

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Patrícia Pereira Silva

**ANÁLISE DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS HUMANOS
INFECTADOS PELA CEPA Y DO *TRYPANOSOMA CRUZI*
E SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM A DROGA BENZONIDAZOL**

Belo Horizonte
2012

Patrícia Pereira Silva

**ANÁLISE DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS HUMANOS
INFECTADOS PELA CEPA Y DO *TRYPANOSOMA CRUZI*
E SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM A DROGA BENZONIDAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular

Orientador: Dra. Gleydes Gambogi Parreira

Co-orientador: Dra. Walderez Ornelas Dutra

Belo Horizonte
2012

Patrícia Pereira Silva

**ANÁLISE DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS HUMANOS
INFECTADOS PELA CEPA Y DO *TRYPANOSOMA CRUZI*
E SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM A DROGA BENZONIDAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular

Dra. Gleydes Gambogi Parreira (Orientadora) – UFMG

Dra. Walderez Ornelas Dutra (Co-orientadora) – UFMG

Dra. Rossana Correa Netto de Melo

Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2012.

*A Deus,
por permitir que eu continuasse trilhando este caminho,
me dando forças pra que eu não desistisse.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser Criador de tudo e por ter estado comigo todo instante me iluminando nos momentos fáceis e principalmente nos momentos em que tudo dava errado.

Aos meus pais, Carlinhos e Marlene, pelas orações, por confiarem em mim e me apoiarem.

Ao Fernando, por palavras de apoio e confiança, dizendo que no fim tudo ia dar certo.

Aos meus familiares, pelo carinho. Em especial ao Matheus pela obra de arte confeccionada com exclusividade para este trabalho.

Às minhas orientadoras, Gleydes e Walderez, obrigada pela oportunidade dada e por todo auxílio prestado.

Aos membros da banca que aceitaram prontamente o convite. Dra. Juliana e Dra. Rossana. Aos professores que conheci ao longo destes 2 anos e meio e que se mostraram excelentes profissionais e muito solícitos em me ajudar. Obrigada professores: Fernanda, Hélio, Aristóbolo, Heloisa, Patrícia.

A professora Luciana, uma querida que me ajudou a todo instante, a cada dúvida nova que surgia muito obrigada pelos momentos de orientação.

A Márcia, técnica do Centro de Microscopia Eletrônica da UNIFESP, por me ensinar novas técnicas.

As professoras Edna Haapalainen (UNIFESP), Elizabeth Ribeiro (UFMG) e Maria de Fátima (UFMG) pela presteza em nos emprestar material em momentos críticos e permitir que nosso projeto continuasse.

Aos colegas do CEMEL, obrigada Diego e Ivete.

A Maristane e Olga do LAD, obrigada por sempre estarem disponíveis em ajudar.

A Roberta e Natália do Centro de Microscopia da UFMG, me ajudando para que o projeto desse certo.

Ao Hemocentro de Belo Horizonte (HEMOMINAS), por ceder as bolsas de sangue.

A todos os meus amigos, pelo apoio e ajuda. Em especial aos queridos que conheci nas minhas andanças pelos laboratórios da UFMG.

Meu muito obrigada, a você Luluzinha, sinceramente não sei o que faria sem ti, me ajudando a todo instante e me dando a calma necessária; Katita, minha eterna amiga e irmã; Patynsky, sem tua ótima vontade em fazer a análise estatística este trabalho não existiria; Amandinha, pernambucana arretada; Malu, por estar sempre a postos pra nos socorrer; Luísa, me auxiliando e me relembrando nos experimentos laboratoriais; Carol, me ajudando nos momentos complicados, principalmente com a matemática; Naty e Cris, duas queridas que fazem de tudo pra que uma comemoração aconteça, pelos quitutes deliciosos feitos com tanto amor e carinho; Dina, outra querida que sempre se mostrou um ombro amigo e disposta a ajudar sempre. Agradeço também aos amigos que se preocuparam e torceram por mim: Aline, Talita e Fernanda.

Aos queridos do MCM (Museu de Ciências Morfológicas), em especial a professora Maria das Graças, pois foi através da oportunidade que me deu e por acreditar em mim que cheguei aonde cheguei. A Gorettinha, com suas caronas providenciais. A todos do MCM.

Aos irmãos e amigos da Igreja Adventista do Sétimo Dia de Novo Glória por sempre se lembrarem de mim em suas orações.

As agências de fomento CAPES e FAPEMIG.

Muito obrigada a todos que me apoiaram de alguma forma, para que eu vencesse mais esta etapa em minha vida!

Deus

Para experimentar Octávio, o mestre diz:

“Já que tudo sabe, venha cá!

Diga em que ponto da extensão terrestre

Ou da extensão celeste Deus está!”

Por um momento apenas, fica mudo Octávio,

E logo esta resposta dá:

“Eu senhor mestre, lhe daria tudo,

Se me dissesse onde é que ele não está!”

Olavo Bilac

RESUMO

A doença de Chagas, considerada ainda de dimensões incontroláveis é decorrente do contato entre o protozoário *Trypanosoma cruzi* com células do hospedeiro definitivo, principalmente as células do sistema mononuclear fagocitário, onde se multiplicam e posteriormente infectam novas células. No entanto, não há nenhum relato sobre os corpúsculos lipídicos de macrófagos humanos infectados *in vitro* com a cepa Y do *T. cruzi*, e posteriormente submetidos ao tratamento com a droga benzonidazol. Os objetivos deste trabalho consistem em avaliar a ocorrência e possíveis alterações morfológicas e ultraestruturais dos corpúsculos lipídicos infectados com *T. cruzi* e tratados com benzonidazol. Para tal, as células foram analisadas através de microscopia de campo claro, usando o tetróxido de ósmio como marcação específica para os corpúsculos lipídicos, e na fluorescência, marcação dos corpúsculos lipídicos com BODIPY®. Os corpúsculos lipídicos de macrófagos humanos foram analisados também à microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram no grupo de macrófagos infectados, características como o núcleo eucromático, projeções e organelas citoplasmáticas como retículo endoplasmático, complexo de Golgi, mitocôndrias e corpúsculos lipídicos, organelas descritas como marcadores estruturais da inflamação. Estas organelas mostraram-se ligeiramente arredondadas, com típica variação em sua osmiofilia. Além de apresentarem interação, por exemplo, com o retículo endoplasmático liso, evidenciando o caráter dinâmico e heterogêneo das mesmas, os corpúsculos lipídicos também foram encontrados em maior número e diâmetro aumentado. Ressalta-se, no entanto, que o grupo de macrófagos infectados pela cepa Y e submetidos ao tratamento com o benzonidazol embora tenham apresentado os mesmos sinais de ativação celular descritos acima, apresentaram redução no número de corpúsculos lipídicos, possivelmente em resposta ao tratamento com o fármaco. Conclui-se a partir dos nossos resultados, que assim como em macrófagos de outras espécies os corpúsculos lipídicos foram responsivos à interação célula-parasito na infecção humana, além de proporcionarem possíveis inferências a novas estratégias de tratamento e estudos de mecanismos de ação de novas drogas.

Palavras-chave: Macrófagos humanos. *Trypanosoma cruzi*. Cepa Y. Corpúsculos lipídicos. Benzonidazol.

ABSTRACT

Chagas' disease, still considered uncontrollable dimensions is due to the contact between the protozoan *Trypanosoma cruzi* with host cells definitive, especially the cells of the mononuclear phagocyte system, where they multiply and subsequently infect new cells. However, there is no literature about the lipid bodies in human macrophages infected *in vitro* with the Y strain of *T. cruzi*, followed by a treatment with the drug benznidazole. The objectives of this study are to describe the occurrence and possible diameter ultrastructural changes in lipid bodies infected with *T. cruzi* and treated with benznidazole. To this end, cells were analyzed using bright field microscopy, using osmium tetroxide as specific staining for lipid body, and fluorescence labeling of lipid bodies with BODIPY[®]. The human macrophage lipid bodies were also analyzed by the transmission electron microscopy. The results showed the infected macrophages with a typical euchromatic nuclei, projections and cytoplasmic organelles such as the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, mitochondria and lipid bodies, organelles described as structural markers of inflammation. These organelles were slightly rounded with typical variation in its osmiofilia. Besides showing interaction, for example, with the smooth endoplasmic reticulum, demonstrating its dynamic and heterogeneous characteristic, the lipid bodies were also found increased in numbers and its diameter. It is highlighted, however, that the group of macrophages infected with Y strain and treated with benznidazole although have shown the same cell activation signals described above showed a reduction in the number of lipid bodies, possibly in response to the treatment with the drug. We conclude from our results, that similar to macrophages of other species lipid bodies were responsive to cellular-parasite interaction in human infection, and provide possible inferences to new treatment strategies and studies mechanisms of new drugs reaction.

Keywords: Human macrophages. *Trypanosoma cruzi*. Strain Y. Lipid bodies. Benznidazole.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo da doença de Chagas	18
Figura 2 – Estrutura molecular do N-benzil-2-nitroimidazol acetamida (Benzonidazol)	21
Figura 3 – Biogênese e estrutura dos corpúsculos lipídicos	30
Figura 4 – Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSPs)	36
Figura 5 – Taxa de infecção dos macrófagos.....	39
Figura 6 – Desenho experimental	40
Figura 7 – Placa de 24 poços representando os grupos propostos	40
Figura 8 – Etapas desenvolvidas	42
Figura 9 – Padronização do número de células a serem contadas	43
Figura 10 – Média e erro padrão da quantificação dos corpúsculos lipídicos.	49
Figura 11 – Média e erro padrão do diâmetro dos corpúsculos lipídicos	49
Figura 12 – Corpúsculos lipídicos em macrófagos humanos corados com o tetróxido de ósmio e observados à microscopia de luz.....	52
Figura 13 – Corpúsculos lipídicos em macrófagos humanos marcados pela sonda BODIPY® e observados à microscopia de fluorescência	54
Figura 14 – Análise quantitativa dos corpúsculos lipídicos nos 4 grupos experimentais.....	56
Figura 15 – Análise do diâmetro dos corpúsculos lipídicos nos 4 grupos experimentais.....	58
Figura 16 – Macrófago de <i>buffy coat</i> humano com sinais de pouca ativação	60
Figura 17 – Macrófago de <i>buffy coat</i> humano, sem intervenção.....	62
Figura 18 – Macrófago infectado com a cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	64
Figura 19 – Vista abrangente de macrófago pertencente ao grupo infectado com a cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	66
Figura 20 – Macrófago pertencente ao grupo infectado com a cepa Y do <i>T. cruzi</i> ..	68
Figura 21 – Detalhe do corpúsculo lipídico em íntima associação com uma cisterna do retículo endoplasmático liso, em macrófago infectado com a cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	70
Figura 22 – Macrófago que pertence ao grupo infectado com a cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratado com o benzonidazol	72

Figura 23 – Macrófago pertencente ao grupo infectado com a cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratado com o benzonidazol	74
Figura 24 – Formas amastigotas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> observada em macrófago após o tratamento com o fármaco benzonidazol.....	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Doença de Chagas	15
1.1.1 <i>Transmissão</i>	16
1.1.2 <i>Ciclo de vida do parasito</i>	16
1.1.3 <i>Diagnóstico</i>	19
1.1.4 <i>Formas clínicas da doença de Chagas e seus sintomas</i>	19
1.1.5 <i>Tratamento</i>	20
1.1.6 <i>Prevenção e controle</i>	22
1.1.7 <i>Contato inicial parasito-hospedeiro: papel dos macrófagos</i>	23
1.2 Corpúsculos lipídicos	25
1.2.1 <i>Composição dos corpúsculos lipídicos</i>	26
1.2.2 <i>Identificação dos corpúsculos lipídicos</i>	28
1.2.3 <i>Biogênese dos corpúsculos lipídicos</i>	29
1.2.4 <i>Corpúsculos lipídicos na doença de Chagas</i>	31
1.3 Justificativa	32
1.4 Objetivos	33
1.4.1 <i>Geral</i>	33
1.4.2 <i>Específicos</i>	33
2 MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSPs)	35
2.2 Plaqueamento das CMSPs e diferenciação em macrófagos	36
2.3 Obtenção de tripomastigotas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
2.4 Taxa de infecção	38
2.5 Grupos experimentais	39
2.5.1 <i>Infecção dos macrófagos com a cepa Y do Trypanosoma cruzi</i>	40
2.5.2 <i>Tratamento dos macrófagos com benzonidazol (BZ)</i>	41
2.6 Processamento do material e análise dos CLs nos diferentes grupos experimentais sob Microscopia de Luz (ML)	42
2.7 Processamento do material e análise dos CLs nos diferentes grupos experimentais sob microscopia de fluorescência	44

2.8	Processamento do material e análise dos CLs nos diferentes grupos experimentais sob Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	44
2.9	Análise estatística	46
3	RESULTADOS	48
3.1	Análise dos corpúsculos lipídicos à microscopia de luz	48
3.1.1	<i>Quantificação dos corpúsculos lipídicos</i>	48
3.1.2	<i>Análise do diâmetro dos corpúsculos lipídicos</i>	49
3.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	50
4	ILUSTRAÇÕES	52
5	DISCUSSÃO	79
6	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, descoberta e descrita pela primeira vez em 1909, em um trabalho pioneiro do médico Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, é também conhecida como Tripanossomíase Americana. A doença de Chagas foi considerada uma endemia restrita à América Latina, onde é considerada uma doença negligenciada endêmica, mas atualmente atinge cerca de 10 milhões de pessoas em todo o mundo e ainda coloca mais de 25 milhões de pessoas em risco. Em 2008, a doença de Chagas levou a morte mais de 10 mil pessoas, sendo uma das principais causas de morte súbita, agravado pelo fato de que pode ocorrer com frequência na idade mais produtiva do indivíduo. (LANA & TAFURI, 2005; TEIXEIRA et al., 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; SALOMON, 2012).

A doença de Chagas, além de ser encontrada principalmente na América Latina tem sido detectada nas últimas décadas nos Estados Unidos da América, Canadá, muitos países europeus e alguns países do Pacífico Ocidental. Isso ocorre devido à mobilidade da população entre a América Latina e o resto do mundo. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

No Brasil, a doença de Chagas é considerada endêmica em todos os estados. Está distribuída em todas as Américas, desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e Chile. (ARGOLO et al., 2008).

A doença de Chagas é um dos típicos casos de manifestações orgânicas resultantes das intervenções no ambiente produzidas pelo homem, capaz de evoluir e se adaptar às condições adversas, muitas vezes decorrentes das distorções econômicas e das imposições sociais (VINHAES; DIAS, 2000; CARDOSO et al., 2009).

O número estimado de infectados no Brasil com o *T. cruzi* é estimada em 6 milhões pessoas. A abrangência real da disseminação da doença é bastante incerta e heterogênea, por conta da extensão e particularidades geográficas brasileiras. Ainda assim, o perfil epidemiológico da doença de Chagas vem mudando, como resultado de empenhos de pesquisadores no controle ambiental e da doença, e de esforços no cenário político. (GÜRTLER; DIOTAIUTI; KITRON, 2008).

1.1.1 Transmissão

O parasito *T. cruzi* é principalmente transmitido pelos triatomíneos hematófagos. Os triatomíneos habitam usualmente fendas de casas de madeira e/ou barro e têm hábitos noturnos, quando se alimentam de sangue humano (repasto sanguíneo). A picada do barbeiro geralmente ocorre em áreas expostas do corpo. O hospedeiro definitivo por sua vez carrega por instinto as fezes contendo os parasitos para a picada, para os olhos, boca, ou para qualquer lugar na pele com lesão. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Além da transmissão vetorial, existem ainda outras formas de transmissão como a congênita, transfusional, por transplantes e por ingestão oral. Essas últimas têm sido eleitas como de grande importância epidemiológica por levar a doença para outros países não-endêmicos e por ser responsável por surtos recentes de doença aguda, sobretudo na Amazônia. Citam-se ainda infecções por manuseio de animais e acidentes laboratoriais. (ARGOLO et al., 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; TESTON, 2012).

1.1.2 Ciclo de vida do parasito

Durante o repasto sanguíneo, o barbeiro libera a forma infectiva da doença de Chagas, tripomastigota metacíclica (protozoário alongado com flagelo, facilitando seu movimento), nas fezes e na urina. O tripomastigota penetra no organismo humano, depois que o indivíduo coça a pele ferida pela picada ou quando as fezes e urina entram em contato com membranas mucosas e conjuntivas. (SOUZA, 2000; TEIXEIRA et al., 2006; ARGOLO et al., 2008).

Dentro do organismo, o tripomastigota metacíclico invade macrófagos teciduais próximos ao local de entrada do parasito, sobrevivendo aos vacúolos parasitóforos ácidos, e logo em seguida deixa o ambiente hostil para entrar livremente no citoplasma da célula hospedeira. O tripomastigota evolui então para a forma amastigota (forma ovóide e sem flagelo) dentro da célula hospedeira e se multiplica por muitas vezes por fissão binária. As células, preenchidas com a forma amastigota que se diferenciaram em tripomastigotas móveis, se rompem, por causa do grande número e movimentação intensa dos parasitos. Assim, liberam no sangue e no sistema linfático, as formas flageladas, tripomastigotas sanguíneos, que

infectam outras células do corpo, causando lesões, principalmente em tecido musculares cardíacos e lisos. (SOUZA, 2000; TEIXEIRA et al., 2006; ARGOLO et al., 2008).

Ao fazer o repasto sanguíneo, o barbeiro, ingere os tripomastigotas do sangue. No estômago do invertebrado, a forma tripomastigota começa a adquirir aspectos arredondados alguns se tornando esferomastigotas (protozoário com longo flagelo colado ao corpo) e outros epimastigotas (protozoário com flagelo curto). Ao chegar ao intestino, mais precisamente na porção média, os parasitos se tornam epimastigotas, e se multiplicam. Os epimastigotas migram então para o intestino posterior do inseto, se diferenciando para a forma tripomastigota metacíclica, que é eliminada nas fezes e urina durante o repasto sanguíneo, que por sua vez pode penetrar através de feridas ou mucosas no organismo do hospedeiro definitivo, recomeçando assim o ciclo de transmissão da doença de Chagas. A figura 1 ilustra o ciclo de vida do parasito, descrito acima. (SOUZA, 2000; ARGOLO et al., 2008).

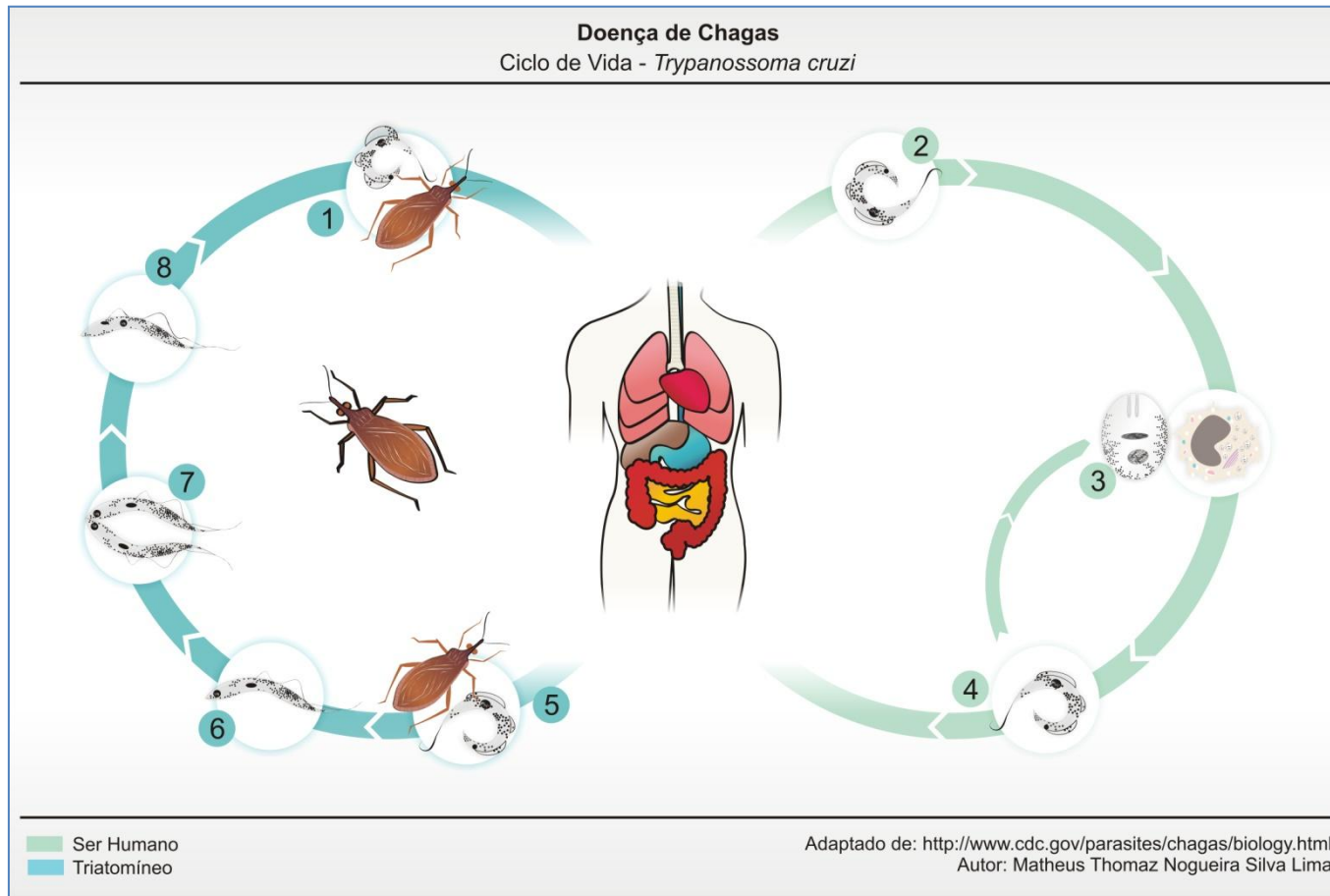


Figura 1 – Ciclo da doença de Chagas. 1 – A forma tripomastigota metacíclica é liberado nas fezes, quando este faz o repasto. 2 – O protozoário entra no hospedeiro definitivo através da ferida ou mucosa, infectando as células; 3 – Dentro das células o tripomastigota se transforma em amastigota, que se reproduz sexualmente (fissão binária); 4 – Amastigotas se tornam tripomastigotas, que são liberados no sangue e linfa, podendo infectar novas células; 5 – O tripomastigota livre no sangue é sugado pelo barbeiro; 6 – No hospedeiro intermediário, barbeiro, o tripomastigota se transforma em epimastigota em seu intestino; 7 – Multiplicação do protozoário; 8 – A forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*, se transforma em tripomastigota metacíclico.
Fonte: Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>, 2012 por Matheus Thomaz Nogueira Silva Lima.

1.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da doença de Chagas deve ser apoiado pela clínica e epidemiologia e confirmado pelo diagnóstico laboratorial. (LUQUETTI; RASSI, 2000). O diagnóstico clínico está relacionado com a origem do paciente, sinais de entrada do parasito no organismo (sinal de Romanã e/ou chagoma de inoculação), acompanhadas algumas vezes de sinais clínicos como: febre irregular, adenopatia, hepatoesplenomegalia, taquicardia e edema. Em conjunto, esses achados levam à suspeita de fase aguda da doença de Chagas. Contudo, a confirmação do diagnóstico clínico deve ser feita por métodos laboratoriais. (LANA; TAFURI, 2005).

O diagnóstico laboratorial pode se apresentar de forma diferente mediante a fase da doença de Chagas em que é submetido. Na fase aguda da doença, observa-se alta parasitemia e presença de anticorpos inespecíficos e o início da formação de anticorpos específicos. Já na fase crônica há baixíssima parasitemia e presença de anticorpos específicos. Portanto, alguns métodos de diagnóstico precisam ser empregados, tais como: métodos parasitológicos e sorológicos (LANA; TAFURI, 2005).

A demonstração direta de parasitos em hospedeiros mamíferos somente pode ser alcançada na fase aguda, pela observação microscópica de esfregaço sanguíneo fresco, notando-se os parasitos móveis entre as células vermelhas. (TEIXEIRA et al., 2006). A confirmação do diagnóstico na fase crônica para a doença de Chagas deve ser feita pelo menos por dois testes sorológicos. O ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e imunofluorescência indireta, testes de alta fidelidade para detectar anticorpos específicos. (TEIXEIRA et al., 2006).

1.1.4 Formas clínicas da doença de Chagas e seus sintomas

Duas fases distintas estão presentes na doença de Chagas. A fase inicial, chamada de fase aguda, dura em torno de dois meses após a infecção e um alto número de parasitos circula no sangue durante esta fase. Os sintomas, na maioria dos casos, são ausentes ou brandos, mas incluem febre, dor de cabeça, aumento das glândulas linfáticas, palidez, dor muscular, dificuldade para respirar, inchaço, dor abdominal ou torácica, hepatoesplenomegalia, meningoencefalite e miocardite. O primeiro sinal visível em menos de 50% das pessoas picadas pelo triatomíneo, é o

chagoma (inchaço na região da picada) ou sinal de Romaña (inchaço das pálpebras). (ARGOLO et al., 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; SALOMON, 2012).

Após a fase aguda, se a infecção não for tratada ou se o tratamento não for eficiente, os indivíduos entram na fase crônica. Nesta fase, observam-se diferentes formas clínicas. A forma clínica indeterminada, geralmente assintomática, compreende um período que pode durar de 10 a 20 anos e é caracterizada pela ausência virtual de sintomas e sinais clínicos. Cerca de 30% dos pacientes infectados desenvolverão as formas sintomáticas da doença de Chagas, que compreende as formas cardíaca, digestiva e cardio-digestiva. (SALOMON, 2012).

Pacientes na fase crônica apresentam parasitos ocultos principalmente no músculo cardíaco e digestivo. Cerca de 30% dos pacientes sofrem com desordens cardíacas e 10% sofrem de problemas digestivos, alargamento do esôfago e cólon e alterações neurológicas ou uma mistura delas. O parasito pode causar também lesões no fígado e no sistema nervoso e linfático. Em períodos variáveis de paciente para paciente, a infecção pode levar à morte súbita ou falha cardíaca causada pela destruição progressiva do músculo cardíaco. (ARGOLO et al., 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

1.1.5 Tratamento

No início da década de 1970, novas perspectivas para o tratamento da doença de Chagas surgiram com dois novos fármacos, cujos compostos demonstraram eficácia na fase aguda e tolerância. São eles, o nifurtimox e o benzonidazol (BZ), as únicas drogas nitrofurano derivadas disponíveis atualmente para o tratamento específico da doença de Chagas.

O Benzonidazol é um 2-nitroimidazol (*N*-benzil-2-nitroimidazol acetamida) (FIG. 2), comercializado no Brasil como Rochagan[®], da Roche. Este fármaco mostrou uma alta atividade contra o *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*. O modo de ação do BZ pode envolver ligação covalente ou outras interações de intermediários nitroreduzidos com componentes do parasito ou ainda ligações ao DNA, lipídios e proteínas. (COURA; CASTRO, 2002).

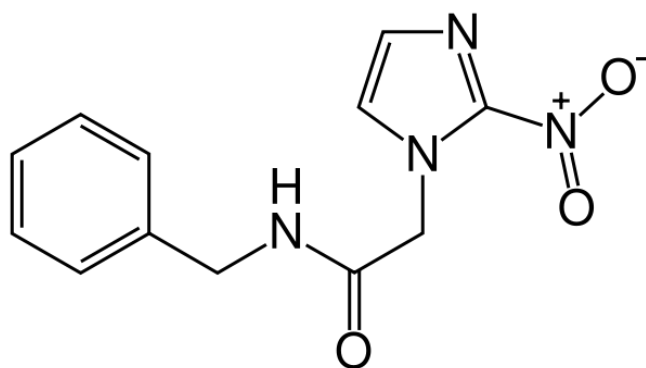


Figura 2 – Estrutura molecular do N-benzil-2-nitroimidazol acetamida (Benzonidazol). Fonte: BENZONIDAZOL, 2012

Existem algumas evidências que indicam que o nifurtimox e o benzonidazol atuam através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. O grupo nitro (NO_2) presente em tais compostos é reduzido ao grupo amino (NH_2) pela ação de nitroreduases, atuando especificamente em sistemas moleculares do tipo R-NO_2 . O processo que se iniciou pela reação catalisada pela NADPH citocromo P450 redutase, forma R-NO_2^- , um intermediário nitro radicalar, com formação subsequente de hidroxilamina (R-NHOH). O radical nitro que é formado por meio da ação do fármaco BZ estaria envolvido com seu efeito tripanocida através da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *Trypanosoma cruzi*, por exemplo, DNA e citocromo P450. O BZ aumenta a fagocitose e lisa o *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$), inibindo o crescimento do *T. cruzi* através da enzima NADH-fumarato redutase. (DIAS et al., 2009).

Tais medicamentos mostram sua eficácia na cura da doença se administrados imediatamente após a infecção, ou seja, no início da fase aguda. O tratamento é indicado também para pessoas onde a infecção foi reativada, por exemplo, por imunossupressão, para crianças com infecção congênita e para pacientes durante o início da fase crônica. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

A ação destes compostos é afetada por algumas condições diretamente, tais como: a duração do tratamento, idade, distribuição geográfica dos pacientes, entre outros. Os melhores resultados foram obtidos na fase aguda da doença. Os medicamentos nifurtimox e benzonidazol, apresentaram entre 50-70% de cura na fase aguda da doença de Chagas, contrastando com valores menores que 20% na fase crônica da doença. Contudo, estas drogas possuem limitações severas, como

alta frequência de efeitos tóxicos consideráveis, longo protocolo de tratamento e eficácia limitada. (DIAS et al., 2009; BECERRA et al., 2012).

Os efeitos colaterais mais frequentes ao fármaco BZ são: manifestações de hipersensibilidade entre elas a dermatite com erupção cutânea, edema generalizado ou periorbital, febre, linfadenopatia, dor muscular e articular; depressão da medula óssea, incluindo neutropenia, púrpura trombocitopênica, agranulocitose (a mais severa manifestação); e polineuropatia periférica, representada por parestesias e polineurite dos nervos periféricos. (COURA; CASTRO, 2002; DIAS et al., 2009).

Apesar dos vários efeitos colaterais que o uso do BZ acarreta aos pacientes que estão sendo tratados pela doença de Chagas, esta é a droga ainda indicada pelos médicos como o fármaco de linha de frente. (MEJIA et al., 2012).

1.1.6 Prevenção e controle

A forma de prevenção da doença de Chagas mais eficiente na América Latina é o controle do vetor. A triagem do sangue também é necessária para evitar a transmissão da doença por transfusão sanguínea e transplante de órgãos. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

As metas principais são a eliminação da transmissão e o acesso à assistência médica para a população infectada e doente. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). A migração de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* tem representado uma ameaça para aqueles países onde a transmissão da doença pelos triatomíneos não ocorre, o que torna a doença de Chagas um problema. Indivíduos de áreas endêmicas têm migrado para alguns lugares, tais como Estados Unidos da América, Canadá, Austrália, Japão e países europeus orientais. (TEIXEIRA et al., 2006).

A seleção apropriada de doadores de sangue, o uso de testes sensíveis de triagem e a aplicação de um sistema de garantia de qualidade mantêm a segurança dos bancos de sangue. A prevenção da transfusão sanguínea com protozoários depende principalmente da seleção dos doadores. O uso de testes de diagnóstico moleculares avançados, mais precisos e sensíveis tem reduzido grandemente o risco da aquisição da doença de Chagas transmitida pelo sangue infectado. (TEIXEIRA et al., 2006).

1.1.7 Contato inicial parasito-hospedeiro: papel dos macrófagos

O sistema mononuclear fagocitário representa um subgrupo dos leucócitos e tem como componentes centrais monócitos, macrófagos e células dendríticas, que derivam de precursores mielóides da medula óssea. No sangue, o monócito é a forma circulante e o macrófago, encontra-se no tecido com importante papel durante a inflamação (GEISSMANN et al., 2010).

Os monócitos permanecem pouco tempo no sangue e então atravessam as paredes dos vasos sanguíneos, penetram no tecido conjuntivo, onde adquirem as características funcionais e morfológicas dos macrófagos, uma fase mais avançada na vida da célula mononuclear fagocitária. Algumas evidências sugerem, portanto que os macrófagos em vários órgãos diferentes se auto-renovam sem a reposição de precursores do sangue (TACKE; RANDOLPH, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ROBBINS; SWIRSKI, 2010).

Os macrófagos são células fagocitárias residentes em tecidos linfóides e não linfóides e acredita-se estar envolvida na homeostase tecidual, via limpeza de células apoptóticas e na produção de fatores de crescimento. Estas células estão equipadas com uma ampla gama de receptores de reconhecimento de patógenos, tornando-as eficientes na fagocitose e na produção induzida de citocinas inflamatórias. A subpopulação de macrófagos é dividida baseada na localização anatômica e fenótipo funcional. Entre os macrófagos especializados residentes no tecido, tem-se osteoclastos, macrófagos alveolares, histiócitos e células de Kupffer. Algumas subpopulações de macrófagos também se encontra em locais privilegiados, tais como o cérebro, olhos e testículos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; GEISSMANN et al., 2010; MURRAY; WYNN, 2011).

A doença de Chagas, em sua fase aguda, provoca uma forte resposta inflamatória. Para controlar a replicação do parasito, células da linhagem monocítica, entre estas, os macrófagos, são recrutadas, desempenhando um papel fundamental na remoção dos parasitos em humanos e também em outros modelos experimentais. (FABRINO et al., 2010). O tripomastigota metacíclico é capaz de invadir uma grande variedade de células no local da inoculação, entre estas células, encontra-se o macrófago. O protozoário usa uma série de moléculas que desencadeará uma sinalização intracelular do hospedeiro. A invasão das células do

hospedeiro vertebrado acontece através do reconhecimento entre parasito e célula. Este processo envolve uma grande variedade de moléculas presentes em ambos, célula do hospedeiro e o *T. cruzi*, podendo ser dividido em 3 estágios: adesão e reconhecimento, sinalização e invasão. Na interação, protozoário e célula hospedeira, deve-se considerar: a cepa de *T. cruzi* utilizada no estudo; o estágio de desenvolvimento; se a forma tripomastigota é delgada ou larga e qual célula hospedeira está sendo usada. Durante a entrada do parasito, acontece uma estreita associação entre a membrana da célula hospedeira e o tripomastigota. Os lisossomos também são recrutados para o local de entrada do *T. cruzi* que gradualmente se funde a membrana plasmática, fornecendo membrana para a formação do vacúolo parasitóforo viável, evitando que o parasito possa sair da célula. Os lisossomos servem como âncoras para o protozoário dentro da célula hospedeira, provavelmente como resultado das estreitas interações das proteínas da membrana lisossomal diretamente com moléculas da membrana plasmática do *T. cruzi*. Este permanece dentro do vacúolo um considerável período de tempo antes de escapar para o citosol e se diferenciar na forma replicativa, amastigota. Portanto, os mecanismos envolvidos no processo que leva a invasão propriamente dita do protozoário à célula hospedeira são complexos. (ANDRADE; ANDREWS, 2005; ALBERTTI et al., 2010; SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010).

Os macrófagos ativados são capazes de produzir altos níveis de citocinas pro inflamatórias e produtos microbicidas, como: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$) e óxido nítrico (NO). Contudo, apesar de extensas investigações experimentais, o mecanismo usado pelo macrófago ativado para eliminar o *T. cruzi* ainda não é totalmente entendido. (FABRINO et al., 2010).

A produção de grandes quantidades de NO, em murinos, através da NO sintase induzida (iNOS) pelos macrófagos, é alegada como uma das principais vias para a morte do parasito. (FABRINO et al., 2010).

Os macrófagos como células apresentadoras de antígenos (APCs) iniciam a resposta imune celular e conseqüentemente ativam a resposta imune humoral, levando a produção de citocinas. Como conseqüência da ativação da resposta adaptativa, as células T são capazes de produzir inúmeras citocinas que orquestraram a resposta imune, controlando a diferenciação celular, adesão, expressão de moléculas co-estimulatórias, migração e recrutamento, entre muitas

outras atividades. Citocinas pró-inflamatórias, como interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), são secretadas pelas células T e estimulam APCs para eliminar o parasito eficientemente. Por sua vez, para a ativação apropriada das células T, as APCs provocam uma reatividade imune celular que pode cooperar na eliminação do parasito. Estas funções são reguladas por citocinas anti-inflamatórias, que podem diminuir a expressão de moléculas ativadoras de células T. A interação apropriada entre APCs e células T, e a consequente resposta imune gerada por tais interações, são essenciais para determinar o destino de uma infecção (SOUZA et al., 2004; SOUZA et al., 2007).

Estudos realizados em monócitos humanos de indivíduos com a forma indeterminada da doença de Chagas produzem altos níveis de interleucina-10 (IL-10) após a exposição á tripomastigotas vivas. Enquanto que os monócitos de indivíduos que apresentam a forma cardíaca da doença produzem TNF- α e altos de níveis de IFN- γ (SOUZA et al., 2004; SOUZA et al., 2007).

A resistência inicial à infecção causada pela *Trypanosoma cruzi* é desempenhada pelos macrófagos. Portanto, um melhor entendimento de suas respostas ao parasito é crucial para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas apropriadas e o controle da doença de Chagas (MELO; MACHADO, 2001; FABRINO et al., 2010).

Uma característica morfológica nos macrófagos desencadeada pela doença de Chagas é a presença de números aumentados de organelas citoplasmáticas distintas, chamadas corpúsculos lipídicos. (MELO, 2009).

1.2 Corpúsculos lipídicos

Os corpúsculos lipídicos (CLs), também conhecidos como gotículas lipídicas ou adiposomas, são organelas ricas em lipídios e estão presentes em praticamente todos os organismos, incluindo plantas, fungos, procariotos, mamíferos e não mamíferos. (BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009).

Há alguns anos acreditava-se que estas organelas estavam amplamente associadas com o armazenamento de lipídios, mas já se reconhece atualmente que os CLs são dinâmicos e funcionalmente ativos. Estão envolvidos em uma variedade

de funções, tais como: metabolismo de lipídios, sinalização celular e inflamação. (MELO et al., 2011).

Os CLs são distribuídos em microambientes específicos no citoplasma celular como organelas aproximadamente esféricas e não possuem uma bicamada fosfolipídica delimitante como na membrana clássica. (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007). Em contraste com as organelas membranosas e vesículas citoplasmáticas os corpúsculos possuem uma arquitetura distinta, pois o cerne dos CLs é formado de lipídios neutros circundados por uma associação de proteínas e colesterol com a monocamada de fosfolipídios. (MELO et al., 2011).

1.2.1 Composição dos corpúsculos lipídicos

A composição lipídica dos CLs inclui a abundância de ácidos graxos insaturados em sua hemi-membrana. O cerne hidrofóbico dos CLs é formado por triacilgliceróis, diacilgliceróis, ésteres de retinil, colesterol livre e ésteres de colesterol em várias proporções dependendo do tipo celular. Os CLs de macrófagos inflamatórios são enriquecidos em triglicerídeos. (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007).

O corpúsculo tem sido caracterizado em diferentes leucócitos e tem sido mostrado que são particularmente sítios ativos para o metabolismo de lipídios araquidônicos. A maioria do araquidonato incorporado pelos macrófagos e outros leucócitos se encontra nos CLs. Estas organelas são locais também de armazenamento de araquidonato esterificado. Pequenas quantidades de ácido araquidônico foram identificadas nos corpúsculos. O araquidonato foi encontrado em diferentes proporções de acordo com o tipo celular. Lipídios neutros contendo ácido araquidônico são a principal forma de armazenamento de ácido araquidônico em monócitos/macrófagos. O ácido araquidônico possui papéis importantes nas células inflamatórias, tais como: molécula de sinalização chave, atuando como segundo mensageiro intracelular; mediador parácrino da ativação celular e como substrato para a conversão enzimática em eicosanóides. (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007).

As proteínas que compõem os corpúsculos lipídicos são de vários tipos, incluindo proteínas estruturais, enzimas metabólicas, quinases, proteínas da família

Rab e pequenas GTPases. Portanto, os CLs podem funcionar no metabolismo lipídico, tráfico de membranas e sinalização celular. Funções inflamatórias e imunorregulatórias são também atribuídas aos corpúsculos, uma vez que eles contenham enzimas formadoras de eicosanóides, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007).

Proteínas da família PAT – Perilipina, ADRP (*Adipose Differentiation Related Protein*) e TIP47 (Tail-Interacting 47kDa Protein) – são proteínas estruturais específicas dos CLs, sendo encontradas como um aro que delimita os corpúsculos e também estão relacionadas na montagem e biogênese dos mesmos. (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007; BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009). Estas proteínas atualmente são chamadas de perilipinas 1 (perilipina), 2 (ADRP) e 3 (TIP47). A padronização dos nomes se deu porque havia uma confusão com relação aos múltiplos nomes de várias proteínas PAT (KIMMEL et al., 2010).

As proteínas PAT são semelhantes em quase toda sequência, com exceção de aproximadamente 20 resíduos na extensão N-terminal da TIP47 e variando no comprimento nas extensões C-terminais nas diferentes perilipinas. A identidade da sequência entre a metade C-terminal da perilipina e da ADRP e TIP47 é inferior em um par de base. (HICKENBOTTOM et al., 2004).

As proteínas PAT compartilham significantes sequências de aminoácidos com similaridade especificamente na região N-terminal (domínio PAT), entretanto, esse domínio é dispensável para o direcionamento do corpúsculo lipídico. Os segmentos do domínio PAT e a porção C-terminal da ADRP permitiu localizar os CLs, sugerindo que existe redundância nas sequências que especificam o direcionamento para os estas organelas. A ADRP é expressa em vários locais e está associada com CLs intracelulares neutros em todos os tipos de células examinadas. De fato, a ADRP é descrita como um marcador protéico específico para CLs. Os leucócitos possuem poucos corpúsculos lipídicos ou nenhum, mas podem ser rapidamente estimulados para formar novos CLs. A formação rápida de CLs após estímulo, envolve a translocação rápida de ADRP pré formado do citosol, não requerendo a síntese de novas proteínas. Embora, o papel da ADRP ainda não seja completamente compreendido, existem evidências, que o papel importante desta proteína seria a captação de ácidos graxos, ligação com colesterol e ácidos graxos, e armazenamento de lipídios neutros. A transfecção de ADRP também levou a

formação de CLs. A superexpressão de ADRP ou perilipina em macrófagos THP-1 aumentou o acúmulo de triglicerídeos e colesterol armazenados. (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007).

As proteínas animais específicas associadas aos CLs melhores caracterizadas são as perilipinas. Múltiplas formas de perilipinas são expressas como resultado do *splicing* alternativo de um único gene transcrito. Esta proteína compartilha sequências semelhantes com proteínas de mamíferos, ADRP e TIP47. A perilipina e a ADRP são localizadas especificamente na superfície dos CLs intracelulares. A ADRP e TIP47 são 50% idênticas em sua sequência e, portanto essas duas proteínas podem ter semelhante papel fisiológico. A TIP47 está associada ao CL, mas não é exclusiva a essa organela, sendo encontrada abundantemente no citosol. (HICKENBOTTOM et al., 2004).

A expressão da perilipina é amplamente restrita aos adipócitos, enquanto que ADRP e TIP47 têm ampla distribuição nos tecidos. A perilipina funciona como um regulador crítico da lipólise de triacilgliceróis nos adipócitos, ela também é capaz de estimular a lipólise em fibroblastos transfectados. (HICKENBOTTOM et al., 2004).

Outras proteínas são encontradas nos corpúsculos lipídicos de diferentes tipos celulares. Enzimas chaves envolvidas no metabolismo de colesterol e na síntese de ácidos graxos. Caveolinas, principal proteína encontrada na cavéola. Uma variedade de quinases. Um pequeno número de GTPases da família Rab. As citocinas são outro grupo de proteínas encontradas dentro dos corpúsculos. (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007).

1.2.2 Identificação dos corpúsculos lipídicos

A identificação dos corpúsculos lipídicos pela microscopia de luz em células inflamatórias e outras possui limitações metodológicas, pois os CLs não são resistentes a secagem ou a fixação e coloração com reagentes a base de álcool. A fixação a base de álcool extrai a maioria dos fosfolipídios celulares e promove a fusão dos CLs, enquanto que a coloração por May-Grünwal-Giemsa causa dissolução dos corpúsculos. Contudo, usando os processos de fixação apropriados, seguidos pelos métodos de identificação de lipídios, os CLs podem ser claramente identificados no citoplasma. Estas técnicas geralmente incluem a fixação com

paraformaldéido ou formaldeído (formalina) e coloração com tetróxido de ósmio ou marcação com diferentes sondas fluorescentes. (MELO et al., 2011).

A visão ultraestrutural dos CLs mostra que estas organelas não são circundadas por uma típica membrana em bicamada, mas uma monocamada de fosfolipídios. Essa característica única dos corpúsculos – sem uma membrana periférica verdadeira – facilita a identificação destas organelas pela microscopia eletrônica de transmissão (MET) quando comparada com outras organelas membranosas intracelulares. Na MET convencional, os CLs aparecem como organelas eletrondensas ou eletrólúcidas dependendo do tipo celular em que se encontram e podem mudar sua osmiofilia em resposta a estímulos inflamatórios. Os CLs são ultraestruturalmente melhor reconhecidos pela MET, mostrando também considerações variáveis em seu tamanho. (MELO et al., 2011).

1.2.3 Biogênese dos corpúsculos lipídicos

Os modelos propostos para a biogênese dos CLs envolvem a transferência de lipídios e proteínas do Retículo Endoplasmático (RE), porém os mecanismos precisos envolvidos ainda permanecem para serem mais bem entendidos. Três modelos principais têm sido propostos para explicar a formação dos CLs e sua interação com RE. Um dos primeiros modelos propostos, “modelo de brotamento”, onde as enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios se acumulam em domínios específicos do RE, assim favorecendo a síntese de lipídios neutros nestas regiões formando uma massa de lipídios hidrofóbicos neutros entre os folhetos da bicamada do RE. Depois de atingir certo tamanho, os CLs nascentes carregados com proteínas sem abranger os domínios trans-membrana brotando do RE no citoplasma que acaba cercado por metade da unidade de membrana fosfolipídica diretamente derivada do folheto citoplasmático do RE (FIG.3-A). (BROWN, 2001; MURPHY, 2001; ROBENEK et al., 2004; MARTIN; PARTON, 2006; BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009).

Um segundo modelo proposto sugere que a formação de CLs acontece preferencialmente ao lado do RE e não dentro deste. No modelo “*egg cup*” os CLs se formam acima de depressões do RE, que são enriquecidas com *clusters* de ADRP no folheto citoplasmático da membrana do RE. Os *clusters* agem como

condutores, transferindo lipídios do RE para os CLs nascentes (FIG. 3-B). (ROBENEK et al., 2006).

O terceiro modelo foi baseado em estudos de CLs em leucócitos e em outras células. O modelo, de envolvimento, propõe que a biogênese destas organelas, acomoda proteínas associadas à membrana e proteínas transmembrana dentro do cerne dos CLs pela incorporação de múltiplos *loops* dos domínios membranosos do RE (FIG. 3-C). (WAN et al., 2007).

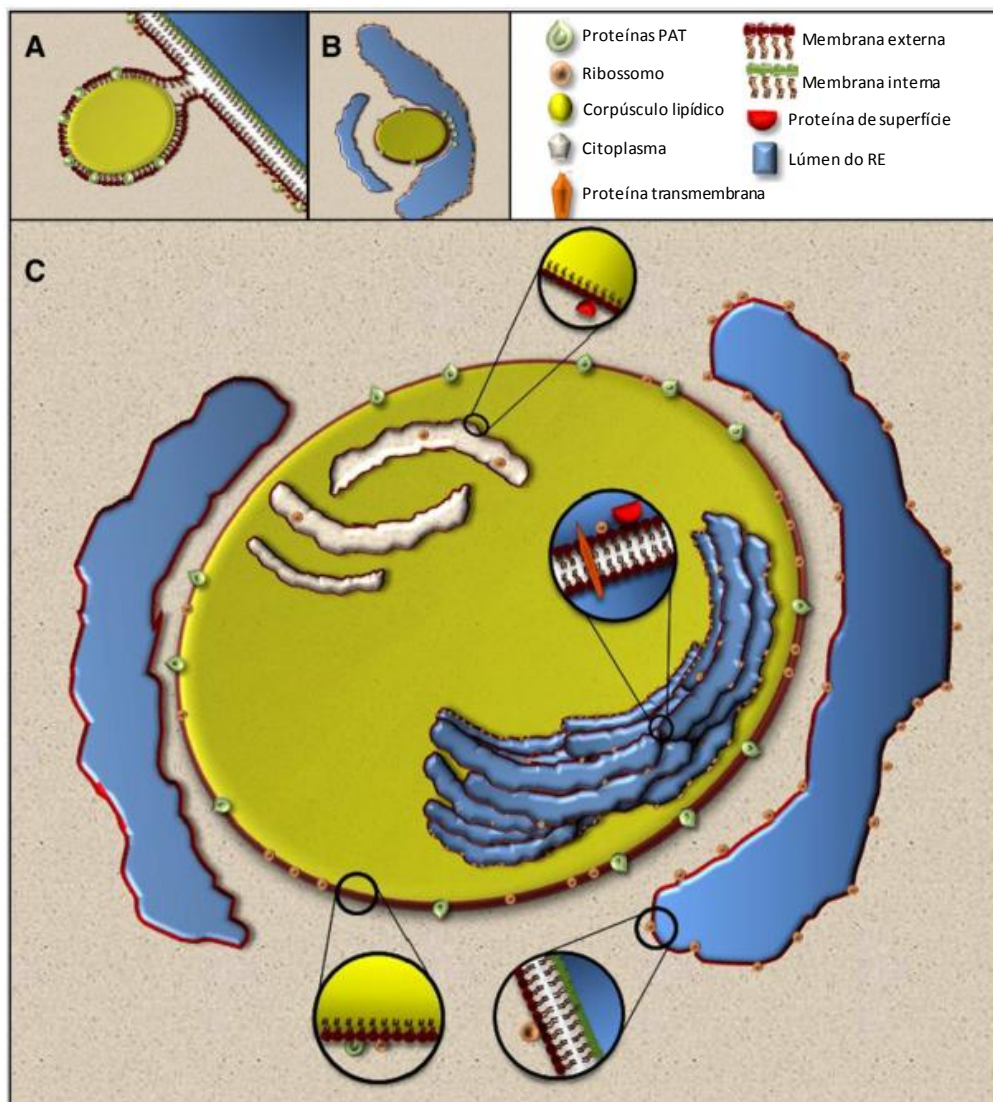


Figura 3 – Biogênese e estrutura dos corpúsculos lipídicos. Fonte: Adaptado de BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009 por Patrícia Pereira Silva

Enzimas envolvidas na síntese de eicosanóides são localizadas nos CLs e estas organelas são os principais locais para a geração de eicosanóides. Estes mediadores inflamatórios pertencem a uma família de lipídios de sinalização,

derivados de ácido araquidônico, que controlam importantes processos celulares, incluindo proliferação celular, apoptose, metabolismo e migração. Os eicosanóides, portanto possuem papéis chaves em condições fisiológicas e patológicas, tais como homeostase tecidual, inflamação e câncer. (BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009).

A localização intracelular direta de eicosanóides recém formados, confirma que os corpúsculos são domínios especializados para a produção focal de eicosanóides. O papel dos eicosanóides derivados de CLs pode variar dependendo do tipo de leucócito, estímulo e condições inflamatórias, controlando assim a síntese destes mediadores lipídicos. Os eicosanóides sintetizados nos CLs podem também funcionar como mediadores intracelulares e extracelulares. (BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009).

1.2.4 Corpúsculos lipídicos na doença de Chagas

Uma característica da infecção causada pelo *Trypanosoma cruzi* nos macrófagos é a presença em maior número das distintas organelas, os corpúsculos lipídicos (MELO et al., 2003). Apesar do acúmulo dos CLs ter sido documentado nos últimos 30 anos em várias células em diferentes doenças inflamatórias, a primeira observação da formação de CLs em resposta a uma doença infecciosa foi descrita por Melo e colaboradores em 2003 (D'AVILA; TOLEDO; MELO, 2012).

Macrófagos inflamatórios de ratos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* foram investigados e observou-se um aumento significativo no número de CLs quando comparado ao controle (MELO et al., 2003). O acúmulo de CLs também foi observado em macrófagos peritoneais isolados de camundongos e infectados com o *T. cruzi*. Este aumento se deu nas células com parasitos internalizados bem como nas células não parasitadas que se encontravam no mesmo ambiente. As células parasitadas apresentaram um aumento bastante significativo do número de corpúsculos lipídicos quando comparadas as células não parasitadas, indicando que a presença do parasito induz diretamente a formação de CLs (D'AVILA et al., 2011).

Análises ultraestruturais de corações de ratos infectados com o *T. cruzi* mostraram que os macrófagos presentes no infiltrado inflamatório cardíaco apresentavam CLs em maior número e tamanho. Estas organelas também

apresentaram variação em sua osmiofilia após a infecção com o parasito (MELO et al., 2003; MELO et al., 2006).

Outra característica morfológica dos corpúsculos decorrente da infecção com o *Trypanosoma cruzi* e que vale ressaltar é a variação no tamanho que estas organelas apresentam. O diâmetro dos CLs dentro de macrófagos de ratos experimentalmente infectados com o *T. cruzi* eram maiores do que os CLs de macrófagos não infectados (MELO et al., 2006).

A infecção com o *T. cruzi*, causador da doença de Chagas, em macrófagos mostraram também uma interação próxima dos CLs com fagossomos e até mesmo uma aparente translocação dos CLs para estes vacúolos. Mas esta interação precisa ainda ser melhor conhecida (MELO et al., 2006).

Nossa hipótese é que a infecção de macrófagos humanos com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e o tratamento com benzonidazol levam a alterações morfológicas, possivelmente refletidas nas organelas citoplasmáticas, especialmente nos corpúsculos lipídicos.

1.3 Justificativa

Embora muitos estudos tenham contribuído significativamente no entendimento da doença, pouco se conhece sobre as alterações morfológicas de monócitos humanos diferenciados em macrófagos, infectados *in vitro* com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e seguidos do tratamento com o fármaco benzonidazol. Salienta-se o estudo das possíveis alterações nas organelas citoplasmáticas, especialmente dos corpúsculos lipídicos. O estudo dessas alterações morfológicas em resposta à infecção e ao tratamento poderá ser importante para auxiliar na compreensão do papel dessas células no combate ao parasito e no estabelecimento da resposta imunológica.

1.4 Objetivos

1.4.1 Geral

- ✓ Analisar os corpúsculos lipídicos em macrófagos humanos infectados pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e submetidos ao tratamento com o fármaco benzonidazol.

1.4.2 Específicos

- ✓ avaliar a ocorrência e alterações dos corpúsculos lipídicos através de marcação específica para microscopia de luz;
- ✓ avaliar o diâmetro dos corpúsculos lipídicos através de marcação específica para a microscopia de luz;
- ✓ avaliar as características ultraestruturais dos corpúsculos lipídicos em macrófagos humanos sem infecção, infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e infectados e posteriormente tratados com a droga benzonidazol.

MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSPs)

Células mononucleares do sangue periférico foram isoladas de bolsas sanguíneas denominadas *buffy coats*, as quais são obtidas a partir do sangue doado nos centros de coleta. Tais bolsas contêm um concentrado de leucócitos, mas são rotineiramente descartadas por não formarem *pool* de plaquetas. Os *buffy coats* utilizados neste projeto foram cedidos pelo Hemocentro de Belo Horizonte (HEMOMINAS) a partir da doação de indivíduos com idade entre 36 a 57 anos, sendo 4 indivíduos do sexo masculino e 1 indivíduo do sexo feminino.

A 5 bolsas foram cedidas uma a cada semana, sendo o procedimento para o isolamento das CMSPs realizado no dia seguinte a sua obtenção, seguindo o protocolo abaixo.

A bolsa contendo cerca de 100 mL de sangue concentrado em leucócitos foi mantida a 4°C, até o momento da obtenção das CMSPs. Iniciando o procedimento, foram separadas 7 alíquotas de 10mL do sangue, às quais foram adicionados 20 mL de RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)1640 estéril. Paralelamente, foram separadas alíquotas de 10 mL de Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare), em tubos cônicos, onde foram cuidadosamente vertidas as soluções de sangue + RPMI, resultando na distinção de duas fases, o gradiente de ficoll sobreposto pela solução sangue + RPMI. Esta mistura foi centrifugada durante 20 minutos, a 970 g, sem freio, em temperatura ambiente, do qual resultou na formação de 4 fases distintas, dentre elas o anel esbranquiçado contendo as CMSPs (FIG. 4). Seguiu-se com o procedimento de coleta do anel, durante o qual é comum a sucção também de frações de ficoll e plasma. No sentido de lavar as CMSPs, o concentrado do anel é submetido a mais duas sequências lavagem por centrifugação, usando um volume final de 40 mL de RPMI na última lavagem, ambas durante 10 minutos a 200 g, em temperatura de 4°C. Após as centrifugações há formação do concentrado de CMSPs, sobre o qual permaneciam resquícios da solução ficoll e plasma no meio de lavagem, que é descartado por emborcamento. Para manter as células viáveis, o concentrado é solubilizado em 20 mL da solução de RPMI 1640 estéril

suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina a 200 mM e 1% de antibiótico e antimicótico 100X (RPMI-suplementado).

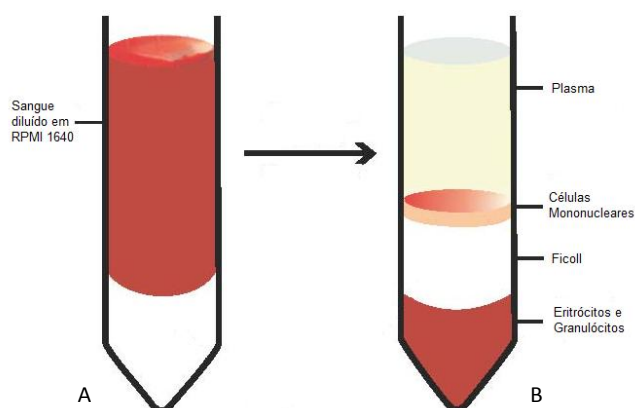


Figura 4 – Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSPs). A) alíquota de *buffy coat* + RPMI e gradiente de ficoll. B) Formação de 4 fases distintas, dentre elas o anel esbranquiçado de CMSPs. Fonte: Adaptado de HISEP™, 2010.

Tendo sido isoladas as CMSPs, seguiu-se para a detecção das células viáveis, para cuja análise utilizou-se o teste com o corante vital azul de tripan a 4%. Para este procedimento, foram adicionados 90 μL do corante a uma alíquota de 10 μL da suspensão de células. A contagem do número de células viáveis (células não coradas) foi realizada nos quadrantes externos da câmara de Neubauer, sendo que o valor obtido corresponde à média dos quatro quadrantes. A média foi multiplicada pelo fator de correção da câmara, pelo fator de diluição (10 vezes) e pelo volume final, onde as células estavam suspensas. O valor resultante, correspondente ao número de CMSPs viáveis, utilizadas para posterior plaqueamento.

2.2 Plaqueamento das CMSPs e diferenciação em macrófagos

Para o plaqueamento foram utilizadas placas de 24 poços (CellStar® Greiner labortechnik). Duas placas foram usadas para plaqueamento dos monócitos para cada doador, sendo que em uma placa, a qual seria destinada a microscopia de luz e fluorescência, 12 poços receberam as células. A outra placa destinada para o estudo a microscopia eletrônica, receberam as células em 8 poços. As CMSPs foram distribuídas na concentração de 5×10^6 células/500 μL de RPMI-suplementado, para cada poço, os quais continham uma lamínula de vidro de 13 mm de diâmetro

(microscopia de luz) e para a microscopia eletrônica, os poços continham uma lamínula feita de polímero, THERMANOX[®]. Após 4 horas, período detectado neste protocolo como suficiente para a adesão dos monócitos, as placas foram lavadas com o próprio meio de cultura para a eliminação das células não aderidas.

Partindo do pressuposto de que 5% do volume (5×10^6) de células plaqueadas são monócitos, permaneceram $2,5 \times 10^5$ de células por poço, as quais foram mantidas em RPMI-suplementado. Assim, com o cuidado de renovar os meios de cultura das placas a cada 2 dias e mantê-las em estufa a 37°C e 5% de CO₂, após 7 dias os monócitos plaqueados adquiriram a morfologia de macrófagos (M ϕ). Este procedimento se repetiu para todos os doadores.

2.3 Obtenção de tripomastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*

A obtenção da forma infectante da doença de Chagas se deu com o cultivo de células LLC-MK₂ (células isoladas de epitélio de revestimento de rim de macaco *Rhesus* e posteriormente imortalizadas) gentilmente cedidas pela Dra. Luciana de Oliveira Andrade, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Morfologia – ICB/UFMG. Cerca de $1,5 \times 10^6$ células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (TPP, Switzerland) e mantidas em 10 mL de DMEM enriquecido com 10% de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina. As culturas de LLC foram mantidas por uma semana, após o plaqueamento, em estufa a 37°C e 5% de CO₂, tempo necessário para a divisão e formação de uma monocamada celular confluenta. Após 7 dias, o meio foi substituído por 10 mL de DMEM suplementado com 2% SFB e 1% de penicilina e estreptomicina, concentração indicada para o desenvolvimento mais eficiente do protozoário. Tendo atingido as condições ideais, as células foram então infectadas com 3×10^6 tripomastigotas da cepa Y. Durante uma semana, a garrafa infectada teve o meio de cultura renovado a cada 48 horas, com 10 mL do meio DMEM com 2% SFB e 1% de penicilina e estreptomicina, por 7 dias, período que coincidia com uma maior quantidade da forma tripomastigota liberada na cultura. O meio contendo as cepas foi transferido para tubo cônico de 50 mL e centrifugado por 10 minutos, à 25°C, a 446,6 g. O tubo foi mantido em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas, tempo este necessário para a purificação da cultura de tripomastigotas, que foi submetida à contagem na câmara de Neubauer, para posterior infecção.

2.4 Taxa de infecção

A concentração de parasitos ideal para promover a infecção dos macrófagos foi definida através de ensaio de imunocitoquímica. Este ensaio foi realizado em placa de 24 poços.

Baseado na quantidade de macrófagos previamente plaqueados ($2,5 \times 10^5$ / poço), três concentrações distintas de parasitos foram testadas, com 4 repetições para cada concentração. A primeira concentração, 10 parasitos/ célula, recebeu $2,5 \times 10^6$ parasitos. A segunda concentração, 25 parasitos/ célula, recebeu $6,25 \times 10^6$ parasitos. A terceira e última concentração testada, 50 parasitos/célula, recebeu $12,5 \times 10^6$ parasitos.

Após a infecção com as diferentes concentrações, as células foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% diluído em PBS (*Phosphate Buffered Saline*), por 1 hora. Posteriormente, os poços foram lavados com PBS+/+ por 2 vezes para a retirada do PFA. Incubou-se então por 20 minutos com BSA (*Bovine Serum Albumin*) da Sigma[®] diluído em PBS+/+ a 2%, para reduzir ligações inespecíficas dos anticorpos. O anticorpo primário policlonal, anti-*T. cruzi* feito em coelho, cedido gentilmente pela Professora Doutora Luciana de Oliveira Andrade, departamento de Morfologia, ICB-UFMG, foi diluído na concentração 1:500 em BSA 2% em PBS+/+. As amostras foram incubadas por 1 hora com o anticorpo primário e a placa foi mantida durante este período em câmara úmida. Lavou-se, mais uma vez com BSA 2% em PBS+/+, por três vezes. Então as amostras foram incubadas por mais 45 minutos em câmara escura e úmida com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho (α -IgG *rabitt* Alexa 546) conjugado com o corante Alexa-Fluor[®] 546 (Invitrogen[™]) (vermelho), na concentração de 1:500 em BSA 2% em PBS+/+. A partir desta etapa o experimento foi conduzido em ambiente escuro. Concluída esta etapa o material foi lavado novamente com solução de BSA 2% em PBS+/+ (3 vezes) e somente com o PBS+/+ por 2 vezes. Após a lavagem, os grupos foram incubados com DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) da Sigma-Aldrich[®] (azul) na concentração de 1:1000 em PBS+/+ por 1 minuto. Lavou-se com BSA 2% em PBS+/+ por 3 vezes de 3 minutos. As lamínulas com a monocultura foram montadas em gel de montagem anti-fading (*p-Phenylenediamine* – PPD e glicerol em tampão Tris), selada as bordas com esmalte incolor e levadas à análise.

Para se chegar à melhor taxa de infecção, a análise consistiu da quantificação do número de macrófagos infectados para cada concentração testada. Para tal, foi utilizado microscópio de fluorescência utilizando objetiva de 100x, percorrendo 10 campos aleatórios de cada lâmina.

Esta análise mostrou que com a taxa de 50 parasitos/célula o número de macrófagos infectados foi significativamente maior em comparação com as demais taxas (FIG. 5). Portanto, a taxa de infecção escolhida foi de 50 parasitos por célula.

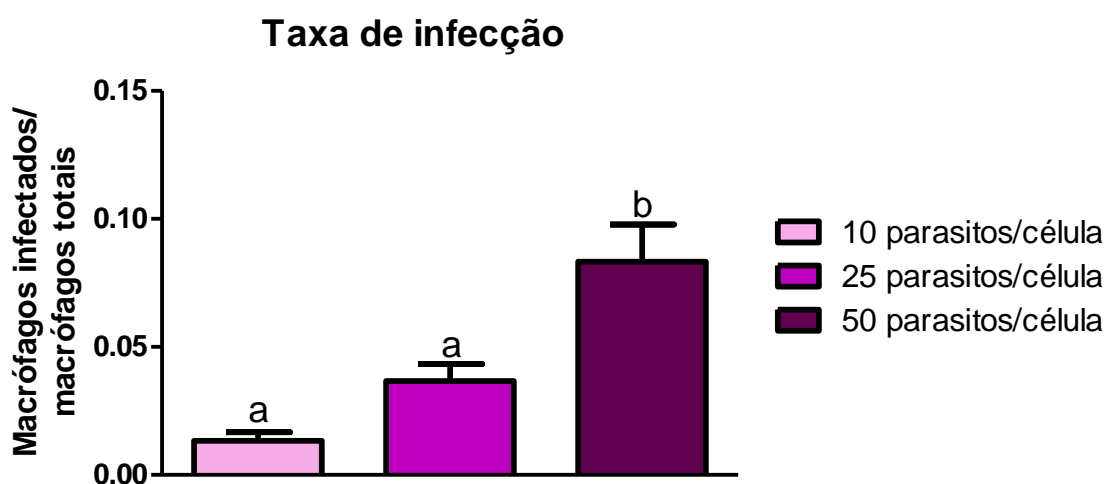


Figura 5 – Taxa de infecção dos macrófagos. As letras indicam diferenças estatisticamente significantes. $P < 0,05$. Fonte: Dados da pesquisa.

2.5 Grupos experimentais

Foram definidos 4 grupos experimentais: o **Grupo 1**, nomeado como “*Macrófagos isolados*” é formado pelas células resultantes da diferenciação de monócitos do sangue periféricos somente. O **Grupo 2**, “*Macrófagos infectados com a cepa Y*”, corresponde ao grupo de células diferenciadas, porém acrescidas da infecção pelo parasito *Trypanosoma cruzi*. Já o **Grupo 3**, chamado de “*Macrófagos tratados com a droga benzonidazol*”, corresponde às células que após diferenciação, receberam apenas uma dosagem da droga benzonidazol. E o **Grupo 4**, “*Macrófagos infectados com a cepa Y e tratados com BZ*”, é formado pelos macrófagos submetidos à infecção com o *T. cruzi*, seguido do tratamento *in vitro* pelo benzonidazol. Os grupos 1 e 3 correspondem aos grupos controles.

A figura 6 reúne os quatros grupos indicados para análise.

Grupos	Macrófagos diferenciados in vitro
1	Macrófagos isolados
2	Macrófagos infectados com a cepa Y
3	Macrófagos tratados com a droga benzonidazol (BZ)
4	Macrófagos infectados com a cepa Y e tratados com BZ

Figura 6 – Desenho experimental. A tabela resume os quatro grupos de análise propostos para o presente trabalho. Fonte: Dados da pesquisa.

Cada grupo experimental foi realizado em triplicata para posterior processamento à microscopia de luz e de fluorescência, totalizando 12 poços. Já para o processamento à microscopia eletrônica de transmissão, cada grupo experimental foi realizado em duplicata, totalizando 8 poços. Os poços das placas foram devidamente identificados, seguindo o esquema abaixo (FIG. 7). Para cada doador foi desenvolvido os 4 grupos experimentais.

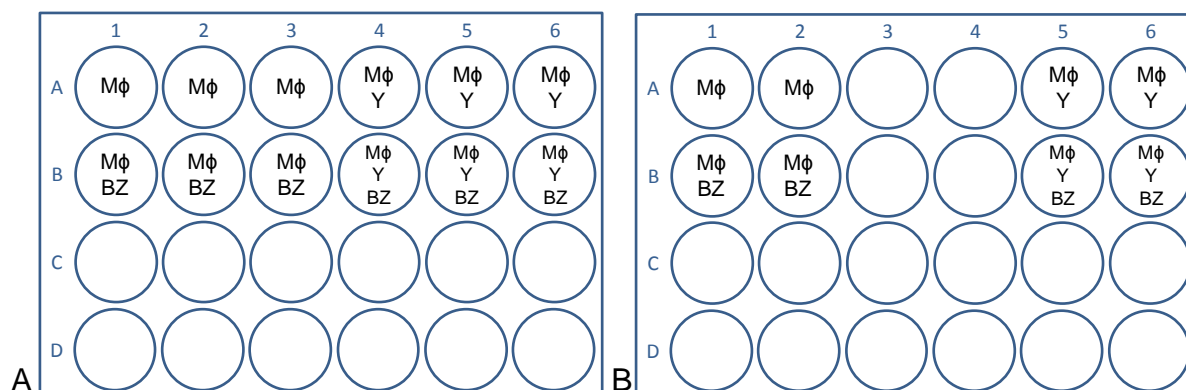


Figura 7 – Placa de 24 poços representando os grupos propostos. A) Placa destinada a microscopia de luz e fluorescência. B) Placa destinada a microscopia eletrônica de transmissão. Fonte: Dados da pesquisa.

2.5.1 Infecção dos macrófagos com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*

Nos poços destinados à infecção, distribuiu-se cepa Y na concentração de $12,5 \times 10^6$ parasitos (ressuspensos em 500 μ L de meio RPMI-suplementado) em cada poço. Após 3 horas de infecção, as culturas foram exaustivamente lavadas com PBS+/+ contendo CaCl_2 e MgCl_2 , a 37°C, para a remoção do máximo possível de parasitos não internalizados. Após a lavagem, o meio de cultura foi devidamente substituído por 500 μ L de RPMI-suplementado, no qual foi mantido até a etapa de

processamento para análises à microscopia de luz, fluorescência e eletrônica de transmissão.

2.5.2 Tratamento dos macrófagos com benzonidazol (BZ)

Nos poços destinados ao tratamento, adicionou-se 1 μ M da droga benzonidazol, conhecida por sua ação deletéria sobre o parasito. Escolhemos a concentração de 1 μ M da droga, pois de acordo com Santos (2008), a concentração mínima de BZ que inibe 50% do desenvolvimento intracelular do parasito e a liberação da forma tripomastigota infectiva *in vitro* foi de 1,3 μ M.

A droga foi inicialmente diluída na proporção de 0,1g/10 mL de dimetilsufóxido (DMSO), e novamente diluída em RPMI 1640 estéril alcançando a concentração de 1 μ M minutos antes de sua aplicação aos poços. É importante ressaltar que de acordo com Almeida e colaboradores (2009) o DMSO usado como veículo não induziu a formação de CLs.

A placa foi mantida por 16 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, para permitir a ação da droga. Assim, todos os grupos, tratados ou não, infectados ou não, foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura e concentração de CO₂ em estufa até o processamento das amostras para às microscopias. Todas as etapas, desde a obtenção das células mononucleares até o tratamento com a droga benzonidazol, estão sumarizadas na figura 8.

O tempo de contato da droga com as culturas foi padronizado de acordo com o tempo de meia-vida de eliminação plasmática da droga, de 12 horas aproximadamente, contudo mantivemos as culturas por mais 4 horas em contato com a droga baseado no trabalho de Koh (2011).

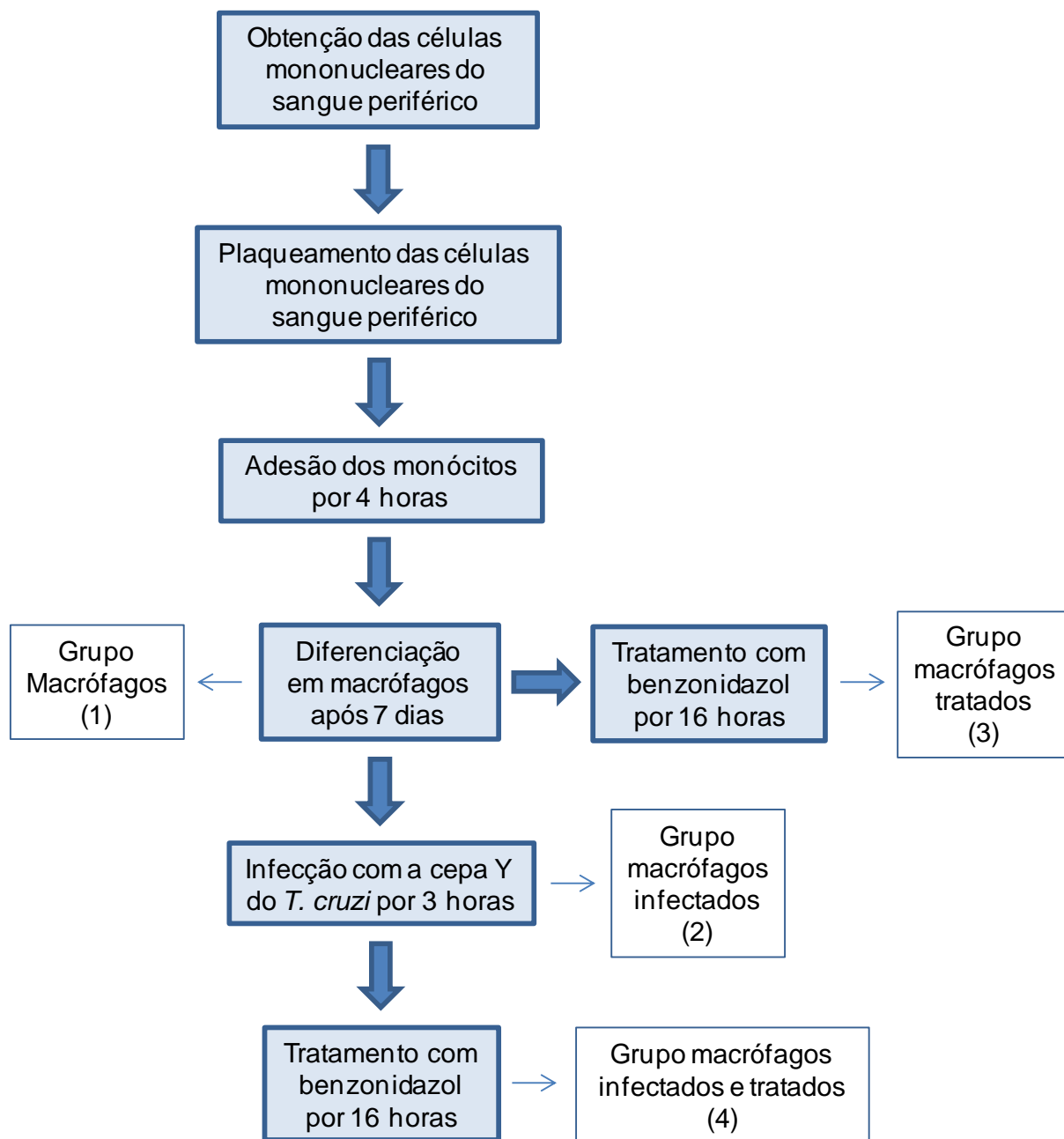


Figura 8 – Etapas desenvolvidas. Fluxograma mostrando todas as etapas realizadas para a obtenção de material, para posterior processamento a ser analisado à microscopia de luz, fluorescência e eletrônica de transmissão. Fonte: Dados da pesquisa.

2.6 Processamento do material e análise dos CLs nos diferentes grupos experimentais sob Microscopia de Luz (ML)

Para esta análise, processamos as células de acordo com o protocolo descrito por Melo e colaboradores, 2003. As células foram fixadas com formalina 3,7% em PBS, por 10 minutos. Os poços contendo as lamínulas foram então lavados

duas vezes com água destilada e a eles foi adicionado 2 gotas de ácido cacodílico 0,1M e uma gota da solução tetróxido de ósmio a 3% diluído em ácido cacodílico 0,1M, permanecendo por 30 minutos. Os poços foram novamente lavados com água destilada e as lamínulas foram cobertas com a tiocarbohidrazida (TCH) durante 3 minutos. Novamente foi adicionada a solução de ácido cacodílico e tetróxido de ósmio na mesma concentração já citada, durante 5 minutos. Após este processamento, as lamínulas foram lavadas mais uma vez com água destilada, secas à temperatura ambiente e montadas em lâmina de vidro com o meio de montagem Entellan[®]. Ressalta-se que a face contendo os macrófagos corados, deve estar voltada contra o meio de montagem, por este conter solvente, o que poderia levar a destruição dos CLs.

Imagens foram capturadas com uma câmera fotográfica digital que contém uma lente de aumento de 2x acoplada ao microscópio Olympus BX51. A objetiva do microscópio utilizada para a obtenção das imagens foi de 100x. As imagens foram analisadas utilizando o software Image J 1.46 para a quantificação dos CLs e utilizando o software AxionVision 4.8 para medição do diâmetro dos CLs. Tais análises foram realizadas em 25 células diferentes para cada grupo experimental.

Para se definir o valor de células a serem analisadas, foi realizado um experimento para padronização, no qual os CLs de 50 e 25 macrófagos foram quantificados. O resultado demonstrou que não houve diferença significativa entre o número de células analisadas (FIG.9). Assim, padronizou-se o menor número de células a serem contadas, 25 macrófagos por grupo.

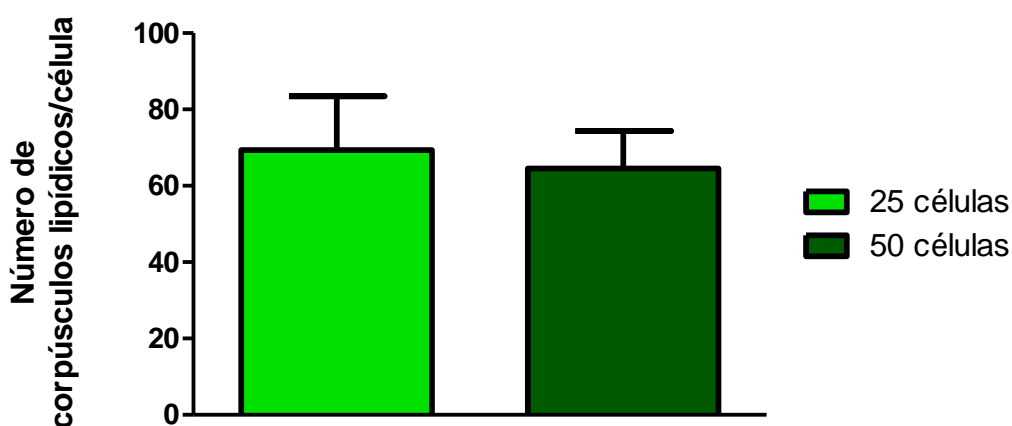


Figura 9 – Padronização do número de células a serem contadas. Fonte: Dados da pesquisa.

O procedimento para a obtenção das imagens dos 25 macrófagos e sua posterior análise quanto ao número e tamanho dos CLs foi realizada para cada grupo de cada doador.

2.7 Processamento do material e análise dos CLs nos diferentes grupos experimentais sob microscopia de fluorescência

Para a visualização dos corpúsculos lipídicos, foi realizada incubação das monocamadas em solução de BODIPY[®] 493/503 (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) da Invitrogen[™] (comprimento de onda 493-503 nm – verde) a 3 µM, fluoróforo intrinsecamente lipofílico (MOLECULAR PROBES, 2003). Após 1 hora de incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%, durante 30 minutos, seguido de uma lavagem com PBS.

Concluída a marcação dos CLs, partiu-se para o processamento do material para evidenciarmos os núcleos das células, e eventualmente dos parasitos. Para tal, o material foi incubado com DAPI diluído em PBS na concentração de 1:1000, por 1 minuto. As lamínulas foram então montadas em PPD, meio de montagem indicado para evitar a perda dos níveis de fluorescência, e vedadas com esmalte.

As células foram imediatamente analisadas à microscopia de fluorescência utilizando filtro verde para observação dos CLs marcados com BODIPY[®] 493/503 e filtro azul para visualização dos núcleos dos parasitos e dos macrófagos. Imagens foram capturadas com uma câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio Olympus BX51 utilizando objetiva de 100x. Todo este procedimento foi realizado para cada doador.

2.8 Processamento do material e análise dos CLs nos diferentes grupos experimentais sob Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O processamento do material destinado a análise a MET diferiu-se dos demais por utilizar como substrato de plaqueamento das CMSPs, uma lamínula formada por um polímero resistente a maioria dos solventes, a Thermanox[®] (THERMANOX COVERSLIPS, 2011). Disponíveis em vários diâmetros, essa lamínula caracteriza-se por apresentar uma face tratada para permitir melhor

aderência celular. Entretanto, todo o processo de diferenciação, infecção e tratamento foram os mesmos das culturas com lamínulas de vidro, obtendo os mesmos grupos experimentais.

Assim, para esta análise, as células foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH7,2, durante 6 horas, seguido da substituição do fixador pelo tampão cacodilato 0,1M, no qual foi mantido a 4°C, cerca de 7 dias. Após este intervalo, seguiu-se a etapa de pós-fixação em tetróxido de ósmio reduzido (tetróxido de ósmio a 1% + ferricianeto de potássio 1,5%) por 30 minutos. As amostras foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1M uma vez por 10 minutos e mais 2 vezes com água destilada por 5 minutos. O material seguiu então para a etapa de contrastação primária, com acetato de uranila 2% em cuja solução permaneceu a 4°C, *overnight*.

A seguir, as células foram lavadas com água destilada e passaram pelo processo de desidratação em série crescente de etanol 70% e 90%, 10 minutos cada, seguidos de 2 banhos de 15 minutos em etanol 100%, e imersão rápida em óxido de propileno, por 2 vezes. Concluída esta etapa seguiu-se para a pré-inclusão em solução de óxido de propileno + resina epon na concentração de 1:1, por 1 hora em recipiente aberto e em resina epon pura, também por 1 hora e em recipiente aberto. As lamínulas então eram retiradas dos poços, cortadas com o auxílio de uma tesoura em fragmentos na dimensão máxima do diâmetro da tampa da cápsula BEEM[®], nas quais eram depositadas com a face contendo as células voltada para cima. O fundo da cápsula era cortado, a cápsula anexada a sua tampa e pela abertura do fundo acrescentava-se a resina em estado líquido, que polimerizava após 48hs, em estufa a 60°C, sobre as células aderidas na Thermanox[®], a qual era destacada após o endurecimento da resina.

Devido à espessura extremamente delgada da monocamada, os blocos de resina eram levados diretamente para o ultramicrótomo LEICA EM UC6 (LEICA Mikrosysteme), obtendo-se secções de 50nm de espessura. Após secção, os cortes foram postados em telas de cobre de 200 mesh e contrastados pelo citrato de chumbo por 5 minutos. As telas foram então analisadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão EM 10 ZEISS. Todo o processamento se repetiu para cada grupo delineado para cada doador.

2.9 Análise estatística

Os dados referentes à padronização do número mínimo de células a serem contadas e à taxa de infecção foram analisados no delineamento inteiramente casualizado. Devido à heterogeneidade da variância, a variável número mínimo de células a serem contadas (contagem de macrófagos) foi transformada pela equação: raiz (variável). As médias foram comparadas pelos testes de Fisher e t-student para as variáveis número de células e taxa de infecção, respectivamente.

Para as variáveis quantidade de corpúsculos e diâmetro dos corpúsculos, o delineamento experimental foi em bloco ao acaso constituído por quatro tratamentos e cinco repetições para cada tratamento (sendo o doador a repetição). As médias foram comparadas pelo teste SNK.

Os dados foram analisados pelo programa Sisvar 5.0 e os gráficos utilizados plotados no programa GraphPad Prism 5.0.

RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 Análise dos corpúsculos lipídicos à microscopia de luz

Investigamos a ocorrência de organelas citoplasmáticas, os corpúsculos lipídicos (CLs) em macrófagos dos diferentes grupos experimentais: “somente macrófagos” (G1), “macrófagos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*”, (G2), “macrófagos submetidos ao medicamento benzonidazol” (G3) e “macrófagos infectados e tratados com a droga benzonidazol” (G4), através das técnicas de microscopia de luz: campo claro e fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão.

A ocorrência dos corpúsculos lipídicos foi inicialmente detectada através da microscopia de campo claro, utilizando-se a coloração com tetróxido de ósmio que se liga a lipídeos insaturados e a terminais fosfolipídicos, componentes dessas organelas. O produto desta reação exibiu os CLs como pontos negros individualizados no citoplasma dos macrófagos nos diferentes grupos (FIG. 12, A, B, C e D), a partir dos quais realizamos a quantificação e mensuração do diâmetro das organelas. Além da identificação pelo ósmio, os CLs foram exibidos através de análises à microscopia de fluorescência, que mostrou estas organelas através de sua marcação com a sonda BODIPY[®], um efetivo corante para regiões hidrofóbicas (FIG. 13 A, B, C e D). Esta técnica permitiu ainda a observação dos núcleos dos parasitos no interior dos macrófagos, comprovando a infecção (FIG. 13 B e D).

3.1.1 Quantificação dos corpúsculos lipídicos

Nas figuras 10 e 14 observamos os resultados da quantificação dos corpúsculos lipídicos nos diferentes grupos. O grupo somente macrófagos (G1), apresentou menor número de CLs quando comparados ao grupo macrófagos infectados (G2) e infectados e tratados com o benzonidazol (G4). Enquanto isto, este mesmo grupo, apresentou valores próximos aos dos macrófagos submetidos à droga, G3. Outro resultado relevante é a diferença significativa apresentada pelos macrófagos do G2, nos quais os CLs se mostraram em maior número quando comparados aos demais grupos. E finalmente, os macrófagos do G4, mostraram

uma sensível, mas significativa diminuição no número de CLs, quando comparado principalmente com o G2, de macrófagos infectados.

Todos os doadores	Grupos com os tratamentos			
	MΦ	MΦ Y	MΦ BZ	MΦ Y BZ
Média	84,23	220,4	85,56	190,6
Erro Padrão	10,97	15,61	12,71	15,30

Figura 10 – Média e erro padrão da quantificação dos corpúsculos lipídicos. Fonte: Dados da pesquisa.

3.1.2 Análise do diâmetro dos corpúsculos lipídicos

Durante a quantificação dos CLs, notou-se variação no tamanho destas organelas, o que levou à análise também do diâmetro dos corpúsculos lipídicos nos diferentes grupos (FIG.11). Na figura 15, observamos que os CLs do grupo somente macrófagos (G1) mostraram-se com diâmetro menor quando comparados ao grupo macrófagos infectados (G2) e macrófagos infectados e tratados com BZ (G4). Já este mesmo grupo não mostrou diferença significativa em relação ao grupo, macrófagos tratados com o fármaco (G3). Os grupos G2 e G4 não mostraram diferença significativa entre eles. Completando esta análise, verificou-se que os grupos G2, G3 e G4, não apresentaram diferença significativa entre eles, indicando que houve um aumento no diâmetro dos CLs nos grupos infectados e naqueles infectados e tratados com a droga.

Todos os doadores	Grupos com os tratamentos			
	MΦ	MΦ Y	MΦ BZ	MΦ Y BZ
Média	0,5907	0,7690	0,6693	0,8055
Erro Padrão	0,04783	0,04460	0,04118	0,03597

Figura 11 – Média e erro padrão do diâmetro dos corpúsculos lipídicos. Fonte: Dados da pesquisa.

3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Complementando as análises do presente trabalho, analisamos as características ultraestruturais dos macrófagos, com ênfase na morfologia dos corpúsculos lipídicos e possíveis interações com outras organelas dos mesmos grupos já citados.

Iniciamos nossa análise pela descrição da morfologia dos macrófagos do grupo G1 (FIG. 16). Estes mostraram superfície irregular, porém com poucos prolongamentos, citoplasma com poucas organelas e de dimensões reduzidas e núcleo heterocromático, características indicativas de um macrófago com pouca atividade metabólica. Além das características citadas registramos a ocorrência de corpúsculos lipídicos arredondados, variando entre borda regular e irregular, região central homogênea e região marginal com acentuada osmiofilia (FIG. 17).

Seguindo a análise, avaliamos o grupo de macrófagos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*, que foi encontrado na forma amastigota, não envolvida por vacúolo parasitóforo, no citoplasma destas células. (FIG. 18). Os macrófagos mostraram alterações bastante significativas percebidas pela abundância de prolongamentos na sua superfície, núcleo eucromático e riqueza de organelas como mitocôndrias e retículo endoplasmático liso. Além destas, identificamos corpúsculos lipídicos com sua característica região central amorfa e homogênea, bordas caracteristicamente mais osmiofílicas, superfície regular e diâmetro aparentemente maior quando comparado com o grupo controle (FIG. 19). Ainda sobre os corpúsculos lipídicos, detectamos diferentes eletrondensidades entre eles (FIG. 20), além de sua íntima associação com o retículo endoplasmático, o que corrobora com os modelos propostos da biogênese destas organelas (FIG. 21).

Concluindo nossas análises, avaliamos que macrófagos infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com a droga benzonidazol apresentam importantes características ultraestruturais que sinalizam ativação. Dentre elas indicamos além da detecção de um grande número de vesículas de retículo endoplasmático liso (FIG. 22), a associação dessas organelas com os corpúsculos lipídicos (FIG. 23). Igualmente ao grupo anterior (G2) foram identificadas formas amastigotas do parasito, no entanto, com eletrondensidade mais destacada, o que é sugestivo de degeneração celular (FIG. 24).

4 ILUSTRAÇÕES

Figura 12 – Corpúsculos lipídicos em macrófagos humanos corados com o tetróxido de ósmio e observados à microscopia de luz. Os corpúsculos lipídicos se apresentam como pontos escuros no citoplasma das células. A) somente macrófagos; B) macrófagos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*; C) macrófagos tratados com a droga benzonidazol; D) macrófagos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e tratados com a droga benzonidazol. Barra: 10µm. Fonte: Dados da pesquisa.

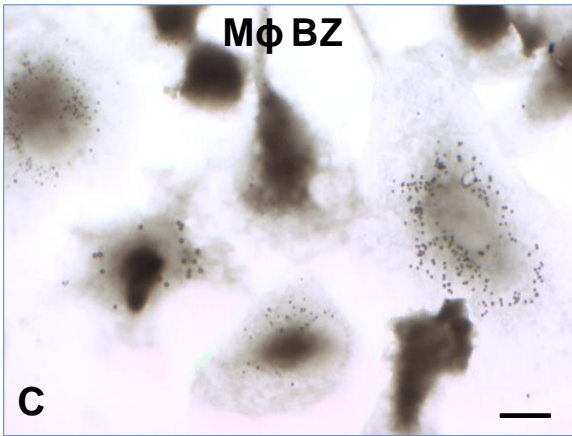
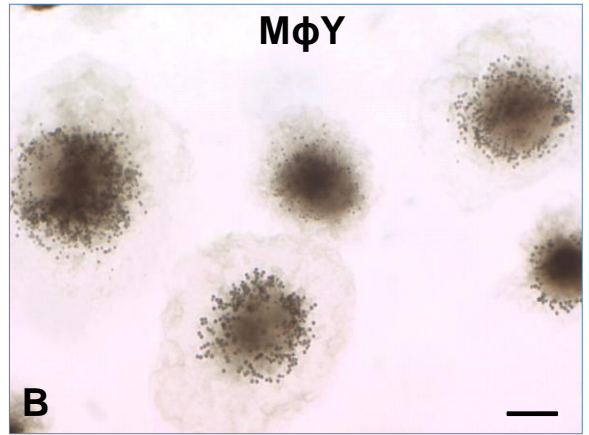
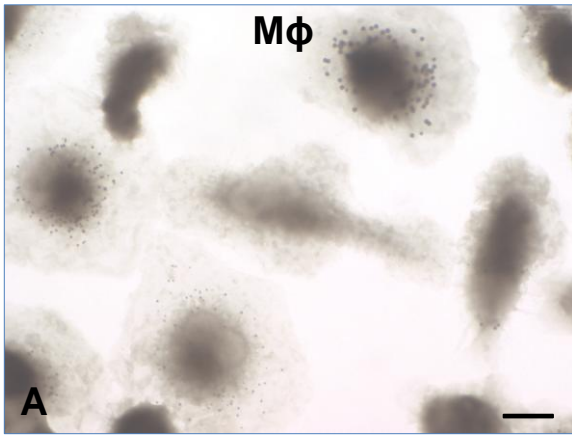


Figura 13 – Corpúsculos lipídicos em macrófagos humanos marcados pela sonda BODIPY® e observados à microscopia de fluorescência. As imagens mostram além dos corpúsculos lipídicos como pontos verdes brilhantes, os núcleos em azul, pelo DAPI. A) somente macrófagos; B) macrófagos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*; C) macrófagos associados com a droga benzonidazol; D) macrófagos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e tratados com a droga benzonidazol. B' e D') célula infectada em destaque. Cabeça de seta vermelha indicando a presença do parasito. Barra: 10µm. Fonte: Dados da pesquisa.

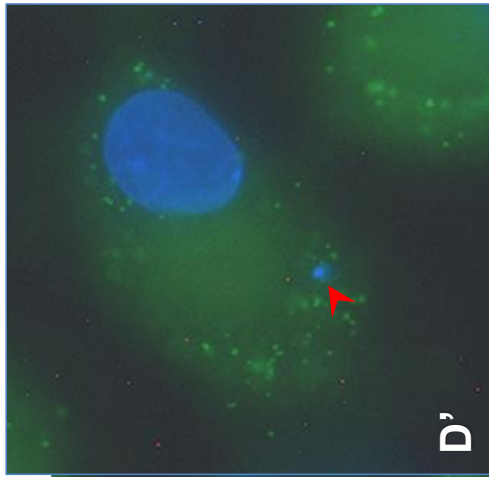
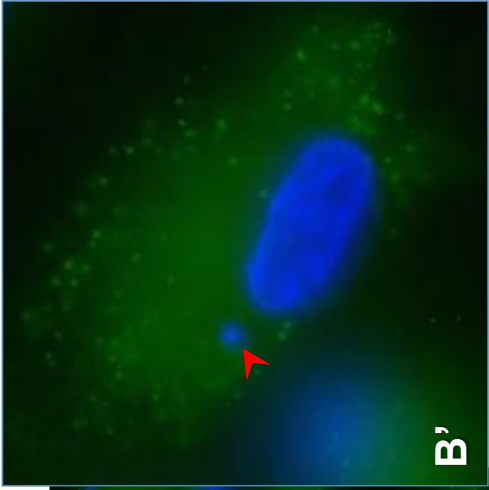
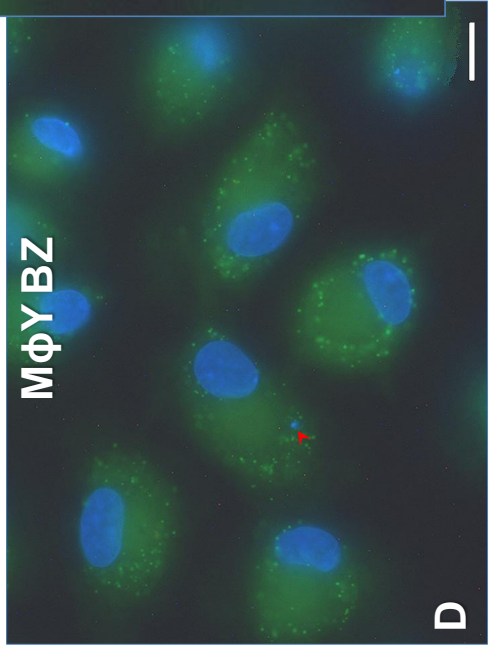
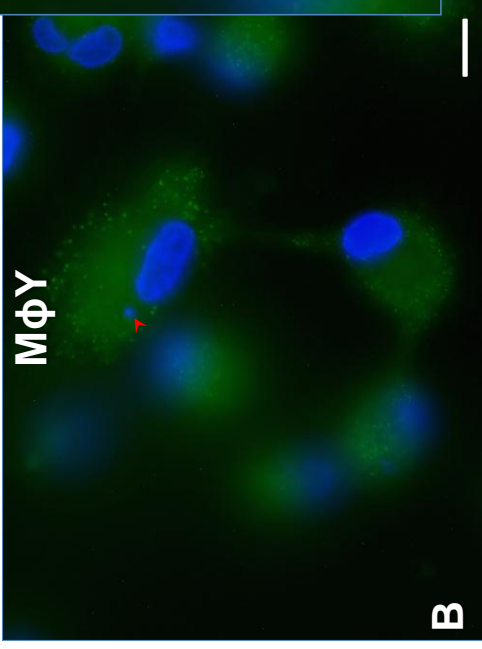
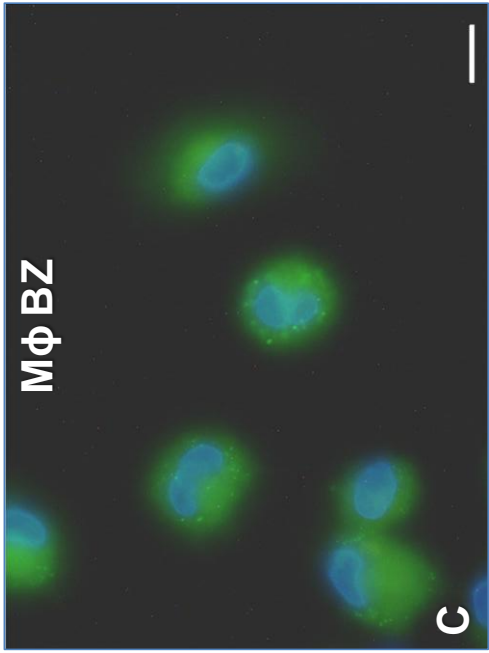
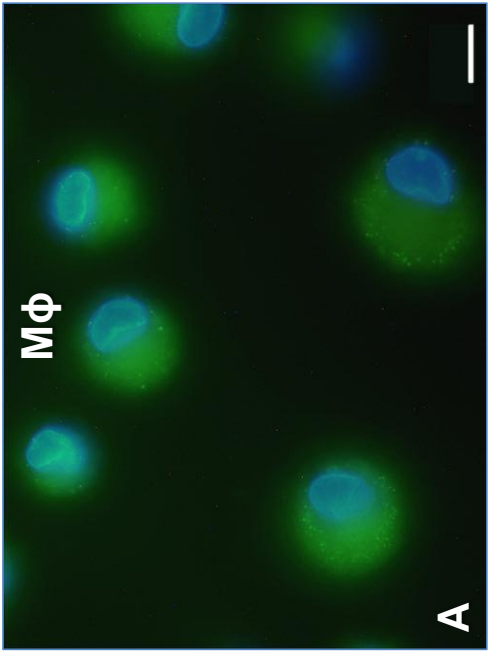


Figura 14 – Análise quantitativa dos corpúsculos lipídicos nos 4 grupos experimentais. Os corpúsculos foram quantificados através da microscopia de luz (objetiva 100X), após coloração com tetróxido de ósmio. Os resultados foram expressos em média \pm EPM. As letras indicam níveis de significância entre os grupos avaliados. $P < 0,05$. Fonte: Dados da pesquisa.

Análise quantitativa dos corpúsculos lipídicos em macrófagos humanos

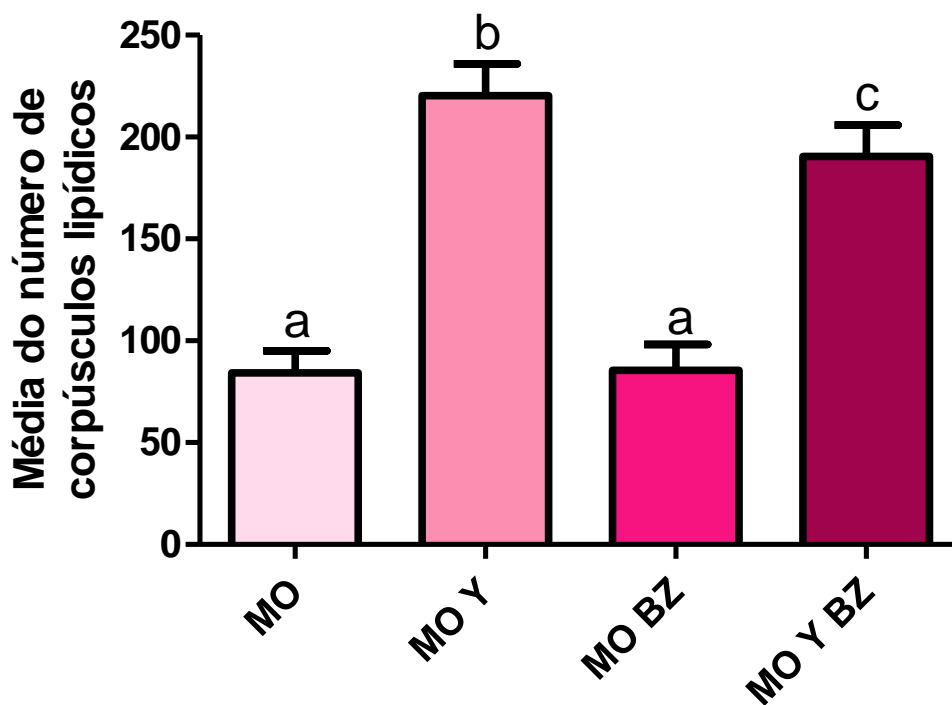


Figura 15 – Análise do diâmetro dos corpúsculos lipídicos nos 4 grupos experimentais. Os resultados foram expressos em média \pm EPM. As letras indicam níveis de significância entre os grupos avaliados. $P < 0.05$. Fonte: Dados da pesquisa.

Diâmetro dos corpúsculos lipídicos

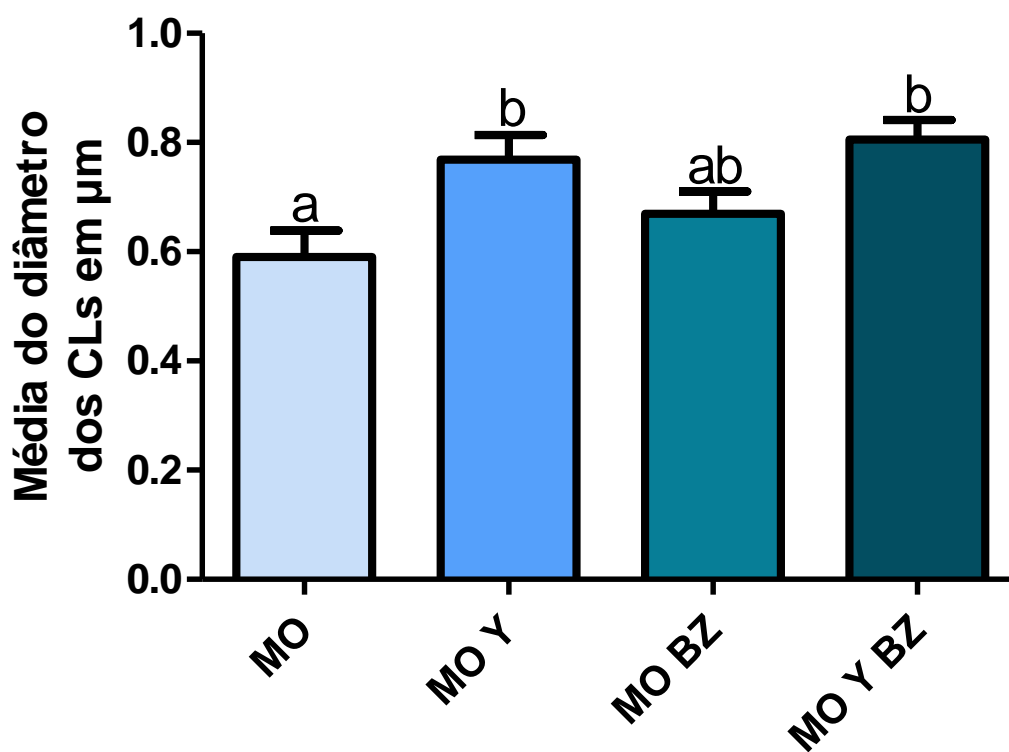


Figura 16 – Macrófago de *buffy coat* humano com sinais de pouca ativação. A) Célula com núcleo predominantemente heterocromático, superfície irregular; No detalhe (A') observa-se parte do citoplasma mostrando as organelas citoplasmáticas. Barra: 5 μm e 1 μm , respectivamente. Fonte: Dados da pesquisa.

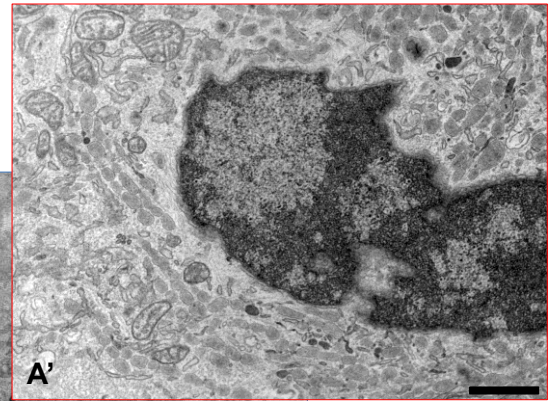
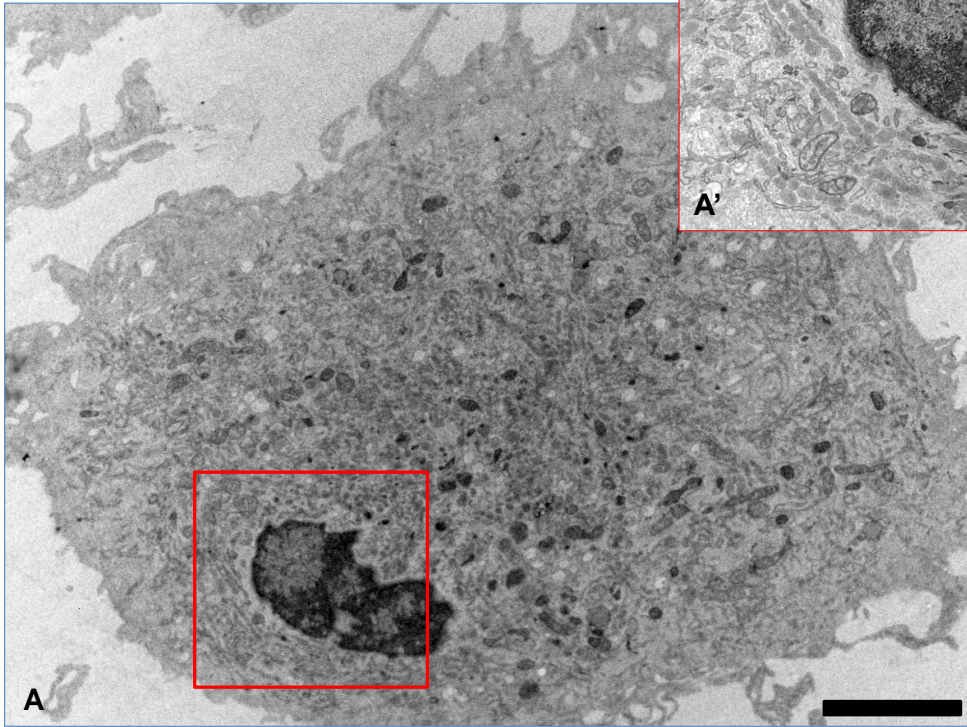
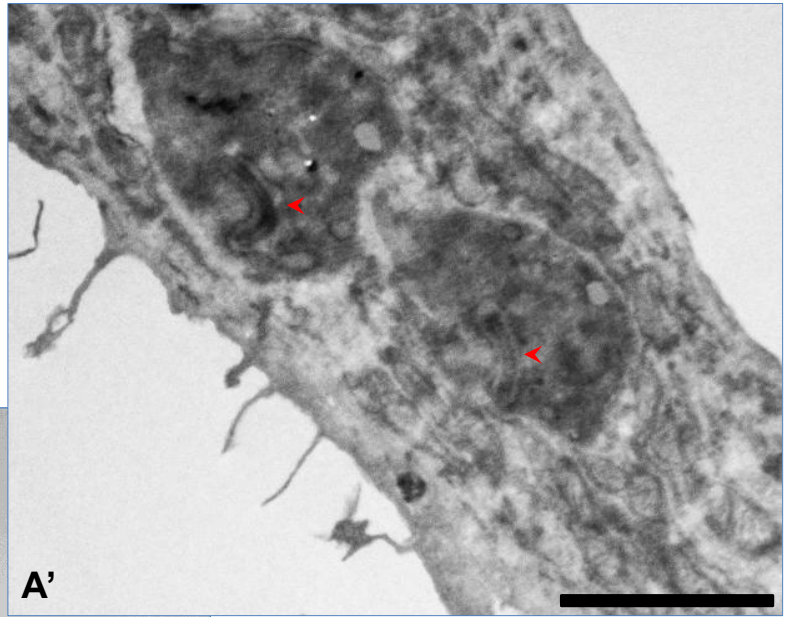
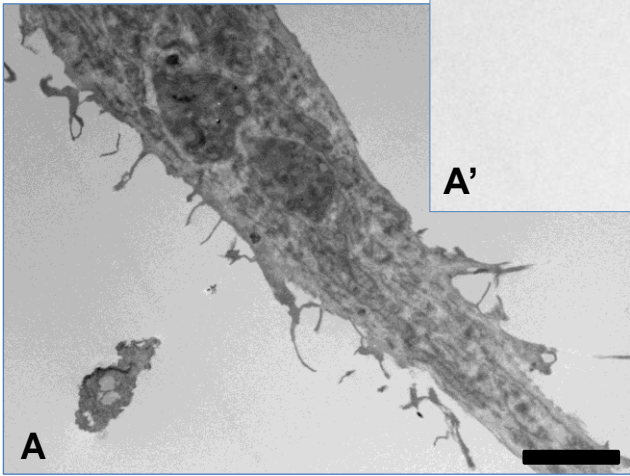




Figura 18 – Macrófago infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. A) Formas amastigotas do protozoário. No detalhe (A') observa-se o cinetoplasto (cabeça de seta). Barra: 2 μm para A e A'.
Fonte: Dados da pesquisa.



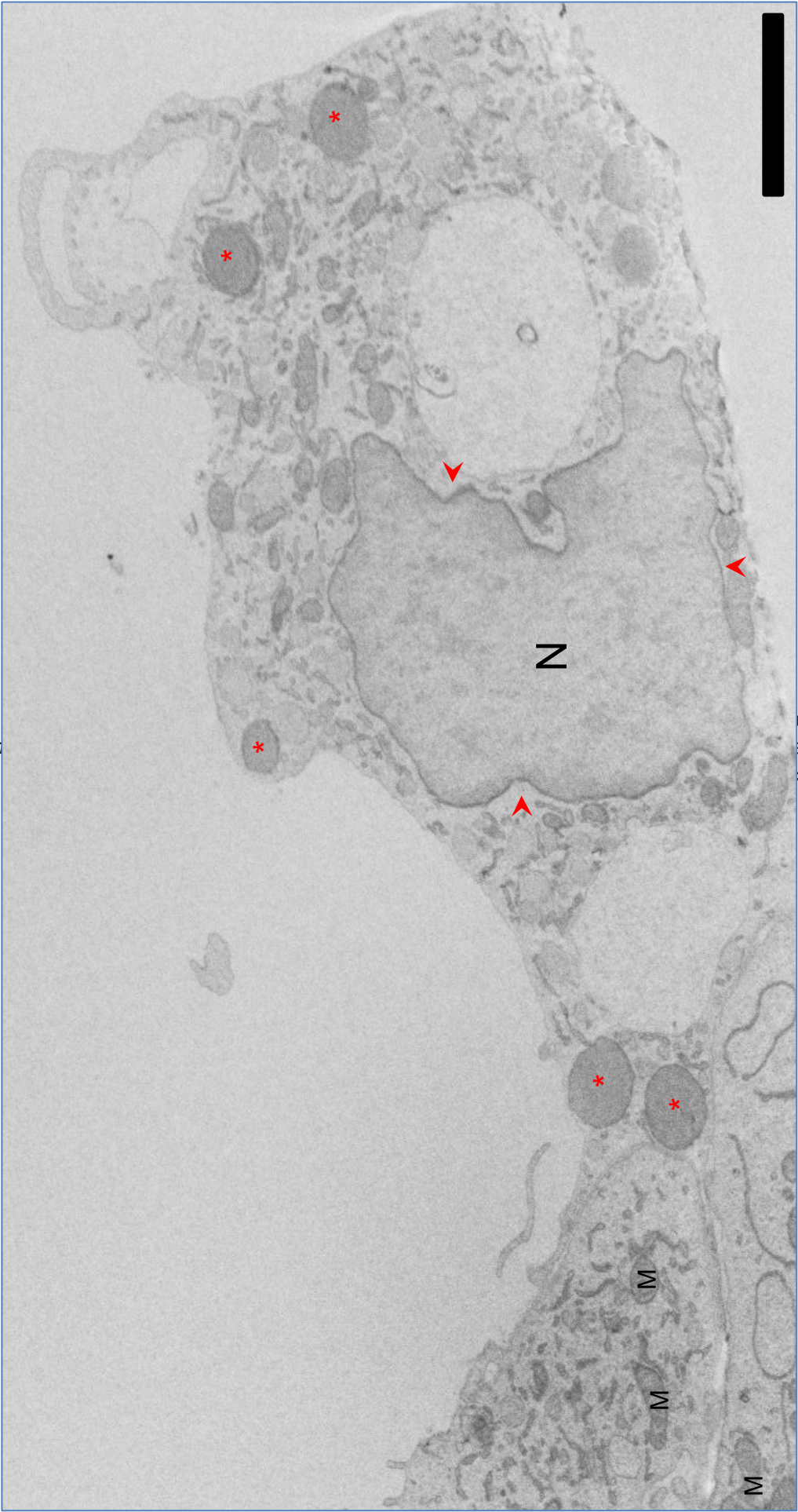


Figura
Trypan
setas),
Barras:

Y do
eça de
os (*).

Figura 20 – Macrófago pertencente ao grupo infectado com a cepa Y do *T. cruzi*, Numerosas vesículas (cabeças de seta) são observadas, cisternas de retículo endoplasmático (setas), mitocôndrias (M), além dos corpúsculos lipídicos em diferentes eletrondensidades (*). Barra: 500 nm. Fonte: Dados da pesquisa

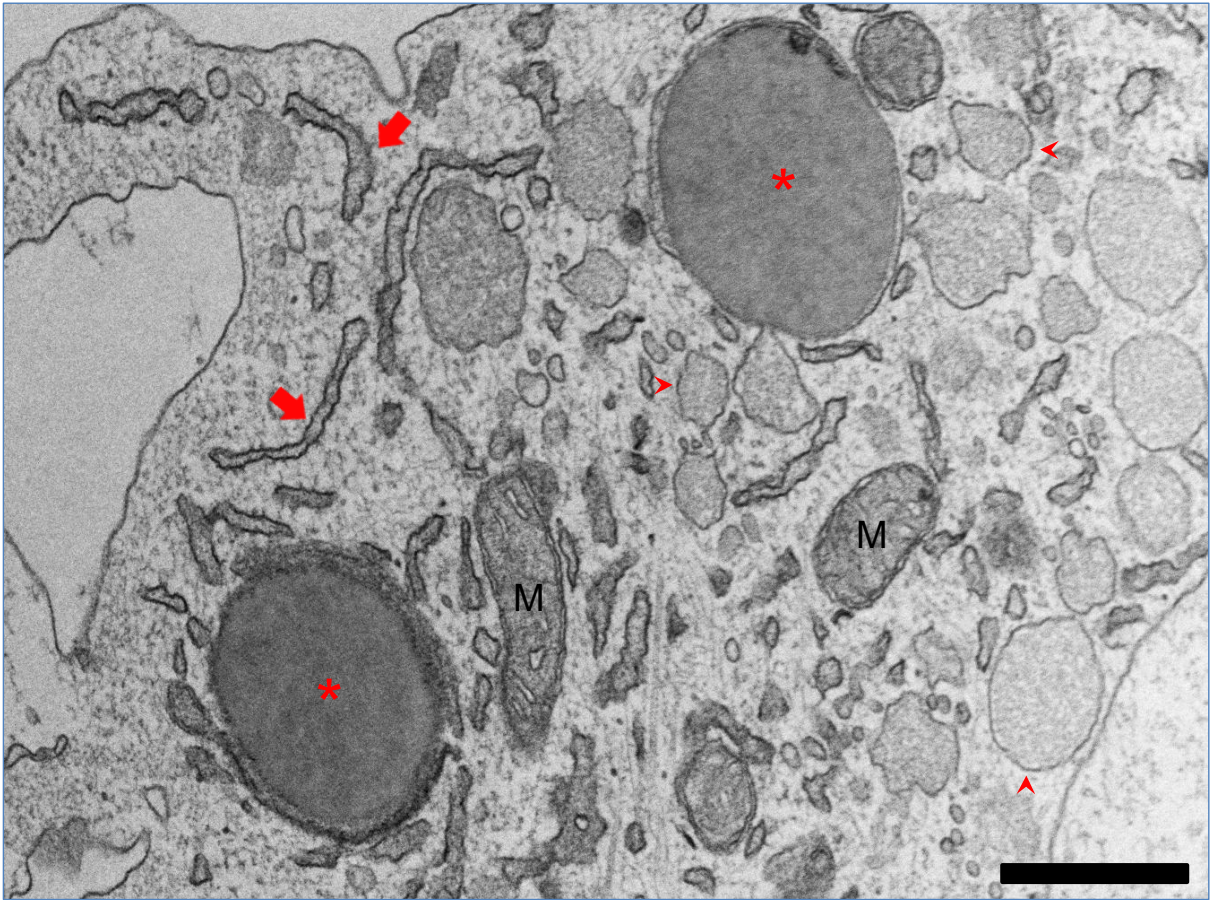


Figura 21 – Detalhe do corpúsculo lipídico (*) em íntima associação com uma cisterna do retículo endoplasmático liso, em macrófago infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* (cabeça de seta). Barra: 200 nm. Fonte: Dados da pesquisa.

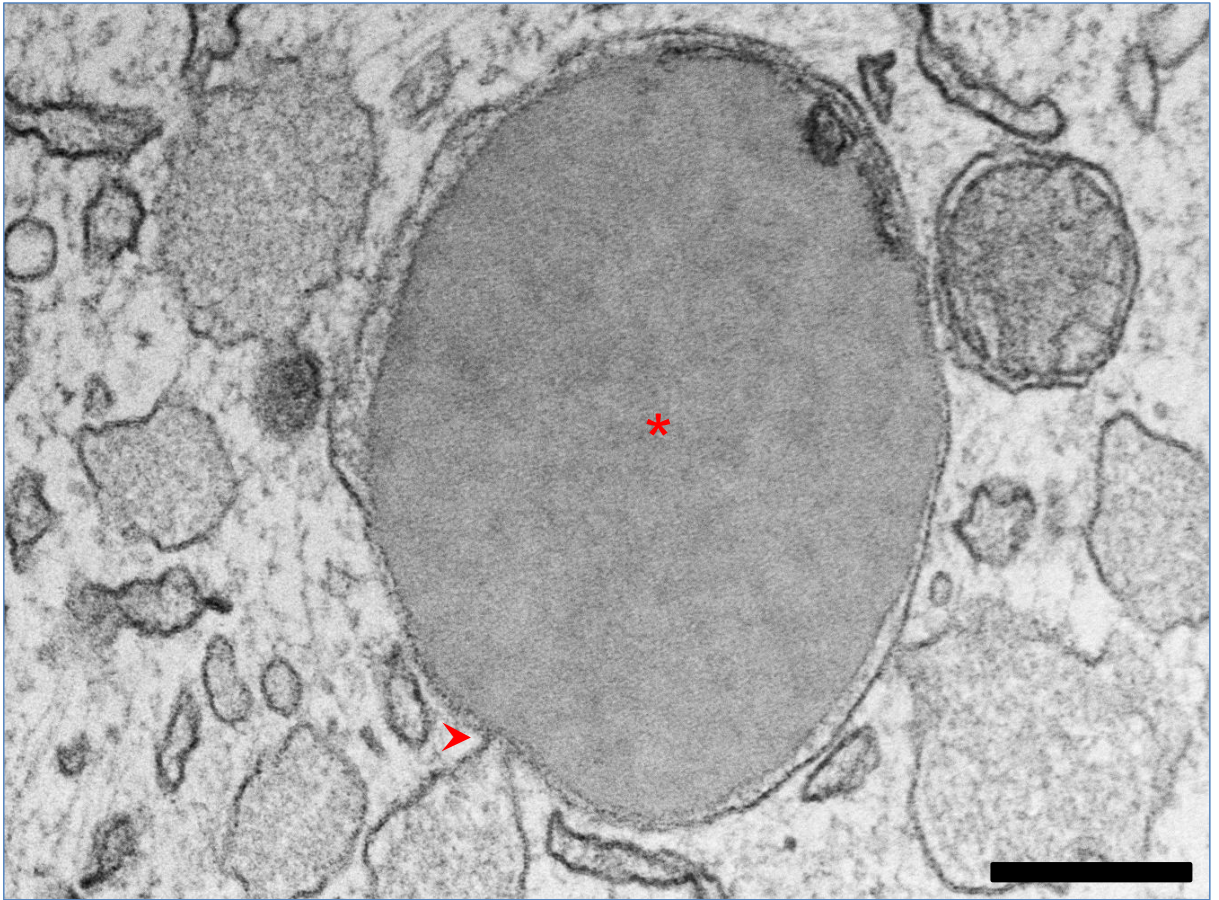


Figura 22 – Macrófago que pertence ao grupo infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratado com o benzonidazol. A eletromicrografia mostra sinais de ativação, seja pela presença de vesículas de brotamento no complexo de Golgi (G) como pela riqueza de vesículas de retículo endoplasmático liso (estrelas). Barra: 1 um. Fonte: Dados da pesquisa.

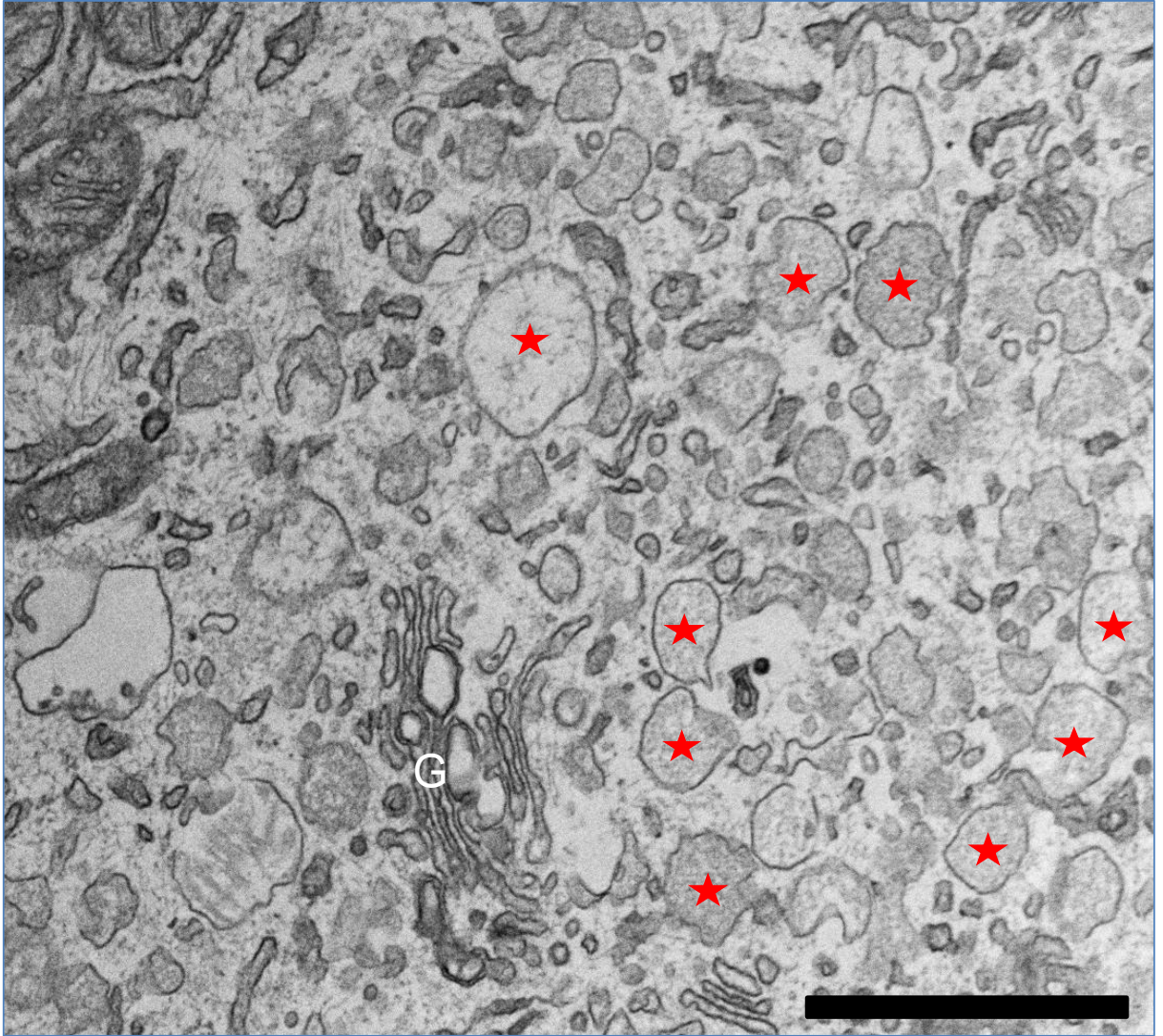


Figura 23 – Macrófago pertencente ao grupo infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratado com o benzonidazol. A eletromicrografia mostra um corpúsculo lipídico (*) próximo à cisterna do retículo liso (cabeça de seta). Barra: 200 nm. Dados da pesquisa.

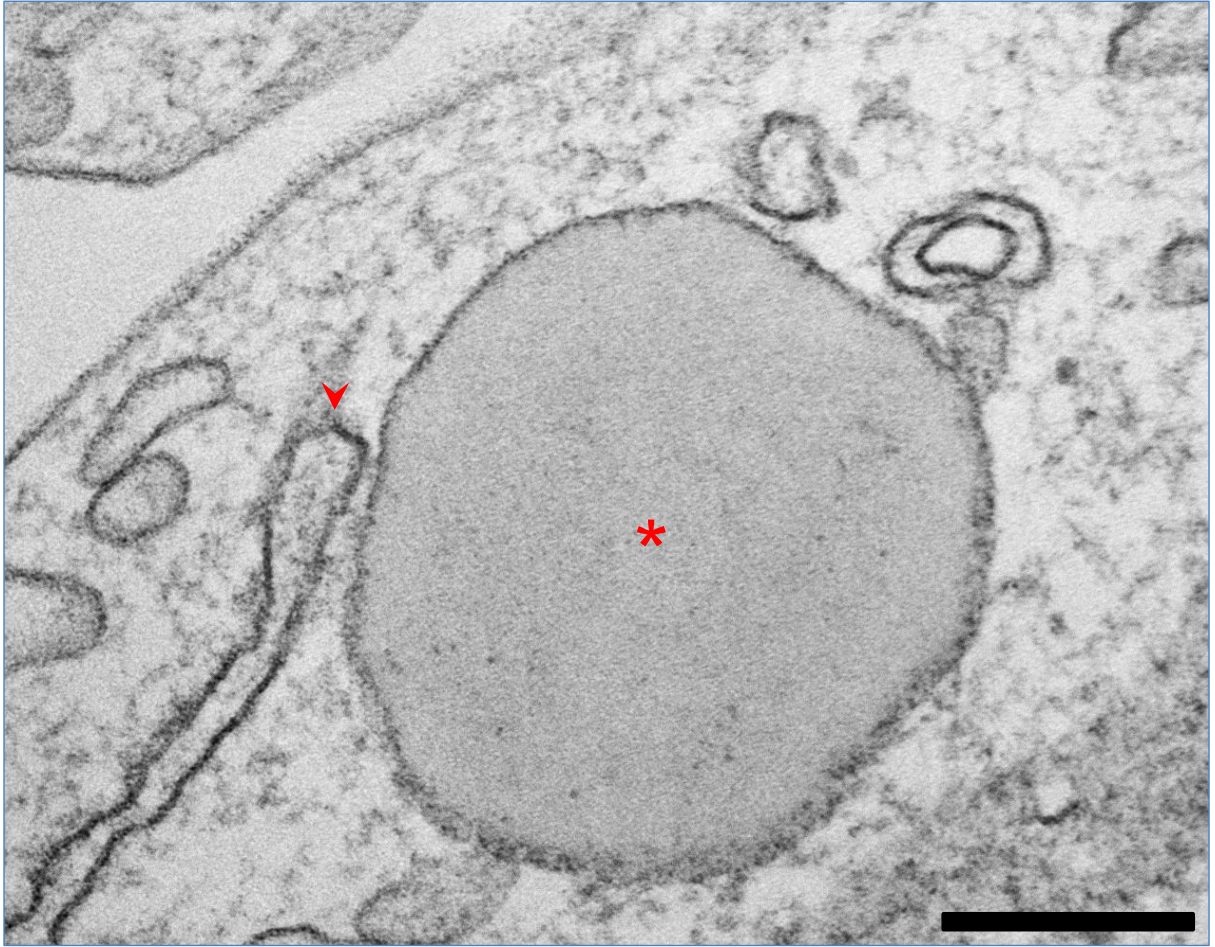
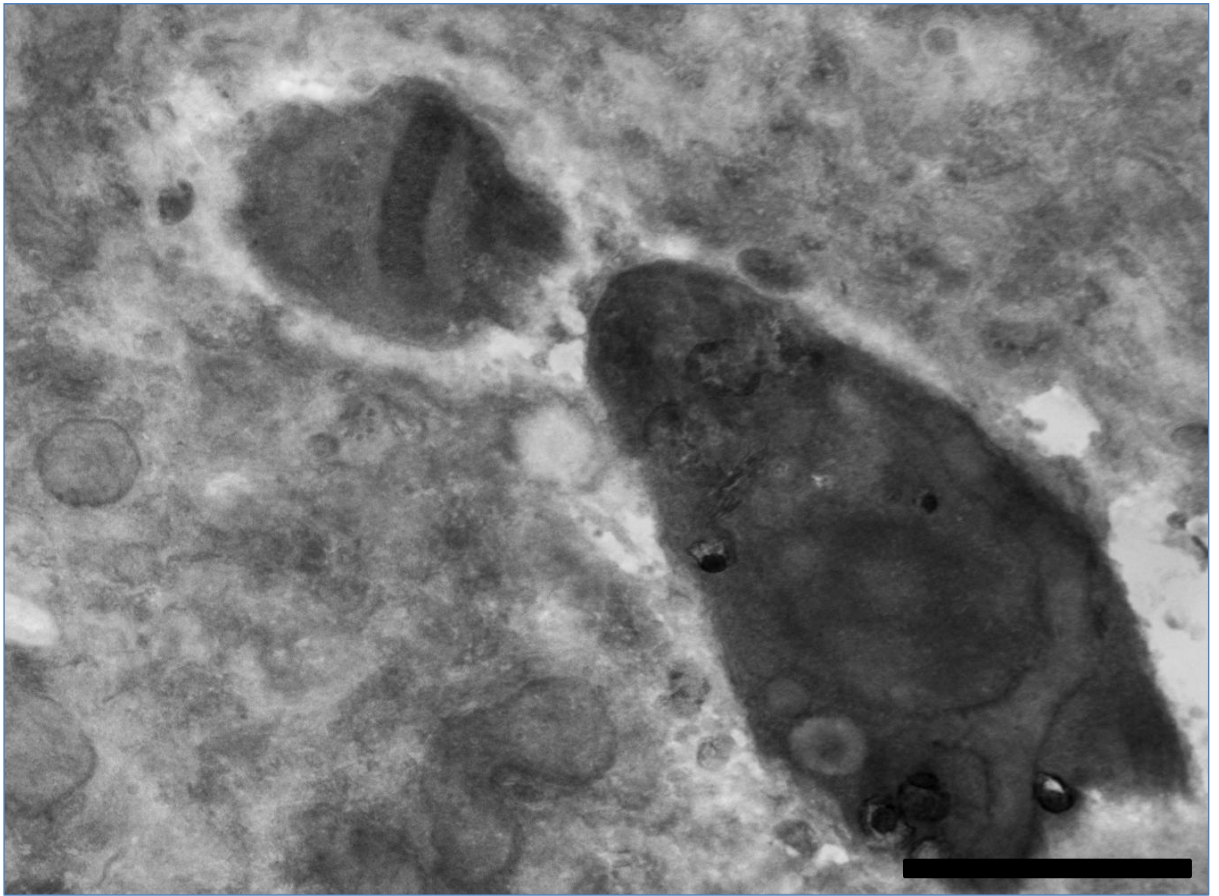


Figura 24 – Formas amastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* observada em macrófago após o tratamento com o fármaco benzonidazol. Observa-se que os amastigotas mostram-se bastante eletrodensos, o que pode indicar degeneração celular. Barra: 1 µm. Fonte: Dados da pesquisa.



5 DISCUSSÃO

Os corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas celulares dinâmicas, arredondadas, armazenadoras de mediadores inflamatórios, os eicosanóides; lipídeos e algumas proteínas. Já se sabe que estas organelas são onipresentes na maioria das células eucarióticas (MELO et al., 2011a) e se acumulam em neoplasias, infecções experimentais e clínicas, obesidade, câncer e doenças inflamatórias (BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009, MELO; DVORAK, 2012). Os CLs estão envolvidos também em várias funções, como o metabolismo de lipídeos, sinalização celular e inflamação (MELO et al., 2011a). O estudo destas organelas tem sido desenvolvido tanto *in vivo* como *in vitro*, por exemplo, pelo isolamento de células de ratos e camundongos.

O nosso trabalho, de forma inédita, demonstra a resposta de macrófagos humanos diferenciados *in vitro* infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e tratados com a droga benzonidazol, com relação à quantificação, diâmetro e características ultraestruturais dos CLs.

É conhecido que macrófagos peritoniais de ratos infectados com a cepa Y, cepa virulenta, do *T. cruzi*, tiveram um aumento significativo no número de CLs dispersos no citoplasma (MELO et al., 2003).

Neste trabalho, quantificamos os CLs em macrófagos humanos sob diferentes condições, estabelecendo 4 grupos experimentais: grupo 1, somente macrófagos; grupo 2, macrófagos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*; grupo 3, macrófagos mais o medicamento benzonidazol e o último grupo, 4, macrófagos previamente infectados com a cepa Y e tratados com BZ. Os grupos 1 e 3 apresentaram um número semelhante de CLs, demonstrando que a quantidade de droga usada, 1 μ M, não levou a formação de novos CLs. Também, avaliando-se as outras organelas celulares, embora não tenhamos realizado uma quantificação, não observaram-se diferenças aparentes. Quando se comparou o grupo 2 com 1 e 3, um maior número

significante de CLs foram encontrados no grupo onde houve somente a infecção com o *T. cruzi*, corroborando com os dados demonstrados por MELO e colaboradores (2003) de que macrófagos peritoniais de ratos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, tiveram um aumento significativo no número de CLs dispersos no citoplasma, e também pelos dados encontrados por Bozza, Melo e Bandeira-Melo (2007), de que os leucócitos apresentam uma pequena quantidade de CLs, mas quando estimulados formam rapidamente novos corpúsculos lipídicos. Assim, observa-se que o processo de infecção leva, possivelmente, a uma ativação celular que desencadeia o aumento dos corpúsculos lipídicos. De fato, trabalhos de nosso grupo já demonstraram que monócitos humanos provenientes de indivíduos não infectados, a exemplo de nosso estudo, quando infectados com *T. cruzi* da cepa Y tornam-se ativados; essa ativação foi verificada por diversos parâmetros: (1) variação na expressão de ligantes de moléculas co-estimulatórias, (2) variação na expressão de citocinas, sobretudo IL-12 que é uma citocina associada à ativação de macrófagos e (3) variação na intensidade de expressão de moléculas associadas à apresentação de antígenos (SOUZA et al., 2004). Além disso, o grupo 4 também teve um aumento significativo no número de CLs em comparação com os grupos 1 e 3. Estes resultados demonstram que de fato a infecção com a cepa Y em macrófagos humanos levou a formação de um maior número de CLs, e que este efeito não foi causado devido à ação da droga. Um resultado interessante foi obtido quando se comparou o grupo 2 com o grupo 4: houve uma diminuição significativa no número de CLs nos macrófagos do grupo 4. O benzonidazol, age em eliminar o parasito, já que este é parcialmente deficiente em mecanismos de detoxicação dos radicais livres que são formados por causa do benzonidazol (COURA; CASTRO, 2002). Assim, podemos sugerir que com a ação da droga, a célula não precisaria responder com a mesma produção de mediadores inflamatórios (armazenados dentro dos CLs) como nas células apenas infectadas para poder combater ao parasito, justificando o menor número de CLs, ou ainda, que a presença do benzonidazol impediu a formação de novos corpúsculos, já que estes provavelmente são oriundos do retículo endoplasmático. Alternativamente, esta diminuição nos CLs poderia ser relacionada a outro mecanismo de ação da droga que levaria a um controle concomitante da resposta inflamatória. Ao mesmo tempo que eliminaria o parasito, contribuiria para o controle de possível lesão tecidual no hospedeiro.

D'Avila e colaboradores (2011) descreveram um aumento no número de CLs não somente em macrófagos de camundongos com parasitos internalizados, mas também em células não parasitadas presentes na mesma cultura que recebeu os parasitos. Os resultados apontados no presente trabalho de certa forma coincidem com aqueles mostrados pelo autores citados, já que a maioria dos macrófagos presentes nas culturas infectadas mostravam grande quantidade de CLs.

Realizamos também análise quanto ao tamanho dos corpúsculos lipídicos. Verificamos que houve variação no diâmetro dos CLs para cada grupo testado quando analisados todos os doadores em conjunto. Os grupos 2 e 4 apresentaram maior tamanho com significância quando comparados ao grupo 1, onde só existem macrófagos. Este dado confirma o que Melo e Dvorak (2012) descreveram, de que a interação com a forma tripomastigota do *T. cruzi*, além de induzir um aumento na quantidade de CLs em macrófagos de rato, como já citado, foi capaz também de aumentar o diâmetro dos CLs e levar a alterações ultraestruturais nestas organelas.

Por último, analisamos as características ultraestruturais das células nos diferentes grupos experimentais, a fim de conhecer mais detalhes da atuação da infecção e tratamento com benzonidazol nos macrófagos humanos.

Neste estudo, a presença dos CLs foi identificada nos macrófagos de todos os grupos experimentais, o que era esperado, visto que estas organelas são encontradas na maioria das células, como já citado. A identificação destas organelas se deu através de sua característica de apresentar uma monocamada externa de fosfolipídios, ao contrário da estrutura trilaminar de membrana clássica, como demonstrado por Dvorak (1991) à microscopia eletrônica de transmissão.

Os corpúsculos lipídicos possuem também outro aspecto intrigante com relação a sua osmiofilia. Tais organelas podem ser identificadas como eletrolúcidas, eletrodensas e fortemente eletrodensas, baseado em sua osmiofilia. Estas características foram observadas dentro de macrófagos inflamatórios de origens diversas (MELO et al., 2006). Nas eletromicrografias obtidas do nosso material, observou-se sutil diferença de eletrodensidade entre corpúsculos de um mesmo grupo, sendo este o grupo macrófagos infectados. No entanto, esta característica não foi observada para o grupo macrófagos infectados e tratados com o benzonidazol. Sugere-se que este resultado esteja relacionado com a resposta inflamatória de cada um dos grupos mencionados acima, já que se conhece que

diferenças osmiofílicas dos CLs podem mudar durante as repostas inflamatórias e estão intimamente relacionadas com o tipo celular onde se encontram (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007). Estas diferenças refletem em modificações na composição lipídica, estágios de formação de novos corpúsculos lipídicos, mobilização e/ou a razão de lipídeos neutros por fosfolipídios dentro dos CLs, além de destacá-los como organelas dinâmicas, sendo capazes de mudar sua estrutura de acordo com a ativação das células (MELO et al., 2006, BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007).

Além disso, os CLs encontrados nos macrófagos ativados podem ser visualizados como organelas heterogêneas, com áreas claras, granulares e/ou com estruturas membranosas internas (MELO et al., 2006), ao contrário do que verificamos em nosso material.

Estudos proteômicos e ultraestruturais mostram que os CLs possuem membrana similar a do retículo endoplasmático e também proteínas luminais, sugerindo um modelo que envolve membranas do retículo e domínios que formam os corpúsculos lipídicos. (WAN et al., 2007). Isso pode explicar a associação observada entre os CLs e o retículo endoplasmático encontrado nas eletromicrografias. O grupo macrófagos infectados apresentaram CLs intimamente associados com o retículo endoplasmático liso. Notou-se também certa proximidade das organelas armazenadoras dos eicosanóides com o retículo liso, no grupo macrófagos infectados mais a droga.

Os macrófagos, quando ativados, exibem um significativo aumento em suas organelas, principalmente o complexo de Golgi, retículo endoplasmático rugoso, polissomos, lisossomos e vesículas, aumento nas projeções de superfície, pseudópodes e núcleo mais eucromático, com contornos irregulares (MELO, 2009), o que está de acordo com o observado no grupo macrófagos infectados, sugerindo ativação destas células perante a infecção.

Na análise ultraestrutural do grupo macrófago infectado, a infecção foi evidenciada pela presença de amastigotas livres, que se apresentavam mais osmiofílicas no citoplasma da célula, evidencia da tentativa de eliminar o parasito. É conhecido que, após 2 horas de infecção, ocorre a fragmentação do vacúolo parasitóforo (SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010) fato que pode justificar a

ausência deste envolvendo as formas amastigotas, já que as células foram fixadas 16 horas após a infecção.

No grupo macrófago infectado e tratado com benzonidazol, observou-se grande quantidade de vesículas do retículo endoplasmático liso. Também foram observadas as formas amastigotas do parasito, porém estas apresentaram sinal de comprometimento celular, mais escuras e com organelas pouco evidentes, indicando a efetiva ação da droga benzonidazol em eliminar os parasitos intracelulares.

Considerando-se as funções desempenhadas pelos CLs na resposta inflamatória, estes resultados indicam que estas organelas podem desempenhar um papel fundamental na interação macrófago-parasito na infecção humana. De forma importante, estes resultados abrem perspectivas para estudos futuros no sentido de avaliar o envolvimento dos CLs no processo de eliminação do parasito. Esta pode ser considerada uma estratégia de tratamento e estudo de mecanismos de ação de novas drogas. Além disso, o esclarecimento do papel das diferentes categorias de CLs nas funções celulares durante a infecção com *T. cruzi* poderá trazer importantes informações sobre a biologia dessas organelas e seu papel na interação *T. cruzi*-macrófago.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os corpúsculos lipídicos, organelas consideradas como marcadoras estruturais do processo inflamatório presentes nos macrófagos, apresentaram diferença com relação ao número e diâmetro entre os grupos testados. Monócitos obtidos de *buffy coats* após diferenciação em macrófagos apresentaram os corpúsculos lipídicos em menor quantidade e diâmetro quando comparados aos demais grupos testados. Macrófagos infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, apresentaram aumento significativo no número e no diâmetro dos corpúsculos lipídicos. Já os macrófagos infectados e tratados com a droga benzonidazol apresentaram um menor número de corpúsculos lipídicos, embora tenham mantido um diâmetro semelhante aos das células infectadas. As células tratadas com a droga também apresentaram presença abundante da organela retículo endoplasmático, já que esta organela é responsável pela degradação de medicamentos.

Além disto, os CLs mostraram, através da análise ultraestrutural, diferença em sua osmiofilia, bordas ligeiramente irregulares e intensamente osmiofílicas. Embora não quantificado através da microscopia eletrônica de transmissão, observou-se um maior número destas organelas, confirmando as análises quantificadas através da microscopia de luz.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALBERTTI, L. A. G. et al. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 784-789, 2010.

ALMEIDA, Patrícia E. et al. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin infection Induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor γ expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. **The Journal of Immunology**. v. 183, p. 1337-1345, 2009.

ANDRADE, Luciana O.; ANDREWS, Norma W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology**, 2005.

ARGOLO, Ana Maria et al. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio: Fundação Oswaldo Cruz: Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, 2008.

BECERRA, M. C. et al. *In vitro* activity of *N*-benzenesulfonylbenzotriazole on *Trypanosoma cruzi* epimastigote and trypomastigote forms. **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 57-62, 2012.

BENZONIDAZOL. **Wikipédia**. Disponível em:
<<http://pt.wikipedia.org/wiki/Benzonidazol>> Acesso em: 20 nov. 2012.

BILAC, Olavo. Deus. **Poesias infantis**.

BOZZA, Patricia T.; MAGALHÃES, Kelly G.; WELLER, Peter F. Leukocyte lipid bodies – biogenesis and functions in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 540-551, 2009.

BOZZA, Patricia T.; MELO, Rossana C. N.; BANDEIRA-MELO, Christianne. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, p. 30-49, 2007.

BROWN, D.A. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. **Curr. Biol.**, v. 11, p. 446–449, 2001.

CARDOSO, Carlos Alfredo Franco et al. Conversações ente Charles Darwin e Carlos Chagas: a infecção por *Trypanosoma cruzi* sob uma perspectiva ecoevolutiva e pedagógica. **Cad. Saúde Colet.**, Rio de Janeiro, v. 17 (4), p. 811-825, 2009.

COURA, José Rodrigues; CASTRO, Solange L. de. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

D'AVILA, Heloisa 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. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, p. 951-961, 2011.

D'AVILA, Heloissa; TOLEDO, Daniel A. M.; MELO, Rossana, C. N. Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-*Trypanosoma cruzi* interplay during innate immune responses. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, 2012.

DIAS, Luiz C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v.32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DVORAK, Ann M. Biochemical contents of granules and lipid bodies – two distinctive organelles found in basophils and mast cells. In: DVORAK, Ann M. **Blood cell biochemistry: basophil and mast cell degranulation and recovery**. New York: Plenum Press, 1991. V. 2. Cap. 3, p. 27-66.

FABRINO, Daniela L. et al. Rat models to investigate host macrophage defense against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Innate Immunity**, v. 3, p. 71-82, 2011.

GEISSMANN, Frederic et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, p. 656-661, 2010.

HICKENBOTTOM, Sabrina J. et al. Structure of a lipid droplet protein: the PAT family member TIP47. **Structure**, v. 12, p. 1199-1207, 2004.

HISEP™. 2010. Disponível em: < <http://www.himedia.cz/produkty/lymfo> > Acesso em: 25 nov. 2012.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p.

KIMMEL, Alan R. et al. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. **Journal of Lipid Research**, v. 51, p. 468-471, 2010.

KOH, Carolina Cattoni. **Avaliação do uso da N-acetilcisteína como adjuvante no tratamento com benzonidazol na infecção de sangue de indivíduos não infectados, in vitro, por Trypanosoma cruzi**. 2011. 53f. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte.

LANA, Marta de; TAFURI, Washington Luiz. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. In: NEVES, David Pereira (Ed.) et al. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2005. Cap. 11.

LUQUETTI, Alejandro O.; RASSI Anis. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Zigman; ANDRADE, Zilton A.; BARRAL-NETO, Manoel. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 17, p. 344-368.

MARTIN, S.; PARTON, R.G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 7, p. 373–378, 2006.

MEJIA, Ana Maria et al. Benzimidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. **The Journal of Infectious Disease**, p. 206-220, 2012.

MELO, Rossana C. N.; MACHADO Conceição R. S. *Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. **Experimental Parasitology**, v. 97, p. 15-23, 2001.

MELO, R. C. N. et al. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. **Tissue & Cell**, v. 35, p. 59-67, 2003.

MELO, R. C. N. et al. Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. **Inflammation Research**, v. 55, n. 8, p. 342-348, 2006.

MELO, Rossana C. N. Acute heart inflammation: ultrastructural and functional aspects of macrophages elicited by *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 13, n. 2, p. 279-294, 2009.

MELO, Rossana C. N. et al. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 540-556, 2011a.

MELO, Rossana C. N. et al. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. In: MELO, Rossana C. N. (Ed.); CHIARINI-GARCIA, Hélio (Ed.). **Light microscopy: methods and protocols**. New York: Humana Press, 2011b. Cap. 9, p. 149-161.

MELO, Rossana C. N.; DVORAK, Ann M. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy?. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 7, 2012.

MOLECULAR PROBES. Bodipy lipid probes. **Product information**, 2003.

MURPHY, Denis J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 5, p. 325-438, 2001.

MURRAY, Peter J.; WYNN, Thomas A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 723-738, 2011.

ROBBINS, Clinton S.; SWIRSKI, Filip K. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 2685-2693, 2010.

ROBENEK, M. J. et al. Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. **FASEB J.**, v. 18, p. 866–868, 2004.

ROBENEK, H. et al. Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. **J. Cell. Sci.**, v. 119, p. 4215–4224, 2006.

SALOMON, Claudio J. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 101, n. 3, p. 888-894, 2012.

SANTOS, Sara Lopes dos. **Análise proteômica da forma tripomastigota de uma população de *Trypanosoma cruzi* susceptível e outra resistente ao benzonidazol**. 2008. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou, Belo Horizonte.

SOUZA, Wanderley de. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Zigman; ANDRADE, Zilton A.; BARRAL-NETO, Manoel. ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 7, p. 88-126.

SOUZA, Paulo E. A. et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5283-5291, 2004.

SOUZA, Paulo E. A. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, p. 1886-1894, 2007.

SOUZA, Wanderley de; CARVALHO, Tecia Maria Ulisses de; BARRIAS, Emile Santos. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.

TACKE, Frank; RANDOLPH, Gwendalyn J. Migratory fate and differentiation of blood monocytes subsets. **Immunobiology**, v. 211, p. 69-618, 2006.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Chagas disease. **Postgrad Med**, v. 82, p. 788-798, 2006.

TESTON, Ana P. M. et al. *In vivo* susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. **Tropical Medicine and International Health**, 2012.

THERMANOX COVERSLEIPS. Technical data sheets. **Electron Microscopy Sciences**, 2011.

VINHAES, Márcio C.; DIAS, João Carlos Pinto. Doenças de Chagas no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16 (Sup. 2), p. 7-12, 2000.

WAN, H. C. et al. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. **FASEB Journal**, v. 21, n. 1, p. 167-178, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>>. Acesso em: 15 fev. 2012.