viabilidade entre grupo *Toxoplasma* e Controle em 24 horas. Após 48 horas de infecção as células do grupo *Toxoplasma*, tratadas com o veículo, C75 e sem tratamento (meio) apresentaram redução da viabilidade em relação ao seu controle. Houve diferença estatística significativa entre o grupo *Toxoplasma* tratado e SFBd, em relação ao grupo veículo e meio (#). Os resultados representam a média e DP dos três experimentos independentes (* P ≤ 0,002; *** P ≤ 0,0003; **** P ≤ 0,0001; ns= não significativo; Teste t Student. ##### **** P ≤ 0,0001 One-way ANOVA). (E) Histograma representativo do gráfico anterior, apresentando a avaliação da população FVD positiva (FVD+) e negativa (FVD-), no grupo *Toxoplasma*, entre diferentes tratamentos, no tempo de 48 horas.

As células cultivadas com parasitas, que foram tratadas com iDGAT, C75 ou cultivadas com SFBd, apresentaram a diminuição da biogênese de CLs em comparação com o veículo e com as células cultivadas com SFB, tanto em 24 horas quanto em 48 horas pós infecção. O fenômeno é observado tanto pelo número médio de CLs por células (figura 20, A e E), quanto pelo percentual de células com CLs (figura B e C) ou a área vermelha por célula (figura C e E). A avaliação da área vermelha por células apresentou um pequeno aumento nas células tratadas com o C75, em relação ao seu controle não infectado, tanto em 24 horas, quanto em 48 horas (figura 20, C e E). Foi observada alteração no tamanho médio dos CLs, apenas no tempo de 48 horas, entre as células infectadas sem tratamentos (figura 20, D e E).

O tratamento com os inibidores e o cultivo com SFBd levou a uma redução no percentual de células infectadas em relação às células controle. Como já observado durante a cinética de infecção (figura 8D), há redução do percentual de células infectadas de 24 para 48 horas, enquanto as células tratadas não mostraram alteração na porcentagem de células infectadas de um tempo para outro (figura 21A). Quanto à média de CLs, as células sem tratamentos e com veículo apresentam o pico de replicação em 24 horas, com posterior redução em 48 horas pós infecção, enquanto as células tratadas com os inibidores e com SFBd apresentaram aumento do número de parasitas por células apenas 48 horas pós-infecção (figura 21B). A avaliação do número de parasitas por VP em 24 horas mostrou que a maioria possui 8 parasitas e há VPs com 16 parasitas, entre as células não tratadas e veículo. Este perfil foi alterado após 48 horas de infecção, onde a maioria dos VPs apresentam apenas 1 a 2 parasitas. De forma curiosa, células que receberam os inibidores apresentaram no máximo 4 parasitas por VP em 24 horas. Após 48 horas de infecção, observamos VPs com 8 parasitas e um pequeno número de células com 16 parasitas por VP (figura 21 C). Juntos esses dados mostram que o tratamento com C75, iDGAT e o uso do SFBd levou a uma redução da biogênese de CLs e, conseqüentemente, um atraso na replicação dos parasitas em comparação aos grupos não tratados e que receberam o veículo.

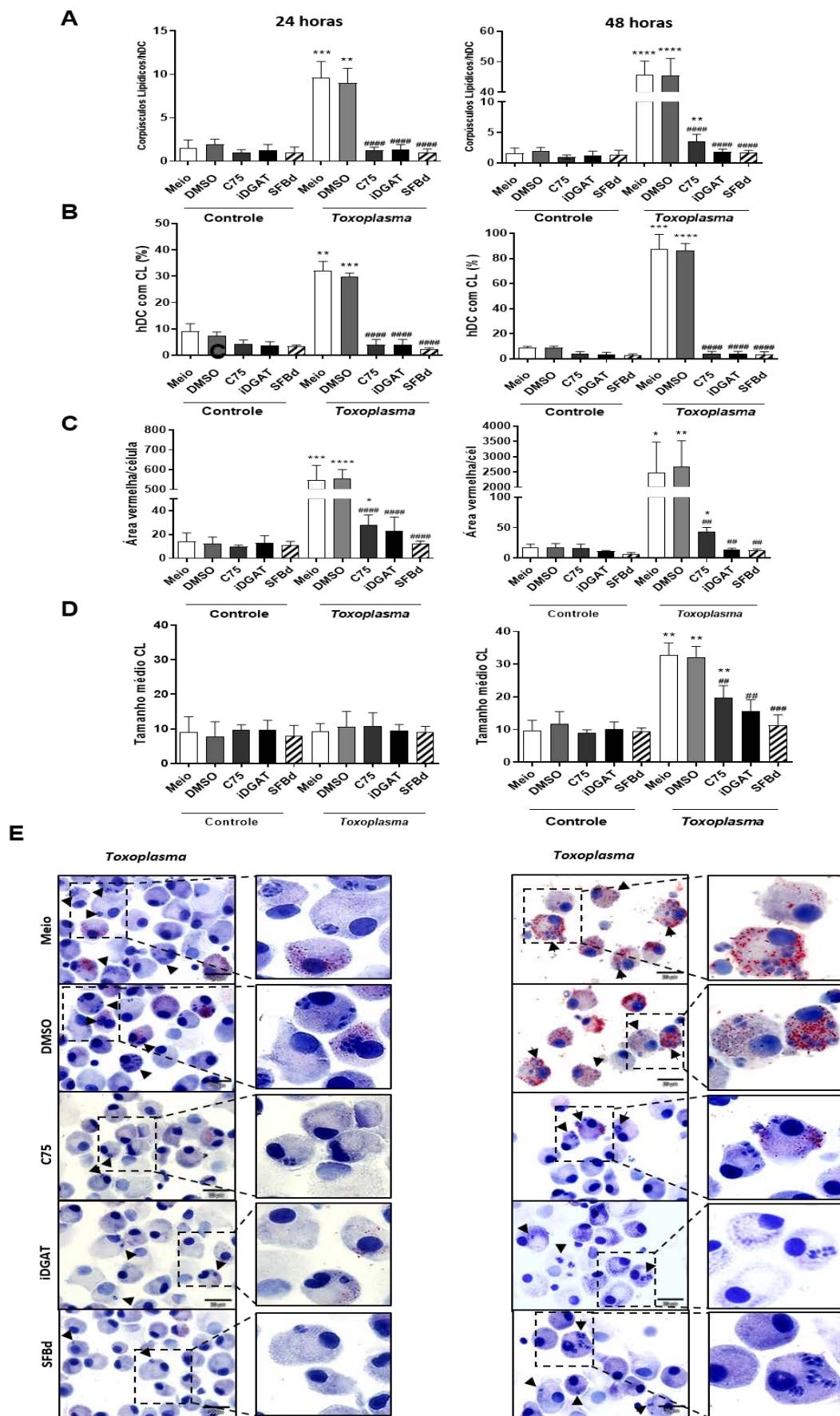


Figura 20. Inibição farmacológica da biogênese de Corpúsculos Lipídicos durante a infecção de células dendríticas pelo *T. gondii* (continua).

Dendríticas humanas (hDC) foram cultivadas com taquizoítas duplamente marcados com PKH-26 (3uM) e Cell Tracer Far Red [CT FarRed (1uM)], na MOI 1. As hDC foram mantidas *overnight* em meio contendo 2% de soro fetal bovino, ou soro fetal bovino delipitado (SFBd). Após 1 hora de infecção, as células foram tratadas com o inibidor da diacilglicerol aciltransferase 1 (A922500, iDGAT [10uM]) com o inibidor da enzima ácido graxo sintase (C75 [5ug/ml]), ou apenas com o veículo (DMSO). Após 24 horas e 48 horas, as células foram citocentrifugadas, fixadas com formalina 4%, coradas e avaliadas por microscopia. Os dados correspondem à média da contagem de 50 células de diferentes campos. (A) A média de CL por células, (B) o percentual de células com CL, (C) e a área vermelha por células apresentam aumento nas células cultivadas com o parasita (*Toxoplasma*), sem tratamento ou tratadas com o veículo, em comparação ao controle do mesmo tempo (*). Os tratamentos farmacológicos levaram à inibição da biogênese de CL no grupo *Toxoplasma*, assim como o uso do SFBd, quando comparado ao veículo e ao grupo meio (#), em ambos os tempos. O tratamento com C75 após 48 horas de infecção, promoveu uma inibição parcial no número de CL por células e pequeno aumento na área vermelha por célula, em 24 horas e 48 horas, quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo (*). (D) O tamanho médio dos CLs não se altera pelos tratamentos ou pela infecção após 24 horas. Após 48 horas é possível observar aumento do tamanho dos CLs no grupo *Toxoplasma* tratado com DMSO, C75 e sem tratamento, em comparação com os grupos 24 horas (*). Os CL dos grupos farmacologicamente tratados se mostraram menores do que o das células tratadas com DMSO ou sem tratamento após 48h de infecção (#). As análises da média da área vermelha por células e tamanho médio dos CL foram realizadas em 50 células, pelo software Image J. Dados apresentados em número de pixels. Resultados representam a média e o DP de três experimento independentes, em triplicata. (* $P \leq 0,02$ ** $P \leq 0,002$; *** $P \leq 0,0005$; **** $P \leq 0,0001$ teste t Student. ## $P \leq 0,001$; ##### $P \leq 0,0001$ One-way ANOVA). (E) Imagens representativas. As células foram coradas com Hematoxilina de Mayer e Oil Red-O (ORO) e analisadas em microscópio de luz convencional, em aumento de 100x, barra de 20 μ m. Setas indicando taquizoítas intracelulares.

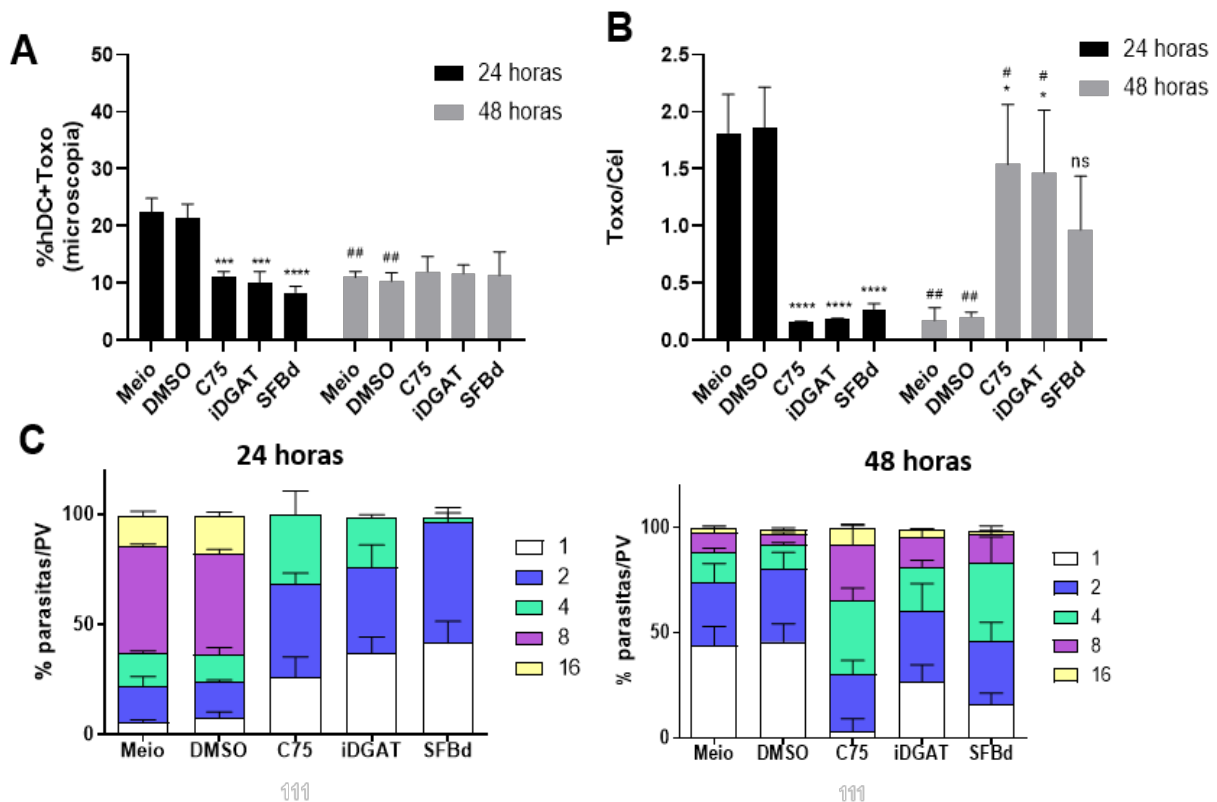


Figura 21. Efeitos da inibição farmacológica da biogênese de Corpúsculos Lipídicos na infectividade e replicação do *T. gondii* durante a infecção de células dendríticas. Células Dendríticas humanas (hDC) foram cultivadas com taquizoítas duplamente marcados com PKH-26 (3uM) e Cell Tracer Far Red [CT FarRed (1uM)] na MOI 1. As hDC foram mantidas *overnight* em meio contendo 2% de soro fetal bovino ou soro fetal bovino delipitado (SFBd). Após 1 hora de infecção, as células foram tratadas com o inibidor da diacilglicerol aciltransferase 1 (A92250, iDGAT [10uM]), o inibidor da enzima ácido graxo sintase (C75 [5ug/ml]), ou apenas com o veículo (DMSO). Após 24 horas e 48 horas, as células foram citocentrifugadas, fixadas com formalina 4%, coradas e avaliadas por microscopia. (A) O percentual de hDCs infectadas (B) e o número médio de parasitas por células, foi mensurado pela contagem de 50 células de diferentes campos, em cada replicata. Dados apresentam menor taxa de infecção nas células farmacologicamente tratadas, em comparação com o veículo, em 24 horas (*). O grupo não tratado (meio) e o veículo apresentaram diminuição da taxa de infecção com comparação com o tempo de 24 horas (#). É um possível observar um aumento no número de parasitas por células, nos grupos tratados, em comparação com o tempo de 24 horas (#) e com o veículo (*), que por sua vez apresentou diminuição em comparação com o tempo de 24 horas (#). Os dados representam a média e oDP de três experimento independentes, em triplicata (* P≤ 0,02; *** P≤ 0,0002; **** P≤ <0,0001; One-way ANOVA. # P≤ 0,01; ## P≤ 0,001; Teste t Student). (C) A taxa de replicação do parasita foi mensurada pelo número de parasitas por vacúolo parasitóforo (PV). Os dados apresentam média e DP de 100 vacúolos parasitóforos, de três experimento independentes.

4.8. Efeitos da suplementação com Ácido Oleico na infecção de células Dendríticas infectadas pelo *Toxoplasma gondii*

Uma vez que os parasitas pareceram demonstrar uma dependência do aporte lipídico da célula hospedeira para sua replicação, nos perguntamos se a suplementação da cultura com ácido graxo poderia recuperar os efeitos causados pela inibição da biogênese de CLs. Para isso, mantivemos o protocolo e as hDCs foram plaqueadas 16-18 horas antes da infecção em meio contendo 2% de SFB e infectadas com taquizoítas duplamente marcados com PKH-26 e CTFR na MOI 1. Após 1 hora de infecção, as células foram tratadas com o inibidor da enzima DGAT 1 (iDGAT[10uM]) e 50uM de Ácido Oleico conjugado a BSA. Para comparação, as células controle receberam o veículo (DMSO) e BSA nas mesmas concentrações utilizadas nos tratamentos. As células foram marcadas com FVD 24 horas após a infecção para avaliação da viabilidade das hDCs. Também foram feitos citoesfregaços em lâminas de vidro, corados com ORO e Hematoxilina, para análise da biogênese de CL, infectividade e replicação dos parasitas.

Ao avaliar a viabilidade e infectividade dos parasitas intracelulares por citometria de fluxo foi possível observar que o percentual de células com parasitas mortos (PKH-26^{pos}CTFaRed^{neg}) se manteve igual entre células tratadas e não tratadas (figura 22, A e C), enquanto o percentual de células infectadas com parasitas vivos (PKH-26^{pos}CTFarRed^{pos}) foi menor nas células tratadas com iDGAT (10%) em relação ao veículo (25%) (figura 22, B e C). A suplementação com Ácido Oleico das células tratadas com iDGAT pareceu recuperar a taxa de infecção, apresentando-se similar ao controle e maior do que as células tratadas apenas com iDGAT. Não houve alterações na viabilidade das células hospedeiras perante os tratamentos ou à infecção (figura 21D).

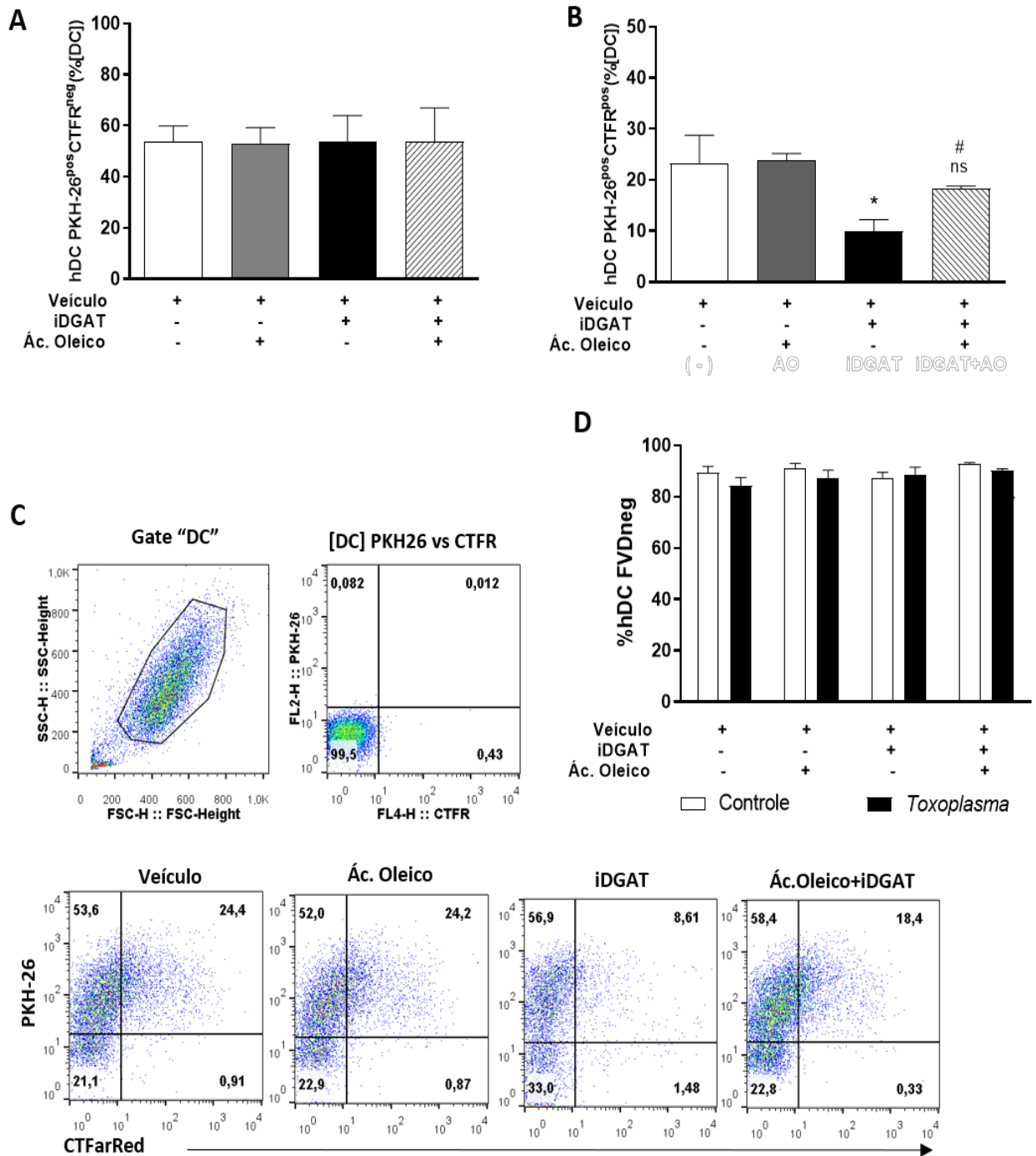


Figura 22. Influência da suplementação com Ácido Oleico na viabilidade de células dendríticas e do *T. gondii* (continua).

Células Dendríticas humanas (hDC) foram cultivadas com taquizoítas duplamente marcadas com PKH-26 (3uM) e Cell Tracer Far Red [CT FarRed (1uM)] na MOI 1. Após 1 hora de infecção, as células foram tratadas com inibidor da diacilglicerol aciltransferase 1 (A922500, iDGAT [10uM]), e ácido oleico [50uM], ou apenas com o veículo. As células foram avaliadas por citometria de fluxo, 24h e 48h pós-infecção. (A-C) Avaliação da viabilidade dos parasitas intracelulares. (A) A frequência de hDC com parasitas mortos (PKH-26posCTFarRedneg) se manteve semelhante entre os tratamentos em 24 horas. (B) A frequência de hDC com parasitas vivos (PKH26posCTFarRedpos), em 24 horas, se mostrou reduzida nas células tratadas com iDGAT, enquanto a suplementação com AO recuperou a infecção de forma similar ao controle (ns) e foi maior do que as células tratadas apenas com iDGAT (#). Os resultados representam a média e o DP de três experimentos independentes (* $P \leq 0,01$; ** $P \leq 0,006$; ns= não significativo One-way ANOVA). (C) Estratégia da análise com a definição da população de hDC por tamanho e complexidade (gate "DC" em FSC x SSC), das populações de hDC negativas para PKH26 e CTFarRed ([DC] PKH26 x CTFarRed) em gráficos de pontos. (D) A viabilidade das hDCs é representada pelo percentual de células Fixable Viability Dye 780 negativas (FVDneg). Não houve diferença de viabilidade entre grupo *Toxoplasma* e Controle em 24 horas. Os resultados representam a média e DP dos três experimentos independentes. (Teste *t* Student.)

Como o esperado, a avaliação da média de CLs por células e da área vermelha mostrou que o cultivo das hDCs com os parasitas levou ao aumento da biogênese de CLs, exceto pelas células tratadas com iDGAT onde o tratamento levou à inibição. As células tratadas com AO mostraram aumento da biogênese tanto nas células infectadas, quanto nas não cultivadas com parasita, na mesma proporção e o tratamento com AO levou à geração de CLs com maior área, quando comparado ao veículo (figura 23 F).

O tratamento dessas células com iDGAT levou a uma redução do número de CLs no controle, similar às células não tratadas, e causou uma pequena redução entre as células cultivadas com *T. gondii*, quando comparado às células apenas suplementadas com AO, havendo assim uma inibição parcial da biogênese nesse grupo (figura 23 D e E).

Quanto à infectividade e replicação do parasita, o tratamento com iDGAT levou à redução do percentual de células infectadas e da média de parasitas por célula. A suplementação com AO das células tratadas com iDGAT levou ao aumento da média de parasitas por células, e fez com que o percentual de células infectadas se assemelhasse ao das células controle (figura 23 A e B). O perfil de parasitas por vacúolo mostrou que a suplementação da cultura com AO, ajudou na replicação dos parasitas (maioria de VPs com 8 parasitas) em comparação com as células não tratadas (maioria de VPs com 4 parasitas). O tratamento com iDGAT levou à redução do número de parasitas por VP (maioria de VPs com 1-2 parasitas) e a suplementação desse grupo com ácido oleico ajudou na replicação dos parasitas, que aumentou o número de VPs com 4 parasitas e apresentou VPs com 8 parasitas (figura 23 C).

Juntos esses dados mostram que a adição de ácido graxos à cultura auxiliou a replicação do parasita, mesmo diante da inibição farmacológica da biogênese de CLs lipídicos, embora de forma parcial nesses casos.

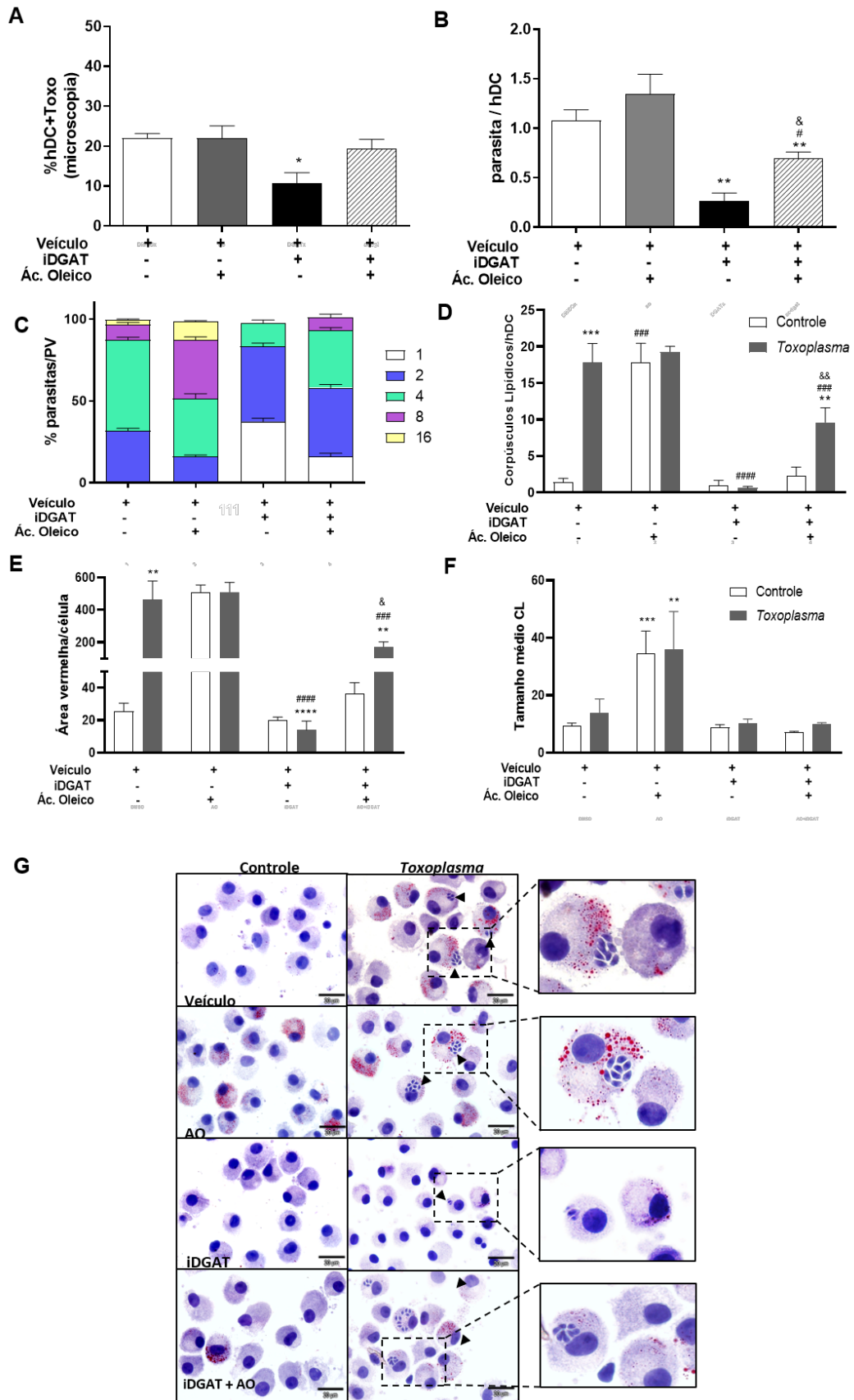


Figura 23. Efeitos da suplementação com ácido graxo na biogênese de CL e na replicação e infectividade do *T. gondii* (continua).

Células Dendríticas humanas (hDC) foram cultivadas com taquizoítas duplamente marcados com PKH-26 (3uM) e Cell Tracer Far Red [CT FarRed (1uM)] na MOI 1. Após 1 hora de infecção, as células foram tratadas com inibidor da diacilglicerol aciltransferase 1 (A922500, iDGAT [10uM]), e ácido oleico [50uM]), ou apenas com o veículo. Após 24 horas de infecção, as células foram citocentrifugadas, fixadas com formalina 4%, coradas e avaliadas por microscopia. Os dados correspondem à média da contagem de 50 células de diferentes campos. (A) O percentual de hDCs infectadas se mostrou menor nas células tratadas com iDGAT. (B) O número médio de parasitas por células se mostrou reduzido nos tratamentos, quando comparado ao veículo (*). As células tratadas com ácido oleico juntamente com iDGAT, mostraram um menor número de parasitas em relação ao veículo (**) e às células tratadas apenas com ácido oleico (#), porém a média foi maior quando comparada às células tratadas com iDGAT (&). Os resultados representam a média e o DP de três experimento independentes. (* $P \leq 0,01$; ** $P \leq 0,002$; One-way ANOVA). (C) A taxa de replicação do parasita foi mensurada pelo número de parasitas por vacúolo parasitóforo (PV). Os dados representam a média e o DP de 100 vacúolos parasitóforos, de três experimento independentes. (D) A média de CL por células, (E) e a área vermelha por células apresentaram aumento nas células cultivadas com o parasita, em relação ao grupo não infectado (*), em todas as condições experimentais, exceto nas células tratadas apenas com iDGAT. Todos os tratamentos levaram a uma redução nas células infectadas, em comparação com o veículo (#). As células tratadas com ácido oleico e iDGAT mostraram inibição parcial da biogênese de corpúsculo, em comparação com o grupo iDGAT (&). As análises da média da área vermelha por células e tamanho médio dos CL foram realizadas em 50 células, pelo software Image J. Os dados representam a média e DP em número de pixels de três experimentos independentes. (** $P \leq 0,002$; *** $P \leq 0,0005$; **** $P \leq 0,0001$ teste t Student. ## $P \leq 0,001$; ### $P \leq 0,0003$; ##### $P \leq 0,0001$ One-way ANOVA). (F) O tamanho médio dos CLs não se altera pela infecção ou entre os tratamentos, exceto pelas células tratadas com ácido oleico, que apresentaram um aumento em relação ao veículo. Resultados apresentam média e DP de três experimento independentes. (One-way ANOVA). (G) Imagens representativas. As células foram coradas com Hematoxilina de Mayer e Oil Red-O (ORO) e analisadas em microscópio de luz convencional, em aumento de 100x, barra de 20µm. Setas indicando taquizoítas intracelulares.

4.9. Expressão de moléculas de superfície induzida pela infecção com *T. gondii*

Para investigar a modulação do fenótipo das hDCs sem CLs e infectadas, avaliamos por citometria de fluxo a expressão de moléculas relacionadas com a apresentação de antígenos (MHC de classe I [MHC I] e de classe II [MHC II]), moléculas coestimuladoras CD86 e CD273, de ativação CD83 e de migração CCR7 (CD197). As células foram infectadas com taquizoítas na MOI 1 e avaliadas após 24 horas de infecção.

A infecção induziu uma tendência de aumento de células positivas para MHC II e aumentou as células positivas para CD83 (figura 24A). A análise da média da intensidade de fluorescência (MIF), apresentou tendência de aumento de MHC II, em células infectadas. O tratamento com o inibidor da DGAT 1 reduziu a intensidade de fluorescência do MHC I em células infectadas (figura 24B).

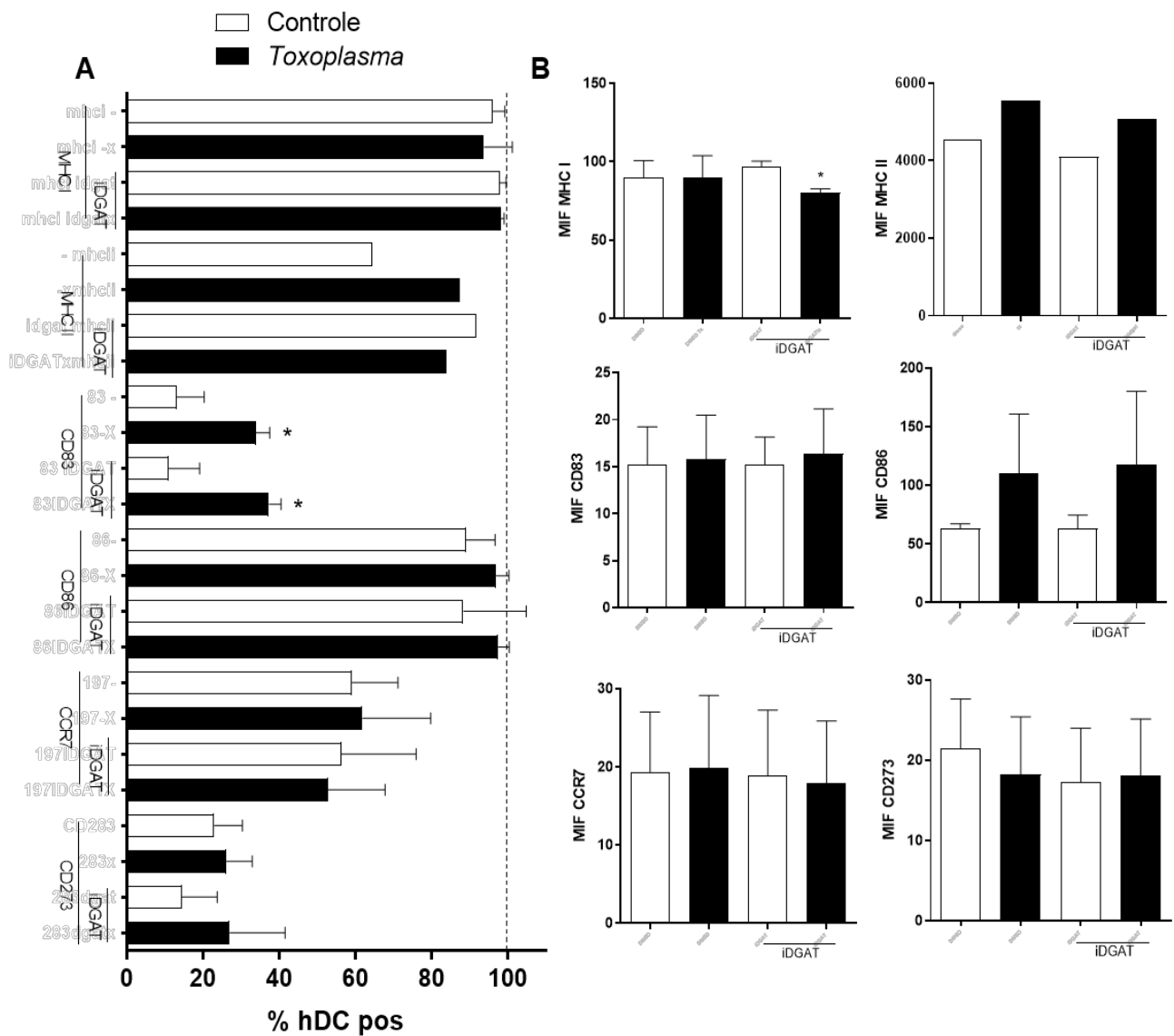


Figura 24. Expressão de moléculas de superfície de hDC infectadas com taquizoítas de *T. gondii* por 24 horas. Cultura de células dendríticas humanas foram infectadas com taquizoítas na MOI 1, por 24 horas. As DCs foram recolhidas, bloqueadas, fixadas e incubadas com os anticorpos anti MHC I, MHC II-APC, CD83-FITC, CD86-PE, CD273-PerCP-Cy5.5 e CCR7-PerCP-Cy5.5. A figura A mostra a expressão das moléculas de superfície em % de DC positivas para cada molécula. Em B temos os dados de média intensidade de fluorescência (MIF). Nos gráficos são apresentados dados de 1 experimento (n=1) com MHC II e média das de três experimentos independentes (n=3) com os demais marcadores. Os dados representam a média e DP (* P≤ 0,02 teste t Student).

5. DISCUSSÃO

O *Toxoplasma gondii* é um parasita altamente adaptado, capaz de infectar e persistir, virtualmente, em todos os tipos de células nucleadas de animais de sangue quente (revisto em Sanecka e Frickel, 2012). Dentre as células sanguíneas, observa-se uma predileção do *T. gondii* à infecção de macrófagos e células dendríticas (DC), células permissivas à divisão por endodiogenia dos parasitas (Delgado Betancourt et al., 2019). O sucesso da infecção irá depender da capacidade do parasita de se estabelecer na célula hospedeira, conseguindo o aporte necessário para sua sobrevivência e replicação. Essa replicação requer um aumento substancial na quantidade de lipídios para formação de estruturas do novo parasita. Desta forma, o *T. gondii* precisa ser capaz de modular o metabolismo do hospedeiro, desviando para o vacúolo parasitóforo os nutrientes e componentes necessários para sua manutenção, principalmente aqueles que não é capaz de produzir, como o colesterol (Nishikawa et al., 2005).

Os corpúsculos lipídicos (CLs) são tidos como a principal fonte lipídica para diferentes patógenos, como *Mycobacterium bovis* BCG, *M. tuberculosis*, *M. lepre*, *C. pneumonia*, *Plasmodium berguei*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Leishmania* sp (revisto em Pereira-Dutra et al., 2019). Já foi demonstrado que o *T. gondii* é capaz não só de induzir a produção dos CLs em diferentes modelos (macrófagos murinos, fibroblastos humanos, células de músculos esquelético), mas também de trazê-los para próximo do PV e internalizar seus lipídios (Gomes et al., 2014; Mota et al., 2014; Hu et al., 2017, Nolan et al., 2017, 2018). Qual seria o papel de fato dos CLs, principalmente durante a infecção de células do sistema imune é faz uma pergunta atual e relevante. Enquanto alguns autores vem demonstrando papéis dessa organela na sobrevivência do parasita intracelular (Nolan et al., 2017, 2018), outros demonstraram que os CLs têm participação importante na resposta imunológica contra o parasita (Haldar et al., 2013; Mota et al., 2014). A maioria destes trabalhos foram realizados utilizando modelos de células murinas, ou células não imunes, e pouco se sabe sobre os eventos que ocorrem durante o desenrolar da infecção em células humanas.

Diante disso, o objetivo inicial deste trabalho foi identificar, em modelo de células dendríticas humanas, qual seria a função dos CLs na sobrevivência do parasita intracelular e na resposta imune contra ele. Para isso, células dendríticas humanas

(hDCs) foram infectadas com taquizoítas da cepa RH, duplamente marcados com PKH-26 e Cell Tracer Far Red (CTFarRed), e avaliados posteriormente por citometria de fluxo e microscopia de luz, em diferentes tempos. Dupont e col. (2014) demonstraram que a infecção ativa de DCs murinas pelo *T. gondii* é de suma importância para que ocorra a maturação dessas células, tornando-as capazes de efetuar sua principal função durante a infecção: ativar células T *naive*. Neste trabalho foram utilizados taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*, a mais virulenta dentre as classicamente descritas, na tentativa de termos o maior número possível de células ativamente infectadas e os efeitos desse processo.

Nossos achados mostraram que células dendríticas humanas são permissivas ao *T. gondii*. O parasita foi capaz de estabelecer a infecção e replicar nesse tipo celular. hDCs infectadas com taquizoítas da cepa RH, MOI 1, apresentaram pico de infecção após 24 horas de infecção, apresentando em torno de 30% de células infectadas com parasitas viáveis, seguido de redução no número de células infectadas e de parasitas por células após 48 horas de infecção. De forma interessante, a redução do número de parasitas por células culminou com a perda da viabilidade das DCs. Foi possível observar que, quanto maior a MOI utilizada, maior é o percentual de DCs infectadas e maior é a taxa de morte das hDCs. Além disso, a análise da população FVD_{pos} (morta), mostrou que sua formação é em suma de células dendríticas infectadas com parasitas mortos (PKH-26^{pos}CTFarRed^{neg}).

Podemos inferir que a infecção pelo *T. gondii* acabou levando à morte da célula hospedeira que, conseqüentemente, acarretou a morte do parasita intracelular. Juntos esses dados poderiam indicar que, dentro do prazo de 48 horas de infecção, os parasitas foram capazes de completar seu ciclo de replicação. Ao alcançar o limite de replicação dentro da células hospedeira, o parasita causa lise destas células a fim de infectar as células vizinhas (Black; Boothroyd, 2000). A perda da viabilidade apenas após 48 horas de infecção pode ser justificado, uma vez que, de acordo com Radke e White (1998), a divisão do parasita ocorre entre 6-8 horas, sendo encontrado vacúolos com até 32 parasitas em fibroblastos humanos infectados, até que a célula seja rompida e o parasita infecte às células vizinhas. O aumento da MOI, aumentou também o número de parasitas por células, o que resultou da perda precoce da viabilidade em células infectadas com MOI 2. Além disso, algumas células infectadas podem ter identificado a presença do parasita em seu citoplasma e terem desencadeado a maquinaria de apoptose celular, o que justificaria a menor viabilidade

entre as células que apresentavam marcação para PKH-26 (foram infectadas)(Lima & Lodoen, 2019).

Credita-se à IL-12 o papel chave para a imunidade contra o *Toxoplasma gondii*, por promover a produção de interferon gama (IFN γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), por células NK e linfócitos que participam da resposta efetora do hospedeiro contra a infecção (Tosh et al., 2016). A infecção experimental por *T. gondii* revelou que DC esplênicas são a células iniciais que produzem IL-12, independente de IFN γ ou de sinais de linfócitos T (Reis e Sousa et al., 1997). Entretanto, estes estudos utilizaram a injeção de antígenos de *T. gondii*, não definindo a função dos taquizoítas vivos na indução da imunidade específica, além de terem sido realizadas em modelos murinos. Diferentemente dos estudos em camundongos, investigações com células dendríticas humanas, derivadas de monócitos, revelaram que DC secretam IL-12 em resposta a taquizoítas vivos, não a taquizoítas mortos e apenas da presença de linfócitos (Leiva Carlos S Subauste & Wessendarp, 2017).

Neste estudo, decidimos traçar o perfil de citocinas produzidas pelas DCs humanas, durante a infecção pelo *T. gondii*. Observamos que a infecção induziu a produção de interleucina (IL) 6, IL-8, TNF α , Fator Inibidor de macrófagos (MIF) e proteína induzida por IFN- γ (IP10/CXCL10). Ibrahim e col. (2012) identificaram duas populações distintas de células dendríticas no fígado de camundongos e humanos, que podem ser distinguidas pelo conteúdo lipídico: uma com alto e outra com baixo teor lipídico. As DCs com maior conteúdo lipídico produziram níveis mais altos de citocinas inflamatórias e quimiocinas, dentre elas IL-6, IL-8 e IP-10, quando comparadas a células dendríticas de baixo conteúdo lipídico.

TNF α é uma citocina pró-inflamatória produzida na fase aguda, de importância na infecção pelo *T. gondii* por atuar de forma sinérgica com o IFN γ para o controle da infecção pelo parasita (Tosh et al., 2016). Em modelos murinos de toxoplasmose ocular, o tratamento com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ ou anti-TNF- α resultou em um aumento dramático no processo inflamatório, patologia no epitélio pigmentar da retina e cicatrizes retinocoroidianas (Iqbal, 2016).

Durante seus estudos, Jebbari e col.(1998) demonstraram que, na ausência de IL-6, camundongos são incapazes de iniciar uma rápida resposta pró-inflamatória contra o *T. gondii*, permitindo o aumento da proliferação do parasita. O aumento da mortalidade de camundongos knockout para IL-6 pode ser diretamente devido a esse

aumento da carga parasitária. Esses achados sustentam a importância da IL-6 na resposta imune contra o parasita.

Nós também detectamos um aumento de IL-8, uma citocina com capacidade quimioatraente e pró-inflamatória. As DCs derivadas de monócitos produzem IL-8 e expressam os receptores funcionais de IL-8, CXCR1 e CXCR2 (Alfaro et al., 2011). Durante a fase aguda da infecção pelo *T. gondii* é relatado o aumento da concentração sérica de IL-8 no sangue de pacientes (Rostami Nejad et al., 2011).

A IP-10, ou CXCL10, é uma quimiocina secretada por vários tipos celulares em resposta aos estímulos por IFN- γ . Essa quimiocina se liga ao receptor CXCR3 (CXCR3) e a ela se atribui vários papéis, tais como quimiotaxia de monócitos, macrófagos, células T, células NK e células dendríticas (Yoneyama et al., 2002). Tanto IP-10 quanto seu receptor foram descritos como importantes para a proteção do hospedeiro durante a infecção pelo *T. gondii*. Durante a infecção, IP10 tem como principal papel promover o recrutamento de linfócitos para tecidos em que o parasita se encontra. Nossos dados mostraram um aumento significativo nos níveis de IP-10 a partir de 12 horas de infecção, mantendo-se elevado até 48 horas. Na literatura, os níveis de IP-10 se mostraram aumentados no cérebro e retina de camundongos com toxoplasmose cerebral ou ocular, respectivamente (Norose et al., 2011; Wen et al., 2010). Além disso, camundongos knockouts para o receptor CXCR3 tiveram maior susceptibilidade à toxoplasmose ocular, provavelmente devido à diminuição do número de células T CD4⁺ e CD8⁺ e da produção de IFN γ na retina e ao aumento da replicação dos parasitas (Snider et al., 2009).

O fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) também tem sido implicado como crítico para a resistência do hospedeiro contra o *T. gondii*. MIF é uma citocina pró-inflamatória com atividade enzimática. Nós detectamos aumento da produção de MIF após 24 horas de infecção. Demonstrou-se que o MIF está envolvido em respostas imunes inatas e adaptativas, estimulando a produção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α e IL-8. DCs maduras estimuladas por TNF α tem seus níveis de produção de MIF aumentado (Popa et al., 2006). Descobriu-se que a MIF sustenta a sobrevivência de macrófagos e a função pró-inflamatória, suprimindo a apoptose dependente de ativação e de p53 (Liu et al., 2019). Flores e col. (2008) demonstraram o papel essencial de MIF para controlar a carga parasitária e a sobrevivência em um modelo de infecção sistêmica por *T. gondii*.

Em acordo com a literatura, os parasitas foram capazes de induzir a biogênese de corpúsculo lipídicos 24 horas pós-infecção, aumentando consideravelmente após 48 horas. Nossos achados não seguem o padrão de biogênese mostrado em fibroblastos humanos infectados, onde o número de CLs na célula hospedeira flutua, aumentando progressivamente, com um pico coincidente com o primeiro ciclo de replicação do parasita (~ 8 h pós-invasão), declinando após esse período de tempo (Nolan et al., 2017). Porém, corrobora com os dados de estudo realizados em macrófagos murinos e células musculares esqueléticas, que apresentaram aumento da biogênese após 24 h e 48h de infecção (Gomes et al., 2014; Mota et al., 2014).

Após 24 horas de infecção, observamos que havia muitas células infectadas, porém sem CLs presente. A análise de parasitas por PV nessas células, mostrou que células com CLs presentes apresentavam um menor número de parasitas por PV, enquanto as células sem CLs mostravam PV com mais de 8 parasitas em sua maioria. Nolan e col. (2017) demonstraram dados similares em seus experimentos de infecção de fibroblastos humanos pelo *T. gondii*, onde as células contendo vacúolos com 1 a 4 parasitas apresentam um número maior de CLs em comparação ao controle não infectado, o que não foi visto em células com 6 ou 16 parasitas por VP. No mesmo artigo, foi visto que o *T. gondii* era capaz de retirar lipídios diretamente dos CLs, internalizá-los e armazená-los nos seus próprios CLs (TgCLs). Pernas e col. (2018) demonstraram em fibroblastos humanos que a infecção pelo *T. gondii* induz lipofagia nas primeiras 12 horas de infecção, onde temos aumento do número de CLs colocalizados com moléculas de LC3 e da presença de ácidos graxos livres. Após 24 horas de infecção esse número decai significativamente, sendo um indicativo de modulação do metabolismo lipídico do indivíduo para armazenamento. Somado a isso, Hu e col., demonstraram recentemente, no mesmo modelo, que o *T. gondii* é capaz de reduzir a expressão da enzima ATGL, envolvida na lipólise de TAGs, após 24 horas de infecção. Em acordo com esses achados, Nolan e col. (2017) mostraram que após 9 horas de infecção ocorre o aumento da expressão do gene da enzima DGAT2, responsável pela conversão de diacilglicerol em triacilglicerol, que irá ser armazenado na forma de CLs, e da ADRP, proteína estrutural dos CLs. Esses dados apoiam nossos achados de que o tamanho dos CLs aumenta após 48 horas de infecção. Dessa forma, nossos resultados indicariam um possível consumo dos CLs das células hospedeiras pelo parasita, principalmente nos tempos iniciais, visando sua

replicação. Em tempos mais tardios, ocorreria a indução do armazenamento de lipídios nos CLs.

A nossa avaliação do perfil de biogênese de CLs mostrou que hDCs infectadas com parasita na MOI 1 possuem pico de produção de CLs mais tardio, em 48 horas, enquanto células infectadas com parasita na MOI 2 apresentam pico de produção já em 24 horas. Além disso, a maior biogênese de CLs se correlacionou com o início da perda da viabilidade que, de acordo com os nossos dados, seria o momento em que o parasita sairia da célula hospedeira para infectar as células vizinhas. Deste modo, poderíamos inferir que essa correlação entre perda da viabilidade e biogênese de CLs poderia ser um mecanismo de sobrevivência do parasita, a fim de induzir os CLs nas células vizinhas, preparando-as para sua infecção. De todo modo, a observação de CLs em praticamente 100% das células após 48 horas de infecção sugere um mecanismo parácrino de indução da biogênese, uma vez que células sem parasitas apresentam CLs em 48 horas. Experimentos utilizando o sobrenadante de culturas de DCs infectadas, avaliando se ocorrerá a biogênese dos CLs nessa condição, poderia responder a essa pergunta e indicar possíveis fatores solúveis no meio que desencadeie esse fenômeno em células vizinhas.

As vias pelas quais a biogênese de CLs é induzida, ainda é pouco conhecida. Na infecção de DCs pelo *T. gondii*, essa lacuna é ainda maior. Mecanismos dependentes de TLR2 têm sido implicados na formação de CLs desencadeada por *Mycobacterium bovis* (BCG), *Mycobacterium leprae*, *T. cruzi*, *Chlamydia pneumonia*, *Histoplasma capsulatum* e lipossomas esquistossomóticos (revisto em Vallochi et al., 2018). Almeida e col. (2009) demonstraram, durante a infecção por *M. bovis* BCG, que o reconhecimento por TLR2 regula a expressão e ativação do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) e induz a formação de CLs. A inibição do PPAR γ pelo seu antagonista reduziu significativamente o número de CLs nos macrófagos infectados pelo BCG, indicando seu envolvimento na biogênese das CLs durante a infecção. Em macrófagos e células dendríticas, o PPAR γ provou ser um regulador chave do metabolismo lipídico e dos genes inflamatórios (Szeles et al., 2007). O PPAR γ é um membro da família de receptores nucleares ativados por lipídios que regula diretamente vários genes que participam da captação de ácidos graxos, armazenamento de lipídios e resposta inflamatória. O envolvimento do PPAR γ na biogênese dos CLs pode ocorrer de diferentes formas: PPAR γ regula a expressão de genes relacionados à síntese lipídica e formação dos CLs, como a

enzima ácido graxo sintase e ADRP (Gao e Serrero, 1999; Larigauderie et al., 2004); aumenta o armazenamento de TAG e colesterol (Gao e Serrero, 1999; Larigauderie et al., 2004) e pode aumentar o influxo de lipídios exógenos devido ao aumento da expressão do receptor de eliminação (Almeida et al., 2014). Dados do grupo não publicados indicam o aumento de PPAR γ durante a infecção de DCs humanas pelo *T. gondii* (figura 25).

Embora não tenha sido demonstrado especificamente em DCs, o TLR2 pode ser ativado em resposta ao *T. gondii*. TLR2 e TLR4 sinalizam após a ligação de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), no entanto, a ausência única de TLR2 ou TLR4 em DCs não reduz a produção de IL-12 em resposta a antígeno solúvel do *T. gondii* (STAg) (Sanecka and Frickel, 2012). Em camundongo, a imunidade inata é mediada pelo reconhecimento da profilina do *T. gondii* pelo TLR11 e TLR12, que é o mecanismo dominante que impulsiona a produção de IL-12. Notavelmente, o TLR11 não é funcional em humanos e o TLR12 não existe no genoma humano, indicando mecanismos alternativos de detecção de parasitas em células humanas (Sasai et al., 2018). Dupont & Hunter (2014) demonstraram que a infecção ativa do parasita em DCs é necessária para que se gere uma resposta imune competente, com geração de linfócitos T CD8⁺ específicos. A partir da literatura e dos nossos dados, podemos hipotetizar que a ativação e indução de CLs pelo *T. gondii* em DCs possa ocorrer durante o processo de infecção ativa, pelo reconhecimento através de um receptor de reconhecimento de padrão, ou ainda pelo processo de replicação (figura 25).

Um dos papéis atribuídos aos CLs durante a infecção por parasitas, é seu uso como fonte lipídica. Não se sabe se isso se aplica ao modelo de DCs humanas. Experimentos de inibição da biogênese de CLs e posterior análise da viabilidade do parasita e taxa de infecção das células, poderiam indicar a veracidade dessa hipótese. Com esse objetivo, as hDCs foram tratadas com o C75, um inibidor da enzima ácido graxo sintase (FAS), responsável pela síntese de ácidos graxos, e com o inibidor A92500 da diacilglicerol Acil-CoA transferase 1 (DGAT-1), enzima responsável pela conversão de diacilglicerol em triacilglicerol. Os tratamentos resultaram na diminuição tanto da biogênese de CLs, quanto no número de células infectadas. Os dados da média de parasitas por célula também apresentaram redução após 24 horas de infecção em comparação com o controle, inferindo assim que a redução do número de CLs produzidos na célula hospedeira afeta diretamente a replicação do parasita e, conseqüentemente, o seu ciclo lítico e infecção das células vizinhas. Desta forma,

podemos inferir que a inibição dos CLs acabou dificultado a replicação do parasito, fazendo com que ocorresse de forma mais lenta. Este mesmo fenômeno foi mostrado por Nolan e col., (2017, 2018) durante a infecção de fibroblastos humanos, onde a replicação do *T. gondii* foi reduzida em células hospedeiras que foram depletadas de CLs ou prejudicadas na lipólise de TAG ou, ainda, no catabolismo de ácidos graxos. Nossos dados corroboram com a ideia de que o parasita use os CLs como fonte de lipídios para sua replicação, uma vez que já foi visto que ele é capaz de acessar lipídios armazenados no CL do hospedeiro e incorpora esses lipídios em suas próprias membranas e CLs.

Embora a inibição dos CLs tenha sido bem significativa, o percentual de células com parasitas viáveis se manteve, mesmo após 48 horas de infecção e, mesmo que de forma reduzida em comparação ao controle, o parasita ainda foi capaz de replicar. Como as células foram cultivadas em meio com 2% de soro fetal bovino, provavelmente o parasita pode obter lipídios suficientes para mantê-lo viável por algum tempo, uma vez que o número de células infectadas com parasitas mortos (PKH-26^{pos}CTFR^{neg}) não sofreram grandes alterações, e replicam mesmo que de forma limitada. Pensando nisso, realizamos experimentos utilizando o soro fetal bovino delipidado na cultura, o que resultou em grande número de PVs com apenas 1 a 2 parasitas cada. Embora os parasitas tenham parecido replicar menos nessa condição em comparação com os efeitos dos inibidores, ainda sim, em 48 horas pós infecção, os parasitas foram capazes de se replicar. Dessa forma, a permanência do parasita vivo pode ter sido possível devido à presença de ácidos graxos produzidos pelas células hospedeiras antes da inibição, que ainda permaneceriam disponíveis, sendo que o *T. gondii* não sintetiza seu próprio lipídio, mas o retira da célula hospedeira e o modifica através das enzimas que possui (Coppens, 2006; Lige et al., 2013a; Nolan et al., 2017a; Robibaro et al., 2002).

Com a inibição da DGAT, a produção de triacilglicerol, um dos principais lipídios que compõe os CLs (Bozza et al., 2009), é diminuída, porém, a síntese de ácidos graxos e diacilglicerol persiste na célula hospedeira, possibilitando a utilização de outra fonte de lipídios que não os CLs, como o reticulo endoplasmático (RE), para a sobrevivência do parasita. Conforme já visto na literatura, o *T. gondii* constrói uma rede de túbulos a partir do PV capaz de aproximá-lo de outras organelas como RE e Complexo de Golgi, servindo como fonte de esterol e esfingolipídios, respectivamente (Dou et al., 2014). Além disso, o *T. gondii* explora muitas fontes de ácidos graxos

derivados do hospedeiro: ácidos graxos exógenos introduzidos no meio, ácidos graxos sintetizados pela célula hospedeira, colesterol derivado das lipoproteínas de baixa densidade e ácidos graxos armazenados no CL do hospedeiro e no PV (figura 25) (Gomes et al., 2014; Hu et al., 2017) ou, ainda, estimulando a lipofagia para liberar os ácidos graxos do TAG (Pernas et al., 2018). Deste modo, podemos inferir que os CLs sejam a principal, mas não a única fonte de lipídios para o parasita.

Uma vez que os CLs representam uma fonte oportuna de vários lipídios neutros para o *T. gondii*, adicionamos ácido oleico (AO) à cultura de células tratadas com o inibidor da DGAT 1, a fim de observar se os efeitos da inibição seriam revertidos. A favor de nossos dados, Pernas et al (2018) demonstraram que fibroblastos murinos knockout para DGAT 1 e 2 infectados pelo *T. gondii* apresentam diminuição da carga parasitária e defeitos na replicação, efeitos que foram revertidos pela adição de 30uM de AO juntamente com colesterol na cultura. Conforme visto, a adição do AO reverteu de forma parcial os efeitos da inibição da biogênese de CLs. Neste caso, a adição de AO à cultura foi benéfico para o parasita, porém Nolan e colaboradores (2018) mostraram o efeito inverso. Em seus experimentos o *T. gondii* incorporou continuamente AO, ou lipídios derivados do metabolismo do OA da célula hospedeira, resultando em uma superacumulação de várias espécies lipídicas neutras em CLs do parasita e levando a lipotoxicidade. A inibição farmacológica da DGAT-1 com o inibidor T863 reduziu drasticamente a replicação dos parasitas, levando a um atraso em sua replicação após 24h de infecção. A combinação do inibidor da DGAT-1 e OA resultou em PV muito pequenos, com 1 ou, raramente, 2 parasitas. Esses diferentes efeitos provavelmente se devem às altas doses de AO utilizadas, em comparação com as que utilizamos, o que poderia justificar os efeitos lipotóxicos que nós não vimos.

A principal característica das DC é a capacidade de ativar linfócitos *naïve* e induzir uma resposta imunológica eficiente e duradoura. Para tal, elas dispõem de uma gama de glicoproteínas que vão atuar na apresentação de antígenos para células TCD4⁺ e TCD8⁺ (Al-Ashmawy, 2018). Analisamos a expressão de membrana de moléculas relacionadas a apresentação de antígenos (MHC I e II), além de molécula coestimulatória (CD86), glicoproteína de ativação (CD83) e receptores de quimiocinas envolvidos em migração (CCR7). Nossos resultados mostraram que a infecção induziu o aumento de MHCII e CD83 após 24 horas de infecção, assim como demonstrado por Lambert et col. (2006). Esses dados sugerem que a infecção induz a

ativação das DCs, que passam pelo processo de maturação e se tornam aptas para apresentar antígenos.

Noor e col. (2010) demonstraram o aumento de CCR7 em células de fígado e cérebro de camundongos com toxoplasmose, após 42 dias de infecção. O uso de camundongos knockout para CCR7, aumentou a mortalidade dos animais pela doença, por prejudicar a montagem da resposta imune competente. As DCs infectadas pelo *T. gondii* apresentam grande motilidade, servindo como transporte do parasita para linfonodos, baço, ou outros sítios no organismo. Barragan & Sibley (2003) demonstraram que taquizoítas são capazes de infectar DCs e induzir um fenótipo de hipermigração. Graças à migração das células infectadas, o *T. gondii* é capaz de infectar sítios mais distantes do organismo, podendo atingir recintos privilegiados como o sistema nervoso central, onde são comumente observados cistos na infecção crônica (Furtado et al., 2012). Lambert e col. (2006) porém, demonstraram que essa migração de DC murinas ocorre independente de CCR7 ou CCR5, mas dependente de sinalização via proteína G.

O tratamento com o inibidor da DGAT reduziu a presença da molécula de MHC I na membrana das DCs. Sendo um parasita intracelular obrigatório, os mecanismos pelos quais esses antígenos são processados e apresentados via MHC I ainda são desconhecidos pois, classicamente, antígenos complexos e armazenados em vesículas ou vacúolos (como o *T. gondii*), são associados às moléculas de MHC II e apresentados aos linfócitos TCD4+. A associação inesperada desses antígenos a moléculas de MHC I é chamada de Apresentação Cruzada e suas vias ainda são pouco conhecidas. Existem trabalhos que sugerem a via vacuolar, com participação de lisossomos e fagossomos, enquanto outros sugerem a via citosólica, com transporte do antígeno para o citoplasma na indução da apresentação de antígenos. Bougnères e colaboradores (2009) demonstraram a relação entre a apresentação cruzada em DCs e os CLs, juntamente com a proteína Irmg3, que participa da via de autofagia e foi detectada na membrana de organelas, inclusive dos CLs. Os autores demonstraram que camundongos nocautes para ADRP tiveram diminuição no número e tamanho dos CLs, o que resultou em uma apresentação cruzada tardia quando comparada com camundongos selvagens. O mesmo fenômeno foi observado em camundongos nocautes para Irgm3, que conseqüentemente também acumularam menos CLs, sugerindo uma associação entre a presença de CLs e a apresentação cruzada (Bougnères et al., 2009). Anos depois foi constatado que CLs não decorados

com Irgm3 são degradados pela via de autofagia (Haldar et al., 2013). Nossos achados, juntamente com a literatura, sugerem a participação dos CLs no processamento de antígenos via MHC I, durante a apresentação cruzada. Mais experimentos são necessários para confirmar essa hipótese. A análise das moléculas de MHC I intracelular durante a infecção, em células com biogênese de CLs inibida, poderiam indicar se existe um papel dos CLs no processo de recirculação das moléculas de MCH I, por exemplo.

Em resumo, nossos dados mostraram que a infecção de células dendríticas pelo *Toxoplasma gondii* induz uma alteração do fenótipo dessas células, para um perfil de células ativadas, possivelmente aptas para a apresentação de antígeno. A infecção ainda leva ao aumento da biogênese de CLs, que é alterada conforme se aumenta taxa de infecção. A inibição dos CLs mostrou que essa organela é importante para a manutenção e a replicação do parasita como fonte de lipídios para o processo, uma vez que a adição de ácido graxo exógeno recuperou parcialmente os efeitos da inibição. Além disso, a ausência de CLs levou a alteração no perfil fenotípico das DCs, com redução das moléculas MHC I na membrana plasmática. Indicando assim uma função dos CLs durante a infecção de células dendríticas para sobrevivência do parasita, mas também na resposta imune do hospedeiro (figura 25).

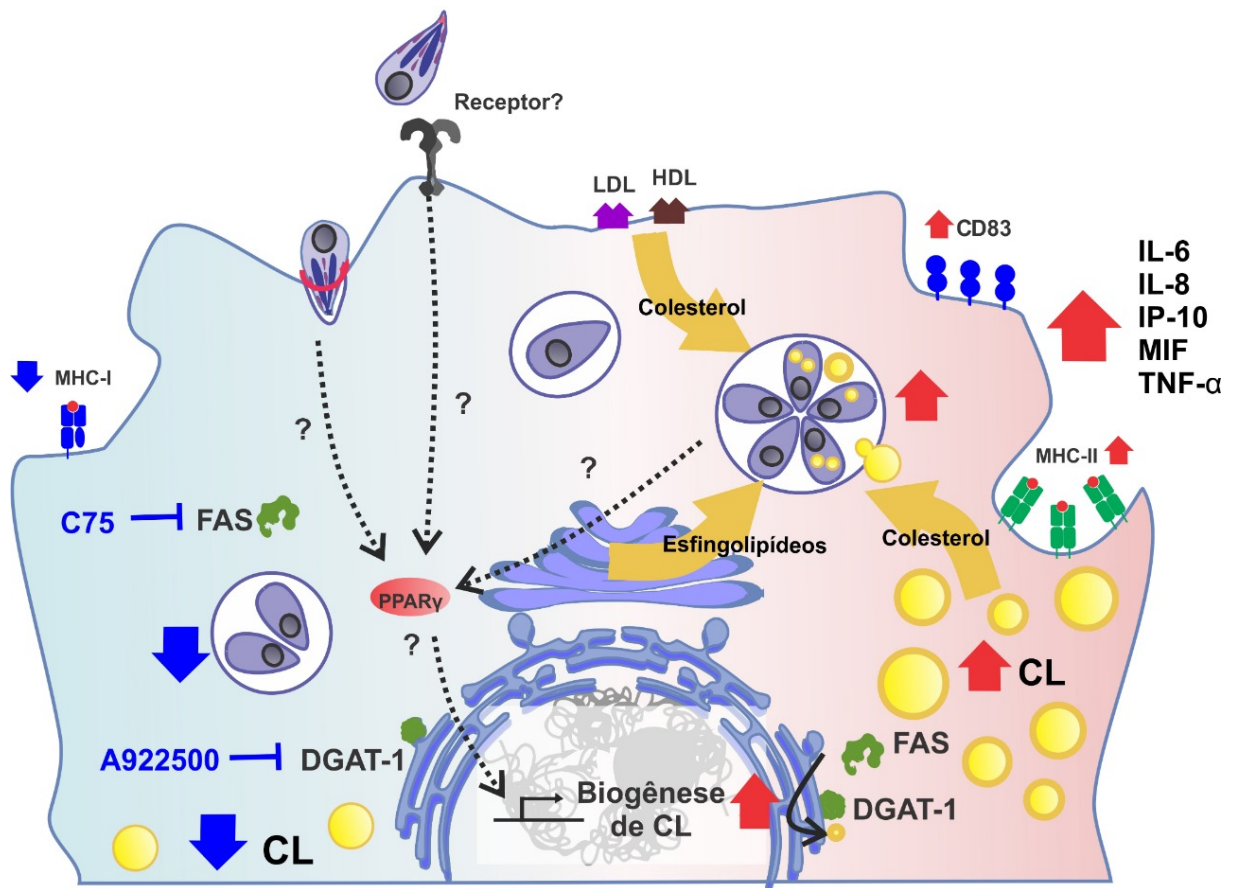


Figura 25 Resumo dos dados encontrados. A infecção pelo *T. gondii* induz a biogênese de Corpúsculos Lipídicos (CLs) por uma via ainda desconhecida. Essa indução poderia ser desencadeada pelo processo ativo de infecção, pelo reconhecimento por receptor desconhecido, ou de forma dependente de replicação, resultado no aumento da expressão de PPAR γ , que promoveria o acúmulo de CLs. O parasita utiliza de lipídios da célula hospedeira advindo de vesícula do complexo de golgi, retículo endoplasmático, lipoproteínas de baixa e alta densidade e, principalmente, dos Corpúsculo Lipídicos para sua replicação. A infecção induz o aumento de CD83 e MHC II. Além da produção de IL-6, IL-8, TNF α , IP-10 e MIF. A inibição das enzimas Ácido Graxo Sintase (FAS) e Diacilglicerol Aciltransferase – 1 (DGAT-1) reduziu a biogênese dos CLs e resultou em um atraso da replicação do parasita. A inibição ainda levou a uma redução de MHC I na membrana plasmática da célula hospedeira.

6. CONCLUSÃO

O *Toxoplasma gondii* é capaz de infectar e replicar em células dendríticas humanas, induzindo a ativação dessas células, a produção de citocinas e a biogênese de corpúsculos lipídicos, que é modulada pela taxa de infecção. O uso de inibidores da biogênese de CLs não causa a morte direta do *T. gondii*, mas a ausência dos CLs leva ao atraso da replicação do parasita, efeito que foi parcialmente revertido pela adição de ácido graxo livre na cultura. A redução do número de CLs ainda reduziu a presença das moléculas MHC I na membrana das células dendríticas. Em conjunto nossos dados sugerem que os CLs possuem funções tanto como fonte de nutrientes para o *T. gondii*, quanto na modulação da resposta imune da hDC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Ashmawy, G. M. Z. (2018). Dendritic Cell Subsets, Maturation and Function, Dendritic Cells. *ItechOpen*. doi:DOI: 10.5772 / intechopen.79926.
- Alfaro, C., Suárez, N., Martínez-Forero, I., Palazón, A., Rouzaut, A., Solano, S., et al. (2011). Carcinoma-derived interleukin-8 disorients dendritic cell migration without impairing T-cell stimulation. *PLoS One* 6, e17922. doi:10.1371/journal.pone.0017922.
- Almeida, P. E., Roque, N. R., Magalhães, K. G., Mattos, K. A., Teixeira, L., Maya-Monteiro, C., et al. (2014). Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by Mycobacterium bovis BCG infection. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1841, 97–107. doi:10.1016/j.bbaliip.2013.10.008.
- Almeida, P. E., Silva, A. R., Maya-Monteiro, C. M., Töröcsik, D., D'Avila, H., Dezsö, B., et al. (2009). Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J. Immunol.* 183, 1337–45. doi:10.4049/jimmunol.0900365.
- Assolini, J. P., Concato, V. M., Gonçalves, M. D., Carloto, A. C. M., Conchon-Costa, I., Pavanelli, W. R., et al. (2017). Nanomedicine advances in toxoplasmosis: diagnostic, treatment, and vaccine applications. *Parasitol. Res.* 116, 1603–1615. doi:10.1007/s00436-017-5458-2.
- Barragan, A., and Sibley, L. D. (2003). Migration of Toxoplasma gondii across biological barriers. *Trends Microbiol.* 11, 426–30. doi:10.1016/S0966-842X(03)00205-1.
- Baum, J., Papenfuss, A. T., Baum, B., Speed, T. P., and Cowman, A. F. (2006). Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 621–628. doi:10.1038/nrmicro1465.
- Black, M. W., and Boothroyd, J. C. (2000). Lytic Cycle of Toxoplasma gondii. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 607–623. doi:10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000.
- Bougdour, A., Tardieux, I., and Hakimi, M.-A. (2014). Toxoplasma exports dense granule proteins beyond the vacuole to the host cell nucleus and rewires the host genome expression. *Cell. Microbiol.* 16, 334–343. doi:10.1111/cmi.12255.
- Bougnères, L., Helfft, J., Tiwari, S., Vargas, P., Chang, B. H.-J., Chan, L., et al. (2009).

- A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. *Immunity* 31, 232–44. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.022.
- Bougnères, L., Helfft, J., Tiwari, S., Vargas, P., Hung-junn, B., Chan, L., et al. (2010). A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. 31, 232–244. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.022.A.
- Bozza, P. T., Bakker-Abreu, I., Navarro-Xavier, R. A., and Bandeira-Melo, C. (2011). Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 85, 205–13. doi:10.1016/j.plefa.2011.04.020.
- Bozza, P. T., D'Ávila, H., Almeida, P. E., Magalhães, K. G., Molinaro, R., Almeida, C. J., et al. (2009a). Lipid droplets in host–pathogen interactions. *Clin. Lipidol* 4, 791–807. doi:10.2217/CLP.09.63.
- Bozza, P. T., Magalhães, K. G., and Weller, P. F. (2009b). Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 540–51. doi:10.1016/j.bbalip.2009.01.005.
- Cham, B. E., and Knowles, B. R. (1976). A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation. *J. Lipid Res.* 17, 176–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/818332> [Accessed August 5, 2019].
- Coppens, I. (2006). Contribution of host lipids to Toxoplasma pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 8, 1–9. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00647.x.
- D'Ávila, H., Maya-Monteiro, C. M., and Bozza, P. T. (2008). Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1308–1315. doi:10.1016/j.intimp.2008.01.035.
- Dard, C., Fricker-hidalgo, H., and Pelloux, H. (2016). Relevance of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis. *Trends Parasitol.* xx. doi:10.1016/j.pt.2016.04.001.
- Delgado Betancourt, E., Hamid, B., Fabian, B. T., Klotz, C., Hartmann, S., and Seeber, F. (2019). From Entry to Early Dissemination-Toxoplasma gondii's Initial Encounter With Its Host. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 46. doi:10.3389/fcimb.2019.00046.
- Denkers, E. Y., and Butcher, B. A. (2005). Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol.* 21, 35–41. doi:10.1016/j.pt.2004.10.004.
- Dou, Z., McGovern, O. L., Di Cristina, M., and Carruthers, V. B. (2014). Toxoplasma gondii ingests and digests host Cytosolic proteins. *MBio* 5, 1–12.

doi:10.1128/mBio.01188-14.

- Drewry, L. L., and Sibley, L. D. (2019). The hitchhiker's guide to parasite dissemination. *Cell. Microbiol.* doi:10.1111/cmi.13070.
- Dubey, J. P., Lago, E. G., Gennari, S. M., Su, C., and Jones, J. L. (2012). *Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology.* doi:10.1017/S0031182012000765.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., and Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 267–99. doi:10.1128/CMR.11.2.267.
- Dubey, J. P., Miller, N. L., and Frenkel, J. K. (1970). The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Exp. Med.* 132, 636–662. doi:10.1084/jem.132.4.636.
- Dupont, C. D., Christian, D. a., Selleck, E. M., Pepper, M., Leney-Greene, M., Harms Pritchard, G., et al. (2014). Parasite Fate and Involvement of Infected Cells in the Induction of CD4+ and CD8+ T Cell Responses to *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 10. doi:10.1371/journal.ppat.1004047.
- Dupont, C., and Hunter, C. (2014). Parasite Fate and Involvement of Infected Cells in the Induction of CD4+ and CD8+T Cell Responses to *Toxoplasma gondii*. *Plos Pathog.* 10, 1–17. doi:doi:10.1371/journal.ppat.1004047.
- Flegr, J., Prandota, J., Sovičková, M., and Israili, Z. H. (2014). Toxoplasmosis--a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS One* 9, e90203. doi:10.1371/journal.pone.0090203.
- Flores, M., Saavedra, R., Bautista, R., Viedma, R., Tenorio, E. P., Leng, L., et al. (2008). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. *FASEB J.* 22, 3661–71. doi:10.1096/fj.08-111666.
- Fung, H. B., and Kirschenbaum, H. L. (1996). Treatment Regimens for Patients with Toxoplasmic Encephalitis. *Clin. Ther.* 18, 1037–1056.
- Furtado, J. M., Bharadwaj, A. S., Chipps, T. J., Pan, Y., Ashander, L. M., and Smith, J. R. (2012). *Toxoplasma gondii* tachyzoites cross retinal endothelium assisted by intercellular adhesion molecule-1 *in vitro*. *Immunol. Cell Biol.* 90, 912–915. doi:10.1038/icb.2012.21.
- Gao, J., and Serrero, G. (1999). Adipose Differentiation Related Protein (ADRP) Expressed in Transfected COS-7 Cells Selectively Stimulates Long Chain Fatty Acid Uptake. *J. Biol. Chem.* 274, 16825–16830. doi:10.1074/jbc.274.24.16825.

- García-García, C., Castillo-Álvarez, F., Azcona-Gutiérrez, J. M., Herraiz, M. J., Ibarra, V., and Oteo, J. A. (2015). Spinal cord toxoplasmosis in human immunodeficiency virus infection/acquired immunodeficiency syndrome. *Infect. Dis. (Auckl)*. 47, 277–282. doi:10.3109/00365548.2014.993421.
- Goldszmid, R. S., Coppens, I., Lev, A., Caspar, P., Mellman, I., and Sher, A. (2009). Host ER–parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii* –infected dendritic cells. *J. Exp. Med.* 206, 399–410. doi:10.1084/jem.20082108.
- Gomes, A. F., Magalhães, K. G., Rodrigues, R. M., de Carvalho, L., Molinaro, R., Bozza, P. T., et al. (2014a). *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN- γ and PGE2. *Parasit. Vectors* 7, 47. doi:10.1186/1756-3305-7-47.
- Gomes, A. F., Magalhães, K. G., Rodrigues, R. M., de Carvalho, L., Molinaro, R., Bozza, P. T., et al. (2014b). *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN- γ and PGE2. *Parasit. Vectors* 7, 47. doi:10.1186/1756-3305-7-47.
- Gomes, A. F., Magalhães, K. G., Rodrigues, R. M., de Carvalho, L., Molinaro, R., Bozza, P. T., et al. (2014c). *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN- γ and PGE2. *Parasit. Vectors* 7, 47. doi:10.1186/1756-3305-7-47.
- Greenberg, A. S., Kraemer, F. B., Soni, K. G., Jedrychowski, M. P., Yan, Q.-W., Graham, C. E., et al. (2011). Lipid droplet meets a mitochondrial protein to regulate adipocyte lipolysis. *EMBO J.* 30, 4337–9. doi:10.1038/emboj.2011.371.
- Gregg, B., Taylor, B. C., John, B., Tait-Wojno, E. D., Girgis, N. M., Miller, N., et al. (2013). Replication and distribution of *Toxoplasma gondii* in the small intestine after oral infection with tissue cysts. *Infect. Immun.* 81, 1635–43. doi:10.1128/IAI.01126-12.
- Haldar, A. K., Foltz, C., Finethy, R., Piro, A. S., Feeley, E. M., Pilla-Moffett, D. M., et al. (2015). Ubiquitin systems mark pathogen-containing vacuoles as targets for host defense by guanylate binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E5628-37. doi:10.1073/pnas.1515966112.
- Haldar, A. K., Saka, H. a., Piro, A. S., Da Dunn, J., Henry, S. C., Taylor, G. a., et al. (2013). IRG and GBP Host Resistance Factors Target Aberrant, “Non-self” Vacuoles Characterized by the Missing of “Self” IRGM Proteins. *PLoS Pathog.* 9.

- doi:10.1371/journal.ppat.1003414.
- Hu, X., Binns, D., and Reese, M. L. (2017). The coccidian parasites *Toxoplasma* and *Neospora* dysregulate mammalian lipid droplet biogenesis Downloaded from. *J. Biol. Chem*, 11009–11020. doi:10.1074/jbc.M116.768176.
- Hunter, C. A., and Sibley, L. D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 766–778. doi:10.1038/nrmicro2858.
- Ibrahim, J., Nguyen, A. H., Rehman, A., Ochi, A., Jamal, M., Graffeo, C. S., et al. (2012). Dendritic cell populations with different concentrations of lipid regulate tolerance and immunity in mouse and human liver. *Gastroenterology* 143, 1061–72. doi:10.1053/j.gastro.2012.06.003.
- Iqbal, J. (2016). Toxoplasmosis: Role of Cytokines in Disease Modulation & Tissue Pathology. *Ann Clin Pathol* 4, 1090. Available at: <https://pdfs.semanticscholar.org/217d/5b243d27c4f34c3c591272cf2708d2173acc.pdf> [Accessed July 24, 2019].
- JEBBARI, ROBERTS, FERGUSON, BLUETHMANN, and ALEXANDER (1998). A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 20, 231–239. doi:10.1046/j.1365-3024.1998.00152.x.
- Khanfar, M. A., Abukhader, M. M., Alqtaishat, S., and Taha, M. O. (2013). Journal of Molecular Graphics and Modelling Pharmacophore modeling , homology modeling , and in silico screening reveal mammalian target of rapamycin inhibitory activities for sotalol , glyburide , metipranolol , sulfamethizole , glipizide , and pioglitaz. *J. Mol. Graph. Model.* 42, 39–49. doi:10.1016/j.jmgm.2013.02.009.
- Lambert, H., Hitziger, N., Dellacasa, I., Svensson, M., and Barragan, A. (2006). Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell. Microbiol.* 8, 1611–1623. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00735.x.
- Larigauderie, G., Furman, C., Jaye, M., Lasselin, C., Copin, C., Fruchart, J.-C., et al. (2004). Adipophilin Enhances Lipid Accumulation and Prevents Lipid Efflux From THP-1 Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 504–510. doi:10.1161/01.ATV.0000115638.27381.97.
- Leiva Carlos S Subauste, L. E., and Wessendarp, M. (2017). CD40 Ligand Trimer Response That Can Be Restored by Soluble Syndrome Have a Defective Type 1 Immune : Patients with Hyper IgM *Toxoplasma gondii* Cell-Mediated Immunity

- Against CD40-CD40 Ligand Interaction Is Central to. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/162/11/6690> [Accessed July 24, 2019].
- Lewis, K. L., and Reizis, B. (2012). Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a007401. doi:10.1101/cshperspect.a007401.
- Lige, B., Sampels, V., and Coppens, I. (2013a). Characterization of a second sterol-esterifying enzyme in *Toxoplasma* highlights the importance of cholesterol storage pathways for the parasite. *Mol. Microbiol.* 87, 951–67. doi:10.1111/mmi.12142.
- Lige, B., Sampels, V., and Coppens, I. (2013b). Characterization of a second sterol-esterifying enzyme in *Toxoplasma* highlights the importance of cholesterol storage pathways for the parasite. *Mol. Microbiol.* 87, 951–967. doi:10.1111/mmi.12142.
- Lima, T. S., and Lodoen, M. B. (2019). Mechanisms of Human Innate Immune Evasion by *Toxoplasma gondii*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 103. doi:10.3389/fcimb.2019.00103.
- Liu, K., Wen, H., Cai, H., Wu, M., An, R., Chu, D., et al. (2019). Protective Effect Against Toxoplasmosis in BALB/c Mice Vaccinated With *Toxoplasma gondii* Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Front. Microbiol.* 10, 813. doi:10.3389/fmicb.2019.00813.
- Magno, R. C., Lemgruber, L., Vommaro, R. C., De Souza, W., and Attias, M. (2005). Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc. Res. Tech.* 67, 45–52. doi:10.1002/jemt.20182.
- Martin, S., and Parton, R. G. (2006). Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Mol. Cell* 7, 373–378. doi:10.1038/nrm1912.
- McIlvaine, T. (1921). Buffer Solution For Colorimetric Comparaison. *J. Biol. Chem.* 49, 183–186. doi:10.1016/j.corsci.2005.10.013.
- Meneceur, P., Bouldouyre, M.-A., Aubert, D., Villena, I., Menotti, J., Sauvage, V., et al. (2008). In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1269–77. doi:10.1128/AAC.01203-07.
- Meyers, A., Weiskittel, T. M., and Dalhaimer, P. (2017). Lipid Droplets: Formation to Breakdown. *Lipids* 52, 465–475. doi:10.1007/s11745-017-4263-0.
- Mitsuka-breganó, R., and Lopes-mori, F. M. R. (2010). Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas.

Online, 24–26.

- Mota, L. A. M., Roberto-Neto, J., Monteiro, V. G., Lobato, C. S. S., De Oliveira, M. A., da Cunha, M., et al. (2014a). Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associate with the parasitophorous vacuole and decrease their microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 767–774. doi:10.1590/0074-0276140119.
- Mota, L. A. M., Roberto Neto, J., Monteiro, V. G., Lobato, C. S. S., Oliveira, M. A. de, Cunha, M. da, et al. (2014b). Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associate with the parasitophorous vacuole and decrease their microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii*. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz* 109, 767–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25317704> [Accessed July 25, 2016].
- Moura, M. de A., Amendoeira, M. R. R., and Barbosa, H. S. (2009). Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 862–864. doi:10.1590/S0074-02762009000600007.
- Nicolle, C., and Manceaux, L. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C. R. Seances Acad. Sci.* 148, 369–72.
- Nishikawa, Y., Quittnat, F., Stedman, T. T., Voelker, D. R., Choi, J. Y., Zahn, M., et al. (2005). Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. *Cell. Microbiol.* 7, 849–867. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00518.x.
- Nolan, S. J., Romano, J. D., and Coppens, I. (2017a). *Host lipid droplets : An important source of lipids salvaged by the intracellular parasite Toxoplasma gondii*. doi:10.1371/journal.ppat.1006362.
- Nolan, S. J., Romano, J. D., and Coppens, I. (2017b). *Host lipid droplets: An important source of lipids salvaged by the intracellular parasite Toxoplasma gondii*. doi:10.1371/journal.ppat.1006362.
- Nolan, S. J., Romano, J. D., Kline, J. T., and Coppens, I. (2018). Novel approaches to kill *Toxoplasma gondii* by exploiting the uncontrolled uptake of unsaturated fatty acids and vulnerability to lipid storage inhibition of the parasite. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62. doi:10.1128/AAC.00347-18.
- Noor, S., Habashy, A. S., Nance, J. P., Clark, R. T., Nemati, K., Carson, M. J., et al. (2010). CCR7-Dependent Immunity during Acute *Toxoplasma gondii* Infection.

- Infect. Immun.* 78, 2257–2263. doi:10.1128/IAI.01314-09.
- Norose, K., Kikumura, A., Luster, A. D., Hunter, C. A., and Harris, T. H. (2011). CXCL10 is required to maintain T-cell populations and to control parasite replication during chronic ocular toxoplasmosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 389–98. doi:10.1167/iovs.10-5819.
- Pappas, G., Roussos, N., and Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 39, 1385–1394. doi:10.1016/J.IJPARA.2009.04.003.
- Pereira-Dutra, F. S., Teixeira, L., Souza Costa, M. F., and Bozza, P. T. (2019). Fat, fight, and beyond: The multiple roles of lipid droplets in infections and inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, JLB.4MR0119-035R. doi:10.1002/JLB.4MR0119-035R.
- Pernas, L., Bean, C., Boothroyd, J. C., and Scorrano, L. (2018). Mitochondria Restrict Growth of the Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii* by Limiting Its Uptake of Fatty Acids. *Cell Metab.* 27, 886–897. doi:10.1016/j.cmet.2018.02.018.
- Popa, C., van Lieshout, A. W. T., Roelofs, M. F., Geurts-Moespot, A., van Riel, P. L. C. M., Calandra, T., et al. (2006). MIF production by dendritic cells is differentially regulated by Toll-like receptors and increased during rheumatoid arthritis. *Cytokine* 36, 51–56. doi:10.1016/J.CYTO.2006.10.011.
- Radke, J. R., and White, M. W. (1998). A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. 94, 237–247.
- Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R. N., et al. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 186, 1819–29. doi:10.1084/jem.186.11.1819.
- Rey, L. (2008). *Parasitologia*. 4^a. , ed. Koogan-Guanabara Rio de Janeiro.
- Robert-Gangneux, F., and Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 264–296. doi:10.1128/CMR.05013-11.
- Robibaro, B., Stedman, T. T., Coppens, I., Ng??, H. M., Pypaert, M., Bivona, T., et al. (2002). *Toxoplasma gondii* Rab5 enhances cholesterol acquisition from host cells. *Cell. Microbiol.* 4, 139–152. doi:10.1046/j.1462-5822.2002.00178.x.
- Rostami Nejad, M., Sherafat, S. J., Roshani, M., Telkabadi, M., Lahmi, F.,

- Cheraghipour, K., et al. (2011). The evaluation of interleukin-8 chemokine in chronic and acute *Toxoplasma gondii* infection. *Gastroenterol. Hepatol. from bed to bench* 4, 34–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24834153> [Accessed July 24, 2019].
- Saadatnia, G., and Golkar, M. (2012a). A review on human toxoplasmosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 44, 805–814. doi:10.3109/00365548.2012.693197.
- Saadatnia, G., and Golkar, M. (2012b). A review on human toxoplasmosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 44, 805–814. doi:10.3109/00365548.2012.693197.
- Saeij, J. P. J., Coller, S., Boyle, J. P., Jerome, M. E., White, M. W., and Boothroyd, J. C. (2007). *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 445, 324–7. doi:10.1038/nature05395.
- Sanecka, A., and Frickel, E.-M. (2012). Use and abuse of dendritic cells by *Toxoplasma gondii*. *Virulence* 3, 678–89. doi:10.4161/viru.22833.
- Sasai, M., Pradipta, A., and Yamamoto, M. (2018). Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. *Int. Immunol.* 30, 113–119. doi:10.1093/intimm/dxy004.
- Snider, H. M., Lockhart, G., Barbi, J., Papenfuss, T. L., Lu, B., and Satoskar, A. R. (2009). The chemokine receptor CXCR3 is required for optimal murine resistance against *Toxoplasma gondii* (129.30). *J. Immunol.* 182.
- Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137, 1142–62. doi:10.1084/jem.137.5.1142.
- SZELES, L., TOROCSIK, D., and NAGY, L. (2007). PPAR γ in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1771, 1014–1030. doi:10.1016/j.bbalip.2007.02.005.
- Taylor, G. A., Feng, C. G., and Sher, A. (2007). Control of IFN- γ -mediated host resistance to intracellular pathogens by immunity-related GTPases (p47 GTPases). *Microbes Infect.* 9, 1644–1651. doi:10.1016/J.MICINF.2007.09.004.
- Tosh, K. W., Mittereder, L., Bonne-Annee, S., Hieny, S., Nutman, T. B., Singer, S. M., et al. (2016). The IL-12 Response of Primary Human Dendritic Cells and Monocytes to *Toxoplasma gondii* Is Stimulated by Phagocytosis of Live Parasites Rather Than Host Cell Invasion. *J. Immunol.* 196, 345–356. doi:10.4049/jimmunol.1501558.
- Vallochi, A. L., Teixeira, L., Oliveira, K. S., Maya-monteiro, C. M., and Bozza, P. T. (2018). Lipid Droplet , a Key Player in Host-Parasite interactions. *Front. Immunol.*

9. doi:10.3389/fimmu.2018.01022.
- Vargas, P., Maiuri, P., Bretou, M., Sáez, P. J., Pierobon, P., Maurin, M., et al. (2015). Innate control of actin nucleation determines two distinct migration behaviours in dendritic cells. *Nat. Cell Biol.* 18, 43–53. doi:10.1038/ncb3284.
- Venugopal, K., and Marion, S. (2018). Secretory organelle trafficking in *Toxoplasma gondii*: A long story for a short travel. *Int. J. Med. Microbiol.* 308, 751–760. doi:10.1016/j.ijmm.2018.07.007.
- Wang, J.-L., Zhang, N.-Z., Li, T.-T., He, J.-J., Elsheikha, H. M., and Zhu, X.-Q. (2019). Advances in the Development of Anti-*Toxoplasma gondii* Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives. *Trends Parasitol.* 35, 239–253. doi:10.1016/j.pt.2019.01.005.
- Weidner, J. M., and Barragan, A. (2014). Tightly regulated migratory subversion of immune cells promotes the dissemination of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 44, 85–90. doi:10.1016/j.ijpara.2013.09.006.
- Welte, M. A. (2015). Expanding Roles for Lipid Droplets. doi:10.1016/j.cub.2015.04.004.
- Wen, X., Kudo, T., Payne, L., Wang, X., Rodgers, L., and Suzuki, Y. (2010). Predominant interferon- γ -mediated expression of CXCL9, CXCL10, and CCL5 proteins in the brain during chronic infection with *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice resistant to development of toxoplasmic encephalitis. *J. Interferon Cytokine Res.* 30, 653–60. doi:10.1089/jir.2009.0119.
- Worbs, T., Hammerschmidt, S. I., and Förster, R. (2017). Dendritic cell migration in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 30–48. doi:10.1038/nri.2016.116.
- Yamamoto, M., Okuyama, M., Ma, J. S., Kimura, T., Kamiyama, N., Saiga, H., et al. (2012). A cluster of interferon- γ -inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 37, 302–13. doi:10.1016/j.immuni.2012.06.009.
- Yoneyama, H., Narumi, S., Zhang, Y., Murai, M., Baggiolini, M., Lanzavecchia, A., et al. (2002). Pivotal Role of Dendritic Cell-derived CXCL10 in the Retention of T Helper Cell 1 Lymphocytes in Secondary Lymph Nodes. *J. Exp. Med.* 195, 1257. doi:10.1084/JEM.20011983.
- Zhao, Y. O., Khaminets, A., Hunn, J. P., and Howard, J. C. (2009). Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFN- γ -inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. *PLoS Pathog.* 5.

doi:10.1371/journal.ppat.1000288.

ANEXO I



Lipid Droplet, a Key Player in Host-Parasite Interactions

Adriana Lima Vallochi*, Livia Teixeira, Karina da Silva Oliveira, Clarissa Menezes Maya-Monteiro and Patricia T. Bozza*

Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Celio Geraldo Freire-de-Lima,
Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Brazil

Reviewed by:

Joshua D. Nosanchuk,
Albert Einstein College of
Medicine, United States
Carlos Arterio Sorgi,
Universidade de São Paulo
Ribeirão Preto, Brazil

*Correspondence:

Adriana Lima Vallochi
vallochi@ioc.fiocruz.br;
Patricia T. Bozza
pbozza@ioc.fiocruz.br

Specialty section:

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

Received: 31 January 2018

Accepted: 24 April 2018

Published: 23 May 2018

Citation:

Vallochi AL, Teixeira L, Oliveira KdS,
Maya-Monteiro CM and Bozza PT
(2018) Lipid Droplet, a Key Player in
Host-Parasite Interactions.
Front. Immunol. 9:1022.
doi: 10.3389/fimmu.2018.01022

Lipid droplets (lipid bodies, LDs) are dynamic organelles that have important roles in regulating lipid metabolism, energy homeostasis, cell signaling, membrane trafficking, and inflammation. LD biogenesis, composition, and functions are highly regulated and may vary according to the stimuli, cell type, activation state, and inflammatory environment. Increased cytoplasmic LDs are frequently observed in leukocytes and other cells in a number of infectious diseases. Accumulating evidence reveals LDs participation in fundamental mechanisms of host-pathogen interactions, including cell signaling and immunity. LDs are sources of eicosanoid production, and may participate in different aspects of innate signaling and antigen presentation. In addition, intracellular pathogens evolved mechanisms to subvert host metabolism and may use host LDs, as ways of immune evasion and nutrients source. Here, we review mechanisms of LDs biogenesis and their contributions to the infection progress, and discuss the latest discoveries on mechanisms and pathways involving LDs roles as regulators of the immune response to protozoan infection.

Keywords: lipid droplets, lipid bodies, parasite, intracellular pathogen, eicosanoids, inflammation, immune response

INTRODUCTION

Lipid droplets (LDs) are dynamic and complex organelles, composed of a hydrophobic core enriched in neutral lipids such as triglyceride, cholesteryl ester, and retinyl ester, a surrounding monolayer of phospholipid, cholesterol, and a varied array of associated proteins with diverse functions in cell homeostasis, metabolism, and signaling (1, 2). The accumulation of lipids within the cytoplasmic LDs is a highly conserved feature, due to its role in energy homeostasis, membrane synthesis and cell signaling, conferring an evolutionary advantage to the organism. Indeed, LDs are present in virtually all cell types and organisms, including in unicellular protozoan parasites (3, 4), and in leukocytes and other cells involved in immune response in mammals (5, 6).

Interest in LDs biogenesis and functions has dramatically increased in recent years due to their association with metabolic and inflammatory diseases, including diabetes (7), atherosclerosis (8, 9), obesity, cancer (10, 11), allergy (12), neurodegenerative diseases (13, 14), and numerous infectious diseases [reviewed in Bozza et al. (15), van der Meer-Janssen et al. (16), and Saka and Valdivia (17)]. Increased numbers of LDs in leukocytes and other cells are observed in infectious diseases caused by bacteria, virus, fungus, and protozoan parasites (17–26). LD accumulation in the cytoplasm of distinct host cell types has been reported after infection with *Plasmodium berguei* (27, 28), *Trypanosoma cruzi* (20, 29, 30), *Toxoplasma gondii* (31–34), and *Leishmania* sp. (35–37) and their contributions in disease pathogenesis are starting to be unveiled.

Different signaling pathways have been implicated in LD biogenesis in leukocytes and other cells involved in inflammatory and/or infectious reactions. Although molecular mechanisms that

govern LD biogenesis are not fully characterized, the observations gathered so far indicate the involvement of both pathogen and host factors. Moreover, accumulating evidence indicates that infection-driven LD formation involves specific and well-regulated mechanisms that involve innate immune receptors, scavenger receptors, and nuclear receptors dependent pathways (18, 21, 26, 30, 38–42). Newly formed host LDs play key roles in host-pathogen interactions. Of note host LDs triggered during infection are major intracellular domains involved in eicosanoid synthesis with multiple functions in inflammation and immune signaling (18, 20, 21, 26, 30, 43, 44). More recently, parasite LDs were also demonstrated to compartmentalize eicosanoid synthesis with roles in parasite physiology and escape mechanisms (45, 46). In addition to functioning as signaling platforms, host LDs properties in energy storage and metabolic homeostasis may be explored by intracellular pathogens for their survival and growth. Accordingly, different authors showed a close association of LDs with parasite vacuoles (PVs) (20, 21, 33, 34, 47–49). This association may enable the nutrients' flow between the host and the parasites, which is of crucial importance for parasite metabolism and may contribute to avoid the host response. Besides the acquisition of nutrients and imbalance of host metabolic pathways, the parasites explore many additional biological host responses with impacts to disease pathogenesis.

Here, we will address the mechanisms of formation and functions of LDs in the interactions between protozoan parasites and mammalian host. We will highlight the LDs role in host-pathogen interactions, discussing the crosstalk between pathogen and host cell on the immune response and survival mechanisms during infection.

LD: A DYNAMIC CELL ORGANELLE

The Organelle Complexity

Lipid droplets are roughly spherical structures consisting mostly of triacylglycerols and sterol esters, lacking a delimiting classical bilayer membrane but surrounding by a monolayer of phospholipids and cholesterol and a variety of associated proteins (50, 51). This unique organization defies understanding how occur transport pathways to receive or deliver protein and lipid, once that arrangement does not fit in classical traffic vesicular mechanisms. On the other hand, favors its distinction from other organelles under electron microscope. More than 160 lipid species have been identified in LDs, with important variations in contents according to the cell type. For instance, triglycerides are largely dominant in white adipocytes, whereas sterol esters are more abundant in macrophages and retinyl esters in stellate cells (52–56). LDs associated proteins vary according to the cell and stimulatory condition and contains perilipin family proteins, lipid biosynthetic enzymes, lipolytic enzymes; enzymes involved in signaling and inflammatory mediator synthesis, and membrane-trafficking proteins (55, 57–65). Proteins associate with LDs surface through amphipathic and/or hydrophobic molecular moieties (66–69). Also, some proteins were detected within the hydrophobic core of the LD (59, 60, 70, 71). However, the most intriguing fact about protein content of LDs certainly

is the presence of proteins with predicted membrane insertion domains within these organelles (59, 60, 65, 72). Among the proteins associated with LDs are the well-characterized perilipin family's proteins that share sequence similarities, previously termed as the PAT family, often used as molecular markers of LDs. It includes perilipin 1, perilipin 2 [PLIN2/adipose differentiation-related protein (ADRP)], perilipin 3 [tail-interacting protein of 47 kDa (TIP-47)], perilipin 4 (S3-12), and perilipin 5 (LSDA5, LSDP5, MLDP, and OXPAT) (73). Perilipins are major structural proteins present at the surface of LDs involved in regulating LD formation, incorporation, and accumulation of lipid in different cells types (74–79). The enzymes Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) and acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) are responsible for the synthesis of the main LD core lipids (TAGs and CE). DGAT2 is inserted exclusively into the external leaflet of the endoplasmic reticulum (ER) membrane and, therefore, can diffuse onto the LD surface during LD formation, promoting TAGs synthesis and the continuation of LD growth (80). LDs also compartmentalize the lipolysis enzyme, adipose tissue triacylglycerol lipase (ATGL), as well as perilipins, that modulate both hormone-sensitive lipase and ATGL activities (80–82).

Lipid droplets are organelles that are intimately related to the ER (1, 83). The first and still accepted model of LDs formation suggests that these organelles are derived from the accumulation of newly synthesized lipids within the double layer of the ER membrane, with subsequent budding off from the ER to the cytoplasm after reaching a critical size (50, 83). According to this model, newly formed LDs detaches are surrounded by a phospholipid monolayer derived from the cytoplasmic leaflet of the ER coated with proteins that lack transmembrane spanning domains (3, 70, 83–85). However, accumulating evidence, based on imaging and composition of LDs, reported the presence of membrane-associated and transmembrane spanning proteins, as well as ribosomal structures and ribosomal associated proteins, giving rise to new hypothetical models for LD biogenesis (2, 65, 70, 86). These different groups suggested that invaginations of ER inside the LDs could be the membranous structure and hydrophilic ambient that allow proteins in the core of LDs (65, 72, 86), and/or that LDs may remain associated to ER through physical bridges (2, 87). Together, these biogenesis models contemplate the existence of subcompartments inside these organelles made possible through the incorporation of ER-derived membranes enabling sequential enzymatic reactions to occur within LDs as in the case of eicosanoid synthesis (5, 86, 88, 89).

Lipid droplets have gained importance as specialized and inducible cytoplasmic organelle due to their various proteic and lipidic components, and their participation in fundamental cellular processes. LD functions extend beyond the regulation of lipid metabolism in cell signaling, immunological activation, membrane trafficking participation, and control of the synthesis and secretion of inflammatory mediators. The LD in infectious diseases also suggests functions beyond the mere interaction with different viral proteins or bacteria; they can participate in important cellular pathways of immune system.

One of the best characterized functions of LDs in leukocytes and other cells of the immune response are their capacity to

act as platforms for heightened eicosanoid synthesis (90, 91). Eicosanoids—including prostaglandins, leukotrienes, and lipoxins—are non-storable but promptly newly synthesized signaling molecules, derived from the enzymatic oxygenation of arachidonic acid (AA), that control key cellular processes, including cell activation, metabolism, migration, proliferation, and death (92). Intracellular compartmentalization of eicosanoid synthesis within leukocytes and other cells has emerged as a key feature that regulates the amount and may also regulate the eicosanoid produced, and LDs has been established as main locales involved in the increased eicosanoid synthesis in inflammatory conditions (90). The substrate for eicosanoid synthesis—AA—is present in LDs, esterified in phospholipids and neutral lipids, where it can be converted into eicosanoids by specialized enzymes (6, 55, 93–95). cPLA₂ and ATGL were shown to co-localize with LDs in different cells where it participates in the release of AA-associated LD from phospholipids and triglyceride pool, respectively (55, 96–98). Notably, *P. aeruginosa* toxin ExoU also mobilizes AA from host LDs due to their phospholipase activity as part of their pathogenic activity (94). The major eicosanoid-forming enzymes—cyclooxygenase, 5-lipoxygenase (5-LO), 15-LO, 5-LO-activating protein, and the terminal enzymes including PGE₂ synthase and LTC₄ synthase—were described within LDs of stimulated cells obtained under inflammatory and infectious conditions (18, 21, 26, 30, 43, 44, 59, 60, 99). Increased LD biogenesis correlates with an enhanced capacity of the cells to produce eicosanoids and suggests that the compartmentalization of the eicosanoid-synthetic machinery within LD have roles in the cellular ability to generate eicosanoids (18, 21, 59, 100). Direct proof of eicosanoid synthesis at LDs came only after the development of a lipid immunolabeling technique termed EicosaCell (88, 101). Since eicosanoids are not stored but are synthesized and released immediately, the EicosaCell method enables to immobilize and label eicosanoids at the exact locale of their synthesis, and by the use of this method the synthesis of leukotrienes and prostaglandins occurring at LDs have been confirmed (21, 30, 43, 101). Accordingly, it has been established that LDs are specialized, inducible cytoplasmic domains that have central roles in the control of synthesis and secretion of inflammatory mediators under different pathophysiological conditions, including in infections [reviewed in Bozza et al. (90)].

Mechanisms of LD Formation in Infectious Diseases Involves Specific and Regulated Mechanisms

Lipid droplet biogenesis in host cells during infections is a highly regulated cellular event. Although still incomplete, great advances on the understanding of the molecular events that govern LD formation in cells during host-pathogen interactions have been achieved in recent years. As detailed below, accumulation of LDs can be observed rapidly after infection with a variety of pathogens, and results from a balance between new lipid synthesis, increased lipid uptake, and regulated lipolysis involving both transcriptional dependent and independent mechanisms. Of note, during infection, not only infected cells and/or cells in direct contact with pathogens exhibit increased accumulation

of LDs in their cytoplasm, but also non-infected neighboring cells at the inflammatory microenvironment may also present increased numbers of LDs indicating that paracrine mechanisms of bystander amplification through host and pathogen-derived signals also take place.

Pattern recognition receptors have been found to be involved in the generation of signals that induce LD formation. The main family of pattern recognition receptors with large range capacity of sensing diverse pathogens is the toll-like receptors (TLR). Cells from TLR4-null mutant mice and cells from signaling inactive mice fail to form LD after stimulation by LPS or during experimental sepsis, establishing the dependency of TLR4 for macrophages LD formation (18, 43). TLR4 signaling triggers the production of inflammatory mediators like platelet activator factor (PAF) and MCP-1/CCL2 that amplify the LD-induced response (18, 21, 43). Other proteins found to be required for productive signaling in response to LPS, include LPS-binding protein, CD14, CD11b/CD18, and myeloid differentiation factor-2 because their neutralization inhibits LPS-induced LD formation (18, 43). Indeed, different pathogens may be specifically recognized through innate receptors to trigger LDs in host cells. TLR2-dependent mechanisms have been implicated in LD formation triggered by *Mycobacterium bovis* (BCG), *Mycobacterium leprae*, *T. cruzi*, *Chlamydia pneumonia*, *Histoplasma capsulatum*, and schistosomal-lipids (21, 26, 38, 44, 102, 103). The studies of *M. bovis* (BCG) infection and stimulation by the purified cell wall component lipoarabinomannan highlighted the importance of TLR2 in LD formation, but not essential roles of TLR4 or TLR6 (21, 38, 104). However, classic TLR2 ligands as Pam3Cys and Zymozan and non-pathogenic mycobacteria *Mycobacterium smegmatis* failed to induce LDs formation or PGE₂ production, while still inducing TLR2-dependent TNF- α production (38). This finding suggests that TLR2 activation, although essential is not sufficient to trigger pathways of LDs formation and other cofactors may be involved. Indeed, CD36, a multi-ligand scavenger receptor, has been demonstrated to cooperate with TLR2 in BCG signaling and LDs biogenesis in a mechanism dependent of compartmentalization within lipid rafts (39). Similarly, in *M. leprae* infection, TLR2 and TLR6 were implicated in LD formation and bystander amplification in macrophages with no internalized bacteria. This suggests an important role for these receptors in LD biogenesis, not only by direct recognition of microbial components, but also by leading to secondary autocrine/paracrine signaling (21, 44). Accordingly, conditioned medium from *M. leprae*-infected wild-type cells induced LD in wild-type and TLR2-deficient cells (40). Notably, many cytokines and chemokines have been described as being able to lead LDs formation (12, 18, 43, 99, 105–107). Indeed, MCP-1/CCL2 has been implicated in sepsis triggered LD formation, whereas IL-10 and CCL3 were shown to participate in mechanisms of mycobacterial LD formation (41, 43). Lipid signaling is also involved in LD formation and may participate in mechanisms of bystander LD formation. PAF and PAF-like lipids are involved in LPS and oxidized low-density lipoprotein (LDL)-induced LDs formation, since pretreatment with PAF receptor antagonist significantly inhibits the number of these organelles during experimental sepsis (18, 43, 107). In addition, cis-unsaturated fatty acids including AA and oleic acid are potent inducers

of LD formation in leukocytes and other cells (106, 108). TLR2 also mediates LD formation during protozoan parasite infection. *T. cruzi* infections induced LD formation in macrophages in a TLR2-dependent manner. Apoptotic cell uptake by these macrophages potentiated the LD formation and PGE₂ production via TGF- β signaling. The inhibition of LD formation by the fatty acid synthase inhibitor C75 reverted the potentiating effects of the apoptotic cells on LD biogenesis, eicosanoid synthesis, and parasite replication, suggesting a role for LD in lipid mediator production and parasite escape mechanisms. Curiously, the effect was not restricted to parasitized cells, suggesting the involvement of paracrine mediators in LD biogenesis (30). Other classes of pattern recognition receptors have also been implicated in LD biogenesis, including dectin-1 (26).

Downstream mechanisms involved in infectious triggered LD formation are starting to be described. In this sense, signaling pathways involved in expression of genes related to influx/efflux of lipids and *de novo* synthesis of lipids during infectious process have been evaluated. Recently, it was reported that bacterial components may modulate expression and function of PPAR γ . PPAR γ is a member of lipid-activated nuclear receptor family that directly regulates several genes participating in fatty acids uptake, lipids storage, and inflammatory response. PPAR γ heterodimerize with retinoid X receptor that binds directly to DNA response elements present in target gene. In macrophages and dendritic cells, PPAR γ have proven to be a key regulator of lipid metabolism and inflammatory genes (109). In addition, PPAR γ signaling pathway has been identified as central to foam cells formation in atherosclerotic lesions (110–113). During *M. bovis* BCG infection, TLR2 regulates the expression and activation of PPAR γ activation as well as LDs formation. PPAR γ inhibition by its antagonist significantly reduces number of LDs in BCG-infected macrophages, indicating its involvement in LDs biogenesis during mycobacterial infection (38). PPAR γ involvement in LDs biogenesis may occur at different levels. PPAR γ regulates expression of genes related to *de novo* lipid synthesis such as fatty acid synthase enzyme and PLIN2/ADRP, increasing TAG and cholesterol storage and reducing cholesterol efflux (114–116). PPAR γ can also increase the influx of exogenous lipids due to increased expression of scavenger receptor CD36 (39). By contrast, liver X receptor, whose activation increases cholesterol efflux, has its transcriptional activity inhibited when viral and bacterial antigens are recognize via TLR3 and TLR4 receptors (117). Together these data show that LDs formation depends on specific signaling pathways activation, which regulate influx and efflux balance of lipids in cells. *C. pneumoniae* express a variety of potential TLR ligands and induces foam cell formation, facilitating atherogenesis. *C. pneumoniae*-induced LD formation also involves MAPK phosphorylation, including JNK and ERK, participates in macrophage LD formation. *C. pneumoniae* infection induced the down-regulation of PPAR α and PPAR γ expression (118), in contrary to the upregulation observed in BCG-infected macrophages where upregulation of PPAR γ and PPAR γ -dependent LD formation was described (39). Surprisingly, JNK and ERK inhibitors blocked LD formation and suppressed the down-regulation of PPAR α and PPAR γ . PPAR α or PPAR γ agonists reverted the infection-induced JNK and ERK phosphorylation while PPAR α

and PPAR γ antagonist enhanced these phosphorylations. The increased *C. pneumoniae*-induced LD formation in LDL-treated THP-1 macrophages was interpreted to be the result of crosstalk between MAPK and PPAR α/γ signaling pathways (118). Changes in the intracellular concentration of PPAR ligands can influence PPAR-dependent gene regulation (119).

Increasing amounts of data regarding the molecular mechanisms that govern lipogenesis, as well as regulation of the influx and efflux of lipids, suggest that these mechanisms operate synergistically for LD formation during infection (34, 39, 40).

LDs IN PARASITE INFECTIONS

Parasite Lipid Homeostasis and Their Own LDs

Throughout the entire infection process beginning with the host cell invasion, there is a huge involvement of lipids from both members' interactions (120–122). Some parasites build and survive inside their PV; others leave them to live in host cytoplasm. The vacuole protects parasites but complicates access to some essential factors for parasite proliferation as, e.g., lipids. Intracellular parasites scavenge cholesterol from LDL or host LDs. LDs are a vital source of energy, and an essential element for the homeostasis (detoxification) of blood-stage parasites, as *Plasmodium* spp. and *Schistosoma* spp. Intracellular parasites have their own LDs—as an energy storage source, for metabolic homeostasis, and to modulate and escape the host response. The roles of parasites' LDs and their interplay with host cells will be discussed in the following section.

Protozoa Are Unable to Synthesize Cholesterol *De Novo* and May Retrieve It From Host LDs

Despite possessing complex molecular machinery to interact in a variety of ways with their host cell, protozoa are unable to synthesize cholesterol *de novo*. *T. cruzi* recruits host lysosomes for fusion with the PV to initiate its egress from the PV and enter into the host cell cytoplasm, where replication begins (123). Parasites of the genus *Leishmania* evolved mechanisms to survive and multiply within acidified vesicles enriched in lysosomal enzymes (124). Otherwise, *T. gondii* and *Plasmodium* spp. have a so-called “active invasion,” and both built a nonfusogenic PV. The *T. gondii* PV interacts with many host structures such as LDs, microtubules, endosomes, the ER, mitochondria, and Golgi vesicles, which closely associated with the vacuole for nutrient acquisition (34, 125). *T. gondii* produces a network of tubule-like structures called the intravacuolar tubulovesicular network, a membranous interface derived from multilamellar vesicles secreted by the parasite (126, 127). However, protozoan parasites rely on their ability to steal cholesterol from different sources of the host (128–130).

As in mammals, *T. cruzi* captures cholesterol from LDLs via LDL receptor (LDLr). Experiments using LDLr knockout cells showed a 62% decrease in the total parasite burden compared with wild-type *T. cruzi*-infected mice. LDLr signaling is also essential in the invasion and fusion of PV with host lysosomes (129). *T. brucei* also needs LDL or high-density lipoproteins (HDL) for its multiplication (131).

Leishmania amazonensis has specific binding sites to HDL and LDL in its membranes. The parasite can capture cholesterol from

LDL, and this process involves detergent-resistant membrane lipid microdomains. In all *L. amazonensis* extensions, host cholesterol is found; the intracellular compartments engaged in parasite lipid traffic and the presence of the LDLr remain to be discovered (130). Recently, Carvalho and colleagues found that some components of lipid metabolism had an association with lipoprotein lipase (LPL), apolipoprotein E (ApoE), and PPAR α gene polymorphisms and presented the risk markers of visceral leishmaniasis (VL). Individuals with clinical manifestation of VL filed high TAG and very-low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) levels, and low high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels. Furthermore, the LPL mutation (H+/H+ genotype and the H+ allele) was associated with elevated VLDL-C and TAG levels, reduced HDL-C levels and revealed an odds ratio of 21.3. The L162V polymorphism in the PPAR α gene showed an odds ratio of 8.77 for Leu/Val when compared with Leu/Leu genotype. Thus, high TAG and VLDL-C levels were associated with susceptibility to VL, whereas low HDL levels with resistance to *L. infantum* infection. The mutated LPL and the PPAR α Leu/Val genotypes may be considered risk markers for the development of VL (132).

Trypanosoma cruzi infection is capable of modulating cholesterol metabolism in the host tissue in both acute and chronic patients (133) as well as *L. major* in mice macrophages (48). Quantitative PCR analysis shows an 8,000-fold increase of LDLr levels in heart tissue of *T. cruzi*-infected mice compared with the control. Both, the accumulation of LDL and its receptor were observed around amastigote nests within infected cardiomyocytes (129). Like *T. cruzi*, *T. brucei*, and *L. amazonensis*, *T. gondii* also scavenges cholesterol from plasma (128). Experiments using LDLr knockout cells showed a 45% reduction in parasite load in *T. gondii*-infected LDLr knockout mice compared with control mice (134). However, Milovanović and colleagues showed a decrease in HDL and cholesterol in *T. gondii*-infected outbred mice, but LDL was unaltered until day 42 of infection. Moreover, they only observed an increase in LDL and consistent triglyceride levels at this end-point. The parasitemia only correlated with HDL levels and with LDL when the LDL levels were above 300 (135).

Host LDs are sources of lipids for many intracellular parasites. Intracellular parasites have evolved ways to attract host LDs to their phagosomal compartment and engulf them intact by unknown mechanisms (20, 33, 34, 48, 49). Although the *Toxoplasma* PV shares no characteristics with a phagosome, *Toxoplasma* also internalizes host LDs into the PV lumen. In *Toxoplasma*-infected cells, this process is independent of host Golgi or endoplasmic reticulum, and the parasite has cholesterol equally distributed, but the PV membrane is low in cholesterol. When in excess, parasites release cholesterol and phosphatidylcholine using membrane-associated ABC-transport proteins (136). Overexpressing TgRab51, a Rab5 homolog, parasite mutants have increased numbers of LD by enhanced uptake of cholesterol and had their growth accelerated (137).

Toxoplasma gondii scavenges host LDs' cholesterol and their lipolytic enzymatic activities to grow for its infectibility. It intercepts and engulfs host Rab7-associated LDs to the PV lumen, and the parasite lipase releases lipids from host LD making them accessible to the parasite. These LDs can be captured by endocytosis

(34) and the parasite can modify the host-derived lipids (138), largely exploring the host lipidome (34). Conversely, *Plasmodium* cannot store cholesterol, because they do not express an ACAT enzyme, indicating that the parasite needs to scavenge lipids from the host constantly (139). The blood-stage form of *Plasmodium* scavenges cholesterol from HDL particles or directly from the erythrocyte membrane; how cholesterol is then transported to the parasite is still unknown. It is important to note that *Plasmodium* expresses sterol translocators and transporter genes and they can collect membrane components in their plasma membrane (140, 141). Furthermore, the *Plasmodium* PV has physical contact with the host plasma membrane, and the intracellular parasites can access cholesterol (142). *Plasmodium* scavenges cholesterol from LDL and HDL particles and LDs from hepatocytes. *Plasmodium*-infected hepatocytes have genes encoding sterol biosynthesis and metabolism components upregulated (143). Both LDL-derived and host synthesized cholesterol are co-transported to the parasite' PV, but sterol biosynthetic pathway, or LDL defective cell lines, do not hamper parasite growth, suggesting compensatory ways to provide cholesterol to the parasite (144). Interestingly, the liver form's PV is enriched in cholesterol and tightly associated only with the host ER. It is permeable to small solutes through channels stably maintained by host-derived cholesterol accumulated at the PV membrane, suggesting that sterols might contribute to parasite nutrient acquisition (144, 145). Then, intracellular parasites have many strategies to scavenge cholesterol, and host LDs are the essential source (Figure 1).

The two parasite ACAT enzymes, which esterified cholesterol (146, 147), are known and orchestrate the formation of LDs into the parasites (31, 34, 128, 138, 148). The parasite also hijacks host Golgi-derived vesicles by Rab14, Rab30, and Rab43 transport, small GTPases family members, within the PV and acquires their sphingolipid content (125).

In Figure 1, we summarize the essential and general ways discussed above by which parasites capture cholesterol from membrane receptors and host LDs. The organelle interactions highlight their importance on the traffic of lipids and metabolites. Moreover, the LD formation on both host and parasite cytoplasm, as well as the LD's phagocytosis, discussed below are also illustrated as general characteristics of intracellular parasites.

Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and *T. gondii* tachyzoites can synthesize neutral lipids, such as triacylglycerol, and store them in LDs present in the parasite cytoplasm (34, 148). The three forms of *T. cruzi*'s life also have intracellular LD formation. Epimastigotes cultured in media with higher concentrations of serum showed an increase in both cytoplasmic LD and LD-associated to reservosomes. In LD fraction present in purified reservosomes, the major neutral lipid was cholesterol and cholesteryl ester. No sterol synthesized by parasite pathways, such as ergosterol or ergosterol ester was found, which reinforces the idea that the lipid content of the LD-associated with reservosomes comes from the uptake of exogenous lipids (149). Once endocytosed, these lipids may be used in biosynthetic pathways of the *T. cruzi*. Carriers ABCA1-like, closely related to the mammal's cholesterol and phospholipid carriers (150), were detected associated with the plasma membrane, intracellular vesicles and flagellar pocket in *T. cruzi* (151) and may participate in the

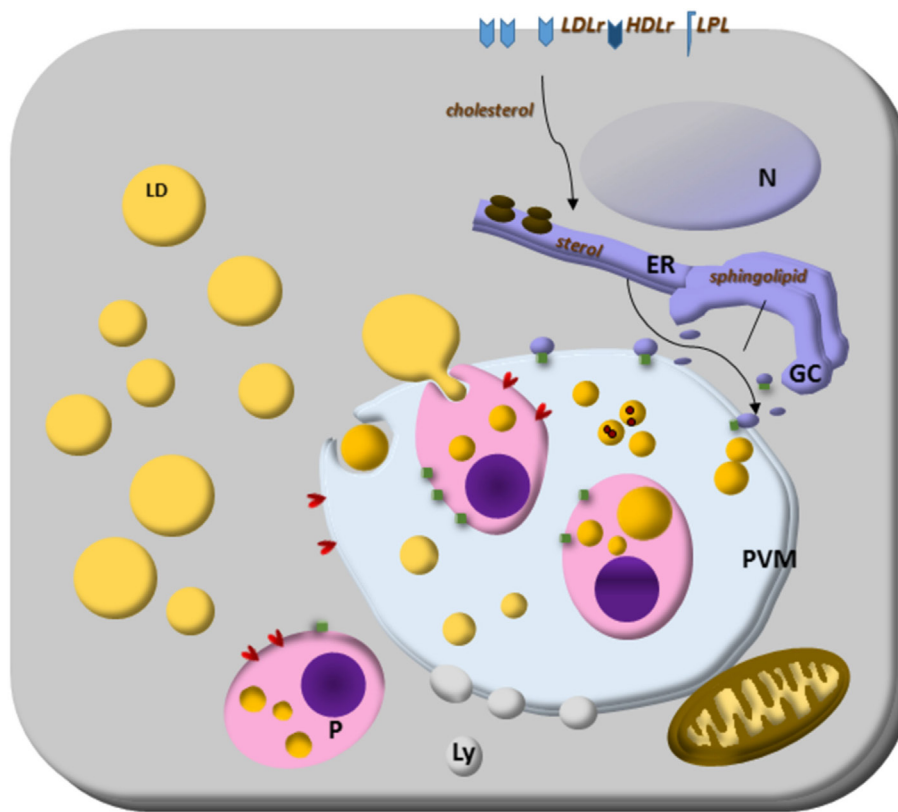


FIGURE 1 | Lipid droplets (LDs) on parasites lipid homeostasis. *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp., and *Toxoplasma gondii* cannot synthesize cholesterol, and the energy and lipid source for them is the host lipid synthesis and host LDs, as well as low-density lipoproteins, eventually high-density lipoproteins particles and lipoprotein lipase. The close relationship with other organelles through Rab proteins can be lipid sources, such as endoplasmic reticulum (ER) for sterol and Golgi complex (GC) for sphingolipid sources. Although the mechanisms are still unknown, some parasites can store lipids on their LD. Lipoprotein- and ABC-proteins are involved in the mammalian lipid transport, as well as important enzymes to lipid synthesis like ACAT and DGAT proteins. These proteins are also present in *T. gondii* and ACAT-like proteins are present in *Trypanosoma cruzi*. The parasite transfer lipids to their own LD to be stored, but in *Plasmodium* spp., or they metabolize them as in *Plasmodium* and *T. gondii*. The parasite and host LDs are involved in essential cell functions that can favor the survival of the parasite, such as energy and lipid source for intracellular parasites proliferation. They also can isolate lipids or toxic metabolites from the cytoplasm for detoxification, such as hemozoin from heme on *Plasmodium*-infected cell LD.

cholesterol transport captured into the cytoplasm. Furthermore, the presence of Rab 18 in reservosomes could contribute from the traffic of lipids to other organelles (152).

Interestingly, the LDs formation in *T. gondii* cytoplasm was observed only when the host cells are in a higher concentration of lipids (34). Then, the presence of LDs on *P. falciparum* and *T. gondii* was associated with parasite energy store and homeostasis; since they are in a higher concentration of lipids, they could be toxic to these parasites (34, 148).

LDs in a Mechanism of Heme Detoxification

Considering that the cholesterol source for an extracellular parasite residing within the mesenteric veins and capillaries of their hosts, would not be a problem, *Schistosoma mansoni* indeed induce a reduction in serum total cholesterol of their host (153). Curiously, this capability of hijack cholesterol from its host is correlated with decrease LD formation in the host. The *S. mansoni* experimental model also shows the decreased levels of serum cholesterol, and of LDs in the liver cells of ApoE

deficient mice fed a high-fat diet. Importantly, it also induced a systemic reduction of lipid since it was observed in adipose tissue around liver, heart, and blood vessels (153). The mechanisms responsible for this decrease remain unknown, but it may be dependent on the presence of parasite eggs and are related to the immune granulomas formed around them (153, 154). It was reported that eggs of *Schistosoma japonicum* require cholesterol ester for their maturation. The uptake of these lipids came from HDL particles and CD36-related protein-mediated internalization (155).

Noteworthy, *S. mansoni* may also secrete parasite LDs. Numerous LD in the gut of parasites had hemozoin associated, and the authors suggested the role of LD in a mechanism of heme detoxification during parasite blood feeding (156, 157). In agreement with this view, other authors observed a prominent production of LD in *Plasmodium berghei*-infected hepatocytes and inside the parasitophorous vacuole and the food vacuole of *P. falciparum*-infected erythrocytes (27, 158, 159). These data suggest that the LDs might play roles in the detoxification of heme in

the *Plasmodium* parasites (148). As summarized in **Figure 1**, the data discussed in the Sections “Protozoa Are Unable to Synthesize Cholesterol De Novo and May Retrieve It From Host LDs” and “LDs in a Mechanism of Heme Detoxification” indicate that LD may exert a parasite energy store and a functional role in parasite homeostasis including detoxification functions.

LDs in Parasite May Modulate Host Response

Intracellular parasites, such as *T. cruzi*, *Leishmania infantum chagasi*, *P. falciparum*, and *T. gondii*, also have cytoplasmic LDs. Notably, experiments with *T. cruzi* and *L. i. chagasi* are shedding light into LD functions in parasites. They went beyond sites for energy storage and suggested their involvement in the modulation of the host immune response, and participation in mechanisms of virulence (46, 160). These recent findings are illustrated in **Figure 2** and discussed below.

Novel findings show that *L. i. chagasi* cytoplasmic LDs are intracellular sites of prostaglandin synthesis, mostly $\text{PGF}_{2\alpha}$ production (45). *L. i. chagasi* has increased LD numbers and amplified expression of prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ synthase according to metacyclogenesis stage: metacyclic and amastigotes LD formation raised, and is the $\text{PGF}_{2\alpha}$ source. Accordingly, it was demonstrated that the FP receptor is localized in the early phagocytic vacuoles and on surface parasitophorous vacuoles during macrophages infection with metacyclic forms of *L. i. chagasi*. Furthermore, the inhibition of the FP receptor in the macrophages diminished the *L. i. chagasi* parasite load 72 h after infection showing that the parasites may mobilize the eicosanoid machinery in the most infective stage of the parasite and suggest that the *Leishmania's* LD could act as a virulence factor (45).

Trypanosoma cruzi LDs have also been associated with eicosanoid metabolism. The LDs of amastigotes growing *in vivo* have

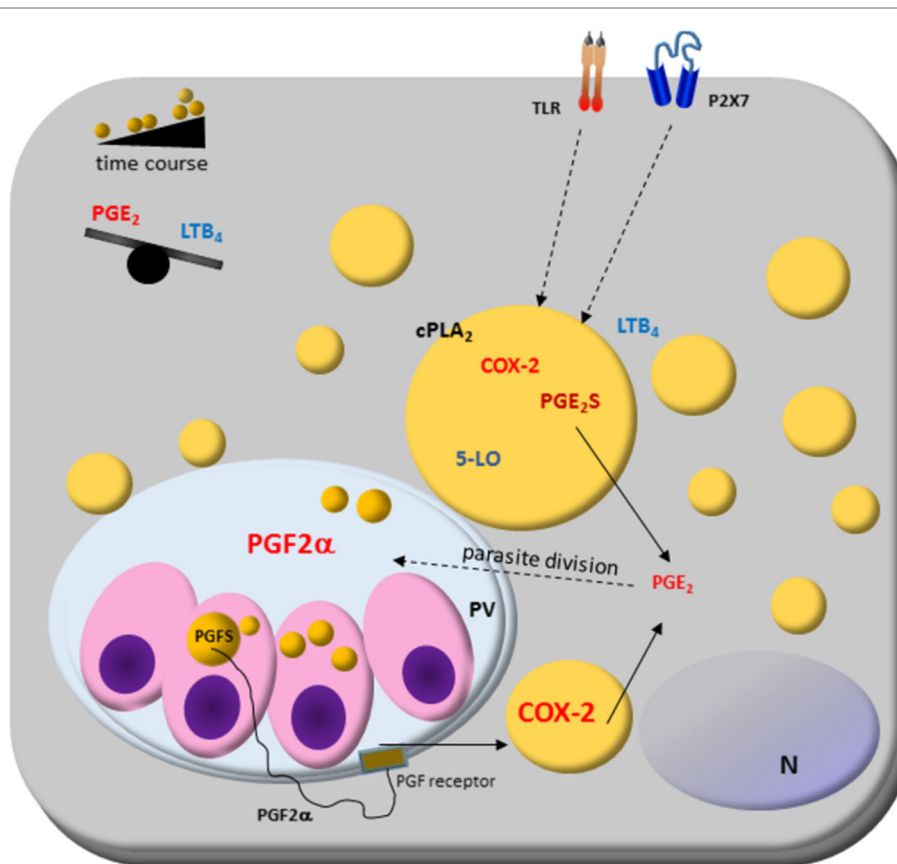


FIGURE 2 | Host cell lipid droplet (LD) biogenesis in response to interaction with protozoan parasites. Increased numbers of LDs occur in the cytoplasm of many cell types after infection with different parasite-containing vesicles as well as on cytoplasm of these parasites, such as *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp., and *Toxoplasma gondii*. The signaling from toll-like receptors (TLRs) by pathogens and pathogen-derived molecules triggers signaling pathways, such as PPARs and MAPKs, which are involved in the formation of LD. LDs produce lipid mediators; they compartmentalize both the substrate and the enzymatic machinery necessary for eicosanoid syntheses, such as cPLA_2 , cyclooxygenases (COX-2), and prostaglandin synthases. Prostaglandin E_2 (PGE_2) production benefits parasite survival, as shown in *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Plasmodium*, and *Toxoplasma* infections. On the other hand, leukotriene B_4 (LTB_4) production by host cells via $\text{P}_2 \times 7$ receptor is related to parasite killing as seen in *Leishmania* infection, where LDs biogenesis and an anti-inflammatory balance in the $\text{PGE}_2/\text{LTB}_4$ axis could facilitate the *Leishmania* transmissibility and infection *in vivo*. Cytoplasmic LD in *Leishmania* express prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ synthase (PGFS) responsible for $\text{PGF}_{2\alpha}$ production. The $\text{PGF}_{2\alpha}$ receptor (FP) is present on parasite vacuole (PV) surface, suggesting these LDs could act as a virulence factor. Then, LD could be involved in inflammation and immune evasion.

increased the size and electron-density than those from amastigotes cultured *in vitro* (46). Trypomastigotes forms also increased LD after both host interaction and exogenous AA stimulation. The AA content in LDs purified from AA-stimulated parasites increased and these parasites released high amounts of PGE₂ and showed PGE₂ synthase expression. Importantly, a PGE₂ synthesis occurred within LDs from AA-stimulated trypomastigotes, indicating that LDs are essential sources of PGE₂, a potent lipid mediator that inhibits many aspects of immune responses, and can be implicated in the pathogen survival (46). These data demonstrate novel functions for parasite-derived LDs in eicosanoid metabolism and evasion of the host immune response (45, 46).

Parasites Induce LDs on Host Cells: Friend or Foe?

Increasing data about the modulation of host lipid metabolism through targeting LD formation and accumulation by intracellular

pathogens emerge as a typical phenotype to viral, bacterial, and parasitic infections and highlights the involving of LD in different aspects of inflammation [reviewed by Bozza et al. (5) and Saka and Valdivia (17)]. However, the understanding of LD formation and their dynamics in the interplay between hosts and parasites is still limited. Here, we will discuss the mechanisms known that parasites induce LD formation on host cells. **Figures 2 and 3** summarize the data known until now.

LDs in Eicosanoids Production and the Regulation of Host-Parasite Interactions

As a major source of eicosanoids production, LDs have been implicated in the regulation of parasite-induced inflammation [reviewed in Bozza et al. (5, 90)]. Eicosanoids are bioactive molecules produced by the oxidation of AA by specific enzymes, such as cyclooxygenases (COX), lipoxygenases, and terminal eicosanoid synthases. Prostaglandins have a wide variety of

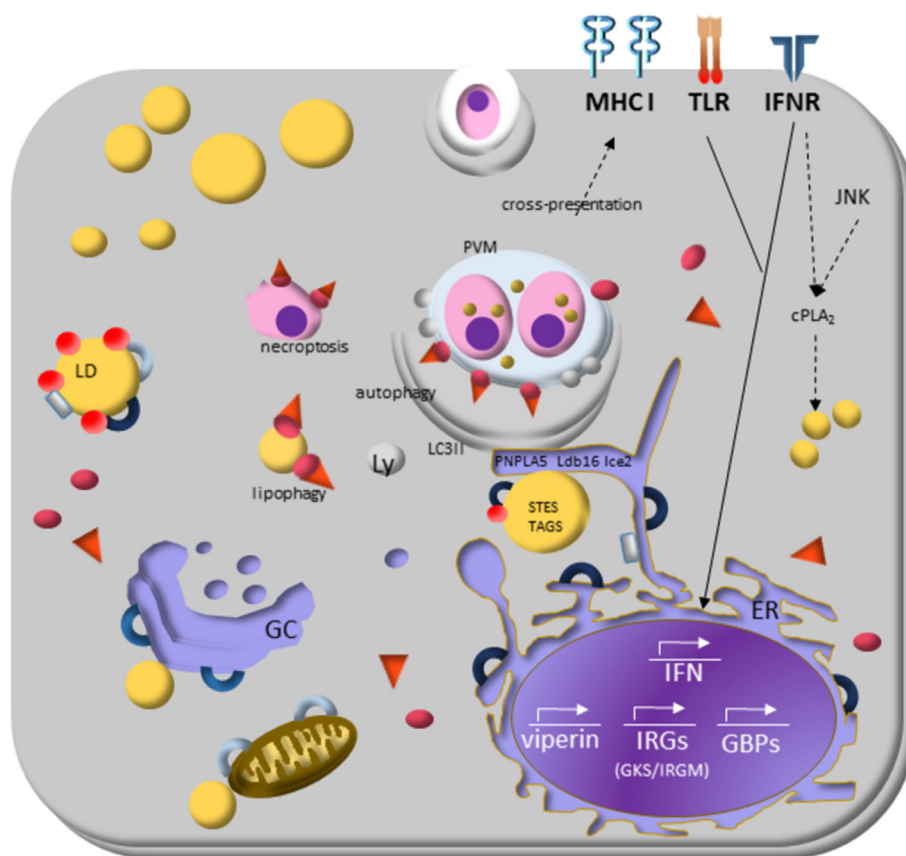


FIGURE 3 | Lipid droplets (LDs) and the molecular mechanisms regulating immune response during protozoan infection. Interferon (IFN)- γ receptor signaling induces transduction of GTPases family molecules—immunity-related GTPases (GKS e IRGM proteins) and GBPs subfamilies—that play essential roles in membrane vesicular trafficking, autophagy, and antimicrobial and anti-inflammatory responses. IRGM are abundant proteins on LDs and “protects self-vesicles” from GKS and guanylate binding proteins (GBPs) destruction by autophagy machinery. The inactive GKS and GBP proteins build a pool of molecules available on cytoplasm and could have a stable association with the IRGM-deficient membrane, as parasitophorous vacuole membrane and eventually as LDs, to target them to autophagy, or lipophagy, respectively. LDs provide fatty acids, and lipids employed the phagophore membrane, implying their enzymes [steryl esters (STEs) and TAGs] on autophagosome biogenesis. IFN- γ signaling induces upregulation of LDs, and it appears to involve perilipin 2 (PLIN2)/ADRP that physically associates with IRGM. LD is also related to cross-presentation pathway since depletion of LDs by pharmacological inhibition of DGAT and by PLIN2/ADRP deficiency led to decreased LD biogenesis and cross-presentation since MHC-I surface expression, and the rate of antigen-presenting cell conjugated with T CD8+ lymphocyte are reduced.

activities, including down-regulation of macrophage functions, and regulatory roles in immune responses. Notably, COX-2 and PGE₂-synthase compartmentalize within LDs (10, 18, 21), and LDs were the main site for heightened PGE₂ production during *T. cruzi* infection (30).

The crucial role of PGE₂ in the modulation of the host immune response can be illustrated by its higher plasma levels in patients with localized or diffuse cutaneous leishmaniasis than patient control (161). Also, the PGE₂ secretion through PLA₂ induced in the progression of cutaneous disease in *L. amazonensis* infection (162). More than that, PGE₂ production benefits parasite survival, as showed in *Leishmania* spp. (35, 163–165), *T. cruzi* (20, 30, 166), and *T. gondii* infections (32, 33, 37).

This association between LD formation and PGE₂ production was observed during *in vivo* infection with *T. cruzi* (20). Infected macrophages exhibit positive immunostaining for COX-2 and PGES, and both co-localize with PLIN2/ADRP staining, a LD structural protein, which confirms the presence of these enzymes inside LD in *T. cruzi*-infected macrophages. The association of PGE₂ production and parasite division highlighted the LD participation on evasion mechanisms of *T. cruzi* (30, 167).

In *Toxoplasma*-infected macrophages and muscle cells, the host LD formation is associated with reduced host microbicides properties, with an increased PGE₂ production, a potent inhibitor of Th1 response, and with a decreased nitric oxide production (32, 33). In muscle cells, the number of LD increased in a time course manner earlier as 6 h, until 48 h post-infection. The LD formation correlated with higher COX-2 and PGE₂ expression, which could be contributing to IL-12 and interferon (IFN)- γ secretion from muscle cells (33). The production of the PGE₂ with IL-12 and IFN- γ seems contradictory. However, IFN- γ is essential to control *T. gondii* infection—and the infections with others parasites [reviewed in Ref. (168–170)].

The secretory serine protease of *Leishmania donovani* is involved in down-regulation of macrophage microbicidal activity by inducing COX-2-mediated PGE₂ release (171). The cytokines, such as IL-12 and IFN- γ , could favor the cyst formation in muscle cells and the establishment and maintenance of the chronic disease and transmission source *via* consumption of raw or undercooked meat containing *T. gondii* (33). The mechanisms of these processes await further investigation. In dendritic cells, *L. amazonensis* infection likewise induced LD formation and the modulation of cholesterol uptake pathways (172). Differently, *L. i. chagasi*-infected macrophages did not show LD formation, only the parasites showed LD formation (45).

The pathogenesis of severe malarial anemia is also due to the release of soluble mediators of inflammation as part of host immune response driven by phagocytosis of malarial pigment (hemozoin) present in parasitized RBC or free release on lysis of these cells (173). Although the suppression of COX-2-derived PGE₂ is also associated with enhanced severity of malaria, how it alters the erythropoietic cascade remains to be determined (174, 175). Recently, increased LDs were demonstrated during malaria infection in different mice strains, however, there are not an association of number of LDs and disease severity (28).

Importantly, the stimulation of PLA₂-COX-2-PGE₂ pathway that can suppress macrophage's activation is observed only

in macrophages infected with live *L. major* parasites (37), highlighting the active role of the parasite with its cell host. Nevertheless, the protein level of COX-2 is unchanged in *L. donovani* (176) and *L. major* infection, suggesting that LD formation may not correlate with PGE₂ production in *L. donovani* and *L. major* infections (48). However, recent data showed the essential role of PGE₂ in suppressing *L. major*-infected macrophages, and this suppression was mediated by B1 cell IL-10 production (177).

A key observation is the host LDs in close apposition—and even inside—parasite-containing phagosomes, such as in *T. cruzi* (20, 49), *L. major* (48), *L. amazonensis* (172), and *T. gondii* infections (33, 34). Nolan et al. (34) showed that the host LDs are necessary for *Toxoplasma* infectivity in human foreskin fibroblasts (HFFs) and mouse embryonic fibroblasts (MEFs). The host LDs progressively increased with a peak of 8 h post-invasion (p.i.) that coincided with PLIN2/ADRP and *GDAT2* upregulation transcription, suggesting stimulation of TAG synthesis in LD, and the host LDs cluster around PV. After that, their number decline and abruptly dropped until parasite egress at 24 h in HFF. In MEF, the host LD and *GDAT2* decrease but the LDs remain around the PV. The authors suggested that the LD biogenesis and breakdown for lipolysis, the distribution of LD, and the *DGAT2* expression levels reflect the highly dynamic status of host neutral lipid metabolism during infection. *T. gondii* may drive it, but it is also be part of a host cell defense mechanism in response to parasite-mediated lipid imbalances (34).

Lipid droplet formation in *L. major*-infected macrophages was very quick, time-dependent, and independent of parasite viability. It suggests that the trigger for LD formation by *L. major* also has a cellular origin, as *T. cruzi* and *T. gondii* infections do (30, 33, 37). Microarray data and transcriptomic analysis from *L. major*-infected macrophages support this formation. They revealed an enhanced cholesterol-uptake coupled with a decreased cholesterol efflux (48) and cholesterol uptake combined with activation of *de novo* TAG synthesis (37). Furthermore, LD formation was independent of cytoskeleton movement and *L. major* phagocytosis (37). As suggested for mycobacterial infections (41, 178), the paracrine induction of LD formation is also observed in the parasites *T. cruzi* (30), *Toxoplasma* (33) and *L. major* (37) infection. Then, soluble factors from infected cells or parasites may act in a paracrine manner to induce LD formation in uninfected bystander cells suggesting that receptors are triggering and downstream signaling pathways are sufficient to cause LD formation (30, 37, 178). It seems to have more and fundamental participants to achieve a homeostasis pattern. In *L. amazonensis* infection, Afonso e collaborators suggested that PGE₂ and TGF- β 1 pathways are involved with the enhanced parasite burden in *L. amazonensis* (179).

The roles of LDs in leukotriene synthesis during infection by intracellular parasites have not yet been established. This would be an important point to address since there is solid evidence that leukotriene B₄ (LTB₄) production by host cells is related to parasite killing in *Leishmania* infection by nitric oxide and reactive oxygen species production (180–183). Although there is evidence that 5-LO enzyme co-localize with LDs in hepatic stellate cells from schistosomal granulomas, where it is involved in the release of Cys-LTs in a TGF- β -regulated manner, potentially

influencing pathogenesis and liver fibrosis in schistosomiasis (184).

The *Leishmania* vector (sand fly, *Lutzomia longipalpis*) saliva components have a central role in parasite infection. They can modulate eicosanoids metabolism and LDs formation in the host cells (164, 185, 186). The *Lutzomia longipalpis* saliva activates macrophages to produce PGE₂ but not LTB₄ (186) and the sand flies salivary gland sonicate (SGS) increases PGE₂ production by neutrophils during *L. infantum* infection (164). The SGS during *L. infantum* inoculation increased the parasite viability inside peritoneal cells, and COX-2 inhibition blocked this action. The LD biogenesis on host or parasite and an anti-inflammatory balance in the PGE₂/LTB₄ axis could facilitate the *Leishmania* transmissibility and infection *in vivo* (160, 186).

The lipid derived pro-resolving mediators called lipoxins, resolvins, and protectins are potent anti-inflammatory mediators involved in the resolution of inflammation. As reviewed by Russell and Schwarze, lipoxins are protective to host control of disease caused by *T. gondii*, *T. cruzi*, and *P. berghei* but not by *Mycobacterium tuberculosis* bacteria. It could be related to the balance between pathogen-control and excessive immune response (187). However, the role of LDs in the synthesis of lipid mediators involved in the resolution of inflammation has not yet been characterized and it would be of interest to investigate whether LD is also involved in lipoxin- or resolvins-mediated mechanisms of pathogen evasion or destruction.

Lipid Droplets in Vesicular Interactions and the Resistance of Host to Parasite Infections

Interferons are effector key molecules involved in protective responses to viruses and intracellular pathogens [reviewed in Schroder et al. (168), Schneider et al. (169), and Pilla-Moffett et al. (170)]. They have their antimicrobial effects by a considerable remodeling transcriptional expression profile of target cells bearing the IFN receptors (188, 189). One of these IFN-stimulated genes encoding viperin (for virus inhibitory protein, ER-associated, and IFN-inducible), a canonical protein evolutionary conserved and found to be highly upregulated in response to LPS, dsDNA, and RNA analogs, and in infection with various viruses. Interestingly, viperin localizes to the cytoplasmic leaflet of the ER and LD, and LDs are sites of viral assembly (190, 191), and has antiviral activity against various human viruses (192).

Saka and Valdivia (17) already draw the attention for the exciting data showing that two signaling pathway (JNK and IFN) are involved in the cPLA2 activation required for LD biogenesis (193), as well as in immunity to *Chlamydia trachomatis* (194) and *C. pneumoniae* (118). In **Figure 3**, we highlighted the receptors described to induce LD formation and the key molecules and pathways involved in the modulation of parasite response. Others possible partners we also discuss in the following text.

Interferon-induced resistance genes include members of two GTPase families named immunity-related GTPases (IRGs) and guanylate binding proteins (GBPs). The IRGs proteins are subdivided into GKS and GMS IRGs class. The current model of IRGs interaction describes that, in IFN- γ -activated cells, the effector GKS proteins are cytosolic and stay in the inactive GDP-bound state by GMS regulatory proteins (195, 196). The specific

membrane targeting of the GMS proteins prevent accumulation of activated GKS proteins and enable GKS proteins to distinguish organelles membranes from that of pathogen vacuoles. The GMS proteins are tightly associated with endomembrane of cellular organelles and restricted to specific organelles: Irgm1 localizes mainly to the Golgi complex membrane, endolysosomal compartment, mitochondria, peroxisomes, and LDs in uninfected cells; Irgm2 localizes to the Golgi and Irgm3 to the ER and LD (197).

Several members of both GTPases families can recognize specific host lipid molecules, to translocate and to adhere precisely to parasitophorous vacuole membranes (PVMs), labeling it for disruption or delivery to lysosomes to inhibit intracellular pathogen growth [reviewed in MacMicking (189)]. The specificity of these intracellular targeting events is well documented (168, 197–199) and the underlying mechanism is beginning to be deciphered (200–202). When GMS proteins are absent in the cell, GKS proteins activate spontaneously and form aggregate-like structures, preferentially on PVMs. The consequence is the disruption of the vacuole and the release of the pathogen into the cytosol or both vacuole and parasite disruption, resulting in either necroptosis or autophagy (203, 204).

Bougnères et al. (205) showed the Irgm3 role in LD formation, as Irgm3-deficient DCs do not accumulate LDs (205). DCs isolated from Irgm3-deficient mice showed the impaired capacity to stimulate specific CD8+ T cells owing to antigen phagocytosis and did not increase LD biogenesis upon IFN- γ stimulation when compared with wild-type mice. The increased antigen cross-presentation competence correlated with LD biogenesis and the chemically inhibited LD biogenesis blocked it. The data show that DCs from PLIN2 (ADRP) deficient mice had similar defects in antigen cross-presentation that Irgm3-deficient mice had and that Irgm3 interacts with PLIN2 suggest that LDs play a significant role in regulating cross-presentation (205). The absence of Irgm3 protein can explain the lack of LD biogenesis, where unprotected by IRGM protein, LD suffer an attack of GKS-GBP proteins bounding on their membrane delivering them to autophagy pathway (201).

The essential functions of GBPs family proteins seem to be their ability to target membranes and to oligomerize in them. Several GBPs harbor C-terminal CaaX motifs for isoprenylation that enable them to associate with intracellular endomembranes (206). They bind and hydrolyze guanosine phosphated, allowing GBPs to form homo- and hetero-oligomers. Once docked on PV membrane, GKS and GBPs proteins can recruit antimicrobial protein complexes, including autophagic cascade and inflammasome pathway to destroy the parasite vacuolar compartment [reviewed by Schroder et al. (168)]. Interestingly, GBP proteins stimulate caspase-11-dependent pyroptosis in macrophages infected with Gram-negative vacuole resident bacteria leading the activation of the non-canonical inflammasome (207, 208).

As inactive proteins, GKS and GBP have lipid binding substrates on LD and *T. gondii* PVMs. Haldar et al. (201) proposed that the high expression of GMS proteins on LDs make them regulatory proteins by increasing the availability of GKS and GBP inactive proteins allowing them to bind on PVMs and deliver them to autophagosomes for parasite degradation. It was recently shown that murine GBP2 positively regulates the recruitment of

Irga6 (a GKS protein) to *T. gondii* PVMs (209) and directly targets the membrane of *T. gondii* after disruption of PVM (202). Then, the vacuolar contents released into the cytosol may be removed through autophagy (198, 203). The vacuolar contents released may be ubiquitinated, resulting in the recruitment of p62. ATG3 and p62 also promote the cross-presentation of vacuolar antigens, derived from lysed vacuoles, on MHC class I (210).

Haldar and colleagues showed that Irgm1 and Irgm3 co-localize on LD of IFN- γ -treated MEFs and that Gbp1 effector protein p62 co-localizes with IRGM-deficient LDs MEFs. Ichimura and Komatsu showed that p62Gbp1 binds directly to the LC3 to deliver its cargo to autophagosomes (211). As LDs from IRGM-deficient mice were inside autophagosomes upon IFN- γ activation, it could suggest that IRGM was not a role in LD formation. Instead, Irgm1 and Irgm3 proteins could protect LDs from degradation in MEFs and p62Gbp1 could start LDs lipophagy (201).

Lipophagy occurs when lysosomes degrade LD after its sequestration by autophagosomes. The recognition of LD by autophagic machinery is unknown [reviewed by Martinez-Lopez and Singh (212)]. Lipophagy could be related to lipid homeostasis, where control size and the number of LDs are making a significant balance of energy source and survival mechanisms, such as cell stress. Accumulating evidence suggest the participation of LD in the regulation of the autophagic process and their destruction by autophagy *via* lipophagy (212–214). LDs also act in concert with the proteasomal and autophagic pathways of protein degradation, proposing their role on isolation stress products inside LD, such as apo B in hepatocytes and α -synuclein in Parkinson's disease (215, 216). On atherosclerosis, however, it seems that IRGM has a pathogenic role. IRGM proteins participate in the positive feedback where ox-LDL up-regulates IRGM in macrophage, which, in turn, modulates the CD36 to promote the ox-LDL uptake (217). Studies on other systems are necessary to investigate the IRGM pathogenic role.

Curiously, IRGM proteins physically interact with the central autophagy regulators and make molecular complexes with the pathogen sensor NOD2. In response to PAMPs, the RIG-1, and TLR3 signaling boost the NOD2-IRGM association. NOD2-IRGM complex promotes the assembly of autophagy regulators highlighting the critical role of IRGM proteins as organizer of the core autophagy machinery and as a vital component of antimicrobial and anti-inflammatory responses (200, 218, 219).

Recently, Shpilka and collaborators suggested that LDs provide fatty acids and lipids for the formation and elongation of the phagophore membrane (220). This work also showed the involvement of the enzymes responsible for the TAG and steryl esters synthesis with autophagosome biogenesis in yeasts strains. Moreover, they showed the essential participation of ER-LD contact-site proteins, Ldb16 and Ice2, in autophagosome formation. They suggested that these two organelles act together, and the lipid transfer from LD to the ER is necessary for autophagosome formation (220). Previously, the contribution of TAG mobilization from the LDs, by the lipase PNPLA5, to autophagosome biogenesis was shown (213).

As the autophagic machinery is also implicated in the formation and growth of LDs (221), feedback between these two

processes could drive LD growth, autophagosome biogenesis, and cellular homeostasis.

Our current understanding of IFN-inducible GTPases role on host resistance to the intracellular protozoa and on the LD role to self-organelle recognition appoint to LD as important cell function modulator, implying the participation of LDs on parasite immune response.

FINAL REMARKS AND FUTURE PERSPECTIVES

A number of key findings have evidenced a protagonist role for LDs in host parasite biology. LDs were shown to have major roles in metabolism, signaling and detoxification, and actively participates in innate immunity response to infection. Parasite-host interactions modulate the lipid metabolism of both organisms, and these studies provide valuable knowledge on cell biology, immune response, and drugs development. In leukocytes and other cells involved in infectious conditions, LD biogenesis is highly induced through regulated mechanisms that involve innate immune receptors and transcriptional dependent and independent pathways. Notably, it is now well established that LDs are main sites for the generation of lipid mediators involved in the host immune responses. The evolving understanding of the interplay of LDs and critical pathways on immune response, as IFN-induced resistance genes, autophagy, antigen cross-presentation and areas that still need to have roles of LDs investigated like resolution of inflammation, could illuminate our knowledge of the signaling ways that control parasite infections or, better to say, establish homeostasis with host and parasite living together. Furthermore, it is not a surprise that the intracellular parasites have developed strategies to evade or use LDs for surviving. Parasites have adapted to exploit LDs as a source of lipids for membrane building, a crucial step for parasite growth, and as a negative regulator of immune response.

Although great advances in the understanding of the mechanisms of LD biogenesis and its roles in lipid metabolism and inflammatory mediator production have been achieved, critical questions remain about the formation and the functions that LDs play in infectious diseases. In conclusion, recent studies have identified LDs as multifunctional organelles with key functions in lipid storage and cell signaling in inflammation, and as such, they are emerging as attractive target candidates for therapeutic intervention. Future studies will be necessary to characterize the role of LDs as targets for therapeutic intervention in infectious diseases that progress with increased LD accumulation. These will need to include the development of selective LD inhibitors. Moreover, the safety characterization of LD inhibition is required, as lipid accumulation within LDs may act as a protective mechanism in lipid homeostasis against cellular lipotoxicity.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AV and PB contributed conception and design of the review. AV, KO, and LT organized the database. AV wrote the first draft of the

manuscript. AV, PB, CM-M, KO, and LT contributed to writing a subset discussion and to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to recognize present and past members of the Laboratory of Immunopharmacology for their valuable

contributions. We acknowledge the comments and input of Dr. Jens Rietdorf (CDTS, FIOCRUZ). We apologize to investigators whose relevant work has not been cited because of space constraints. The work of the authors is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brasil); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil); PAPES/Fiocruz; Oswaldo Cruz Institute (IOC), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

REFERENCES

- Walther TC, Chung J, Farese RV. Lipid droplet biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2017) 33:491–510. doi:10.1146/annurev-cellbio-100616-060608
- Pol A, Gross SP, Parton RG. Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites. *J Cell Biol* (2014) 204:635–46. doi:10.1083/jcb.201311051
- Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* (2001) 40:325–438. doi:10.1016/S0163-7827(01)00013-3
- Ding Y, Yang L, Zhang S, Wang Y, Du Y, Pu J, et al. Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets. *J Lipid Res* (2012) 53:399–411. doi:10.1194/jlr.M021899
- Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies – Biogenesis functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta* (2009) 1791:540–51. doi:10.1016/j.bbali.2009.01.005
- Melo RCN, D'Avila H, Wan H-C, Bozza PT, Dvorak AM, Weller PF. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *J Histochem Cytochem* (2011) 59:540–56. doi:10.1369/0022155411404073
- Borén J, Taskinen MR, Olofsson SO, Levin M. Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship. *J Intern Med* (2013) 274:25–40. doi:10.1111/joim.12071
- Paul A, Chang BH, Li L, Yechoor VK, Chan L. Deficiency of adipose differentiation-related protein impairs foam cell formation and protects against atherosclerosis. *Circ Res* (2008) 102:1492–501. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.168070
- Yuan Y, Li P, Ye J. Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis. *Protein Cell* (2012) 3:173–81. doi:10.1007/s13238-012-2025-6
- Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, Robbs BK, Oliveira SS, et al. Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res* (2008) 68:1732–40. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1999
- Bozza PT, Viola JPB. Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (2010) 82:243–50. doi:10.1016/j.plefa.2010.02.005
- Vieira-de-Abreu A, Assis EF, Gomes GS, Castro-Faria-Neto HC, Weller PF, Bandeira-Melo C, et al. Allergic challenge-elicited lipid bodies compartmentalize in vivo leukotriene C 4 synthesis within eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2005) 33:254–61. doi:10.1165/rcmb.2005-0145OC
- Liu L, Zhang K, Sandoval H, Yamamoto S, Jaiswal M, Sanz E, et al. Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell* (2015) 160:177–90. doi:10.1016/j.cell.2014.12.019
- Cabirol-Pol M-J, Khalil B, Rival T, Favre-Sarrailh C, Besson MT. Glial lipid droplets and neurodegeneration in a *Drosophila* model of complex I deficiency. *Glia* (2018) 66:874–88. doi:10.1002/glia.23290
- Bozza PT, Melo RCN, Bandeira-Melo C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther* (2007) 113:30–49. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.06.006
- van der Meer-Janssen YPM, van Galen J, Batenburg JJ, Helms JB. Lipids in host-pathogen interactions: pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Prog Lipid Res* (2010) 49:1–26. doi:10.1016/j.plipres.2009.07.003
- Saka HA, Valdivia R. Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2012) 28:411–37. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-153958
- Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, et al. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol* (2002) 169:6498–506. doi:10.4049/jimmunol.169.11.6498
- Cardona PJ, Llatjós R, Gordillo S, Díaz J, Ojanguren I, Ariza A, et al. Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* (2000) 52:156–63. doi:10.1046/j.1365-3083.2000.00763.x
- Melo RC, D'Avila H, Fabrino DL, Almeida PE, Bozza PT. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell* (2003) 35:59–67. doi:10.1016/S0040-8166(02)00105-2
- D'Avila H, Melo RCN, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol* (2006) 176:3087–97. doi:10.4049/jimmunol.176.5.3087
- Kumar Y, Cocchiari J, Valdivia RH. The obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* targets host lipid droplets. *Curr Biol* (2006) 16:1646–51. doi:10.1016/j.cub.2006.06.060
- Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, et al. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog* (2009) 5:e1000632. doi:10.1371/journal.ppat.1000632
- Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, et al. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94:1200–5. doi:10.1073/pnas.94.4.1200
- Hope RG, Murphy DJ, McLauchlan J. The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *J Biol Chem* (2002) 277:4261–70. doi:10.1074/jbc.M108798200
- Sorgi CA, Secatto A, Fontanari C, Turato WM, Belanger C, de Medeiros AI, et al. *Histoplasma capsulatum* cell wall-glucan induces lipid body formation through CD18, TLR2, and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B4 generation and role in HIV-1 infection. *J Immunol* (2009) 182:4025–35. doi:10.4049/jimmunol.0801795
- Rodríguez-Acosta A, Finol HJ, Pulido-Méndez M, Márquez A, Andrade G, González N, et al. Liver ultrastructural pathology in mice infected with *Plasmodium berghei*. *J Submicrosc Cytol Pathol* (1998) 30:299–307.
- Borges TKS, Alves ÉAR, Vasconcelos HAR, Carneiro FP, Nicola AM, Magalhães KG, et al. Differences in the modulation of reactive species, lipid bodies, cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase and PPAR- γ in cerebral malaria-susceptible and resistant mice. *Immunobiology* (2017) 222:604–19. doi:10.1016/j.imbio.2016.11.010
- Melo RCN, Fabrino DL, Dias FF, Parreira GG. Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflamm Res* (2006) 55:342–8. doi:10.1007/s00011-006-5205-0
- D'Avila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, et al. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E2 generation and increased parasite growth. *J Infect Dis* (2011) 204:951–61. doi:10.1093/infdis/jir432
- Coppens I. Contribution of host lipids to toxoplasma pathogenesis. *Cell Microbiol* (2006) 8:1–9. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00647.x

32. Mota LA, Roberto Neto J, Monteiro VG, Lobato CS, Oliveira MA, Cunha Md, et al. Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associate with the parasitophorous vacuole and decrease their microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2014) 109:767–74. doi:10.1590/0074-0276140119
33. Gomes AF, Magalhães KG, Rodrigues RM, de Carvalho L, Molinaro R, Bozza PT, et al. *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN- γ and PGE2. *Parasit Vectors* (2014) 7:47. doi:10.1186/1756-3305-7-47
34. Nolan SJ, Romano JD, Coppens I. Host lipid droplets: an important source of lipids salvaged by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* (2017) 13:e1006362. doi:10.1371/journal.ppat.1006362
35. Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Ávila H, Bozza PT, Takiya CM, et al. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect* (2009) 11:181–90. doi:10.1016/j.micinf.2008.11.006
36. Rodríguez NE, Lockard RD, Turcotte EA, Araújo-Santos T, Bozza PT, Borges VM, et al. Lipid bodies accumulation in *Leishmania infantum* -infected C57BL/6 macrophages. *Parasite Immunol* (2017) 39:e12443. doi:10.1111/pim.12443
37. Rabhi S, Rabhi I, Trentin B, Piquemal D, Regnault B, Goyard S, et al. Lipid droplet formation, their localization and dynamics during *Leishmania* major macrophage infection. *PLoS One* (2016) 11:1–19. doi:10.1371/journal.pone.0148640
38. Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Torocsik D, D'Ávila H, Dezso B, et al. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol* (2009) 183:1337–45. doi:10.4049/jimmunol.0900365
39. Almeida PE, Roque NR, Magalhães KG, Mattos KA, Teixeira L, Maya-Monteiro C, et al. Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by *Mycobacterium bovis* BCG infection. *Biochim Biophys Acta* (2014) 1841:97–107. doi:10.1016/j.bbali.2013.10.008
40. Mattos KA, Oliveira VC, Berrêdo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LC, Melo RC, et al. *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol* (2014) 16:797–815. doi:10.1111/cmi.12279
41. Mattos KA, Lara FA, Oliveira VGC, Rodrigues LS, D'Ávila H, Melo RCN, et al. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell Microbiol* (2011) 13:259–73. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01533.x
42. Rajaram MVS, Brooks MN, Morris JD, Torrelles JB, Azad AK, Schlesinger LS. *Mycobacterium tuberculosis* activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. *J Immunol* (2010) 185:929–42. doi:10.4049/jimmunol.1000866
43. Pacheco P, Vieira-de-Abreu A, Gomes RN, Barbosa-Lima G, Wermelinger LB, Maya-Monteiro CM, et al. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene b₄-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. *J Immunol* (2007) 179:8500–8. doi:10.4049/jimmunol.179.12.8500
44. Mattos KA, D'Ávila H, Rodrigues LS, Oliveira VGC, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol* (2010) 87:371–84. doi:10.1189/jlb.0609433
45. Araújo-Santos T, Rodríguez NE, Moura-Pontes S, Dixt UG, Abánades DR, Bozza PT, et al. Role of prostaglandin F_{2 α} production in lipid bodies from *Leishmania infantum* chagasi: insights on virulence. *J Infect Dis* (2014) 210:1951–61. doi:10.1093/infdis/jiu299
46. Toledo DA, D'Ávila H, Melo RC. Host lipid bodies as platforms for intracellular survival of protozoan parasites. *Front Immunol* (2016) 7:174. doi:10.3389/fimmu.2016.00174
47. Cocchiari J, Kumar Y, Fischer ER, Hackstadt T, Valdivia RH. Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the *Chlamydia trachomatis* parasitophorous vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105:9379–84. doi:10.1073/pnas.0712241105
48. Rabhi I, Rabhi S, Ben-Othman R, Rasche A, Consortium S, Daskalaki A, et al. Transcriptomic signature of *Leishmania* infected mice macrophages: a metabolic point of view. *PLoS Negl Trop Dis* (2012) 6:e1763. doi:10.1371/journal.pntd.0001763
49. Melo RC, Dvorak AM. Lipid body–phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog* (2012) 8:e1002729. doi:10.1371/journal.ppat.1002729
50. Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J Biol Chem* (2002) 277:44507–12. doi:10.1074/jbc.M207712200
51. Murphy DJ. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma* (2012) 249(3):541–85. doi:10.1007/s00709-011-0329-7
52. Bartz R, Li W-H, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R, et al. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res* (2007) 48:837–47. doi:10.1194/jlr.M600413-JLR200
53. Grillitsch K, Connerth M, Köfeler H, Arrey TN, Rietschel B, Wagner B, et al. Lipid particles/droplets of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* revisited: lipidome meets proteome. *Biochim Biophys Acta* (2011) 1811:1165–75. doi:10.1016/j.bbali.2011.07.015
54. Leber R, Zinsler E, Paltauf F, Daum G, Zellnig G. Characterization of lipid particles of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* (1994) 10:1421–8. doi:10.1002/yea.320101105
55. Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, Gray JP, Cassara J, Dvorak AM, et al. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol* (1998) 152:759–69.
56. Blaner WS, O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Kluwe J, D'Ambrosio DM, Jiang H, et al. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta* (2009) 1791(6):467–73. doi:10.1016/j.bbali.2008.11.001
57. McGookey DJ, Anderson RG. Morphological characterization of the cholesteryl ester cycle in cultured mouse macrophage foam cells. *J Cell Biol* (1983) 97:1156–68. doi:10.1083/jcb.97.4.1156
58. Yu W, Cassara J, Weller PF. Phosphatidylinositol 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood* (2000) 95:1078–85.
59. Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med* (1997) 186:909–20. doi:10.1084/jem.186.6.909
60. Dvorak AM, Morgan E, Schleimer RP, Ryeom SW, Lichtenstein LM, Weller PF. Ultrastructural immunogold localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to non-membrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human lung mast cells, alveolar macrophages, type II pneumocytes, and neutrophils. *J Histochem Cytochem* (1992) 40:759–69. doi:10.1177/40.6.1316915
61. Umlauf E, Caszaz E, Moertelmaier M, Schuetz GJ, Parton RG, Prohaska R. Association of stomatin with lipid bodies. *J Biol Chem* (2004) 279:23699–709. doi:10.1074/jbc.M310546200
62. Fujimoto T, Yamazaki S, Eto-Kimura A, Takeshige K, Muta T. The amino-terminal region of toll-like receptor 4 is essential for binding to MD-2 and receptor translocation to the cell surface. *J Biol Chem* (2004) 279:47431–7. doi:10.1074/jbc.M408724200
63. Liu P, Ying Y, Zhao Y, Mundy DI, Zhu M, Anderson RG. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem* (2004) 279:3787–92. doi:10.1074/jbc.M311945200
64. Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* (2004) 279:46835–42. doi:10.1074/jbc.M409340200
65. Wan HC, Melo RCN, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J* (2007) 21:167–78. doi:10.1096/fj.06-6711.com
66. Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratnien M, Targett-Adams P, Lavergne J-P, et al. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* (2006) 281:22236–47. doi:10.1074/jbc.M61031200
67. Bussell R, Eliezer D. A structural and functional role for 11-mer repeats in α -synuclein and other exchangeable lipid binding proteins. *J Mol Biol* (2003) 329:763–78. doi:10.1016/S0022-2836(03)00520-5

68. Ostermeyer AG, Ramcharan LT, Zeng Y, Lublin DM, Brown DA. Role of the hydrophobic domain in targeting caveolin-1 to lipid droplets. *J Cell Biol* (2004) 164:69–78. doi:10.1083/jcb.200303037
69. Subramanian V, Garcia A, Sekowski A, Brasaemle DL. Hydrophobic sequences target and anchor perilipin A to lipid droplets. *J Lipid Res* (2004) 45:1983–91. doi:10.1194/jlr.M400291-JLR200
70. Robenek H, Buers I, Hofnagel O, Robenek MJ, Troyer D, Severs NJ. Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis. *Biochim Biophys Acta* (2009) 1791:408–18. doi:10.1016/j.bbali.2008.12.001
71. Robenek H, Robenek MJ, Troyer D. PAT family proteins pervade lipid droplet cores. *J Lipid Res* (2005) 46:1331–8. doi:10.1194/jlr.M400323-JLR200
72. Robenek MJ, Severs NJ, Schlattmann K, Plenz G, Zimmer K-P, Troyer D, et al. Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *FASEB J* (2004) 18:866–8. doi:10.1096/fj.03-0782fj
73. Itabe H, Yamaguchi T, Nimura S, Sasabe N. Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. *Lipids Health Dis* (2017) 16:1–11. doi:10.1186/s12944-017-0473-y
74. Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res* (1997) 38:2249–63.
75. Wolins NE, Rubin B, Brasaemle DL. TIP47 associates with lipid droplets. *J Biol Chem* (2001) 276:5101–8. doi:10.1074/jbc.M006775200
76. Yamaguchi T, Matsushita S, Motojima K, Hirose F, Osumi T. MLDP, a novel PAT family protein localized to lipid droplets and enriched in the heart, is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Biol Chem* (2006) 281:14232–40. doi:10.1074/jbc.M601682200
77. Tansey JT, Sztalryd C, Hlavin EM, Kimmel AR, Londos C. The central role of perilipin A in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB Life* (2004) 56:379–85. doi:10.1080/15216540400009968
78. Sztalryd C, Xu G, Dorward H, Tansey JT, Contreras JA, Kimmel AR, et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol* (2003) 161:1093–103. doi:10.1083/jcb.200210169
79. Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem* (1991) 266:11341–6.
80. Meyers A, Weiskittel TM, Dalhaimer P. Lipid droplets: formation to breakdown. *Lipids* (2017) 52:465–75. doi:10.1007/s11745-017-4263-0
81. Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R. Lipolysis – a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res* (2011) 50:14–27. doi:10.1016/j.plipres.2010.10.004
82. Greenberg AS, Kraemer FB, Soni KG, Jedrychowski MP, Yan Q-W, Graham CE, et al. Lipid droplet meets a mitochondrial protein to regulate adipocyte lipolysis. *EMBO J* (2011) 30:4337–9. doi:10.1038/emboj.2011.371
83. Martin S, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2006) 7:373–8. doi:10.1038/nrm1912
84. Brown DA. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol* (2001) 11:446–9. doi:10.1016/S0960-9822(01)00257-3
85. Brasaemle DL, Wolins NE. Packaging of fat: an evolving model of lipid droplet assembly and expansion. *J Biol Chem* (2012) 287:2273–9. doi:10.1074/jbc.R111.309088
86. Melo RCN, Paganoti GF, Dvorak AM, Weller PF. The internal architecture of leukocyte lipid body organelles captured by three-dimensional electron microscopy tomography. *PLoS One* (2013) 8:e59578. doi:10.1371/journal.pone.0059578
87. Kassar A, Herms A, Fernández-Vidal A, Bosch M, Schieber NL, Reddy BJN, et al. Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains. *J Cell Biol* (2013) 203:985–1001. doi:10.1083/jcb.201305142
88. Bandeira-Melo C, Paiva LA, Amorim NRT, Weller PF, Bozza PT. Eicosacell: an imaging-based assay to identify spatiotemporal eicosanoid synthesis. *Methods Mol Biol* (2017) 1554:127–41. doi:10.1007/978-1-4939-6759-9_6
89. Melo RC, Weller PF. Lipid droplets in leukocytes: organelles linked to inflammatory responses. *Exp Cell Res* (2016) 340:193–7. doi:10.1016/j.yexcr.2015.10.028
90. Bozza PT, Bakker-Abreu I, Navarro-Xavier RA, Bandeira-Melo C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (2011) 85:205–13. doi:10.1016/j.plefa.2011.04.020
91. Weller PF, Bozza PT, Yu W, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies in eosinophils: central roles in eicosanoid generation. *Int Arch Allergy Immunol* (1999) 118:450–2. doi:10.1159/000024161
92. Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2008) 9:162–76. doi:10.1038/nrm2335
93. Weller PF, Longworth DL, Jaffe JJ. Leukotriene C₄ synthesis catalyzed by *Dirofilaria immitis* glutathione S-transferase. *Am J Trop Med Hyg* (1989) 40:171–5.
94. Plotkowski M-C, Brandão BA, de Assis M-C, Feliciano L-FP, Raymond B, Freitas C, et al. Lipid body mobilization in the ExoU-induced release of inflammatory mediators by airway epithelial cells. *Microb Pathog* (2008) 45:30–7. doi:10.1016/j.micpath.2008.01.008
95. Triggiani M, Oriente A, Seeds MC, Bass DA, Marone G, Chilton FH. Migration of human inflammatory cells into the lung results in the remodeling of arachidonic acid into a triglyceride pool. *J Exp Med* (1995) 182:1181–90. doi:10.1084/jem.182.5.1181
96. Moreira LS, Piva B, Gentile LB, Mesquita-Santos FP, D'Avila H, Maya-Monteiro CM, et al. Cytosolic phospholipase A₂-driven PGE₂ synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* (2009) 1791:156–65. doi:10.1016/j.bbali.2009.01.003
97. Dichlberger A, Schlager S, Maaninka K, Schneider WJ, Kovanen PT. Adipose triglyceride lipase regulates eicosanoid production in activated human mast cells. *J Lipid Res* (2014) 55:2471–8. doi:10.1194/jlr.M048553
98. Schlager S, Goeritzer M, Jandl K, Frei R, Vujic N, Kolb D, et al. Adipose triglyceride lipase acts on neutrophil lipid droplets to regulate substrate availability for lipid mediator synthesis. *J Leukoc Biol* (2015) 98:837–50. doi:10.1189/jlb.3A0515-206R
99. Bozza PT, Yu W, Cassara J, Weller PF. Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. *J Leukoc Biol* (1998) 64:563–9. doi:10.1002/jlb.64.4.563
100. Bozza PT. Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J Exp Med* (1996) 183:1515–25. doi:10.1084/jem.183.4.1515
101. Bandeira-Melo C, Gillard G, Ghiran I, Weller PF. EliCell: a gel-phase dual antibody capture and detection assay to measure cytokine release from eosinophils. *J Immunol Methods* (2000) 244:105–15. doi:10.1016/S0022-1759(00)00264-7
102. Magalhães KG, Almeida PE, Atella GC, Maya-Monteiro CM, Castro-Faria-Neto HC, Pelajo-Machado M, et al. Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine are involved in eosinophil activation and recruitment through Toll-like receptor-2-dependent mechanisms. *J Infect Dis* (2010) 202:1369–79. doi:10.1086/656477
103. Cao F, Castrillo A, Tontonoz P, Re F, Byrne GI. *Chlamydia pneumoniae*-induced macrophage foam cell formation is mediated by toll-like receptor 2. *Infect Immun* (2007) 75:753–9. doi:10.1128/IAI.01386-06
104. D'Avila H, Almeida PE, Roque NR, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Toll-Like receptor-2-mediated C-C chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by *Mycobacterium bovis* BCG pleurisy. *Infect Immun* (2007) 75:1507–11. doi:10.1128/IAI.01326-06
105. Bandeira-Melo C, Phoofolo M, Weller PF. Extracellular lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C₄ production in eosinophils and basophils. *J Biol Chem* (2001) 276:22779–87. doi:10.1074/jbc.M101436200
106. Bozza PT, Payne JL, Morham SG, Langenbach R, Smithies O, Weller PF. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) 93:11091–6. doi:10.1073/pnas.93.20.11091
107. Silva AR, Pacheco P, Vieira-de-Abreu A, Maya-Monteiro CM, D'Alegria B, Magalhães KG, et al. Lipid bodies in oxidized LDL-induced foam cells are leukotriene-synthesizing organelles: a MCP-1/CCL2 regulated phenomenon. *Biochim Biophys Acta* (2009) 1791:1066–75. doi:10.1016/j.bbali.2009.06.004
108. Weller PE, Ryeom W, Pieard ST, Aekerman SJ, Dvorak M. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *J Cell Biol* (1991) 113:137–46. doi:10.1083/jcb.113.1.137

109. Széles L, Torocsik D, Nagy L. PPAR γ in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim Biophys Acta* (2007) 1771:1014–30. doi:10.1016/j.bbali.2007.02.005
110. Chawla A, Boisvert WA, Lee C-H, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, et al. A PPAR γ -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* (2001) 7:161–71. doi:10.1016/S1097-2765(01)00164-2
111. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JGA, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell* (1998) 93:229–40. doi:10.1016/S0092-8674(00)81574-3
112. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) 95:7614–9. doi:10.1073/pnas.95.13.7614
113. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* (1998) 93:241–52. doi:10.1016/S0092-8674(00)81575-5
114. Gao J, Serrero G. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J Biol Chem* (1999) 274:16825–30. doi:10.1074/jbc.274.24.16825
115. Imamura M, Inoguchi T, Ikuyama S, Taniguchi S, Kobayashi K, Nakashima N, et al. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2002) 283:E775–83. doi:10.1152/ajpendo.00040.2002
116. Larigauderie G, Furman C, Jaye M, Lasselin C, Copin C, Fruchart J-C, et al. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2004) 24:504–10. doi:10.1161/01.ATV.0000115638.27381.97
117. Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA, Haberland M, Fogelman AM, Cheng G, et al. Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell* (2003) 12:805–16. doi:10.1016/S1097-2765(03)00384-8
118. Cheng B, Wu X, Sun S, Wu Q, Mei C, Xu Q, et al. MAPK-PPAR α/γ signal transduction pathways are involved in *Chlamydia pneumoniae*-induced macrophage-derived foam cell formation. *Microb Pathog* (2014) 69–70:1–8. doi:10.1016/j.micpath.2014.03.001
119. Georgiadi A, Kersten S. Mechanisms of gene regulation by fatty acids. *Adv Nutr An Int Rev J* (2012) 3:127–34. doi:10.3945/an.111.001602
120. Ramakrishnan S, Serricchio M, Striepen B, Bütikofer P. Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and apicomplexans. *Prog Lipid Res* (2013) 52:488–512. doi:10.1016/j.plipres.2013.06.003
121. Rub A, Arish M, Husain SA, Ahmed N, Akhter Y. Host-lipidome as a potential target of protozoan parasites. *Microbes Infect* (2013) 15:649–60. doi:10.1016/j.micinf.2013.06.006
122. Coppens I. Targeting lipid biosynthesis and salvage in apicomplexan parasites for improved chemotherapies. *Nat Rev Microbiol* (2013) 11:823–35. doi:10.1038/nrmicro3139
123. Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* (1992) 71:1117–30. doi:10.1016/S0092-8674(05)80061-3
124. Antoine J-C, Prina E, Lang T, Courret N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol* (1998) 6:392–401. doi:10.1016/S0966-842X(98)01324-9
125. Romano JD, Coppens I. Host organelle hijackers: a similar modus operandi for *Toxoplasma gondii* and *Chlamydia trachomatis*: co-infection model as a tool to investigate pathogenesis. *Pathog Dis* (2013) 69:72–86. doi:10.1111/2049-632X.12057
126. Sibley LD, Niesman IR, Parmley SF, Cesbron-Delauw MF. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* (1995) 108:1669–77.
127. Mercier C, Dubremetz JF, Rauscher B, Lecordier L, Sibley LD, Cesbron-Delauw MF. Biogenesis of nanotubular network in toxoplasma parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol Biol Cell* (2002) 13:2397–409. doi:10.1091/mbc.E02-01-0021
128. Coppens I, Sinai AP, Joiner KA. *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J Cell Biol* (2000) 149:167–80. doi:10.1083/jcb.149.1.167
129. Nagajyothi F, Weiss LM, Silver DL, Desruisseaux MS, Scherer PE, Herz J, et al. *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. *PLoS Negl Trop Dis* (2011) 5:e953. doi:10.1371/journal.pntd.0000953
130. De Cicco NNT, Pereira MG, Corrêa JR, Andrade-Neto VV, Saraiva FB, Chagas-Lima AC, et al. LDL uptake by *Leishmania amazonensis*: involvement of membrane lipid microdomains. *Exp Parasitol* (2012) 130:330–40. doi:10.1016/j.exppara.2012.02.014
131. Black S, Vandeweerd V. Serum lipoproteins are required for multiplication of *Trypanosoma brucei* under axenic culture conditions. *Mol Biochem Parasitol* (1989) 37:65–72. doi:10.1016/0166-6851(89)90103-5
132. Carvalho MDT, Alonso DP, Vendrame CMV, Costa DL, Costa CHN, Werneck GL, et al. Lipoprotein lipase and PPAR alpha gene polymorphisms, increased very-low-density lipoprotein levels, and decreased high-density lipoprotein levels as risk markers for the development of visceral Leishmaniasis by *Leishmania infantum*. *Mediators Inflamm* (2014) 2014:230129. doi:10.1155/2014/230129
133. Johndrow C, Nelson R, Tanowitz H, Weiss LM, Nagajyothi F. *Trypanosoma cruzi* infection results in an increase in intracellular cholesterol. *Microbes Infect* (2014) 16:337–44. doi:10.1016/j.micinf.2014.01.001
134. Portugal LR, Fernandes LR, Pietra Pedroso VS, Santiago HC, Gazzinelli RT, Alvarez-Leite JI. Influence of low-density lipoprotein (LDL) receptor on lipid composition, inflammation and parasitism during *Toxoplasma gondii* infection. *Microbes Infect* (2008) 10:276–84. doi:10.1016/j.micinf.2007.12.001
135. Milovanović I, Trbovič AM, Vujanic M, Klun I, Bobic B, Nikolic A, et al. *Toxoplasma gondii* infection induces lipid metabolism alterations in the murine host. *Int J Infect Dis* (2008) 12:e172–3. doi:10.1016/j.ijid.2008.05.430
136. Ehrenman K, Sehgal A, Lige B, Stedman TT, Joiner KA, Coppens I. Novel roles for ATP-binding cassette G transporters in lipid redistribution in *Toxoplasma*. *Mol Microbiol* (2010) 76:1232–49. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07169.x
137. Robibarbo B, Stedman TT, Coppens I, Ngô HM, Pypaert M, Bivona T, et al. *Toxoplasma gondii* Rab5 enhances cholesterol acquisition from host cells. *Cell Microbiol* (2002) 4:139–52. doi:10.1046/j.1462-5822.2002.00178.x
138. Charron AJ, Sibley LD. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* (2002) 115:3049–59.
139. Coppens I, Vielemeyer O. Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: from storage to potential mediation in parasite metabolic activities. *Int J Parasitol* (2005) 35:597–615. doi:10.1016/j.ijpara.2005.01.009
140. Hiller NL, Akompong T, Morrow JS, Holder AA, Haldar K. Identification of a stomatin orthologue in vacuoles induced in human erythrocytes by malaria parasites. *J Biol Chem* (2003) 278:48413–21. doi:10.1074/jbc.M307266200
141. Di Girolamo F, Raggi C, Birago C, Pizzi E, Lalle M, Picci L, et al. Plasmodium lipid rafts contain proteins implicated in vesicular trafficking and signalling as well as members of the PIR superfamily, potentially implicated in host immune system interactions. *Proteomics* (2008) 8:2500–13. doi:10.1002/pmic.200700763
142. Lauer S, VanWye J, Harrison T, McManus H, Samuel BU, Hiller NL, et al. Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *EMBO J* (2000) 19:3556–64. doi:10.1093/emboj/19.14.3556
143. Albuquerque SS, Carret C, Grosso AR, Tarun AS, Peng X, Kappe SHI, et al. Host cell transcriptional profiling during malaria liver stage infection reveals a coordinated and sequential set of biological events. *BMC Genomics* (2009) 10:270. doi:10.1186/1471-2164-10-270
144. Labaied M, Jayabalasingham B, Bano N, Cha S-J, Sandoval J, Guan G, et al. Plasmodium salvages cholesterol internalized by LDL and synthesized de novo in the liver. *Cell Microbiol* (2011) 13:569–86. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01555.x
145. Bano N, Romano JD, Jayabalasingham B, Coppens I. Cellular interactions of *Plasmodium* liver stage with its host mammalian cell. *Int J Parasitol* (2007) 37:1329–41. doi:10.1016/j.ijpara.2007.04.005
146. Nishikawa Y, Quittnat F, Stedman TT, Voelker DR, Choi J-Y, Zahn M, et al. Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. *Cell Microbiol* (2005) 7:849–67. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00518.x
147. Lige B, Sampels V, Coppens I. Characterization of a second sterol-esterifying enzyme in *Toxoplasma* highlights the importance of cholesterol storage pathways for the parasite. *Mol Microbiol* (2013) 87:951–67. doi:10.1111/mmi.12142

148. Vilemeyer O, McIntosh MT, Joiner KA, Coppens I. Neutral lipid synthesis and storage in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* (2004) 135:197–209. doi:10.1016/j.molbiopara.2003.08.017
149. Pereira MG, Nakayasu ES, Sant'Anna C, De Cicco NNT, Atella GC, de Souza W, et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservoir lipid inclusions. *PLoS One* (2011) 6:e22359. doi:10.1371/journal.pone.0022359
150. Attie A. ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis. *Trends Biochem Sci* (2007) 32:172–9. doi:10.1016/j.tibs.2007.02.001
151. Torres C, Pérez-Victoria FJ, Parodi-Talice A, Castanys S, Gamarro F. Characterization of an ABCA-like transporter involved in vesicular trafficking in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol* (2004) 54:632–46. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04304.x
152. Sant'Anna C, Nakayasu ES, Pereira MG, Lourenço D, De Souza W, Almeida IC, et al. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservoirs. *Proteomics* (2009) 9:1782–94. doi:10.1002/pmic.200800730
153. Doenhoff MJ, Stanley RG, Griffiths K, Jackson CL. An anti-atherogenic effect of *Schistosoma mansoni* infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol. *Parasitology* (2002) 125:415–21. doi:10.1017/S0031182002002275
154. Stanley RG, Jackson CL, Griffiths K, Doenhoff MJ. Effects of *Schistosoma mansoni* worms and eggs on circulating cholesterol and liver lipids in mice. *Atherosclerosis* (2009) 207:131–8. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.04.037
155. Okumura-Noji K, Miura Y, Lu R, Asai K, Ohta N, Brindley PJ, et al. CD36-related protein in *Schistosoma japonicum*: candidate mediator of selective cholesteryl ester uptake from high-density lipoprotein for egg maturation. *FASEB J* (2013) 27:1236–44. doi:10.1096/fj.12-219816
156. Lvova M, Zhukova M, Kiseleva E, Mayboroda O, Hensbergen P, Kizilova E, et al. Hemozoin is a product of heme detoxification in the gut of the most medically important species of the family Opisthorchiidae. *Int J Parasitol* (2016) 46:147–56. doi:10.1016/j.ijpara.2015.12.003
157. Corrêa Soares JB, Maya-Monteiro CM, Bittencourt-Cunha PR, Atella GC, Lara FA, D'Avila JC, et al. Extracellular lipid droplets promote hemozoin crystallization in the gut of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *FEBS Lett* (2007) 581:1742–50. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.054
158. Jackson KE, Klonis N, Ferguson DJP, Adisa A, Dogovski C, Tilley L. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* (2004) 54:109–22. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04284.x
159. Palacpac NM, Hiramane Y, Mi-ichi F, Torii M, Kita K, Hiramatsu R, et al. Developmental-stage-specific triacylglycerol biosynthesis, degradation and trafficking as lipid bodies in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Cell Sci* (2004) 117:1469–80. doi:10.1242/jcs.00988
160. Araújo-Santos T, Prates DB, França-Costa J, Luz NF, Andrade BB, Miranda JC, et al. Prostaglandin E2/leukotriene B4 balance induced by *Lutzomyia longipalpis* saliva favors *Leishmania infantum* infection. *Parasit Vectors* (2014) 7:1–8. doi:10.1186/s13071-014-0601-8
161. França-Costa J, Van Weyenbergh J, Boaventura VS, Luz NF, Malta-Santos H, Oliveira MC, et al. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E 2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* (2015) 211:426–35. doi:10.1093/infdis/jiu455
162. Passero LF, Laurenti MD, Tomokane TY, Corbett CEP, Toyama MH. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Parasitol Res* (2008) 102:1025–33. doi:10.1007/s00436-007-0871-6
163. Lonardon MVC, Barbieri CL, Russo M, Jancar S. Modulation of *Leishmania (L.) amazonensis* growth in cultured mouse macrophages by prostaglandins and platelet activating factor. *Mediators Inflamm* (1994) 3:137–41. doi:10.1155/S0962935194000177
164. Prates DB, Araújo-Santos T, Luz NF, Andrade BB, França-Costa J, Afonso L, et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. *J Leukoc Biol* (2011) 90:575–82. doi:10.1189/jlb.0211105
165. Saha A, Biswas A, Srivastav S, Mukherjee M, Das PK, Ukil A. Prostaglandin E 2 negatively regulates the production of inflammatory cytokines/chemokines and IL-17 in visceral leishmaniasis. *J Immunol* (2014) 193:2330–9. doi:10.4049/jimmunol.1400399
166. Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MBP, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* (2000) 403:199–203. doi:10.1038/35003208
167. Almeida PE, Toledo DAM, Rodrigues GSC, D'Avila H. Lipid bodies as sites of prostaglandin E2 synthesis during chagas disease: impact in the parasite escape mechanism. *Front Microbiol* (2018) 9:499. doi:10.3389/fmicb.2018.00499
168. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* (2004) 75:163–89. doi:10.1189/jlb.0603252
169. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* (2014) 32:513–45. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120231
170. Pilla-Moffett D, Barber MF, Taylor GA, Coers J. Interferon-inducible GTPases in host resistance, inflammation and disease. *J Mol Biol* (2016) 428:3495–513. doi:10.1016/j.jmb.2016.04.032
171. Das P, De T, Chakraborti T. *Leishmania donovani* secretory serine protease alters macrophage inflammatory response via COX-2 mediated PGE-2 production. *Indian J Biochem Biophys* (2014) 51:542–51.
172. Lecoeur H, Giraud E, Prévost MC, Milon G, Lang T. Reprogramming neutral lipid metabolism in mouse dendritic leukocytes hosting live *Leishmania amazonensis* amastigotes. *PLoS Negl Trop Dis* (2013) 7(6):e2276. doi:10.1371/journal.pntd.0002276
173. Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hittner JB, Ong'echa JM. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *Int J Biol Sci* (2011) 7:1427–42. doi:10.7150/ijbs.7.1427
174. Anyona SB, Kempaiah P, Davenport GC, Vulule JM, Hittner JB, Ong'echa JM, et al. Suppressed circulating bicyclo-PGE2 levels and leukocyte COX-2 transcripts in children co-infected with *P. falciparum* malaria and HIV-1 or bacteremia. *Biochem Biophys Res Commun* (2013) 436:585–90. doi:10.1016/j.bbrc.2013.05.089
175. Anyona SB, Kempaiah P, Raballah E, Davenport GC, Were T, Konah SN, et al. Reduced systemic bicyclo-prostaglandin-E2 and cyclooxygenase-2 gene expression are associated with inefficient erythropoiesis and enhanced uptake of monocytic hemozoin in children with severe malarial anemia. *Am J Hematol* (2012) 87:782–9. doi:10.1002/ajh.23253
176. Matte C, Maion G, Mourad W, Olivier M. *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. *Parasite Immunol* (2001) 23:177–84. doi:10.1046/j.1365-3024.2001.00372.x
177. Arcanjo AF, Nunes MP, Silva-Junior EB, Leandro M, da Rocha JDB, Morrot A, et al. B-1 cells modulate the murine macrophage response to *Leishmania major* infection. *World J Biol Chem* (2017) 8:151. doi:10.4331/wjbc.v8.i2.151
178. D'Avila H, Roque NR, Cardoso RM, Castro-Faria-Neto HC, Melo RCN, Bozza PT. Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E2 production by macrophage. *Cell Microbiol* (2008) 10:2589–604. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01233.x
179. Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Dutra AN, et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol* (2008) 84:389–96. doi:10.1189/jlb.0108018
180. Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol* (2005) 174:589–94. doi:10.4049/jimmunol.174.2.589
181. Serezani CH, Perrella JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J Immunol* (2006) 177:3201–8. doi:10.4049/jimmunol.177.5.3201
182. Tavares NM, Araújo-Santos T, Afonso L, Nogueira PM, Lopes UG, Soares RP, et al. Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection in vitro: the role of LTB4 derived from human neutrophils. *J Infect Dis* (2014) 210:656–66. doi:10.1093/infdis/jiu158
183. Chaves MM, Marques-da-Silva C, Monteiro APT, Canetti C, Coutinho-Silva R. Leukotriene B4 modulates P2X7 receptor-mediated *Leishmania*

- amazonensis* elimination in murine macrophages. *J Immunol* (2014) 192:4765–73. doi:10.4049/jimmunol.1301058
184. Paiva LA, Maya-Monteiro CM, Bandeira-Melo C, Silva PMR, El-Cheikh MC, Teodoro AJ, et al. Interplay of cysteinyl leukotrienes and TGF- β in the activation of hepatic stellate cells from *Schistosoma mansoni* granulomas. *Biochim Biophys Acta* (2010) 1801:1341–8. doi:10.1016/j.bbali.2010.08.014
 185. Carregaro V, Valenzuela JG, Cunha TM, Verri WA, Grespan R, Matsumura G, et al. Phlebotomine salivas inhibit immune inflammation-induced neutrophil migration via an autocrine DC-derived PGE 2/IL-10 sequential pathway. *J Leukoc Biol* (2008) 84:104–14. doi:10.1189/jlb.1107797
 186. Araújo-Santos T, Prates DB, Andrade BB, Nascimento DO, Clarêncio J, Entringer PF, et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva triggers lipid body formation and prostaglandin E2 production in murine macrophages. *PLoS Negl Trop Dis* (2010) 4:e873. doi:10.1371/journal.pntd.0000873
 187. Russell CD, Schwarze J. The role of pro-resolution lipid mediators in infectious disease. *Immunology* (2014) 141:166–73. doi:10.1111/imm.12206
 188. Katze MG, He Y, Gale M. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* (2002) 2:675–87. doi:10.1038/nri888
 189. MacMicking JD. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* (2012) 12:367–82. doi:10.1038/nri3210
 190. Hinson ER, Cresswell P. The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic α -helix. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106:20452–7. doi:10.1073/pnas.0911679106
 191. Hinson ER, Cresswell P. The N-terminal amphipathic α -helix of viperin mediates localization to the cytosolic face of the endoplasmic reticulum and inhibits protein secretion. *J Biol Chem* (2009) 284:4705–12. doi:10.1074/jbc.M807261200
 192. Fitzgerald KA. The interferon inducible gene: viperin. *J Interf Cytokine Res* (2011) 31:131–5. doi:10.1089/jir.2010.0127
 193. Gubern A, Barceló-Torns M, Barneda D, López JM, Masgrau R, Picatoste F, et al. JNK and ceramide kinase govern the biogenesis of lipid droplets through activation of group IVA phospholipase A2. *J Biol Chem* (2009) 284:32359–69. doi:10.1074/jbc.M109.061515
 194. Vignola MJ, Kashatus DF, Taylor GA, Counter CM, Valdivia RH. cPLA 2 regulates the expression of type I interferons and intracellular immunity to *Chlamydia trachomatis*. *J Biol Chem* (2010) 285:21625–35. doi:10.1074/jbc.M110.103010
 195. Martens S, Sabel K, Lange R, Uthaiha R, Wolf E, Howard JC. Mechanisms regulating the positioning of mouse p47 resistance GTPases LRG-47 and IIGP1 on cellular membranes: retargeting to plasma membrane induced by phagocytosis. *J Immunol* (2004) 173:2594–606. doi:10.4049/jimmunol.173.4.2594
 196. Hunn JP, Koenen-Waisman S, Papic N, Schroeder N, Pawlowski N, Lange R, et al. Regulatory interactions between IRG resistance GTPases in the cellular response to *Toxoplasma gondii*. *EMBO J* (2008) 27:2495–509. doi:10.1038/emboj.2008.176
 197. Maric-Biresev J, Hunn JP, Krut O, Helms JB, Martens S, Howard JC. Loss of the interferon- γ -inducible regulatory immunity-related GTPase (IRG), Irgm1, causes activation of effector IRG proteins on lysosomes, damaging lysosomal function and predicting the dramatic susceptibility of Irgm1-deficient mice to infection. *BMC Biol* (2016) 14:33. doi:10.1186/s12915-016-0255-4
 198. Howard JC, Hunn JP, Steinfeldt T. The IRG protein-based resistance mechanism in mice and its relation to virulence in *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Microbiol* (2011) 14:414–21. doi:10.1016/j.mib.2011.07.002
 199. Hunn JP, Feng CG, Sher A, Howard JC. The immunity-related GTPases in mammals: a fast-evolving cell-autonomous resistance system against intracellular pathogens. *Mamm Genome* (2011) 22:43–54. doi:10.1007/s00335-010-9293-3
 200. Chauhan S, Mandell MA, Deretic V. IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Mol Cell* (2015) 58:507–21. doi:10.1016/j.molcel.2015.03.020
 201. Haldar AK, Saka HA, Piro AS, Dunn JD, Henry SC, Taylor GA, et al. IRG and GBP host resistance factors target aberrant, “non-self” vacuoles characterized by the missing of “self” IRGM proteins. *PLoS Pathog* (2013) 9:e1003414. doi:10.1371/journal.ppat.1003414
 202. Kravets E, Degrandi D, Ma Q, Peulen T-O, Klümpers V, Felekyan S, et al. Guanylate binding proteins directly attack *Toxoplasma gondii* via supramolecular complexes. *Elife* (2016) 5:1–30. doi:10.7554/eLife.11479
 203. Ling YM, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJ, et al. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J Exp Med* (2006) 203:2063–71. doi:10.1084/jem.20061318
 204. Zhao YO, Khaminets A, Hunn JP, Howard JC. Disruption of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole by IFN γ -inducible immunity-related GTPases (IRG Proteins) triggers necrotic cell death. *PLoS Pathog* (2009) 5:e1000288. doi:10.1371/journal.ppat.1000288
 205. Bougnères L, Helft J, Tiwari S, Vargas P, Chang BHJ, Chan L, et al. A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. *Immunity* (2009) 31:232–44. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.022
 206. Britzen-Laurent N, Bauer M, Berton V, Fischer N, Syguda A, Reipschläger S, et al. Intracellular trafficking of guanylate-binding proteins is regulated by heterodimerization in a hierarchical manner. *PLoS One* (2010) 5:e14246. doi:10.1371/journal.pone.0014246
 207. Pilla DM, Hagar JA, Haldar AK, Mason AK, Degrandi D, Pfeffer K, et al. Guanylate binding proteins promote caspase-11-dependent pyroptosis in response to cytoplasmic LPS. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111:6046–51. doi:10.1073/pnas.1321700111
 208. Meunier E, Dick MS, Dreier RF, Schürmann N, Broz DK, Warming S, et al. Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature* (2014) 509:366–70. doi:10.1038/nature13157
 209. Ohshima J, Sasaki M, Liu J, Yamashita K, Ma JS, Lee Y, et al. RabGDII α is a negative regulator of interferon- γ -inducible GTPase-dependent cell-autonomous immunity to *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) 112:E4581–90. doi:10.1073/pnas.1510031112
 210. Haldar AK, Foltz C, Finethy R, Piro AS, Feeley EM, Pilla-Moffett DM, et al. Ubiquitin systems mark pathogen-containing vacuoles as targets for host defense by guanylate binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) 112:E5628–37. doi:10.1073/pnas.1515966112
 211. Ichimura Y, Komatsu M. Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol* (2010) 32:431–6. doi:10.1007/s00281-010-0220-1
 212. Martínez-López N, Singh R. Autophagy and lipid droplets in the liver. *Annu Rev Nutr* (2015) 35:215–37. doi:10.1146/annurev-nutr-071813-105336
 213. Dupont N, Chauhan S, Arko-Mensah J, Castillo EF, Masedunskas A, Weigert R, et al. Neutral lipid stores and lipase PNPLA5 contribute to autophagosome biogenesis. *Curr Biol* (2014) 24:609–20. doi:10.1016/j.cub.2014.02.008
 214. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* (2009) 458:1131–5. doi:10.1038/nature07976
 215. Fujimoto T, Ohsaki Y. The proteasomal and autophagic pathways converge on lipid droplets. *Autophagy* (2006) 2:299–301. doi:10.4161/auto.2904
 216. Ohsaki Y, Cheng J, Fujita A, Tokumoto T, Fujimoto T. Cytoplasmic lipid droplets are sites of convergence of proteasomal and autophagic degradation of apolipoprotein B. *Mol Biol Cell* (2006) 17:2674–83. doi:10.1091/mbc.E05-07-0659
 217. Xia F, Li R, Wang C, Yang S, Tian L, Dong H, et al. IRGM1 regulates oxidized LDL uptake by macrophage via actin-dependent receptor internalization during atherosclerosis. *Sci Rep* (2013) 3:1867. doi:10.1038/srep01867
 218. Singh SB, Ornatowski W, Vergne I, Naylor J, Delgado M, Roberts E, et al. Human IRGM regulates autophagy and cell-autonomous immunity functions through mitochondria. *Nat Cell Biol* (2010) 12:1154–65. doi:10.1038/ncb2119
 219. Traver MK, Henry SC, Cantillana V, Oliver T, Hunn JP, Howard JC, et al. Immunity-related GTPase M (IRGM) proteins influence the localization of guanylate-binding protein 2 (GBP2) by modulating macroautophagy. *J Biol Chem* (2011) 286:30471–80. doi:10.1074/jbc.M111.251967
 220. Shpilka T, Welter E, Borovsky N, Amar N, Mari M, Reggiori F, et al. Lipid droplets and their component triglycerides and steryl esters regulate autophagosome biogenesis. *EMBO J* (2015) 34:e201490315. doi:10.15252/embj.201490315

221. Rambold AS, Cohen S, Lippincott-Schwartz J. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev Cell* (2015) 32:678–92. doi:10.1016/j.devcel.2015.01.029

Conflict of Interest Statement: The authors have no other affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject discussed in the manuscript.

Copyright © 2018 Vallochi, Teixeira, Oliveira, Maya-Monteiro and Bozza. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.