

INDUÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS POR
SORO DE CAMUNDONGO E SEUS EFEITOS NA INFECÇÃO
PELO *Toxoplasma gondii*

LAURA AZEREDO MIRANDA MOTA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RIO DE JANEIRO
SETEMBRO 2014

INDUÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS POR
SORO DE CAMUNDONGO E SEUS EFEITOS NA INFECÇÃO
PELO *Toxoplasma gondii*

LAURA AZEREDO MIRANDA MOTA

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como requisito das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia”.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RIO DE JANEIRO
SETEMBRO DE 2014

INDUÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS POR
SORO DE CAMUNDONGO E SEUS EFEITOS NA INFECÇÃO
PELO *Toxoplasma gondii*

LAURA AZEREDO MIRANDA MOTA

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como requisito das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia”.

Aprovada em 30 de Setembro de 2014.

Comissão Examinadora:

Prof.^a Mariana Caldas Waghbi (Dra. em Biologia Celular Parasitária) - FIOCRUZ

Prof.^a Antônia Elenir Amâncio Oliveira (Dr.^a em Ciência) - UENF

Prof.^a Andréa Cristina Veto Arnholdt (Dr.^a em Ciência) - UENF

Prof. Renato Augusto DaMatta (Dr. em Ciência) – UENF
(Orientador)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, no Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro sob a orientação do Professor Doutor Renato Augusto DaMatta.

Apoio Financeiro:

- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico(CNPq);
- Fundação de Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

I Crônicas 29: 11-13

*Teus, ó Senhor,
são a grandeza, o poder,
a glória, a majestade e o esplendor,
pois tudo o que há
nos céus e na terra é teu.
Teu, ó Senhor, é o reino;
tu estás acima de tudo.*

*A riqueza e a honra vêm de ti;
tu dominas sobre todas as coisas.
Nas tuas mãos estão a força e o poder
para exaltar e dar força a todos.*

*Agora, nosso Deus, damos-te graças,
e louvamos o teu glorioso nome.*

Dedico esta Tese a DEUS,
ao meu amado esposo
Pedro Ivo e filhos André e
Lucas.

Agradecimentos

Acima de tudo, agradeço a Deus pelo dom da vida, graça e amor.

Ao meu amado Pedro Ivo Botelho Mota, por me apoiar e me ajudar a sempre enxergar além, por ser minha família.

Aos meus lindos filhos, por encher minha vida de alegria e me fazer ser melhor a cada dia.

Aos meus pais, Odilon Miranda Filho e Regina Célia Azeredo Miranda, pelo amor, cuidado e apoio em mais esta etapa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta, pelo ensino e amizade durante toda minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Sérgio Henrique Seabra pela obtenção do soro de camundongo, boa vontade, disponibilidade e por sempre compartilhar seu conhecimento

A Prof^a. Dr^a. Maura da Cunha pelo auxílio na microscopia eletrônica de transmissão, a Prof^a Dr^a. Patrícia Torres Bozza, Dra. Heloísa da Silva Bizarro D'Ávila, Prof^a Dr^a. Geórgia Correa Atella e Prof^a Dr^a. Maria Raquel Garcia Vega pelas conversas esclarecedoras, contribuição em experimentos e ideias.

A Prof^a. Dr^a. Alba Lucínia Peixoto Rangel, pela revisão da tese.

A Prof^a Dr^a. Andréa Cristina Vetö Arnholdt por estar presente durante minha vida acadêmica e por mais uma vez aceitar fazer parte de minha banca.

A Prof^a Dr^a. Mariana Caldas Waghabi, Prof^a Dr^a. Antônia Elenir Amâncio Oliveira por suas contribuições neste trabalho, compondo esta banca.

A Prof^a Dr^a. Olga Lima Tavares Machado por intervir a meu favor, garantindo essa vitória.

A Caroliny Samary Lobato, Verônica Gomes Monteiro, Thiago Torres de Aguiar e João Roberto-Neto por contribuírem na construção do artigo e pela amizade.

A Juliana da Cruz Padrão, amiga companheira e cuidadosa, obrigada pela ajuda em todos os momentos de nossa caminhada.

Aos demais colegas de bancada Juliana Costa de Azevedo, João Cláudio Damasceno de Sá, Luciana Lemos Rangel da Silva, Thiago Torres de Aguiar, Fernanda Silva de Souza, Gabriel Rabello de Abreu Cabral, todo o grupo do LBCT e técnicos Darli Keller, Rosemary Maciel, Adriana Martins, Fábio Conceição, Beatriz Ribeiro e Geovana Moraes.

Muito obrigada.

SUMÁRIO

Resumo	XI
Abstract	XII
Lista de Abreviatura e Siglas:	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. Macrófago	2
2.2. Corpos Lipídicos	3
2.2.1- Composição e Estrutura do CL	3
2.2.2. Funções dos CL e doenças relacionadas a esta organela	5
2.2.3.- Acumulação de CL em macrófagos	7
2.2.4- Biogênese de CL	9
2.2.5- Associações de CL dentro da célula	10
2.3. <i>Toxoplasma gondii</i>	11
2.3.1- Ciclo de vida	11
2.3.2- Sucesso do parasito	11
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo geral	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. Resultados	15
4.1 Artigo	15
4.2. Manuscrito 1	24
Resumo	25
4.2.1- Introdução	26
4.2.2- Material e métodos	27
4.2.2.1-Obtenção do soro de camundongo e de plasma sanguíneo, cultivo de macrófagos e quantificação de corpos lipídicos	27
4.2.2.1.1-Obtenção de soro e de plasma sanguíneo de camundongo	27
4.2.2.1.2- Obtenção e cultivo de macrófagos	28
4.2.2.1.3- Marcação e quantificação de corpos lipídicos	28
4.2.2.2- Aquecimento do soro	29
4.2.2.3- Ciclo de congelamento e descongelamento	29

4.2.2.4- Diálise do soro	29
4.2.2.5- Determinação da concentração de proteínas com o método do ácido bicinconínico	30
4.2.2.6- Deslipidação do soro	30
4.2.2.7- Pesagem de lipídios totais (gravimetria)	30
4.2.2.8- Extração total de lipídios	31
4.2.2.9- Cromatografia em camada delgada (TLC)	31
4.2.3. Resultados	31
4.2.3.1- Plasma sanguíneo de camundongo submetido ou não a choque térmico induz corpos lipídicos em macrófagos peritoneais de camundongo	31
4.2.3.2- Soro de camundongos submetidos à restrição alimentar induz menos corpos lipídicos em macrófagos do que soro de camundongo alimentados normalmente	32
4.2.3.3- Diferentes tratamentos do soro de camundongo buscando reconhecer o(s) fator(es) responsável(veis) pelo disparo da gênese de corpos lipídicos	33
4.2.3.3.1- Aquecimento do soro de camundongo	33
4.2.3.3.2- Leve diminuição do número de corpos lipídicos de macrófagos cultivados com soro de camundongo submetido a ciclo de congelamento e descongelamento	34
4.2.3.3.3- Diálise no soro diminui a capacidade de geração de corpos lipídicos	35
4.2.3.3.4- Deslipidação do soro	36
4.2.3.4- C75 diminuiu a geração de corpos lipídicos em macrófagos cultivados com soro de camundongo	38
4.2.3.5- Soro de camundongo possui maior diversidade e quantidade de lipídios que o soro fetal bovino revelada pela cromatografia de camada delgada	39
4.2.4. Discussão	41
4.2.5. Conclusão	46
4.2.6. Referências:	46
4.3. Manuscrito 2	51

Resumo	52
4.3.1- Introdução	53
4.3.2- Material e métodos	54
4.3.2.1- Obtenção e cultivo de macrófagos	54
4.3.2.1.1- Macrófagos peritoneais de camundongo	54
4.3.2.1.2- Macrófagos Murinos RAW 264, J774-A1 e Alveolares	55
4.3.2.1.3- Macrófago Medular	55
4.3.2.1.4- Macrófagos de rato	55
4.3.2.1.5- Linhagem de macrófagos de galinha transformados HD11	56
4.3.2.2- Obtenção de soro	56
4.3.2.2.1- Soro de camundongo e de rato	56
4.3.2.2.2- Soro fetal bovino e de galinha	56
4.3.2.3- Marcação e quantificação de corpos lipídicos	56
4.3.2.4- Análise ultraestrutural	57
4.3.3- Resultados	58
4.3.3.1- Análise da Gênese de Corpos Lipídicos	58
4.3.3.1.1 – Cinética da geração de corpos lipídicos	58
4.3.3.1.2- Associação de corpo lipídico com retículo endoplasmático	59
4.3.3.2 – Soro de camundongo induz corpos lipídicos nas diferentes linhagens de macrófagos murinos testadas	61
4.3.3.3 – Soro de camundongo é capaz de induzir corpos lipídicos em macrófagos de rato e de galinha	63
4.3.3.3.1 - Macrófagos de rato	63
4.3.3.3.2- Macrófago de galinha (HD11)	65
4.3.4- Discussão	66
4.3.5- Conclusão	69
4.3.6- Referências	70
5- Considerações Finais	74
5.1- Alterações dos macrófagos pelo cultivo com soro de camundongo	74
5.2- Fatores do soro de camundongo que induzem corpos lipídicos	78
5.3- Gênese e poder indutor de corpos lipídicos pelo SC	79
6- Conclusão	80
7- Referências	81

Resumo

Os corpos lipídicos (CL) são organelas ricas em lipídios, altamente reguladas e dinâmicas, mas pouco entendidas. CL estão presentes em quase todas as células realizando diferentes funções. Em macrófagos seu número e volume podem ser alterados em consequência de infecções. Nesse trabalho essa organela foi estudada em macrófagos peritoneais murinos cultivados com soro de camundongo (SC), potente indutor de CL, analisando a alteração da capacidade microbicida destas células, a natureza dos indutores de CL presentes nesse soro, gênese e indução de CL pelo SC em outras linhagens de macrófagos murino, de rato e de galinha. Macrófagos peritoneais murinos cultivados com SC apresentaram CL, os quais diminuíram a capacidade microbicida destas células frente a *Toxoplasma gondii*. Além disso, associação de CL a vacúolos parasitóforos foi observada. A submissão do SC a diferentes tratamentos como aquecimento progressivo, submissão a ciclo de congelamento e descongelamento e diálise, mostrou diminuição na capacidade indutora de CL, assim como o uso em cultura de C75, inibidor da ácido graxo sintase, indicando possível existência de mais de um indutor de natureza lipídica e/ou proteica. Ademais, SC induziu CL não só em macrófagos peritoneais murinos, mas também nas linhagens RAW 264, J774A-1, medular e alveolar como também em macrófagos de rato e galinha (HD11). Esses resultados mostram grande poder de indução de CL pelo SC. Esse estudo traz contribuições importantes sobre como CL podem ser induzidos e gerados em macrófagos, seus efeitos na morfologia destas células e na funcionalidade microbicida. Acreditamos que o SC pode ser utilizado para gerar bom modelo de estudo, importante para o entendimento da funcionalidade e gênese dessa organela.

Palavras-chave: macrófagos, soro de camundongo, corpos lipídicos, óxido nítrico, prostaglandina E₂, capacidade microbicida, *Toxoplasma gondii*, indução e gênese.

Abstract

Lipid bodies (LB) are lipid-enriched organelles, highly regulated and dynamic, but little understood. LB are present in almost all cells performing different functions. In macrophages LB number and volume can be altered in consequence of infections. In this work this organelle was studied in murine peritoneal macrophages cultured with mouse serum (MS), a potent LB inducer, analyzing the change of the microbicidal capacity of these cells, the nature of the LB inducers present in serum, the genesis and the induction of LB by MS in other lineages of murine macrophages, rat and chicken. Murine peritoneal macrophages cultured with MS presented many LB, which decreased the microbicidal capacity of these cells against *Toxoplasma gondii*. Besides, the association of parasitophorous vacuole to LB was observed. The submission of MS to different treatments like progressive heating, freeze-thaw cycle and dialysis showed a decrease in LB inducing capacity, as well as the use in culture of C75, fatty acid synthase inhibitor, indicating the possible existence of more than one inducer of lipid and / or protein nature. Furthermore, MS induced LB not only in murine peritoneal macrophages but also in RAW 264, J774A-1 lineages, derived bone-marrow and alveolar, as well as rat and chicken (HD11) macrophages. These results show great power of LB induction by MS. This study brings important contributions on how LB can be induced and generated in macrophages, their effects on these cells morphology and on microbicidal functionality. We believe that the SC can be used to generate good study model, important for understanding the functioning and genesis of this organelle.

Keywords: macrophages, mouse serum, lipid bodies, nitric oxide, prostaglandin E2, microbicidal capacity, *Toxoplasma gondii*, induction and genesis.

Lista de Abreviatura e Siglas:

- CL: corpo(s) lipídico(s);
- DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium;
- IFN- γ : interferon- gamma - do inglês - interferon- γ ;
- IL: interleucina;
- LDL: lipoproteína de baixa densidade – do inglês: low density lipoprotein;
- LPS: lipopolissacarídeo;
- MoCam: macrófagos de camundongo;
- MoRt: macrófagos de rato;
- mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos - mammalian target of rapamycin;
- NO: óxido nítrico – do inglês: nitric oxide;
- PAF: fator de ativação de plaquetas – do inglês: platelet activating factor;
- PGE₂: prostaglandina E₂;
- PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase – do inglês: phosphatidil inositol 3-phosphate;
- RE: retículo endoplasmático;
- SC: soro de camundongo;
- SFB: soro fetal bovino;
- SG: soro de galinha;
- SR: soro de rato;
- TGF- β 1: fator de transformação do crescimento do inglês: transforming growth fator - β 1;
- TLC: cromatografia de camada delgada – do inglês: Thin layer chromatography;
- TLR: Toll-like receptor;
- VP: vacúolo parasitóforo;

1. Introdução

O corpo lipídico (CL), inclusão lipídica citoplasmática, não membranosa, tem sido descrito como organela ou domínio celular especializado, presente em pequeno número nos neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, mastócitos e monócitos/macrófagos em condições não patológicas (Bozza *et al.*, 2009). Diversas funções têm sido relatadas para esta organela (Bozza *et al.*, 2007; Beller *et al.*, 2010; Farese Jr. & Walther, 2009), no entanto, vários aspectos são desconhecidos. O CL está envolvido na geração de mediadores inflamatórios funcionando como sítio de produção de eicosanóides (D'Ávila *et al.*, 2006; Bozza *et al.*, 2007; D'Ávila *et al.*, 2011; Bandeira-Melo *et al.*, 2011). Em doença infecciosa observa-se a presença de leucócitos, incluindo macrófagos, contendo grande número de CL o que reforça o envolvimento desta organela na inflamação (Melo *et al.*, 2006). No entanto, pouco se sabe sobre como a presença de CL altera a ação microbicida de macrófagos.

O mecanismo de geração de CL ocorre de maneira extremamente regulada dependendo do estímulo extracelular. Este(s) estímulo(s) dispara(m) diferentes vias de sinalização, pouco caracterizadas e entendidas, culminando na geração de CL que podem variar nos conteúdos lipídico e proteico (Bozza *et al.*, 2009). Esta heterogeneidade reflete a gama de relações que o CL exerce sobre a funcionalidade celular. De forma geral, a infecção *in vivo* e *in vitro* com patógenos intracelulares aumenta o número de CL em macrófagos, assim como seus metabólitos secundários (Melo & Dvorak, 2012). Outras moléculas como triacilgliceróis (Zweytick *et al.*, 2000; Farese *et al.*, 2009; Walther e Farese Jr., 2009; Beller *et al.*, 2010), ácido oleico (Suzuki *et al.*, 2011), citocinas (Melo *et al.*, 2013), quimiocinas e hormônios (Bozza *et al.*, 2009), dentre outras, também são responsáveis pela gênese de CL. Apesar de diversos estímulos, a gênese dos CL ainda é questão de debate. Existem vários modelos experimentais de gênese desta organela, muitos envolvendo retículo endoplasmático (RE) e também o aparecimento de CL direto no citosol (Thiele & Spandl, 2008; Bozza *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2011).

O CL é um domínio intracelular induzível, multifuncional envolvido na sinalização e ativação celular, regulação do metabolismo e tráfego lipídico, além de controlar a síntese e secreção de mediadores inflamatórios. Entender melhor como a presença de CL altera a funcionalidade de macrófagos e o que

dispara a gênese desta organela ajudará no entendimento de mais uma faceta de CL.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Macrófago

O macrófago, célula derivada de monócitos, é a célula mais diferenciada do sistema mononuclear fagocitário, que representa um subgrupo de leucócitos originalmente descritos como uma população de células mielóides derivadas da medula óssea (van Furth *et al.*, 1972) extremamente efetivo na resposta primária a patógenos, na coordenação da resposta imune adaptativa, inflamação, resolução e reparo (Martinez *et al.*, 2009). Nos tecidos, essas células exercem função fagocitária efetora na primeira linha de defesa da imunidade inata fagocitando microrganismos. Macrófagos fagocitam também restos celulares contribuindo para a homeostase do organismo (Geissmann *et al.*, 2010; Davies *et al.*, 2013).

Macrófagos possuem vasta distribuição no organismo (Dougherty & McBride, 1984; Auger & Ross *et al.*, 1992; Mosser & Edwards, 2008; Davies *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2014) exibindo grande heterogeneidade, resultante, em parte, da especialização de macrófagos teciduais em microambientes particulares (Gordon & Taylor 2005). Yona *et al.* (2013) demonstraram que as principais populações de macrófagos residentes de tecidos, incluindo células de Kupffer do fígado e alveolares do pulmão, baço e os macrófagos peritoneais, são estabelecidos antes do nascimento e mantêm-se subsequentemente durante a vida adulta independente de reposição pelos monócitos do sangue.

Macrófagos são ativados após contato com patógeno ou moléculas provenientes desses, assim como moléculas da resposta do sistema imune do hospedeiro o que lhe confere diferentes perfis de ativação e fenótipos (Gordon & Taylor 2005; Geissmann *et al.*, 2010). Estas células reconhecem sinais de perigo através de seus receptores capazes de induzir programas de ativação especializados (Martinez *et al.*, 2008). Macrófagos denominados de “M1” sofrem ativação clássica, induzida por interferon- gamma (IFN- γ), que dispara severa resposta pró-inflamatória. Essa ativação confere aos macrófagos M1 capacidade microbicida ou tumoricida aumentada, além da secreção de altos

níveis de citocinas, como interleucina (IL)-6, fator de necrose tumoral-alfa e IL-1) bem como mediadores inflamatórios (como eicosanoides), requerida para eliminação de patógenos intracelulares. Já os macrófagos denominados M2 sofrem ativação alternativa por IL-4 e IL-13, a qual dispara um fenótipo diferente importante para as respostas imunes a helmintos decorrente da indução de produção de Imunoglobulina E (Martinez *et al.*, 2009).

Óxido nítrico (NO), um poderoso agente microbicida gerado por macrófagos M1, desempenha importante papel citotóxico nos processos de defesa do hospedeiro contra microorganismos invasores e células neoplásicas (Jacobs & Ignarro, 2003). Este radical livre endógeno é importante na redução do crescimento de *Toxoplasma gondii*, parasito intracelular obrigatório (Adams *et al.*, 1990), porém *T. gondii* inibe parcialmente a produção de NO, provavelmente como uma estratégia de escape (Seabra *et al.*, 2002).

2.2. Corpos Lipídicos

CL são organelas ricas em lipídios, altamente reguladas, presentes em toda a gama de organismos biológicos de archaea e bactérias, células eucarióticas, indo desde levedura, protozoários e *Drosophila* até vertebrados, incluindo seres humanos (revisado por Murphy *et al.*, 2012). Numerosas proteínas, muitas das quais desempenham papéis funcionais na biologia do CL, decoram sua superfície. As primeiras descrições de gotículas lipídicas datam do século XIX. Tanto Altmann (1890) quanto Wilson (1896) descreveram gotículas de gordura nas células e especularam sobre sua origem (Altman, 1890; Wilson, 1896; revisado em Farese *et al.*, 2009). Logo no início, as propriedades de alta difração dos CL facilitaram sua identificação por microscopia de luz. Com o seu reconhecimento como um componente da maioria das células no início do século XX esta organela passou a ser chamada de lipossoma. No entanto, no final da década de 60, lipossomas artificiais foram inventados e rapidamente usurpou o nome. Desde então, essas organelas foram chamadas por muitos nomes, incluindo gotículas lipídicas, gotículas de gordura, adipossomas e CL (Martin & Parton, 2006).

2.2.1- Composição e Estrutura do CL

Esta organela consiste de um centro de lipídios neutros altamente hidrofóbicos, formado principalmente de tri e diacilglicerol (Farese Jr. & Walther, 2009; Beller *et al.*, 2010; Ohsaki *et al.*, 2014; Wilfling *et al.*, 2014),

esteróis, ésteres de colesterol (Zweytick *et al.*, 2000; Farese *et al.*, 2009) e colesterol livre (Tauchi-Sato *et al.*, 2002) assim como outros esteróis. Em alguns tipos celulares diacilgliceróis, precursores da síntese de triacilgliceróis e um dos produtos de sua quebra (Ohsaki *et al.*, 2014), também são encontrados no interior desta organela (Farese Jr. & Walther, 2009). O cerne desta organela é cercado por uma monocamada lipídica complexa de fosfolipídios e ácidos graxos (Murphy, 2001; Tauchi-Sato *et al.*, 2002; Bartz *et al.*, 2007; Farese *et al.*, 2009). A porção hidrofílica desta monocamada é virada para o citoplasma e a hidrofóbica interage com o interior do CL (Murphy & Vance, 1999; Brown, 2001). Apesar de variações morfológicas e composição molecular nos diferentes tipos celulares, a estrutura e organização desta organela são altamente conservadas (Beller *et al.*, 2010).

Proteínas estruturais pertencentes à família perilipina, outrora nomeada PAT (perilipina, ADRP - *adipose related protein*, e TIP-47 - *tail interacting protein* – 47 KDa) (Murphy & Vance, 1999; Brown, 2001; Sztalryd & Kimmel 2014) estão presentes nesta organela (Saka e Valdivia, 2012). Em 1991, no laboratório de Constantine Londos, foram identificadas as perilipinas em adipócitos (Greenberg *et al.*, 1991). As perilipinas recobrem os CL e estão relacionadas ao estoque, utilização de lipídios e proteção contra lipólise nas células (Sztalryd & Kimmel, 2014). Já as ADPR estão relacionadas à gênese e crescimento destas organelas (Robenek *et al.*, 2006), servindo como centro de nucleação para acumulação de lipídios e/ou agindo como âncora dentro da célula (Heid *et al.*, 1998; Nakamura & Fujimoto, 2003; Brasaemle *et al.*, 2004). Esta proteína é descrita como marcadora específica de CL (Brasaemle *et al.*, 1997; Heid *et al.*, 1998).

Outras proteínas podem estar presentes no CL dependendo da função desempenhada pela organela em determinado tipo celular. A constituição proteica da membrana dos CL pode variar dentro de uma mesma célula (Wilfling *et al.*, 2014). Dentre as enzimas encontradas nos CL vale ressaltar a presença de enzimas metabólicas, quinases (MAP quinases – do inglês - mitogen activated protein; PI3K - fosfatidilinositol-3-quinase; PKC- proteína quinase C) (Yu *et al.*, 1998, 2000), proteínas da família Rab (Ozeki *et al.*, 2005), GTPases (Liu *et al.*, 2004; Fujimoto *et al.*, 2004), enzimas relacionadas à formação de eicosanóides (Dvorak *et al.*, 1993; Bozza *et al.*, 1997, 1998;

Pacheco *et al.*, 2002; Bozza & Bandeira-Melo, 2005) e caveolina (Fujimoto *et al.*, 2001; Brasaemle *et al.*, 2004; Pol *et al.*, 2004, Wan *et al.*, 2007; Martin & Parton, 2005).

2.2.2. Funções dos CL e doenças relacionadas a esta organela

Durante a última década, tem havido uma mudança de paradigma na compreensão dos papéis dos CL. Novas tecnologias genéticas, bioquímicas e de imagem têm sustentado esses avanços, que estão revelando muita informação nova sobre essas organelas (Murphy & Vance, 1999; Tauchi-Sato *et al.*, 2002; Brasaemle *et al.*, 2004; Fujimoto *et al.*, 2004; Umlauf *et al.*, 2004; Wan *et al.*, 2007; Bartz *et al.*, 2007).

O CL provavelmente evoluiu originalmente em microorganismos como estoques temporários de excesso de lipídios na dieta, importante para as necessidades imediatas de formação de membrana (Ducharme e Bickel, 2008). CL também atua no armazenamento de fosfolipídios e esteróis necessários para a síntese de membranas biológicas, hormônios e sais biliares (Pol *et al.*, 2014). Com o passar do tempo a aquisição de papéis como estoque de carbono em longo prazo permitiu a sobrevivência de organismos a episódica falta de nutrientes. Em organismos multicelulares, CL passaram a adquirir várias funções adicionais, incluindo homeostase de lipídios (Zweytick *et al.*, 2000; Brasaemle *et al.*, 2000), protegendo a célula contra efeitos tóxicos da possível internalização aumentada de lipídios (Farese *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2011), sequestro de proteína, servindo como plataformas para deposição e degradação de algumas proteínas em proteassomos (Farese *et al.*, 2009; Wilfling *et al.*, 2014); tráfico de membrana e vesicular (Brasaemle *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Fujimoto *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005), na sinalização, na ativação e no metabolismo celular, bem como em processos inflamatórios (síntese e secreção de mediadores) (Weller *et al.*, 1999; Pacheco *et al.*, 2002; Bandeira-Melo *et al.*, 2002; Melo *et al.*, 2003, 2006; Bozza *et al.*, 2007; D'Ávila *et al.*, 2008; Bozza *et al.*, 2009) e neoplásicos (Bozza & Viola, 2010). Finalmente, as avarias em CL, e proteínas associadas estão envolvidas em várias doenças degenerativas do homem moderno tais como obesidade (Martinez-Botas *et al.*, 2000), deslipidemia e resistência à insulina (Konige *et al.*, 2014), que está associada à síndrome metabólica (Al-Farai *et al.*, 2014; Bahrami *et al.*, 2014).

Devido à importância de lipídios em diferentes atividades celulares, o tráfego lipídico envolvendo CL é altamente regulado, pois a alteração deste pode levar a estoque excessivo de lipídios culminando no desenvolvimento de doenças metabólicas como arteriosclerose (Ross 1995; Larigauderie *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006; Schmitz & Grandl 2008), esteatoses (Heid *et al.*, 1998), e obesidade (Martinez-Botas *et al.*, 2000). Estudos de proteômica têm mostrado que a presença de proteínas não esperadas na superfície do CL em condições patológicas estão ligadas ao mau funcionamento do metabolismo de CL (Cole *et al.*, 2002). Por outro lado, a incapacidade de estocar lipídios também resulta em problemas sistêmicos multifacetados (Herranz *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2011). A aparente necessidade de um balanço energético altamente controlado nos organismos demanda uma regulação fina do estoque e mobilização de lipídios que pode ser traduzida em gênese e crescimento da massa dos CL recém-formados, bem como da mobilização dos lipídios presentes nesta organela. O entendimento da biologia do CL poderia indicar alvos terapêuticos potenciais para prevenir a acumulação de CL e complicações associadas a este evento.

CL está presente em adipócitos e células esteroidogênicas (Heid *et al.*, 1998), células do epitélio da glândula mamária (durante o período de gravidez e lactação) e células hepáticas em número elevado (Arisqueta *et al.*, 2013). Também vem sendo observada a presença desta organela em neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, mastócitos, monócitos/macrófagos, normalmente em número limitado (Dvorak *et al.*, 1983; Galli *et al.*, 1985; Weller *et al.*, 1985; Weller *et al.*, 1991a; Weller *et al.*, 1991b; Melo *et al.*, 2006). Estudos têm demonstrado que havendo sinalização específica, a quantidade de CL pode ser altamente alterada (Dvorak *et al.*, 1993; Bozza *et al.*, 2007, 2009). Muitos fatores são responsáveis pelo disparo da gênese de CL.

A acumulação de CL dentro das células é observada tanto em condições clínicas patológicas, experimentais, desordens metabólicas, infecciosas, neoplásicas e inflamatórias (Weller *et al.*, 1989; Bozza & Bandeira-Melo, 2005; Bozza & Viola 2010). O aumento no número e tamanho de CL em macrófagos relacionados à doença infecciosa (Weller *et al.*, 1999; Pacheco *et al.*, 2002; Melo *et al.*, 2003; D'Avila *et al.*, 2006; Bozza *et al.*, 2009), reforça a ideia da formação do CL como resposta das células à inflamação (Melo *et al.*, 2006).

Muitos estudos relacionam a presença desta organela com a produção de mediadores inflamatórios (Dvorak *et al.*, 2003; Bozza *et al.*, 1997, 1998; Pacheco *et al.*, 2002), porém pouco é conhecido a respeito desta organela e sua influência na modulação da capacidade microbicida de células.

Infecção *in vivo* (Melo *et al.*, 2003; D'Ávila *et al.*, 2011) e *in vitro* (D'Ávila *et al.*, 2011) com patógenos intracelulares aumenta o número de CL em macrófagos. A formação de CL foi observada em células infectadas por *Trypanosoma cruzi* (Melo *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2006; Bozza *et al.*, 2007; D'Ávila *et al.*, 2012), *Plasmodium falciparum* (Jackson *et al.*, 2004) e *Toxoplasma gondii* (Gomes *et al.*, 2014). A presença desta organela foi detectada no interior de *T. gondii* (Coppens *et al.*, 2000), e extensa caracterização realizada mostrando desvio de lipídios da célula hospedeira (Coppens *et al.*, 2000, 2006; Charron & Sibley, 2002; Gupta *et al.*, 2005) e estoque destes em CL para sua própria manutenção bem como de sua progenia (Sonda *et al.*, 2001; Charron & Sibley, 2002; Quittnat *et al.*, 2004).

Esta organela localiza enzimas que sintetizam eicosanóides e seu aumento se correlaciona com maior produção destes mediadores inflamatórios lipídicos tais como prostaglandina E₂ (PGE₂) (Pacheco *et al.*, 2002; Melo *et al.*, 2003; D'Ávila *et al.*, 2006). Esta correlação direta foi observada em macrófagos infectados com *T. cruzi* (Bozza *et al.*, 2009, D'Ávila *et al.*, 2011). PGE₂ pode inibir a resposta imune tipo Th1 e desativar macrófagos através da redução de TNF- α e da produção de NO (Renz *et al.*, 1998; Betz & Fox, 1991; Freire-de-Lima *et al.*, 2000). Porém dependendo do parasito em questão, cepa e do hospedeiro, a presença do CL pode auxiliar tanto na sobrevivência quanto na morte do parasito intracelular. (Melo & Dvorak, 2012).

2.2.3.- Acumulação de CL em macrófagos

Todas as respostas imunológicas são decorrentes da interação receptor-ligante. Dentre a grande gama de fatores que atuam nos macrófagos estão os IRFs (fatores reguladores de interferon). Estes fatores desempenham importante papel na polarização de macrófagos, como revisto por Günthner & Anders (2013), e regulação da maturação de células do sistema imune (Tamura *et al.*, 2008). Os macrófagos respondem a lipopolissacarídeo (LPS), componente da membrana externa de bactérias gram-negativas, via receptor Toll-Like (TLR). O TLR-4 expresso em macrófagos reconhece patógenos

microbianos, bem como suas moléculas, tais como LPS, o que gera um sinal intracelular que induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Chow *et al.*, 1999), expressão da NO sintase induzida culminando na produção de NO e aumento do metabolismo lipídico incluindo geração de CL (Li *et al.*, 2005). Em adição aos agentes patogênicos exógenos, TLR-4 reconhece lipoproteína de baixa densidade (LDL) minimamente oxidada, o que conduz a maior captação de lipoproteínas em macrófagos que contribuem para o acúmulo de CL e formação de células espumosas (“foam cells”) e aterosclerose (Choi *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2012).

A LDL é um importante transportador extracelular de colesterol e, como tal, desempenha papéis fisiológicos importantes na função celular e regulação das vias metabólicas. No entanto, em condições patológicas de hiperlipidemia, estresse oxidativo e/ou distúrbios genéticos, componentes específicos do LDL se tornam oxidados ou modificados (Miller *et al.*, 2010). Com isso o transporte do colesterol por LDL modificada é desviado de seus objetivos fisiológicos induzindo acúmulo excessivo de colesterol em macrófagos e a consequente formação de células espumosas na parede vascular contribuindo para o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (Miller *et al.*, 2010). A formação de células espumosas é um processo essencial durante o desenvolvimento da aterosclerose, conduzindo a inflamação vascular e crescimento da placa aterosclerótica. No modelo de peixe-zebra hipercolesterêmico foi demonstrado que a deficiência de TLR-4 reduz significativamente a taxa de acumulação de lípidos *in vivo* nos macrófagos de lesões vasculares nos estágios iniciais (Miller *et al.*, 2009). Outra evidência que TLRs podem contribuir na aterosclerose está na diminuição da placa aterosclerótica em modelos de camundongos que sofreram a deleção dos genes TLR-2 e TLR-4 (Mullick, *et al.*, 2005). Em ratos deficientes em TLR-4 também foi observada diminuição significativa da acumulação de CL em monócitos circulantes após injeção de LDL minimamente oxidada (Miller *et al.*, 2012). De maneira intrigante a expressão de TLR-1, TLR-2, e TLR-4 é marcadamente aumentada em placa ateroscleróticas de humanos (Edfeldt *et al.*, 2002). Estes resultados fazem a conexão do desenvolvimento de aterosclerose a cascatas de sinalização pró-inflamatória, a qual também é acionada por patógenos microbianos. De fato a ativação de macrófagos por LPS causa aumento de concentrações

intracelulares de colesterol livre e esterificado, sugerindo papel potencial de infecções, em particular LPS na aterogênese (Funk *et al.*, 1993).

A acumulação de CL dentro de leucócitos é observada tanto em condições clínicas, experimentais, metabólicas, infecciosas, neoplásicas e outras condições inflamatórias (revisito por Bozza & Viola, 2010). O aumento no número e tamanho de CL em macrófagos relacionados à doença infecciosa (Weller *et al.*, 1999; Pacheco *et al.*, 2002; Melo *et al.*, 2003; D'Avila *et al.*, 2006), reforça a ideia da formação do CL como um evento natural em células envolvidas na inflamação (Melo *et al.*, 2006). Além disso, a presença desta organela está relacionada a produção de eicosanoides (Pacheco *et al.*, 2002; Melo *et al.*, 2003; D'Avila *et al.*, 2006), dentre outras funções (Bozza *et al.*, 2009; Khor *et al.*, 2013).

2.2.4- Biogênese de CL

Muitos avanços têm sido realizados no estudo da gênese do CL em células eucarióticas, embora os mecanismos celulares e moleculares que participam deste processo não sejam completamente compreendidos, sendo apresentados diversos modelos de gênese (Murphy & Vance, 1999; Zweytick *et al.*, 2000; Murphy 2001; Ploegh 2007; Robenek *et al.*, 2006; Bozza *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2009; Wilfling *et al.*, 2014, Pol *et al.*, 2014). Evidências sugerem que os CL se originam do RE (Tauchi-Sato *et al.*, 2002; Blanchette-Mackie *et al.*, 1995), porém ainda há controvérsias se a geração desta organela ocorre entre os folhetos da membrana do RE (Brown, 2001; Murphy, 2001; Martin & Parton, 2005, 2006; Suzuki *et al.*, 2011) ou ao longo dele (Robenek *et al.*, 2006; Bozza *et al.*, 2009; Wilfling *et al.*, 2014). Entretanto, em todos os modelos existe a transferência de proteínas e lipídios do RE (Wilfling *et al.*, 2014) para o CL nascente o que explicaria a organização do CL, com cerne de lipídios neutros circundados por uma monocamada de fosfolipídios (Brown, 2001; Murphy, 2001; Tauchi-Sato *et al.*, 2002). Bozza *et al.*, (2009) propuseram a formação de CL a partir da incorporação de porções membranares derivadas do RE, o que é reafirmado pela presença de proteínas integrais de membrana funcionais no interior dessas organelas. Este modelo foi corroborado por evidências recentes (Melo *et al.*, 2013), porém os modelos existentes não passam de hipóteses. Outros modelos de geração de CL vêm sendo propostos tendo o RE como local de geração desta organela, porém é controversa a origem da

monocamada derivada do RE, que pode ser da porção citosólica da membrana do RE ou da porção oposta, que está virada para o lúmen do RE (Guo *et al.*, 2009; Sturley & Hussain, 2012), ou até mesmo ambas as faces da membrana do RE (Guo *et al.*, 2009). Pol *et al.* (2014) e Wilfling *et al.* (2014) descreveram um modelo similar aos anteriores, no qual ocorre acúmulo de lipídios entre a bicamada que circunda o RE.

Em procariotos, CL são derivados da membrana plasmática (Wältermann *et al.*, 2005; Wältermann & Steinbüchel, 2005; Farese Jr. & Walther, 2009). Entretanto, em bactérias os CL se formam no citoplasma, e a origem da monocamada lipídica que envolve essa organela é desconhecida (Stehr *et al.*, 2012). Em leveduras, a fissão de CL existentes também foi descrito como mecanismo de formação de novos CL (Pol *et al.*, 2014).

2.2.5- Associações de CL dentro da célula

Associações de CL com mitocôndria (Pu *et al.*, 2011), fagossomo (Anes *et al.*, 2003; van Manen *et al.*, 2005; Bougneres *et al.*, 2009; Melo & Dvorak 2012), peroxissomo (Binns *et al.*, 2006; Pu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013), ribossomo (Dvorak *et al.*, 2003; Dvorak 2005; Wan *et al.*, 2007), membrana perinuclear (D'Ávila *et al.*, 2006) têm sido descritas. As interações melhores caracterizadas são relativas às cisternas do RE liso (Dvorak *et al.*, 1991; Bozza *et al.*, 1997, Ozeki *et al.*, 2005; Martin & Parton, 2005). Regiões especializadas do RE, conhecidas como membranas associadas a mitocôndrias, são entendidas como centros de síntese de lipídios, as quais também estão associadas com CL (Murphy *et al.*, 2009). Esses subdomínios do RE facilitam o tráfego não vesicular de fosfatidilserina a partir do RE e em CL de hepatócitos que estão em brotamento os quais retornam a regiões específicas do RE para transferir lipídios para a formação de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) (Murphy *et al.*, 2009). A síntese de novos fosfolipídios de membrana ocorre a partir de enzimas derivadas do RE, que estão presentes na superfície dos CL, mas também necessita de processos que ocorrem em mitocôndrias e em peroxissomos (Pol *et al.*, 2014).

2.3. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii, protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, possui vasta distribuição mundial. Infecta uma grande variedade de animais domésticos e selvagens, ocorrendo infecção também em seres humanos. A infecção em indivíduos imunocompetentes é usualmente assintomática, porém em indivíduos imunocomprometidos diferentes órgãos podem ser afetados levando ao desenvolvimento de encefalites, miocardites e pneumonia. A infecção aguda é caracterizada por formas rápidas de reprodução, taquizoítos, os quais podem levar a lise da célula hospedeira dentro de 24 a 48h. Em resposta a pressão do sistema imune estes parasitos se diferenciam em formas lentas de reprodução, bradizoítos, os quais residem no interior de cistos intracelulares (Sibley, 2011).

2.3.1- Ciclo de vida

O ciclo de vida deste parasito pode ser sexuado ou assexuado. A fase sexuada ocorre exclusivamente no epitélio intestinal de felinos, hospedeiros definitivos, no qual os oocistos são gerados e liberados nas fezes contaminando o ambiente e, conseqüentemente, outros hospedeiros (revisto por Holliman, 1997). É no hospedeiro definitivo que ocorre a gamogamia, diferenciação das formas replicativas em gametas, onde após fecundação gera-se o oocisto. Os oocistos em contato com o ar atmosférico sofrem esporogonia – esporulação (Dubey *et al.*, 1998) com o aparecimento de dois esporocisto contendo quatro esporozoítos.

2.3.2- Sucesso do parasito

A infecção por *T. gondii* causa a toxoplasmose que afeta em torno de um terço da população humana (Tenter *et al.*, 2000). Esse parasito é intracelular obrigatório e se multiplica em um vacúolo da célula hospedeira conhecido como vacúolo parasitóforo (VP) (Sinai, 2008). O metabolismo lipídico celular é de extrema importância para a replicação de *T. gondii*. Esse parasito é auxotrófico para colina e colesterol. A falta desses lipídios, bem como seu bloqueio por intervenção farmacológica é desfavorável para o crescimento do parasito (Coppens & Joiner, 2003). Em células infectadas a endocitose de LDL, mediada por receptor, aumenta significativamente quando comparada com células não infectadas (Foussard *et al.*, 1991), assim como o número deste receptor (Portugal *et al.*, 2008) resultando no aumento do número de CL no

citoplasma do parasito (Robibaro *et al.*, 2002). Este parasito também desvia colesterol de derivados de LDL que tenham transitado através de lisossomos da célula hospedeira (Coppens *et al.*, 2000; Coppens 2006).

Experimentos com o uso de sondas lipídicas fluorescentes ou radioativas foram realizados para analisar o tráfego lipídico da célula hospedeira para *T. gondii*, possibilitando o entendimento da captação e interconversão de lipídios exógenos. Muitas estruturas esféricas contendo lipídios foram observadas no espaço intracelular de *T. gondii* (Sonda *et al.*, 2001; Charron & Sibley, 2002; Quittnat *et al.*, 2004), confirmando a habilidade do parasito em estocar colesterol em CL (Nishikawa *et al.*, 2005). Além disso, este parasito possui deficiência enzimática para a síntese de moléculas de esterol (Coppens *et al.*, 2000) e apesar de possuir capacidade autônoma pra sintetizar fosfolipídios, não sintetiza *de novo* algumas classes (Azzouz *et al.*, 2002). Portanto, é necessário o desvio destes lipídios do citoplasma da célula hospedeira para o parasito e até mesmo de precursores destes lipídios com o intuito de construir lipídios mais complexos (Charron & Sibley, 2002; Gupta *et al.*, 2005; Laliberté & Carruthers, 2008).

Parasitos extracelulares expressam receptores únicos de superfície que seletivamente se ligam e captam lipoproteínas do meio de cultura ou da célula hospedeira (Seghal *et al.*, 2005). Uma das estratégias utilizadas pelo parasito intracelular com o intuito de acessar nutrientes da célula hospedeira é a realocização de organelas celulares. Mitocôndrias, RE e complexo de Golgi (Sinai *et al.*, 1997; Sinai & Joiner, 2001; Goldszmid *et al.*, 2009) da célula hospedeira passam a se localizar ao redor do VP. Este posicionamento de mitocôndria e RE ao redor do VP pode representar zonas privilegiadas de troca de lipídios.

Coppens *et al.*, (2006) mostraram que o VP de *T. gondii* capta material do sistema endolisossomal da célula hospedeira. Para isto o parasito recruta microtúbulos da célula hospedeira que invaginam a membrana do VP levando vesículas com material do sistema endolisossomal. Dessa forma o parasito tem acesso a diversos componentes de baixo peso molecular produzidos por este sistema.

Além disso, *T. gondii* se utiliza de um mecanismo dependente de ATP para obter lipídios da célula hospedeira (Ehrenman *et al.*, 2010). As proteínas

que são constitutivamente liberadas dentro do VP pelos parasitos em crescimento desempenham papel fundamental na aquisição de lipídios da célula hospedeira. Magno *et al.*, (2005) sugerem que a membrana do VP sofre modificações no decorrer do processo de infecção para facilitar a sobrevivência e a proliferação do patógeno dentro da célula hospedeira, garantindo assim o curso da doença. Schwab *et al.*, (1994), mostraram que a habilidade de *T. gondii* de modificar a permeabilidade da membrana do VP permite livre difusão de pequenas moléculas como açúcares, aminoácidos, bases nucleares e cofatores provenientes do citoplasma da célula hospedeira para o espaço vacuolar. Tem sido observado que o repertório de atividades da membrana do VP é bem plástico, refletindo mudanças temporais associadas com a fase replicativa do crescimento do parasito (Sinai, 2008). Alguns estudos mostram o envolvimento de organelas tais como a mitocôndria e, principalmente, RE da célula hospedeira como fornecedores de lipídios, contribuindo assim para o aumento da área da membrana de vacúolos durante o desenvolvimento do parasito (Sinai, 2008). Recentemente foi demonstrado que a célula hospedeira é o maior contribuinte de lipídios para a rede intravacuolar do VP contendo *T. gondii* (Caffaro & Boothroyd, 2011). Perturbação de proteínas do parasito que medeiam a retenção de mitocôndria e RE na membrana do VP, como a ROP2, resulta na falha do recrutamento dessas organelas pelo VP evitando a aquisição de lipídios da célula hospedeira, reduzindo o crescimento do parasito tanto *in vitro* quanto em camundongos (Nakaar *et al.*, 2003).

Gomes *et al.*,(2014) demonstraram que a infecção de células musculares com *T. gondii* dispara a gênese de CL nestas células, correlacionada positivamente com o aumento da geração de PGE₂ e citocinas como IL-12 e IFN- γ . Uma vez que, *T. gondii* desvia grande variedade de precursores de lípidos do citoplasma do hospedeiro e transforma-os de forma eficiente em lipídios complexos para seu próprio benefício (Charron & Dibley, 2002; Coppens *et al.*, 2006; Caffaro & Boothroyd, 2011), há necessidade de verificar se existe alguma associação de CL de macrófagos ao VP contendo *T. gondii* e se a presença desta organela deixariam os macrófagos menos microbicidas contra este parasito.

3. OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Analisar o efeito do SC no cultivo de macrófagos peritoneais de camundongos verificando ação microbicida, buscando identificar qual (s) fator(es) presente(s) no SC dispara(am) a geração de CL em macrófagos e determinar o poder indutor de CL do SC em outras linhagens de macrófago.

3.2- Objetivos específicos

- Analisar a natureza das vesículas que aparecem nos macrófagos peritoneais de camundongos cultivados com SC;
- Estudar a ação microbicida dos macrófagos cultivados com SC e SFB analisando produção de NO, PGE₂, e multiplicação de taquizoítos de *T. gondii*;
- Utilizar inibidor da via ciclooxigenase para bloquear a produção de PGE₂ e testar a ação microbicida destes macrófagos;
- Verificar a associação de CL ao VP;
- Verificar se ocorre a geração de CL em macrófagos peritoneais de camundongos com plasma sanguíneo de camundongo;
- Submeter o SC a diferentes tratamentos e verificar indução de CL em macrófagos;
- Analisar o conteúdo lipídico e proteico do SC e do SFB para elucidar os possíveis indutores de CL no SC;
- Verificar se ocorre a geração de CL em diferentes linhagens de macrófagos murino, de rato e de galinha cultivados com SC;
- Analisar a gênese dos CL nos macrófagos peritoneais de camundongo.

4. Resultados

4.1. Artigo

Título:

Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associate with the parasitophorous vacuole and decrease their microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii*

Autores:

Laura Azeredo Miranda Mota, João Roberto-Neto, Verônica Gomes Monteiro, Caroliny Samary Silva Lobato, Marco Antônio de Oliveira, Maura da Cunha, Heloisa D'Ávila, Sérgio Henrique Seabra, Patrícia Torres Bozza, Renato Augusto DaMatta.

Revista:

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

4.2. Manuscrito 1

Soro de camundongo: propriedades indutoras de corpos lipídicos

Laura Azeredo Miranda Mota¹, Thiago Torres de Aguiar¹, Sérgio Henrique Seabra², Maria Raquel Garcia Vega³, Patrícia Torres Bozza⁴, Georgia Correa Atella⁵, Renato Augusto DaMatta^{1*}.

1 Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

2 Laboratório de Tecnologia em Bioquímica e Microscopia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

3 Laboratório de Ciências Químicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

4 Laboratório de Imunofarmacologia, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

5 Laboratório de Bioquímica de Lipídios e Lipoproteínas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica/CCS. Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ.

*Autor de correspondência: Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

E-mail: renato@uenf.br, Tel: +55 (22) 2739-7310, Fax: +55 (22) 2739-7178

Resumo

Corpos lipídicos (CL) são organelas delimitadas por monocamada de fosfolipídios e cerne composto por lipídios neutros. CL são reconhecidos como organelas multi-funcionais que afetam muitos aspectos da biologia e metabolismo celular. A indução de CL é altamente regulada e específica, podendo ocorrer por diversos fatores. Macrófagos peritoneais de camundongo cultivados com soro de camundongo (SC) apresentam grande número de CL. Na tentativa de identificar os indutores de CL pelo SC, diversos procedimentos foram realizados neste soro, analisando também o plasma sanguíneo. Plasma de camundongo gerou CL de maneira similar ao SC, porém após indução de agregação plaquetária no plasma a geração desta organela foi menor. Soros de camundongos submetidos à restrição alimentar por 24 e 48 h geraram menos CL em comparação ao SC sem restrição. SC submetido a aumento contínuo da temperatura perdeu progressivamente a capacidade de induzir CL. O congelamento e descongelamento do SC induziu leve queda da capacidade de geração de CL. SC submetido a diálise diminuiu a geração de CL. O SC tem o dobro de lipídios e proteínas comparado com o soro fetal bovino. Após deslipidação ambas as porções lipídica e proteica do SC apresentaram menor indução de CL que o SC normal, porém semelhantes entre si. O cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo com SC juntamente com C75, inibidor da enzima ácido graxo sintase, resultou em menor geração de CL, indicando participação no metabolismo lipídico através de nova síntese e não incorporação direta de lipídios em CL. Na cromatografia em camada delgada foi revelada maior diversidade e quantidade de lipídios no SC. Esses resultados indicam que o poder de indução de CL pelo SC é, provavelmente, proveniente de mais de um fator, podendo ser lipídico e/ou proteico. Uma análise mais aprofundada dos constituintes do soro e testes posteriores em cultivo deve ser realizada.

Palavras-chaves: corpos lipídicos, macrófagos, soro de camundongo, plasma, lipídios e proteínas.

4.2.1- Introdução

Corpos lipídicos (CL) são estruturas intracelulares que estocam lipídios neutros. Avanços recentes têm revolucionado o entendimento dos CL outrora visto como grânulos de estoque de energia, ora aumentando ora decrescendo dependendo do requerimento energético (Suzuki *et al.*, 2011). Os CL são reconhecidos como organelas multifuncionais que afetam muitos aspectos da biologia e metabolismo celular, incluindo a síntese e mobilização de lipídios, tráfego de membranas, estoque e degradação de proteínas (Murphy, 2012).

Muitos fatores são responsáveis pelo disparo da gênese de CL em células, desde ácidos graxos insaturados (Weller *et al.*, 1991b; Huang & Chen, 2006), lipoproteínas (McGookey & Anderson 1983; Schmitz & Grandl, 2008) até quimiocinas (Bandeira-Melo *et al.*, 2001; Pacheco *et al.*, 2007) e fator de ativação de plaquetas (PAF) (Bartemes *et al.*, 1999).

O soro em cultura é a principal fonte de fatores de crescimento e de nutrição crucial para o desenvolvimento de células *in vitro*. A suplementação clássica de um meio geral de cultivo é o soro fetal bovino (SFB), usado frequentemente para todos os tipos de cultura. Além do SFB, outros soros como de cabra têm sido testados em culturas de diversos tipos celulares (Paranjape, 2004). A indução de CL nos modelos celulares estudados se dá a partir da adição de fatores indutores dessa organela ao meio de cultura suplementado com SFB. No entanto, recentemente nosso trabalho mostrou que esta indução também pode acontecer em macrófagos peritoneais de camundongo cultivados com soro de camundongo (SC), sem a necessidade de enriquecimento do meio com fatores exógenos (Mota *et al.*, 2014). Após 24 horas de cultivo em meio suplementado com SC, macrófagos apresentam grande número de CL, produzem mais prostaglandina E₂, menos óxido nítrico e ficam menos microbicidas ao *Toxoplasma gondii* (Mota *et al.*, 2014). Portanto, o cultivo de macrófagos com SC gera um fenótipo que pode ser modelo de estudo desta organela. No entanto, não se sabe o que existe no SC que induz CL em macrófagos.

Este trabalho teve como objetivo apontar a possível fonte indutora de CL em SC. SC, obtido de camundongos submetidos a regime de restrição alimentar, e plasma de camundongos alimentados normalmente foram testados no cultivo de macrófagos. Ademais, SC foi aquecido, submetido a ciclos de

congelamento e descongelamento, e dialisado. Para verificar a participação do metabolismo lipídico na gênese de CL induzido por SC, C75, inibidor da enzima ácido graxo sintase, foi utilizado em cultura juntamente com esse soro. O SC foi caracterizado por cromatografia em camada delgada (TLC), após deslipidação, e as frações lipídicas e proteicas foram testadas no cultivo.

4.2.2- Material e métodos

4.2.2.1- Obtenção do soro de camundongo e de plasma sanguíneo, cultivo de macrófagos e quantificação de corpos lipídicos

4.2.2.1.1- Obtenção de soro e de plasma sanguíneo de camundongo

O SC foi obtido a partir da coleta de sangue de camundongos Suíços, machos adultos (6 a 8 semanas/ 30 a 40 g), por punção cardíaca utilizando seringa de 3 mL e agulha 26G após eutanásia por CO₂ em câmara de gás. O sangue obtido foi mantido na seringa por 2-3 h a 25 °C para coagular. Posteriormente, as seringas foram acondicionadas na geladeira por 1 h. O soro foi coletado com uma pipeta *Pasteur*, transferido para tubos cônicos (15 mL) e centrifugado a 600 g por 10 min. O soro foi inativado (30 min, 56 °C), aliquotado (200 µL) e estocado no freezer a -20 °C. Os soros obtidos de camundongos submetidos à restrição alimentar por 24 e 48 h foi realizado da mesma maneira, porém cada grupo foi dividido em 3 grupos de 5 camundongos obtendo-se 3 amostras diferentes de soro por grupo.

Para obtenção de plasma sanguíneo a coleta de sangue foi realizada também por punção cardíaca, utilizando como anticoagulante citrato de sódio a 0,38% em PBS. O sangue obtido foi centrifugado a 600 g por 10 min para obtenção do plasma. O plasma foi coletado e dividido em dois grupos. Uma parte do plasma foi inativado, aliquotado e armazenado como descrito no parágrafo anterior. A outra sofreu choque térmico, ao ser incubado em gelo com água por 20 min, seguido de incubação em banho a 37 °C até obter um agregado de plaquetas, e conseqüente liberação de várias substâncias de plaquetas ativadas, incluindo o PAF. O plasma resultante foi então inativado, aliquotado e armazenado.

O uso dos camundongos neste trabalho foi aprovado pela CEUA – UENF em junho de 2010, protocolo 87.

4.2.2.1.2- Obtenção e cultivo de macrófagos

Os macrófagos foram obtidos após lavado peritoneal em camundongos Suíços, machos, adultos (6 a 8 semanas/ 30 a 40 g) utilizando 10 mL de Hank's por animal, eutanasiados como descrito no item 4.2.2.1.1. Para plaqueamento em placa de 24 poços foram usados 4 animais por experimento. A suspensão celular do lavado foi centrifugada a 500 g por 10 min a 4° C. O sedimento foi ressuspenso em 4 mL de solução de Hank's e semeados 150 µL por poço. Após aderência de 1 h a 37° C, atmosfera de 5% de CO₂, as células foram lavadas 2 vezes com solução de Hank's e cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com 2% de SC ou SFB, ou 2% dos produtos da ultracentrifugação, da diálise e do aquecimento do soro por 24h. Com o intuito de verificar a participação da via de síntese do ácido graxo na geração de CL, C75, inibidor da ácido graxo sintase, foi usado nas concentrações 0,5; 1 e 5 µg/mL no cultivo destas células com 2% de SC por 24h. Nesse caso foi realizado um teste de viabilidade verificando a liberação celular da desidrogenase láctica através da quantificação da atividade dessa enzima por um kit comercial da marca Doles.

4.2.2.1.3- Marcação e quantificação de corpos lipídicos

Macrófagos cultivados por 24 h com 2% de plasma, SFB, SC normal ou submetido a diferentes processos (ultracentrifugação, diálise, aquecimento e ciclos de congelamento e descongelamento) foram fixados por 10 min com 4% de formaldeído recém-preparado em PBS. Após esse período as células foram lavadas em PBS por 2 vezes, incubadas por 15 min com o corante Vermelho de Nilo a 1 µg/mL, e lavados novamente em PBS (Greenspan *et al.*, 1985). A seguir, as lamínulas foram montadas em 10 µL de ProLong Gold (Invitrogen P36931) e seladas com esmalte, sendo observadas no dia seguinte em microscópio de fluorescência Axioplan Zeiss equipado com contraste interferencial de Nomarski, lâmpada HBO 100 e câmera digital AxioCam Mrc5 gerenciada pelo programa Axiovision. Todo o processo de manipulação do marcador fluorescente foi feito ao abrigo de luz.

Para a quantificação de CL, os macrófagos foram classificados em categorias que variaram de acordo com a quantidade de CL que cada um possuía. Estas categorias compreenderam macrófagos sem CL, com 1 até 3,

com 4 até 6, com 7 até 9 ou com 10 ou mais CL. Em cada lamínula 100 células foram contabilizadas e distribuídas nas categorias de acordo com a quantidade de CL observados; pelo menos 3 lamínulas em cada variante experimental por experimento foram quantificadas para obtenção de média e desvio padrão.

Os resultados foram representados graficamente utilizando-se o programa GraphPad Prism 5. Os gráficos utilizados foram do tipo ordenada e abscissa. No eixo das abscissas estão as diferentes categorias de macrófagos baseadas no número de CL presentes; no eixo das ordenadas está a quantidade de células referente a cada categoria. Os gráficos foram testados estatisticamente com o uso do programa GraphPad Prism 5 pelo teste ANOVA, utilizando o método de Bonferroni sendo o valor de *P* representado na legenda quando houve diferença estatística.

4.2.2.2- Aquecimento do soro

Alíquotas de 200 µL de SC foram submetidas a temperaturas de 70, 80, 90 ou 100 °C por 5 min. Os soros tratados com diferentes temperaturas foram testados separadamente no cultivo de macrófagos por 24 h na concentração de 2%, seguindo preparo para observação e contagem de CL (item 2.1.3).

4.2.2.3- Ciclo de congelamento e descongelamento

Alíquotas de 200 µL de SC foram submetidas ao processo de descongelamento em banho-maria a 37 °C. Em seguida foram congeladas em freezer por 30 min. O ciclo de congelamento e descongelamento foi realizado por 2, 4, 6, e 8 vezes. Macrófagos foram cultivados por 24 h com 2% de SC submetido ao ciclo e preparado para observação e contagem de CL como descrito no item 2.

4.2.2.4- Diálise do soro

Duas alíquotas de 1 mL de SC foram submetidas ao processo de diálise com membranas de celulose com poros que excluem massa molecular de 1.000 (Sigma-Aldrich D7884-10FT) e 12.400 Da (Sigma-Aldrich D0530-100FT) para baixo em água destilada. As alíquotas foram colocadas nos sacos de diálise e deixadas em água destilada (meio de troca) por 24 h. A água foi trocada 3 vezes e a porção retida no saco de diálise foi coletada e testada no cultivo de macrófagos após leitura de proteínas, pelo método do ácido bicinconínico, para normatização da concentração.

4.2.2.5- Determinação da concentração de proteínas com o método do ácido bicinconínico

A determinação da concentração de proteínas foi analisada indiretamente pela leitura colorimétrica de Cu^+ através do kit de leitura de proteína usando ácido bicinconínico (Sigma). Para isto, 1 μL de amostra do produto das diálises e de SC (não submetido à diálise) foi misturado com 24 μL de água destilada separadamente em placa de 96 poços, acrescido posteriormente de 200 μL do reagente ácido bicinconínico. A placa foi agitada em agitador orbital durante 30 seg, coberta e incubada a 37 °C durante 30 min. Após esfriamento da placa, foi feita a leitura num leitor de placa utilizando 562 nm como comprimento de onda. A concentração foi calculada por uma curva padrão pré-calibrada usando albumina sérica bovina (BSA) em água destilada como padrão.

4.2.2.6- Deslipidação do soro

Para cada 5 mL de SC foram adicionados 10 mL de solução éter diisopropílico:n-butanol (60:40 v/v) (Vetec) e 10 μL de EDTA (50 mg/mL) em tubo cônico de 15 mL. A solução foi misturada por 30 min em aparelho orbital (Arsec HOM030). Em seguida foi centrifugada (2 min, 800 g, temperatura ambiente). As duas porções resultantes (proteica e lipídica) foram coletadas com pipeta *Pasteur* e alíquotadas em *ependorfs* para secagem de solventes com o uso de arraste de nitrogênio. As porções secas foram ressuspensas em SFB no mesmo volume inicial da amostra de soro e testadas separadamente (porção lipídica ou proteica) ou conjuntamente (porção lipídica e proteica) no cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo (Cham e Knowles, 1976).

4.2.2.7- Pesagem de lipídios totais (gravimetria)

Tubos de polipropileno de 1,5 mL novos e vazios foram pesados 5 vezes. As amostras de lipídios extraídas (item 4.2) foram secas por arraste de nitrogênio e ressuspensas em 300 μL de clorofórmio e 300 μL de metanol. Após a solubilização, as amostras foram transferidas para os tubos já pesados. As amostras foram secas através de arraste de nitrogênio e os *ependorfs* foram novamente pesados. A diferença entre a média aritmética de 5 pesagens dos *ependorfs* com as amostras secas e das 5 pesagens dos *ependorfs* vazios foi calculada.

4.2.2.8- Extração total de lipídios

As amostras de 400 µL de SFB ou SC foram colocadas em tubos de vidro de fundo cônico (15 mL) e foram adicionados 0,5 mL de clorofórmio e 1 mL de metanol. A solução foi misturada com o uso de aparelho vórtex de 5 em 5 min durante 1 h. Em seguida a solução foi centrifugada (1000 g, 30 min, 25 °C) e o sobrenadante coletado. O sedimento da solução sofreu uma segunda extração, com a mesma solução. O sobrenadante foi coletado e misturado ao sobrenadante da primeira extração. Foram adicionados 0,5 mL de clorofórmio e 0,5 mL de água aos sobrenadantes coletados. A solução foi misturada com o uso de aparelho vórtex e centrifugada (1000 g, 30 min, 25 °C). O sedimento resultante (fase orgânica) foi coletado e colocado em novo tubo (Bligh e Dyer, 1959).

4.2.2.9- Cromatografia em camada delgada (TLC)

Uma placa de sílica para TLC foi marcada para inserção de 400 µL das amostras de SFB, SC e dos padrões. As amostras sofreram extração de lipídios (item 2.8), foram secas por arraste de nitrogênio e ressuspensas em 50 µL de clorofórmio. Os seguintes padrões foram utilizados: monoacilglicerol, diacilglicerol, triacilglicerol, colesterol, colesterol esterificado e fosfolípido.

Após aplicação das amostras e padrões, a placa foi eluída em béquer, parcialmente embebida, em posição vertical, com 60 mL de hexano, 40 mL de éter etílico e 1 mL de ácido acético. A seguir a placa de TLC foi deixada para secar em temperatura ambiente. Após secagem a placa foi borrifada com agente revelador (10% CuSO₄, 8% H₃PO₄ em água destilada), e foi deixada novamente para secar em temperatura ambiente. Em seguida foi colocada sob uma placa aquecedora a cerca de 200 °C por 5 min. A análise densitométrica foi realizada com o programa TotalLab, utilizando-se a imagem obtida da placa de sílica após revelação e escaneamento.

4.2.3. Resultados

4.2.3.1- Plasma sanguíneo de camundongo submetido ou não a choque térmico induz corpos lipídicos em macrófagos peritoneais de camundongo

Plasma obtido com sangue coletado com citrato de sódio foi capaz de gerar CL em macrófagos de camundongo de maneira semelhante ao SC (Figura 1). Com a agregação das plaquetas, induzida através do choque

térmico culminando na liberação de fator de agregação de plaquetas – PAF, houve perda de 20% na capacidade de gerar CL (Figura 1).

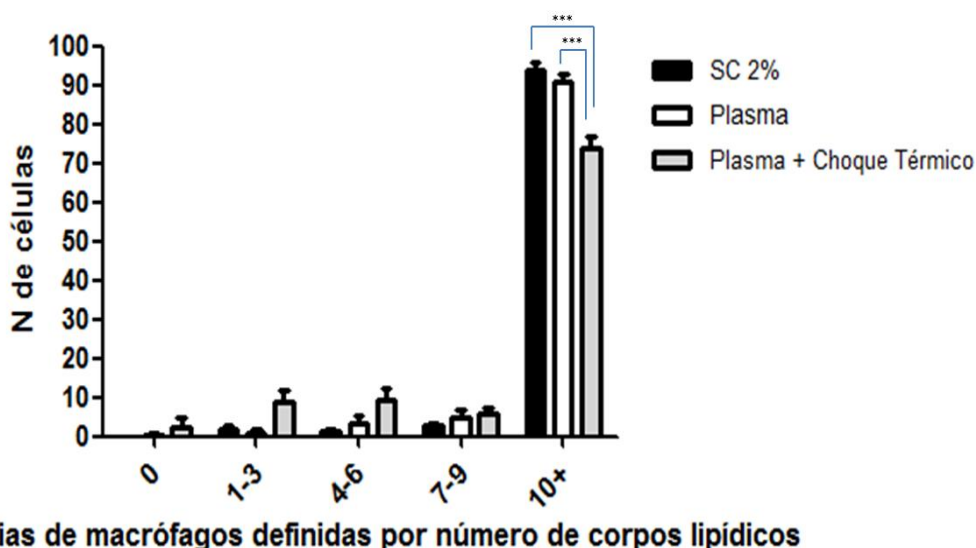


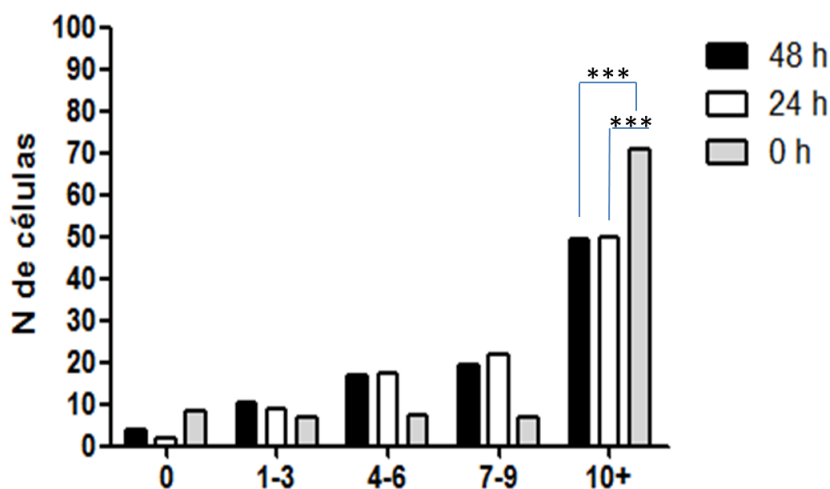
Figura 1. Plasma sanguíneo de camundongos gera corpos lipídicos. Número de células (N de células) por categoria de macrófagos peritoneais de camundongo definida por número de corpos lipídicos após cultivo por 24 h com 2% de soro de camundongo (SC) plasma submetido ou não a choque térmico. Média e desvio padrão de três experimentos.***Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P < 0,001$).

4.2.3.2- Soro de camundongos submetidos à restrição alimentar induz menos corpos lipídicos em macrófagos do que soro de camundongo alimentados normalmente

A geração do CL pode ser induzida por diferentes vias de sinalização celular. Uma dessas vias é a da leptina, que é um hormônio/citocina. A leptina funciona como sensor de nutriente celular, níveis de energia e status redox. Ela é produzida em altos níveis não somente durante a inflamação, mas também após estado alimentado (Lam & Lu, 2007; La Cava & Matarese, 2004). Portanto, camundongos foram submetidos a períodos de restrição alimentar de 0, 24 e 48 h para estudar o possível efeito da leptina na geração de CL a partir do soro obtido destes camundongos.

Macrófagos cultivados com SC submetidos à restrição alimentar por 24 e 48 h apresentaram menor número de CL quando comparado aos macrófagos cultivados com SC provenientes de camundongos não submetidos à restrição

(0 h) (Figura 2). Não houve diferença na gênese de CL entre os dois soros submetidos à restrição (Figura 2).



Categorias de macrófagos definidas por número de corpos lipídicos

Figura 2. Efeito da restrição alimentar em camundongos na geração de corpos lipídicos. Número de células (N de células) por categoria de macrófagos peritoneais de camundongo definida por número de corpos lipídicos após cultivo por 24 h com 2% de soro de camundongo submetido à restrição alimentar por 48, 24 e 0 h. Média e desvio padrão de três experimentos.***Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P < 0,001$).

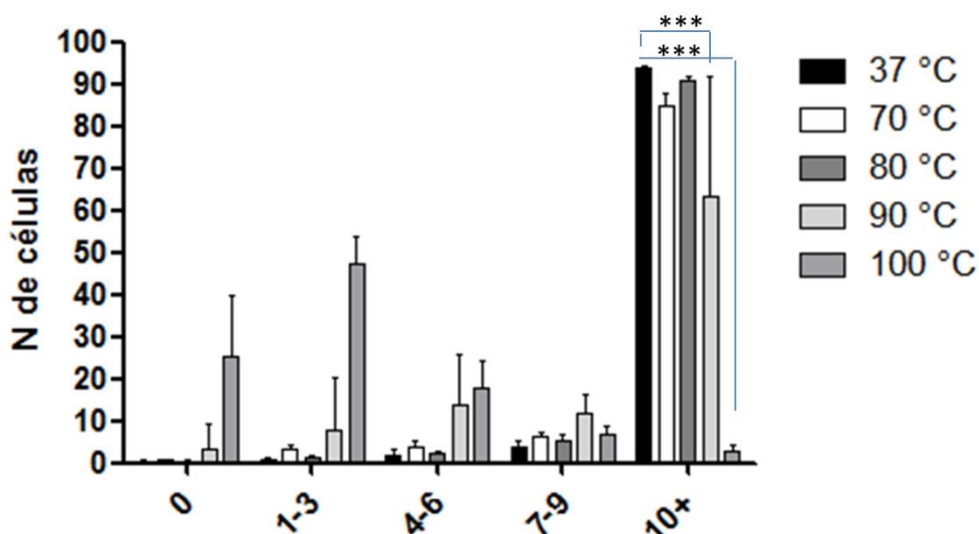
4.2.3.3- Diferentes tratamentos do soro de camundongo buscando reconhecer o(s) fator(es) responsável(veis) pelo disparo da gênese de corpos lipídicos

Diferentes abordagens experimentais foram realizadas com o intuito de identificar o fator, ou fatores, envolvidos no disparo da gênese do CL em macrófagos peritoneais cultivados com SC. O SC foi submetido a aquecimento, ciclos de congelamento e descongelamento, diálise, deslipidação, e extração total de lipídios.

4.2.3.3.1– Aquecimento do soro de camundongo

O SC foi submetido a diferentes temperaturas e a capacidade de indução de CL verificada. SC aquecido a 70 e 80 °C não sofreu alteração em sua capacidade indutora de CL, comparado ao SC não submetido a nenhum tratamento (Figura 3). A partir de 90 °C pode ser observada claramente a diminuição na capacidade indutora de CL pelo soro tratado (Figura 3). Após

tratamento em 100 °C a capacidade de geração de CL foi quase eliminada (Figura 3).

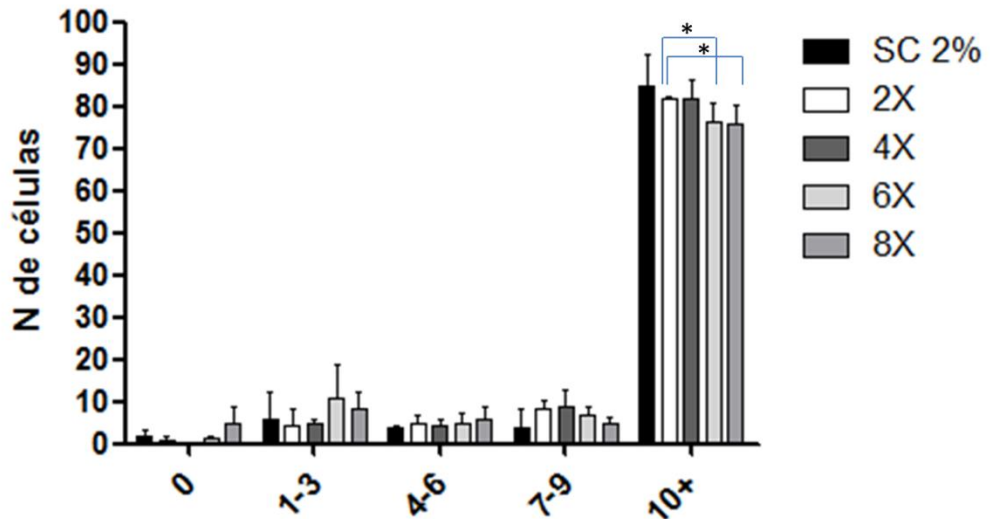


Categorias de macrófagos definidas por número de corpos lipídicos

Figura 3. Efeito do aquecimento do soro na geração de corpos lipídicos. Número de células (N de células) por categoria de macrófagos peritoneais de camundongo definida por número de corpos lipídicos após cultivo por 24 h com 2% de soro de camundongo submetido à aquecimento de 70, 80, 90 ou 100 °C. Média e desvio padrão de três experimentos. ***Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P<0,001$); *Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P<0,05$).

4.2.3.3.2- Leve diminuição do número de corpos lipídicos de macrófagos cultivados com soro de camundongo submetido a ciclo de congelamento e descongelamento

Outra abordagem utilizada com o intuito de identificar a natureza do possível fator indutor do SC foi a submissão do SC a ciclos de congelamento e descongelamento. A submissão do SC ao congelamento e descongelamento afetaria citocinas e proteínas em geral, as quais podem ter alguma relação com o processo da gênese de CL. O número de CL teve ligeira queda ao longo do ciclo de congelamento e descongelamento (Figura 4).

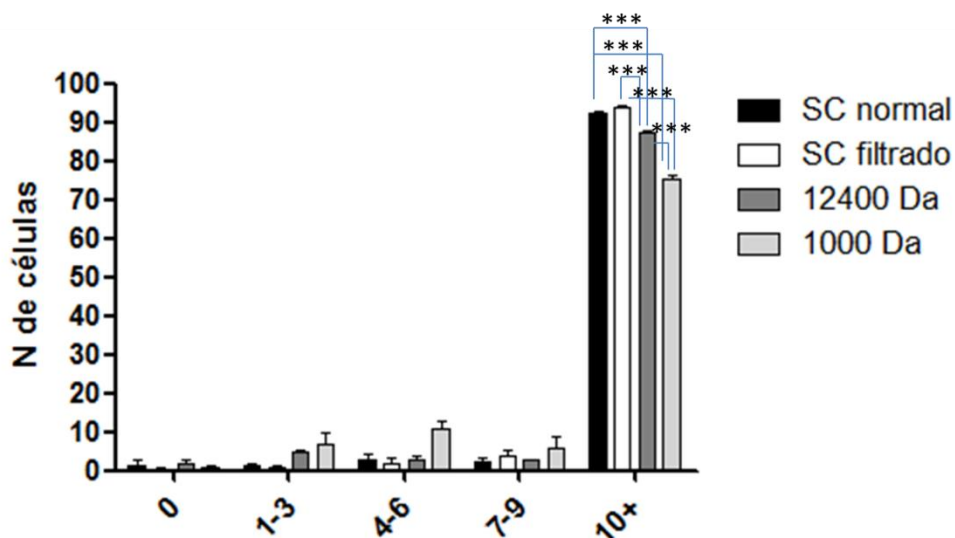


Categorias de macrófagos definidas por número de corpos lipídicos

Figura 4. Ciclo de congelamento e descongelamento do soro de camundongo. Número de células (N de células) por categoria de macrófagos peritoneais de camundongo definida por número de corpos lipídicos após cultivo por 24 h com 2% de soro de camundongo (SC) e SC submetido à ciclo de congelamento por 2, 4, 6 e 8 vezes. Média e desvio padrão de três experimentos. *Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P < 0,05$).

4.2.3.3.3- Diálise no soro diminui a capacidade de geração de corpos lipídicos

O SC foi submetido à diálise em membranas de 1.000 e 12.400 Da e sua capacidade de gerar CL foi verificada. Ambos os soros dialisados apresentaram menor capacidade indutora de CL comparados com o soro não dialisado, porém esta redução foi maior no macrófago cultivado com o material da diálise de poro menor (Figura 5).



Categorias de macrófagos definidas por número de corpos lipídicos

Figura 5. Diálise do soro de camundongo. Número de células (N de células) por categoria de macrófagos peritoneais de camundongo definida por número de corpos lipídicos após cultivo por 24 h com 2% de soro de camundongo (SC) não dialisado ou filtrado ou produto da diálise do SC em membrana de 1.000 Da ou 12.400 Da. Média e desvio padrão de três experimentos.***Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P < 0,001$).

4.2.3.3.4- Deslipidação do soro

Após a deslipidação de SFB e SC observou-se que o SC tem maior fração lipídica e menor proteica em relação ao SFB (Figura 6). A análise da gravimetria dos lipídios extraídos demonstrou que a composição lipídica do SC é cerca de 2 vezes maior do que a composição lipídica do SFB (Tabela 1). O mesmo foi observado com relação à composição proteica (Tabela 2).

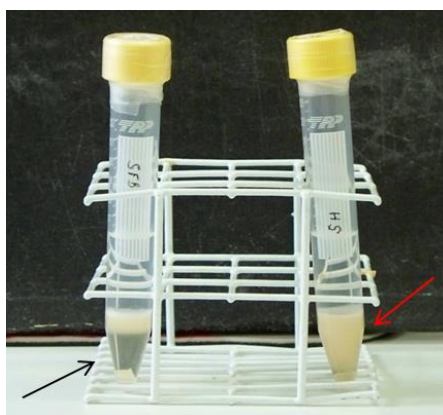


Figura 6. Soro fetal bovino (SFB - esquerda) e soro camundongo (SC - direita) após serem submetidos a deslipidação. Nota-se que o SC apresenta maior fração lipídica (seta vermelha) e o SFB possui maior volume na porção proteica (seta preta).

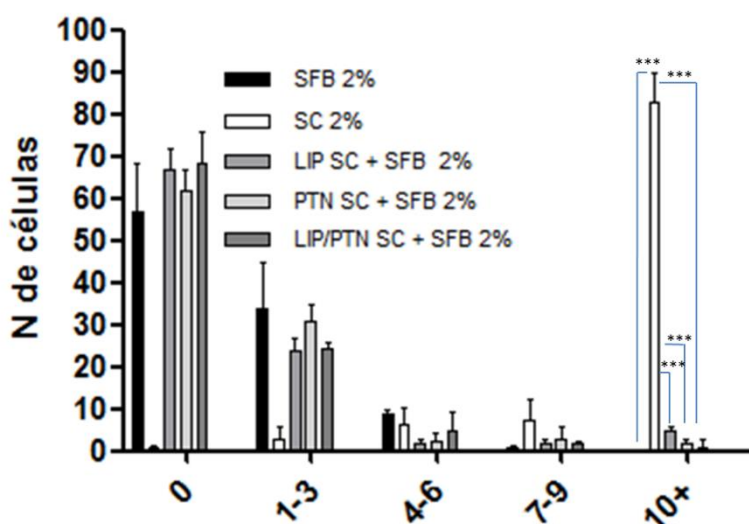
Tabela 1. Gravimetria de 400 µL de soro fetal bovino (SFB) e de camundongo (SC) após extração total de lipídios.

Soros	Peso em miligramas
SFB:	0,90
SC:	2,00

Tabela 2. Dosagem de proteínas através da técnica do ácido bicinonínico em soro fetal bovino (SFB) e soro camundongo (SC).

Soros	Concentração (µg/mL)
SFB	24,30
SC	46,65

As diferentes frações resultantes da deslipidação, lipídica e proteica foram utilizadas no cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo. A porção lipídica e proteica gerou números semelhantes de CL. A mistura das duas porções não retornou a capacidade de geração de CL (Figura 7).



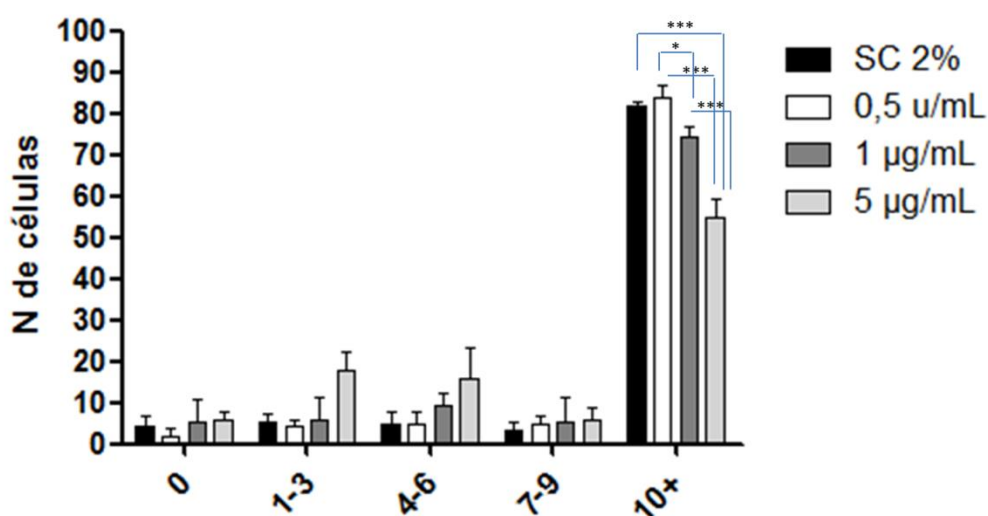
Categorias de macrófagos definidas por número de corpos lipídicos

Figura 7. Efeito das frações do soro de camundongo na geração de corpo lipídico. Número de células (N de células) por categoria de macrófagos peritoneais de camundongo definida por número de corpos lipídicos após cultivo por 24 h com 2% de

soro fetal bovino (SFB) ou de soro de camundongo (SC), 2% de porção lipídica do SC solubilizada em 2% de SFB (LIP SC + SFB2% FILTRADO), 2% de porção proteica do SC solubilizada em 2% de SFB (PTN SC + SFB 2% FILTRADO) e 2% de porção proteica e lipídica do SC solubilizadas em 2% de SFB (LIP/PTN SC + SFB 2% FILTRADO). Média e desvio padrão de três experimentos.***Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P<0,001$).

4.2.3.4- C75 diminuiu a geração de corpos lipídicos em macrófagos cultivados com soro de camundongo

C75, inibidor da ácido graxo sintase, levou a diminuição no número de CL em macrófagos cultivados com SC. Quanto maior a concentração de C75, menor o número de CL (Figura 8). Após o tratamento com C75 nas diferentes concentrações a viabilidade das células estava similar ao do controle não tratado (dados não mostrados).



Categorias de macrófagos definidas por número de corpos lipídicos

Figura 8. Efeito de C75 na geração de corpos lipídicos. Número de células (N de células) por categoria de macrófagos peritoneais de camundongo definida por número de corpos lipídicos após cultivo por 24 h com 2% de soro de camundongo (SC) e C75 em diferentes concentrações. Média e desvio padrão de três experimentos.***Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P<0,001$). *Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P<0,05$).

4.2.3.5- Soro de camundongo possui maior diversidade e quantidade de lipídios que o soro fetal bovino revelada pela cromatografia de camada delgada

A comparação da composição lipídica do SFB e do SC através de TLC revelou claras diferenças entre os dois soros. O perfil lipídico do SC se mostrou mais diversificado (Figuras 9 e 10). O SC apresentou menor concentração de colesterol esterificado (Choe) quando comparado ao SFB (Figuras 9 e 10). Os dois soros apresentaram concentrações equivalentes de colesterol (Cho) e fosfolipídios (PL). Maiores concentrações de triacilgliceróis (TG) e ácido oléico (Ác. oléico) foram detectadas em SC. O SC apresentou diacilglicerol (DAG) e dois grupamentos de lipídios não determinados (ND1 e ND2), ausentes no SFB (Figuras 9 e 10). É importante ressaltar que a figura 10 expressa os resultados em porcentagem dentro de cada soro exclusivamente. Considerando, portanto, o volume total, o SC tem mais lipídios em todas as classes observadas em relação ao SFB.

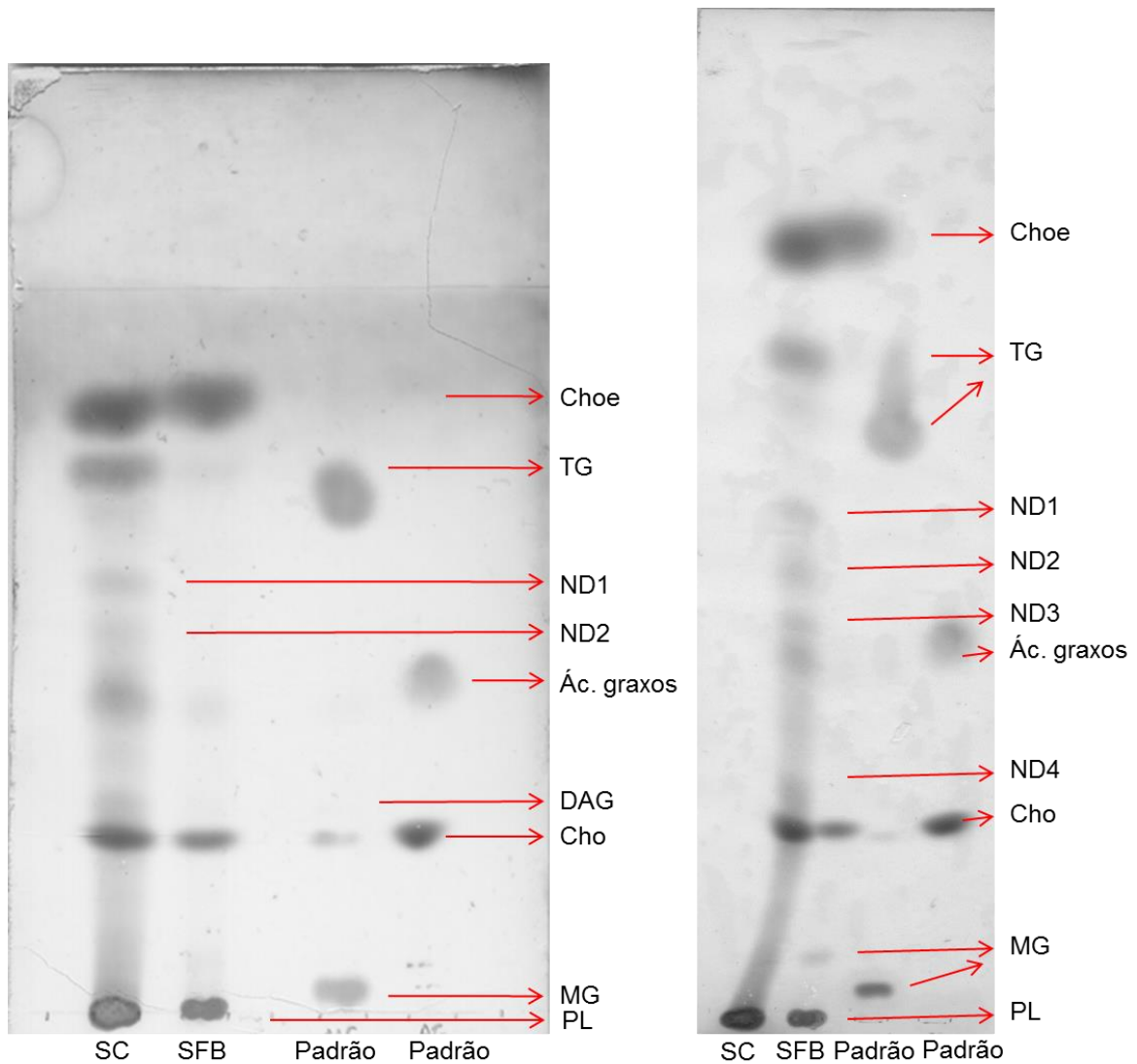


Figura 9. Cromatografia de camada delgada mostrando a composição lipídica do soro fetal bovino (SFB) e do soro de camundongo (SC). Ctrl: controle; PL: fosfolípideo; MG: monoacilglicerol; Cho: colesterol; DAG: diacilglicerol; Ác. oléico: ácido oléico; ND1, ND2, ND3 e ND4: não determinado 1, 2, 3, 4; TG: Triacilglicerol; Choe: Colesterol esterificado. A e B são repetições do mesmo experimento.

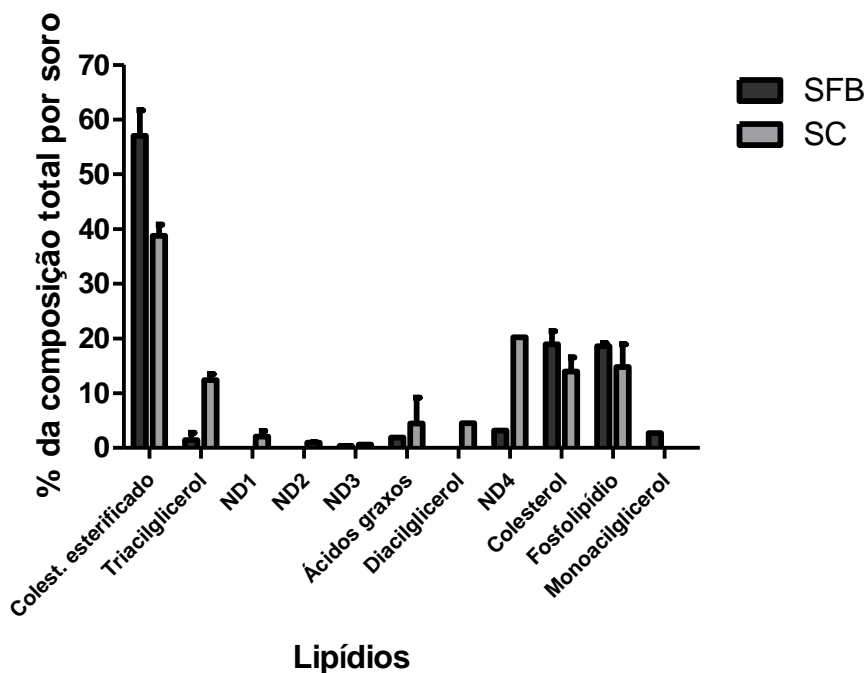


Figura 10. Porcentagem da composição lipídica do SFB e do SC derivada da densitometria da cromatografia de camada delgada. SFB: soro fetal bovino; SC: soro de camundongo; Ctrl: controle; PL: fosfolípido; Cho: colesterol; DAG: diacilglicerol; Ác. oléico: ácido oléico; ND1, ND2, ND3 e ND4: não determinado 1, 2, 3, 4; TG: Triacilglicerol; Choe: Colesterol esterificado. Análise feita com o uso do programa Total Lab 1D. Os gráficos exprimem a média das cromatografias de camada delgada da figura 9.

4.2.4. Discussão

CL são organelas lipídicas altamente heterogêneas, dinâmicas e reguladas. Sua geração ocorre em diversos tipos de células decorrente de estímulos específicos. Mota *et al.*, (2014) demonstraram que o cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo com SC gera grande número de CL, mas não se sabe o que no SC induz esse fator. Neste trabalho foi observado que plasma de camundongo induziu CL e que soro proveniente de camundongos em restrição alimentar diminuiu a geração desta organela com o aumento do período de restrição. Além disso, tratamentos dos SC como aquecimento, submissão do SC a ciclos de congelamento e descongelamento e diálise alteraram o número de CL. O SC também foi submetido ao processo

de deslipidação e TLC revelando grande diversidade e quantidade de lipídios, possíveis indutores de CL neste soro.

Sabendo do poder de geração de CL pelo SC, sangue de camundongo foi coletado tendo o plasma separado para analisar a geração de CL. A geração de CL pelo plasma foi similar ao SC, porém ao ser submetido ao choque térmico levando a agregação de plaquetas, diminuição na geração de CL foi observada. Esse resultado foi contrário à ideia de que a agregação de plaquetas liberasse PAF (fator de ativação de plaquetas), um dos indutores de CL (Bozza *et al.*, 1996, 1997; Bartemes *et al.*, 1999; deAssis *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2003; D'Ávila *et al.*, 2008). Isso indica que o fator indutor de CL está presente tanto no plasma quanto no soro independente da ativação de plaquetas. Além disso, o PAF liberado por choque térmico parece não ter tido concentração suficiente para alterar o nível de indução de CL. Por outro lado, esse processo poder ter contribuído para sequestro ou degradação de algum componente presente no plasma responsável pela geração de CL. Outra possibilidade é de que a separação do plasma seguido de choque térmico tenha interferido na liberação dos elementos da cascata de coagulação sendo diferenciada ou inadequada para geração de CL.

Camundongos foram submetidos a regime de restrição alimentar com o intuito de verificar se seus soros induziriam CL de forma diferente. Foi observada diminuição no número de CL com o aumento do período de restrição. Isto pode ser devido à diminuição dos níveis séricos de nutrientes e lipídios, bem como modulação de hormônios envolvidos no metabolismo. Leptina, hormônio/citocina secretado pelo tecido adiposo, é um dos fatores que disparam a gênese de CL em macrófagos (Maya-Monteiro *et al.*, 2008; Maya-Monteiro & Bozza, 2008). Altos níveis de leptina são encontrados em animais alimentados sofrendo diminuição das concentrações de leptina sérica em animais submetidos à escassez de alimentos (Zhao *et al.*, 2014). A possível queda dos níveis de leptina, presentes no SC sob restrição alimentar pode ter levado a diminuição do número de CL, bem como a disponibilidade lipídica.

Aquecimento do SC levou a diminuição do número de CL com o aumento progressivo da temperatura. Isso demonstra que o fator indutor sofre influência da temperatura. Proteínas sofrem desnaturação e consequente perda de atividade ao serem submetidas a mudanças térmicas (Levitsky *et al.*,

2008; Bock & Peralta, 2009; Cerasoli *et al.*, 2014). SC submetido a altas temperaturas diminuiu drasticamente sua capacidade de disparo da gênese de CL. Também foi observado mudança no aspecto do soro, o qual se tornou gelatinoso. Essa mudança dificultou a coleta do soro para utilização em cultura, o que pode também ter modificado a concentração do fator indutor de CL, ou sequestro deste em consequência da alteração da consistência do soro. Essa mudança pode ser devida ao cozimento das proteínas e mudança na viscosidade dos lipídios (Bock & Peralta, 2009). Dependendo da natureza do indutor, lipídica ou proteica, a mudança conformacional pode alterar a capacidade de geração de CL, diminuindo desta forma a geração de CL.

No soro também estão presentes citocinas, além de proteínas, vitaminas, ácidos graxos e lipídios. Algumas citocinas têm o poder de disparar a gênese de CL em leucócitos (Melo *et al.*, 2013). Citocinas são mais estáveis se mantidas a baixas temperaturas (Aziz *et al.*, 1999; de Jager *et al.*, 2009). SC submetido a ciclo de congelamento e descongelamento apresenta menor número de CL que SC não submetido a tal processo. Proteínas também geralmente são desnaturadas ao serem submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento (Pierce, 2005). Portanto a submissão do SC ao ciclo pode estar não somente afetando citocinas, proteínas como também lipoproteínas, o que pode ser indicador da participação destes elementos como possíveis indutores de CL no SC.

No sentido de verificar se a formação de CL em macrófagos peritoneais de camundongos era através da incorporação de lipídios e estoque intracelular em CL, ou por nova síntese de ácidos graxos, principal constituinte do cerne do CL, C75, inibidor da enzima ácido graxo sintase (Kim *et al.*, 2004), foi utilizado no cultivo de macrófagos com SC. C75, promoveu redução significativa na formação de CL, induzidos pelo cultivo com SC. A capacidade de C75 de inibir geração de CL foi descrita anteriormente relacionando a diminuição desta organela com o declínio na geração de PGE₂ (Accioly *et al.*, 2008; DÁvila *et al.*, 2011). Em leveduras, a deleção de enzimas que realizam a síntese de ésteres de lipídios resulta no desaparecimento de CL, o que indica a necessidade da síntese de lipídios para o surgimento de CL (Ohsaki *et al.*, 2014). Isto indica que o processo de biogênese de CL induzido por SC envolve o metabolismo de lipídios, particularmente ácidos graxos. Adicionalmente, para verificar se a

adição de C75 ao meio de cultura estava reduzindo a indução de CL por SC por morte dos macrófagos, foi feita uma leitura de desidrogenase láctica do meio. Os resultados indicaram que os macrófagos estavam vivos, e que a queda do número de CL contabilizados ocorreu devido à ação do C75, e não devido a morte das células.

O SC foi submetido à diálise em membranas de 1.000 e 12.400 Da e sua capacidade de gerar CL foi verificada. Ambos os soros dialisados apresentaram menor capacidade indutora de CL comparados com o soro não dialisado, porém esta redução foi maior no macrófago cultivado com o material da diálise de poro menor. Isso mostra que o possível fator indutor possui massa maior que 12.400 Da, podendo ser algum complexo proteico ou lipoproteína. Além disso, o poro maior permitiu a saída de outros fatores, não responsáveis pela gênese de CL, levando a concentração do fator indutor de CL, presente no SC.

Na tentativa de descobrir o fator que dispara a gênese de CL, SFB e SC foram submetidos ao processo de deslipidação tornando possível a separação dos soros em porções proteica e lipídica. Após deslipidação, foi observada grande quantidade de lipídios e proteínas em SC, a qual foi confirmada pela gravimetria e dosagem de proteínas, além do resultado gerado após análise de TLC. A indução de CL em macrófagos peritoneais de camundongo, a partir das porções obtidas dos soros, mostrou maior geração de CL no cultivo com os lipídios obtidos, comparado às proteínas, porém esta diferença não foi significativa. Ao reunir as porções lipídica e proteica novamente no cultivo de macrófagos não foi restaurada a capacidade de disparo, sendo menor que a porção lipídica e similar à proteica. A porção lipídica do SC parece ter um papel importante no disparo da gênese de CL. A geração de CL pode ser estimulada pela presença no meio extracelular de lipídios agonistas como ácidos graxos insaturados (Weller *et al.*, 1991; Bozza *et al.*, 1996; Pol *et al.*, 2004; Pu *et al.*, 2011), ácido oléico (Chen *et al.*, 2002; Huang & Chen, 2006; Suzuki *et al.*, 2011), ácido oleico conjugado com albumina de SFB (Brasaemle *et al.*, 2000; Robenek *et al.*, 2004), ácido araquidônico (van Manen *et al.*, 2005; Bozza *et al.*, 1996; Weller *et al.*, 1989) e triacilgliceróis (Zweytick *et al.*, 2000; Farese *et al.*, 2009; Walther & Farese Jr., 2009; Beller *et al.*, 2010). Outros compostos lipídicos como lipoproteína de baixa densidade (LDL) acetilada (Greenspan *et*

al., 1985; Robenek *et al.*, 2005; Klinkner *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 2011), LDL oxidada (Pacheco *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2009) dispara a geração de CL, ao passo que a LDL em sua forma nativa não causa esta geração (Pacheco *et al.*, 2002, Silva *et al.*, 2002), assim como ácidos graxos saturados (Weller *et al.*, 1989, 1991; Bozza & Weller, 2001). Isso reflete a complexidade e especificidade da regulação de estímulos que disparam a geração desta organela. Fosfolipídios parecem ter um papel conservado no crescimento dos CL (Yang *et al.*, 2012). Lipídios neutros de armazenamento, como triacilglicerol (TG) e ésteres de esterol, compõem o núcleo de CL, que são envoltos por uma monocamada de fosfolípidos e de outros lipídios polares. Assim, é concebível que tanto lipídios e fosfolípidos de armazenamento possam ter papéis estruturais e reguladores da geração e do crescimento de CL. Isso pode ser corroborado pela existência de uma cepa de levedura sem CL, onde a síntese de TG e éster de esterol é suprimida devido à ausência de diacilglicerol (DAG) e acyltransferases esteróis (Oelkers *et al.*, 2002; Sandager *et al.*, 2002). Grande parte dessas classes de lipídios, responsáveis pela geração de CL, foi encontrada em maior quantidade em SC, comparado a SFB por TLC. Na análise densitométrica de TLC do SFB e SC, o volume percentual de colesterol no SFB foi maior do que no SC. Entretanto, o volume total de colesterol no SC é maior, assim como de todos os lipídios encontrados, com exceção de monoacilglicerol (MG). Haja vista a participação de colesterol na geração de CL em macrófagos, importado de LDL oxidada por radicais livres (Ross, 1993). Além disso, o SC apresentou maior quantidade e diversidade de lipídios que o SFB. A soma destes fatores ajudam a explicar porque o SC tem grande poder de gerar CL em macrófagos peritoneias de camundongo.

Algumas proteínas como citocinas (Melo *et al.*, 2013), quimiocinas e hormônios (Bozza *et al.*, 2009) também disparam a gênese de CL. A parte proteica do soro obtida após deslipidação induziu poucos CL. Isso mostra que apesar de pequena indução, proteínas do SC podem, juntamente com os lipídios, estarem envolvidas no processo da geração de CL. Esse resultado pode conceber a participação de lipoproteínas no disparo da gênese, além de citocinas, quimiocinas e hormônios, visto que o aumento da temperatura e a submissão do soro a ciclos de congelamento e descongelamento levam a declínio na geração desta organela. É importante ressaltar que o método de

deslipidação utilizado não causa a desnaturação das proteínas do soro (Clam e Knowles, 1976), porém se o fator indutor for uma lipoproteína, a separação do complexo lipídio-proteína resulta na diminuição do número de CL nas porções obtidas após deslipidação e a junção das porções não possui capacidade de se reorganizarem novamente, sendo necessária a utilização de plasma fresco nesse processo.

4.2.5. Conclusão

SC tem grande poder indutor de CL, sendo possível sua utilização em modelos de estudo de geração desta organela. Todas as abordagens realizadas, com o intuito de descobrir os fatores indutores de CL presentes no SC, apontam a existência de mais de um possível indutor, de natureza lipídica ou mista (lipídica/proteica), além da possível participação do hormônio leptina. Mais estudos são necessários para certificação dos fatores indutores de CL.

4.2.6. Referências:

- Accioly, M.T., Pacheco, P., Maya-Monteiro, C.M., Carrossini, N., Robbs, B.K., Oliveira, S.S., Kaufmann, C., Morgado-Diaz, J.A., Bozza, P.T., Viola, J.P. (2008). Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res.* 68:1732-1740.
- Aziz, N., Nishanian, P., Mitsuyasu, R., Detels, R., Fahey, J.L. (1999). Variables that affect assays for plasma cytokines and soluble activation markers. *Clin Diagn Lab Immunol.* 6:89-95.
- Bandeira-Melo, C., Herbst, A., Weller, P.F. (2001). Eotaxins. Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 24:653-657.
- Bartemes, K.R., McKinney, S., Gleich, G.J., Kite, H. (1999). Endogenous platelet-activating factor is critically involved in effector functions of eosinophils stimulated with IL-5 or IgG. *J Immunol.* 162:2982-2989.
- Beller M., Thiel, K., Thul, P.J., Jäckle, H. (2010). Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus. *FEBS Lett.* 584:2176-2182.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *J Biochem Physiol.* 37:911-913.
- Bock, P.M., Peralta, J.S. (2009). Alterações estruturais e nutricionais em lipídeos submetidos a processamento químico e aquecimento. *La Salle - Rev EDICIC.* 14:77-86.
- Bozza, P.T., Payne, J.L., Goulet, J.L., Weller, P.F. (1996a). Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J Exp Med.* 183:1515-1525.
- Bozza, P.T., Payne, J.L., Morham, S.G., Langenbach, R., Smithies, O., Weller, P.F. (1996b). Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation:

- cyclooxygenase independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:11091-11096.
- Bozza, P.T., Yu, W., Penrose, J.F., Morgan, E.S., Dvorak, A.M., Weller, P.F. (1997). Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med*. 186:909-920.
- Bozza, P.T., Magalhães, K.G., Weller, P.F. (2009). Leukocyte lipid bodies – Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 1791:540-551.
- Bozza, P.T., Weller, P.F. (2001). Arachidonyl trifluoromethyl ketone induces lipid body formation in leukocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 64:227-230.
- Brasaemle, D.L., Rubin, B., Harten, I.A., Gruia-Gray, J., Kimmel, A.R., Londos, C. (2000). Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem*. 275:38486-38493.
- Cerasoli, E., Ravi, J., Garfagnini, T., Gnaniah, S., le Pevelen, D., Tranter, G.E. (2014). Temperature denaturation and aggregation of a multi-domain protein (IgG1) investigated with an array of complementary biophysical methods. *FEBS J*. 275:4280-4295.
- Cham, B.E., Knowles, B.R. (1976). A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation. *J Lipid Res*. 17:176:181.
- Chen, J.S., Greenberb, A.S., Wang, S.M. (2002). Oleic acid-induced PCK isoenzyme translocation in RAW 264.7 Macrophages. *J Cell Biochem*. 86:784-791.
- D'Ávila, H., Maya-Monteiro, C.M., Bozza, P.T. (2008). Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int Immunopharmacol*. 8:1308-1315.
- D'Avila, H., Freire-de-Lima, C.G., Roque, N.R., Teixeira, L., Barja-Fidalgo, C., Silva, A.R., Melo, R.C., Dosreis, G.A., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T. (2011). Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E generation and increased parasite growth. *J Infect Dis*. 204:951-961.
- De Jager, W., Bourcier, K., Rijkers, G.T., Prakken, B.J., and Seyfert-Margolis, V. (2009). Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. *BMC Immunol*. 10:52.
- de Assis, E.F., Silva, A.R., Caiado, L.F., Marathe, G.K., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M., McIntvre, T.M., Bozza, P.T., de Castro-Faria-Neto, H.C. (2003). Synergism between platelet-activation factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *J Immunol*. 171:2090-2098.
- Farese, R.V., Farese Jr., R.V., Walther, T.C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell*. 139:855-860.
- Greenspan, P., Mayer, E.P., Fowler, S.D. (1985). Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol*. 100:965-973.
- Huang, W.C, Chen, J.S. (2006). Nitric Oxide-independent lipid metabolism in RAW 264.7 macrophages loaded with oleic acid. *Cell Biol Int*. 30:947-951.
- Kim, E., Miller, I., Aja, S., Landree, L.E., Pinn, M., Mcfaden, J., Kuhajda, F.P., Moran, T.H., Ronnett, G.V. (2004). C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 279:19970-19976.

- Klinkner, A.M., Waites, C.R., Kerns, W.D., Bugelski, P.J. (1995). Evidence of foam cell and cholesterol crystal formation in macrophages incubated with oxidized LDL by fluorescence and electron microscopy. *J Histochem Cytochem.* 43:1071-1078.
- La Cava A., Matarese G. (2004). The weight of leptina in immunity. *Nat Rev Immunol.* 4:371-379.
- Lam, Q.L., Lu, L. (2007). Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol.* 4:1-13.
- Levitsky, D.I., Pivovarova, A.V., Mikhailova, V.V., Nikolaeva, O.P. (2008). Thermal unfolding and aggregation of actin. *FEBS J.* 275:4280-4295.
- Maya-Monteiro, C.M., Bozza, P.T. (2008). Leptin and mTOR: partners in metabolismo and inflammation. *Cell Cycle.* 7:1713-1717.
- Maya-Monteiro, C.M., Almeida, P.E., D'Ávila, H., Martins, A.S., Rezende, A.P., Castro-Faria-Neto, H., Bozza, P.T. (2008). Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 283:2203-2210.
- McGookey, D.J., Anderson, R.G. (1983). Morphological characterization of cholesteryl ester cycle in cultured mouse macrophage foam cells. *J Cell Biol.* 97:1156-1168.
- Melo, R.C.N., D'Ávila, H., Fabrino, D.L., Almeida, P.E., Bozza, P. (2003). Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell.* 35:59-67.
- Melo, R.C., Paganoti, G.F., Dvorak, A.M., Weller, P.F. (2013). The internal architecture of leukocyte lipid body organelles captured by three-dimensional electron microscopy tomography. *PLoS One.* 8:e59578.
- Mota, L.A.M., Roberto-Neto, J., Monteiro, V.G., Lobato, C.S.S., Oliveira, M.A., Cunha, M., D'Ávila, H., Seabra, S.H., Bozza, P.T., DaMatta, R.A. (2014). Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associates to the parasitophorous vacuole and lower microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, in press.*
- Murphy, D.J. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma.* 249:541-585.
- Oelkers, P., Cromley, D., Padamsee, M., Billheimer, J.T., Sturley, S.L. (2002). The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. *J Biol Chem.* 277:8877-8881.
- Ohsaki, Y., Suzuki, M., Fujimoto, T. (2014). Open questions in lipid droplet biology. *Chem Biol.* 21:86-96.
- Pacheco, P., Bozza, F.A., Gomes, R.N., Bozza, M., Weller, P.F., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T. (2002). Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol.* 169:6498.
- Pacheco, P., Vieira-de-Abreu, A., Gomes, R.N., Barbosa-Lima, G., Wermelinger, L.B., Maya-Monteiro, C.M., Silva, A.R., Bozza, M.T., Castro-Faria-Neto, H.C., Badeira-Melo, C., Bozza, P.T. (2007). Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B₄-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by immune response. *J. Immunol.* 179:8500-8508.
- Paranjape, S. (2004). Goat serum: an alternative to fetal bovine serum in biomedical research. *Indian J Exp Biol.* 42:26-35.

- Pierce Biotechnology Inc. (2005) Technical Resource: Protein stability and storage. TR0043.1. Disponível em <http://sites.bio.indiana.edu/~chenlab/protocol_files/protein_storage.pdf>. Acessado em 09/05/2014.
- Pol, A., Martin, S., Fernandez, M.A., Ferguson, C., Carozzi, A., Luetterforst, R., Enrich, C., Parton, R.G. (2004). Dynamic and regulated association of cavelin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. *Mol Biol Cell*. 15:99-110.
- Pu, J., Ha, C.W., Zhang, S., Jung, J.P., Huh, W.K., Liu, P. (2011). Interatomic study on interaction between lipid droplets and mitochondria. *Protein Cell* 2:487-496.
- Robenek, M.J., Severs, N.J., Schlattmann, K., Plenz, G., Zimmer, K.P., Troyer, D., Robenek, H. (2004). Lipid partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *FASEB J*. 18:866-868.
- Robenek, H., Robenek, M.J., Buers, .I, Lorkowski, S., Hofnagel, O., Troyer, D., Severs, N.J. (2005). Lipid droplets gain PAT family proteins by interaction with specialized plasma membrane domains. *J Biol Chem*. 280:26330-26338.
- Robenek, H., Robenek, M.J., Troyer, D. (2005). PAT family proteins pervade lipid droplet cores. *J Lipid Res*. 46:1331-1338.
- Ross, R., (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 362:801-809.
- Sandager, L., Gustavsson, M.H., Stahl, U., Dahlqvist, A., Wiberg, E., Banas, A., Lenman, M., Ronne, H., Stymne, S. (2002). Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. *J Biol Chem*. 277:6478-6482.
- Schmitz, G., Grandl, M. (2008). Lipid homeostasis in macrophages – implications for atherosclerosis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 160:93-125.
- Silva, A.R., Pacheco, P., Vieira-de-Abreu, A., Maya-Monteiro, C.M., D'Alegria, B., Magalhães, K.G., de Assis, E.F., Bandeira-Melo, C., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T. (2009). Lipid bodies in oxidized LDL-induced foam cells are leukotriene-synthesizing organelles: a MCP-1/CCL2 regulated phenomenon. *Biochim Biophys Acta*. 1791:1066-1075.
- Silva; A.R., Assis, E.F., Caiado, L.F., Marathe, G.K., Bozza, M.T., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M., Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C. (2002). Monocyte chemoattractant protein-1 and 5-lipoxygenase products recruit leukocytes in response to platelet-activating factor-like lipids in oxidized low-density lipoprotein. *J Immunol*. 168: 4112-4120.
- Suzuki, M., Shinohara, Y., Ohsaki, Y., Fujimoto, T. (2011) Lipid droplets: size matters. *J. Electron Microsc.* 60 :S101-S116.
- Van Manen, H.J., Kraan, Y.M., Roos, D., Otto, C. (2005). Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci. U S A*. 102:10159-10164.
- Walther, T.C., Farese Jr., R.V. (2009) The life of lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta*. 1791:459-466.
- Weller, P.F, Ackerman, S.J., Nicholson-Weller, A., Dvorak, A.M. (1989). Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. *Am J Pathol*. 135:947-959.

- Weller, P.F., Monahan-Earley, R.A., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M. (1991a). Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. *Am J Pathol.* 138:141-148.
- Weller, P.F., Ryeom, S.W., Picard, S.T., Acherman, S.J., Dvorak, A.M. (1991b). Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils : formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein Kinase C. *J Cell Biol.* 113:137-146.
- Xu, W., Yu, L., Zhou, W., Luo, M. (2006). Resistin increases lipid accumulation and CD36 expression in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 351:376-382.
- Yang, H., Galea, A., Sytnyk, V., Crossley, M. (2012). Controlling the size of lipid droplets: lipid and protein factors. *Curr Opin Cell Biol.* 24:509-5016.
- Zhao, Z.J., Chen, K.X., Liu, Y.A., Wang, C.M., Cao, J. (2014). Decreased circulating leptin and increased neuropeptide Y gene expression are implicated in food deprivation-induced hyperactivity in striped hamsters, *Cricetulus barabensis*. *Horm Behav.* 65:355-362.
- Zweytick, D., Athenstaedt, K., Daum, G. (2000). Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta.* 1469:101-120.

4.3. Manuscrito 2

Soro de camundongo indutor de corpos lipídicos em macrófagos de diferentes espécie e classe de vertebrado e gênese temporal e associação dessa organela com retículo endoplasmático em macrófagos murinos

Laura Azeredo Miranda Mota¹, Thiago Torres de Aguiar¹, Sérgio Henrique Seabra², Renato Augusto DaMatta^{1*}.

1 Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

2 Laboratório de Tecnologia em Bioquímica e Microscopia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*Autor de correspondência: Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

E-mail: renato@uenf.br, Tel: +55 (22) 2739-7310, Fax: +55 (22) 2739-7178

Resumo

Avanços recentes têm transformado nosso entendimento sobre os corpos lipídicos (CL). Uma vez considerados grânulos de estoque lipídico, CL são agora reconhecidos como organelas multifuncionais que afetam muitos aspectos da biologia celular e metabolismo lipídico. Contudo, questões fundamentais no que tange a biogênese desta organela permanecem sem resposta. Soro de camundongo (SC) induz grande número de CL em macrófagos peritoneais de camundongo, no entanto, não sabemos se esta indução pode ocorrer em outras linhagens de macrófagos. A gênese de CL em macrófagos peritoneais de camundongo ocorre com aumento progressivo do número desta organela ao longo de 24h de cultivo com SC, apresentando crescimento notável nos tempos de 8, 12 e 24 h. Além disso, associação de CL com o retículo endoplasmático e variação de osmiófilia foram observadas. SC também induz geração de CL em macrófagos murinos RAW264, J774-A1, medular e alveolar após cultivo de 24 h. Esse soro também tem poder de indução de CL em macrófagos peritoneais de rato e em uma linhagem de macrófago de galinha (HD11). Porém, soro de rato também foi capaz de gerar CL nos macrófagos de rato, ressaltando que a homologia soro versus célula é um fator relevante. O poder indutor de CL pelo SC mostra a possibilidade deste soro ser utilizado em modelo de estudo da gênese desta organela em diferentes tipos de macrófagos contribuindo para entendimento da biogênese e funcionalidade desta organela.

Palavras chaves: macrófagos, corpos lipídicos, soro de camundongo, gênese.

4.3.1- Introdução

Corpos lipídicos (CL) são as organelas celulares pouco caracterizadas (Walther & Farese Jr, 2009). Consideradas por muito tempo como simples depósitos de armazenamento de lipídios, estas organelas dinâmicas e notáveis foram recentemente implicadas em muitos processos biológicos. CL estão presentes em muitas células, incluindo adipócitos, células esteroideogênicas, hepatócitos e células engajadas em processos inflamatórios (revisão em Farese Jr & Walther, 2009; Murphy, 2012; Bozza *et al.*, 2009). CL estão envolvidos no armazenamento e mobilização de lipídios (Murphy *et al.*, 2009), bem como no desenvolvimento de doença (Melo *et al.*, 2013). Estas organelas possuem uma arquitetura peculiar formada por uma monocamada de fosfolipídios de composição única (Tsuchi-Sato *et al.*, 2002), o que lhe confere diferenciação das demais organelas. Além disso, não é fácil preservar estas organelas e uma vez submetidas a processos rotineiros de preparação da amostra há extração de conteúdo lipídico, requerendo preparação específica (Ohsaki *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2011). Diversos indutores são utilizados no estudo da gênese de CL (Bozza *et al.*, 2009). O aumento do número de CL é observado em inflamação (Bozza *et al.*, 2009), células cancerígenas (Accioly *et al.*, 2008; Bozza & Viola 2010) e em condições de excesso de lipídios (Suzuki *et al.*, 2011). Macrófagos peritoneais de camundongos cultivados com soro de camundongo (SC) geram muitos CL, produzem mais prostaglandina E₂ (PGE₂) e menos óxido nítrico (NO), sendo menos eficiente no controle do crescimento de *Toxoplasma gondii* (Mota *et al.*, 2014). Ainda não se sabe o fator responsável pelo disparo da gênese de CL em macrófagos cultivados com SC, mas resultados preliminares indicam que SC têm muito mais constituintes lipídicos do que o soro fetal bovino. Nossa hipótese é que o SC pode induzir CL em diferentes tipos de macrófagos e de diferentes espécies.

Diferentes modelos de biogênese de CL têm sido propostos. O primeiro e mais aceito modelo de geração de CL sugere brotamento desta organela a partir do retículo endoplasmático (RE) para o citoplasma, circundado por uma monocamada de fosfolipídios provenientes da membrana citosólica do RE (Martin & Parton, 2006; Murphy & Vance 1999). Contudo, hipóteses alternativas sugerem a formação de CL ao longo e não dentro do RE (Robenek *et al.*, 2004; 2006). A revelação de um sistema complexo de membranas dentro do CL

suporta o modelo de formação de CL por incorporação de membranas do RE (Melo *et al.*, 2013), sendo corroborado pela presença de proteínas transmembrana no interior de CL (Wan *et al.*, 2007; Bartz *et al.*, 2007). Até o momento não há nenhuma evidência concreta dos modelos de geração de CL. Portanto, não existe consenso no modelo de gênese de CL. O estudo temporal da gênese de CL no modelo de macrófagos murinos cultivados com SC pode ajudar no melhor entendimento desse processo.

Neste presente estudo a ocorrência da geração de CL em macrófagos murinos e de outras espécies como rato e galinha cultivados com SC foi investigada. Aqui mostramos que o cultivo de macrófagos murino de linhagem RAW 264, J774-A1, macrófago medular, alveolar com SC apresentam grande número de CL. A geração desta organela também ocorre em macrófagos peritoneais de rato e macrófagos de galinha (linhagem HD11). Sabendo do grande poder indutor de CL pelo SC, este soro foi utilizado para observação temporal da gênese de CL e sua possível associação com RE. Nossos resultados mostram o SC como um potente indutor de CL, capaz de disparar a gênese desta organela não somente em espécies murinos como também em diferentes espécies, ademais, existe associação do RE com o CL nascente. Portanto, o uso de SC em cultura é alternativa para modelo de estudo da gênese de CL.

4.3.2- Material e métodos

4.3.2.1- Obtenção e cultivo de macrófagos

4.3.2.1.1- Macrófagos peritoneais de camundongo

Os macrófagos foram obtidos após lavado peritoneal em camundongos Suíços, machos, adultos (6 a 8 semanas/ 30 a 40 g) utilizando 10 mL de Hank's por animal, eutanasiados por CO₂ em câmara de gás. Para plaqueamento em placa de 24 poços foram usados 4 animais por experimento. A suspensão celular do lavado foi centrifugada a 500 g por 10 min a 4 °C. O sedimento foi ressuspenso em 4 mL de solução de Hank's e semeados 150 µL por poço. Após aderência de 1 h a 37 °C, atmosfera de 5% de CO₂, as células foram lavadas 2 vezes com solução de Hank's e cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com 2 ou 10 % de SC ou soro fetal bovino (SFB), ou soro de rato (SR) ou soro de galinha (SG).

4.3.2.1.2- Macrófagos Murinos RAW 264, J774-A1 e Alveolares

As linhagens de macrófago murino RAW 264 (Sigma-Aldrich – 91062701), J774-A1 e alveolares (ATCC – CRL-2019) foram cultivadas em garrafas de 25 cm² com meio DMEM suplementado com 5% de SFB a 37 °C, atmosfera de 5% de CO₂. Atingindo confluência, as células foram removidas da garrafa utilizando 1 mL de tripsina por poucos segundos seguida da adição de 4 mL de DMEM suplementado com 5% de SFB. As células soltas foram centrifugadas a 500 g, 10 min, 20 °C, ressuspensas em 1 mL de DMEM, contadas na câmara de Neubauer e plaqueadas na concentração de 1 x 10⁵ células sobre a lamínula em placa de 24 poços com 500 µl de DMEM suplementado com 2 e 10% de SFB e SC.

4.3.2.1.3- Macrófago Medular

Após eutanásia em câmara de CO₂ camundongos Suíços machos de 3 semanas de idade tiveram seus ossos fêmures removidos e todo tecido muscular adjacente foi raspado. Para remoção das células utilizou-se uma seringa de 10 mL com agulha e meio de cultura DMEM-F12 (Sigma-Aldrich – 85020C) sem soro (20 mL por cada animal). A suspensão celular foi colocada diretamente em placa de petri e os grumos celulares foram desfeitos por vigorosa pipetagem. As células foram incubadas por 1h a 37 °C e 5% CO₂, lavadas e cultivadas por 7 dias. Para realização do experimento as células foram raspadas e semeadas sobre lamínulas redondas de vidro e cultivadas em DMEM-F12 suplementado com 2 ou 10% de SC ou SFB e 20% do MCSF (macrophage colony-stimulating factor). Este fator foi obtido a partir da cultura de 1X10⁶ células L929 (Sigma-Aldrich – 85011425) viáveis, verificadas pela coloração de azul de tripan (0,1% de azul de tripan em PBS por 5 minutos na proporção 1:1 – célula: solução de azul de tripan). Essas células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² com meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB. Após 7 dias, este meio condicionado foi centrifugado (1000g ,4 °C), e o sobrenadante aliquoteado e estocado a -20 °C (Seabra *et al.*, 2002).

4.3.2.1.4- Macrófagos de rato

Macrófagos de rato foram após lavado peritoneal em ratos wistar, machos, adultos (20 mL de Hank's/animal), pesando 250 gr. O processamento seguinte foi igual ao realizado em macrófagos peritoneais de camundongos

(item 1.2). As células de rato foram cultivadas em DMEM com 2% e 10% de SR ou de SC por 24 h.

4.3.2.1.5- Linhagem de macrófagos de galinha transformados HD11

A linhagem de macrófagos de galinha transformada HD11 foi cultivada em garrafas de cultura de células de 25 cm² contendo DMEM suplementado com 10% de soro de SFB, incubados a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Na passagem anterior a experimentação as células eram cultivadas com 5% de SFB. Para experimentação as células foram retiradas das garrafas de cultura com tripsina-versene (0,2%:0,02%), centrifugadas (500 g, 10 min, temperatura ambiente), colocadas sobre lamínulas em placas de 24 poços nas proporções de 1 x 10⁴ e 1 x 10⁵ células por poço e cultivadas em DMEM contendo 2% ou 10% de SFB (REF 12657-029) ou SC ou SG (CAT- 16110-082) da gibco.

4.3.2.2- Obtenção de soro

4.3.2.2.1- Soro de camundongo e de rato

O SC foi obtido a partir da coleta de sangue de camundongos Suíços, machos adultos (6 a 8 semanas/ 30 a 40 g), por punção cardíaca utilizando seringa de 3 mL e agulha 26G após eutanásia por CO₂ em câmara de gás. O sangue obtido foi mantido na seringa por 2-3 h a 25 °C para coagular. Posteriormente, as seringas foram acondicionadas na geladeira por 1 h. O soro foi coletado com uma pipeta *Pasteur*, transferido para tubos cônico (15 mL) e centrifugado a 600 g por 10 min. O soro foi inativado (30 min, 56 °C), aliquoteado (200 µL) e estocado no freezer a -20 °C.

O SR foi obtido da mesma maneira que SC, porém ratos wistar adultos, pesando 250 g foram utilizados no processo.

4.3.2.2.2- Soro fetal bovino e de galinha

O SFB (REF: 12657-029) e de galinha (CAT: 16110-082) utilizados nos experimentos são da linha comercial Gibco, enquanto do SC foi preparado em nosso laboratório (Monteiro *et al.*, 2005; Mota *et al.*, 2014).

4.3.2.3- Marcação e quantificação de corpos lipídicos

Macrófagos cultivados por 24 h com 2 ou 10% de SFB, SC, SR e SG foram fixados por 10 min com 4% de formaldeído recém-preparado em PBS. Após esse período as células foram lavadas em PBS por 2 vezes, incubadas por 15 min com o corante Vermelho de Nilo a 1 µg/mL, e lavados novamente em PBS (Greenspan *et al.*, 1985). A seguir, as lamínulas foram montadas em 10 µL de

ProLong Gold (Invitrogen P36931) e seladas com esmalte, sendo observadas no dia seguinte em microscópio de fluorescência Axioplan Zeiss equipado com contraste interferencial de Nomarski, lâmpada HBO 100 e câmera digital AxioCam Mrc5 gerenciada pelo programa Axiovision. Todo o processo de manipulação do marcador fluorescente foi feito ao abrigo de luz. Esse processo também foi realizado para análise da gênese de CL, sendo os macrófagos cultivados por 0,1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h com 2% de SC.

Para a quantificação de CL, os macrófagos foram classificados em categorias que variaram de acordo com a quantidade de CL que cada um possuía. Estas categorias compreenderam macrófagos sem CL, com 1 até 3, com 4 até 6, com 7 até 9 ou com 10 ou mais CL. Em cada lamínula 100 células foram contabilizadas e distribuídas nas categorias de acordo com a quantidade de CL observados; pelo menos 3 lamínulas em cada variante experimental por experimento foram quantificadas para obtenção de média e desvio padrão.

Os resultados foram representados graficamente utilizando-se o programa GraphPad Prism 5. Os gráficos utilizados foram do tipo ordenada e abscissa. No eixo das abscissas estão as diferentes categorias de macrófagos baseadas no número de CL presentes; no eixo das ordenadas está a quantidade de células referente a cada categoria. Os gráficos foram testados estatisticamente com o uso do programa GraphPad Prism 5 pelo teste de Anova sendo o valor de *P* representado na legenda quando houve diferença estatística.

4.3.2.4- Análise ultraestrutural

Para análise da geração dos CL macrófagos foram cultivados por 5, 10, 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h em 2% de SC para realização da cinética da gênese de CL. As células foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato (0,1M, pH 7,2), lavadas em tampões fosfato e imidazol (0,1M, pH 7,5) e pós-fixadas em 2% de tetróxido de ósmio em tampão imidazol por 2 h, protegido da luz. Lavadas novamente seguindo desidratação em série alcoólica e embebido em resina epóxi (Epon ®). Cortes semi-finos foram contrastados com acetato de uranila e examinados no microscópio eletrônico de transmissão 900.

4.3.3- Resultados

4.3.3.1- Análise da Gênese de Corpos Lipídicos

A geração de CL é disparada por muitos indutores em leucócitos (Bozza *et al.*, 2009). A gênese de CL tem sido observada em diversos modelos (Murphy & Vance 1999; Robenek *et al.*, 2006; Fujimoto & Parton 2011; Melo *et al.*, 2013), em que a indução de CL se dá pela suplementação do meio de cultivo com lipídios exógenos. Macrófagos peritoneais de camundongo cultivados com SC geram muitos CL, sendo possível sua utilização no estudo desta organela (Mota *et al.*, 2014).

4.3.3.1.1 – Cinética da geração de corpos lipídicos

Sabendo que o SC dispara a gênese de CL (Mota *et al.*, 2014) uma cinética de geração de CL foi realizada cultivando macrófagos peritoneais com 2% de SC por 24h, seguido de marcação com Vermelho de Nilo e contagem de CL (Figura 1). A cinética de geração de CL em macrófagos peritoneais mostrou aumento progressivo do número de CL ao longo de 24h de cultivo, mostrando aumento notável nos tempos de 8, 12 e 24 h de cultivo (Figura 1).

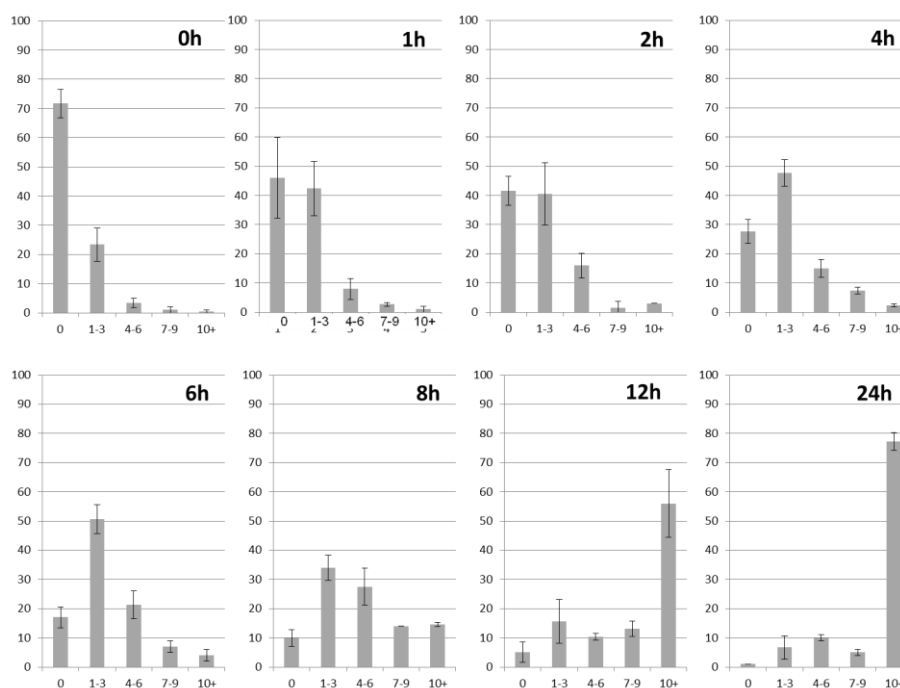


Figura 1. Cinética da geração de corpos lipídicos em macrófagos cultivados por 24 horas com 2% de soro de camundongo (SC). No eixo das coordenadas temos o número de macrófagos e no das abcissas temos a disposição destas células em categorias de macrófagos definidas pelo número de corpo lipídico (CL) em cada célula.

4.3.3.1.2- Associação de corpo lipídico com retículo endoplasmático

A geração de CL foi analisada verificando provável co-localização com o RE, sendo possível observar íntima relação do RE com CL (Figura 2). Também foi possível observar porções da membrana do RE rodeando o CL (Figura 2 A, B, C, E, F e H), bem como de apenas uma das faces da membrana do RE (Figura 2 D), não permitindo, portanto, a clara observação se a formação do CL ocorre dentro ou ao longo do RE. Além disso, pode ser vista claramente diferença na osmiofilia (atração a ósmio e, portanto, diferente eletrondensidade) destes CL (Figura 2); CL com alta eletrondensidade (Figura 2 A e G), média (Figura 2 C e E) e baixa (Figura 2 B, F e H) foram observados. Ademais, na Figura 2 H, pode ser observado estruturas semelhantes a membranas e porções amorfas internamente.

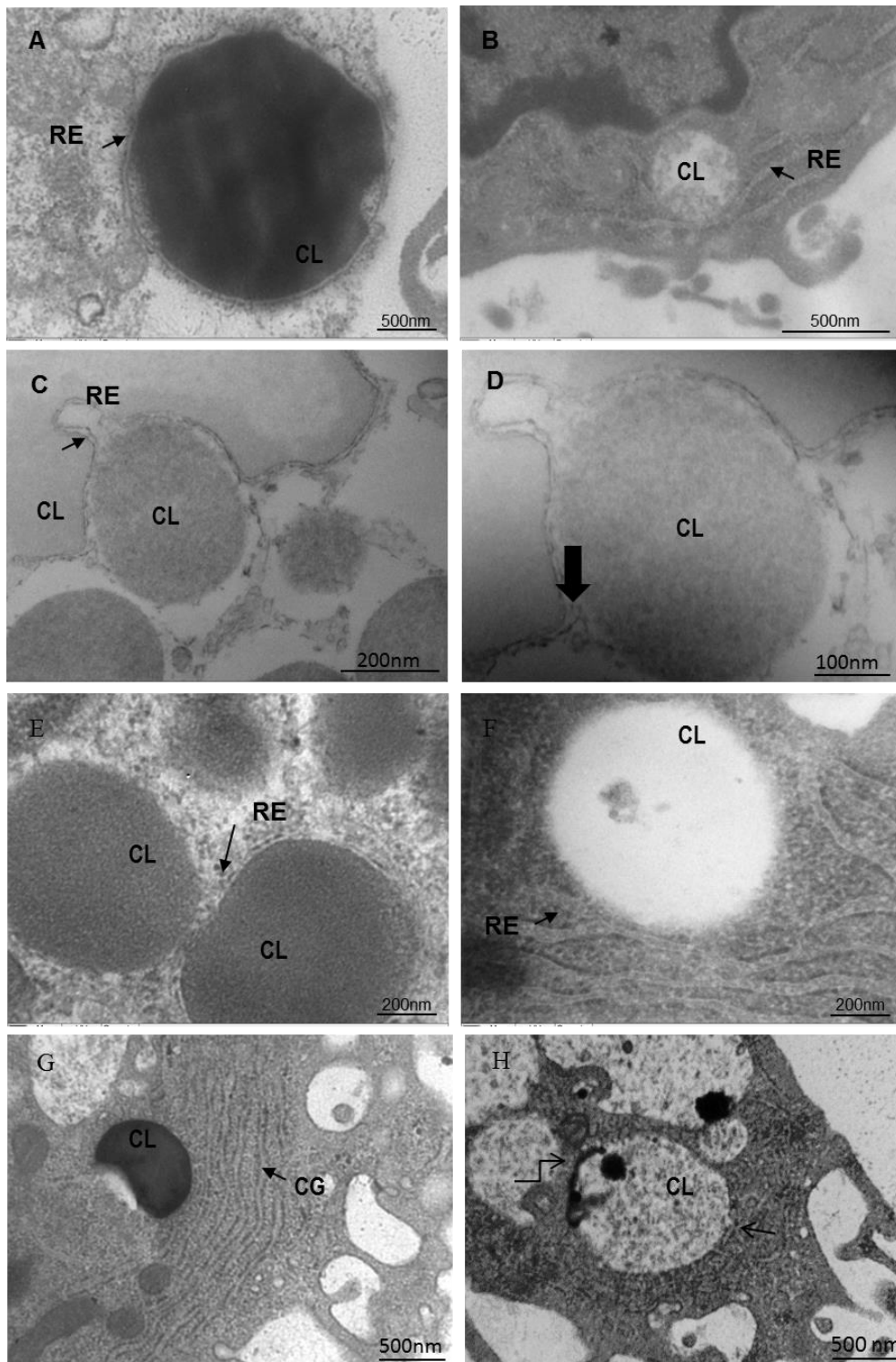


Figura 2. Análise ultraestrutural de corpo lipídico (CL) de macrófagos peritoneais de camundongo cultivados por 5 min (A e B), 45 min (C, D), 1 (E e F), 2 (G) e 4 h (H) em 2% de soro de camundongo (SC). RE – retículo endoplasmático; CG: complexo de Golgi. Seta reta mostrando dupla membranda do RE; seta angulada mostrando porção amorfa no interior do CL (H).

4.3.3.2 – Soro de camundongo induz corpos lipídicos nas diferentes linhagens de macrófagos murinos testadas

Sabendo do grande poder indutor de CL pelo SC, macrófagos murinos RAW 264, J774-A1, medular e alveolar foram cultivados com SC. Com o intuito de verificar se a indução de CL ocorreria em outras espécies que não murinos, macrófagos de rato e de galinha (HD11) foram cultivados com SC.

Todas as linhagens de macrófagos murinos testadas (RAW 264, J774-A1, medular e alveolar) apresentaram maior número de CL quando cultivadas com SC em relação às cultivadas com SFB (Figuras 3 a 6). Também foi observado em todas as linhagens que 2% de SC geraram significativamente mais CL que 10% de SFB (Figuras 3 a 6). Nas linhagens J774-A1 e alveolar não foi observada maior geração de CL ao aumentar a concentração do SC de 2 % para 10% (Figura 4 e 6). No entanto, para as linhagens RAW 264 e medular o aumento da concentração de SC aumentou o número desta organela (Figura 3 e 5).

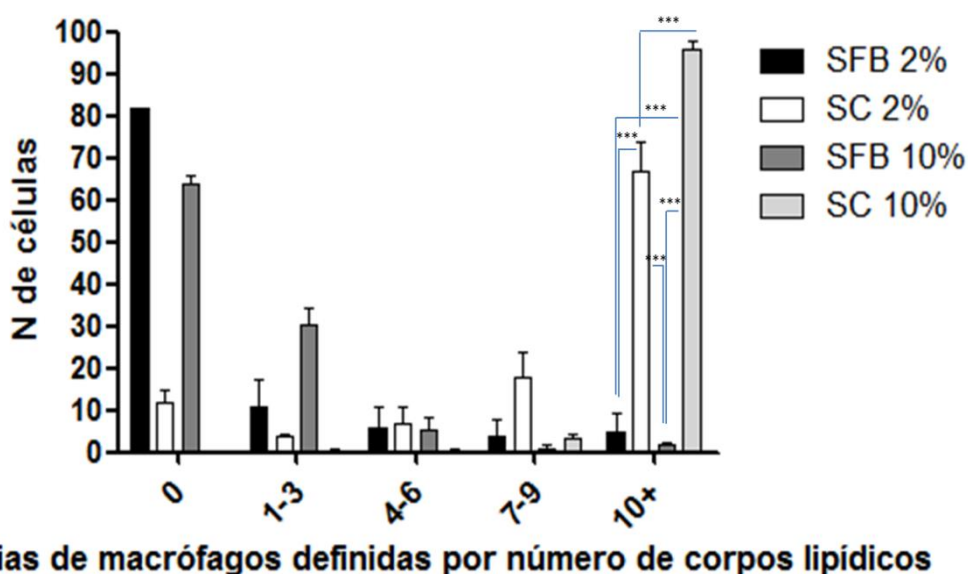


Figura 3. Corpos lipídicos em macrófagos RAW 264. Número de células (N de células) por categoria de macrófagos RAW 264 definida por número de corpos lipídicos (CL) após cultivo com 2 e 10% de soro fetal bovino (SFB) ou soro de camundongo (SC) por 24 h. Média e desvio padrão de três experimentos. ***Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P < 0,001$).

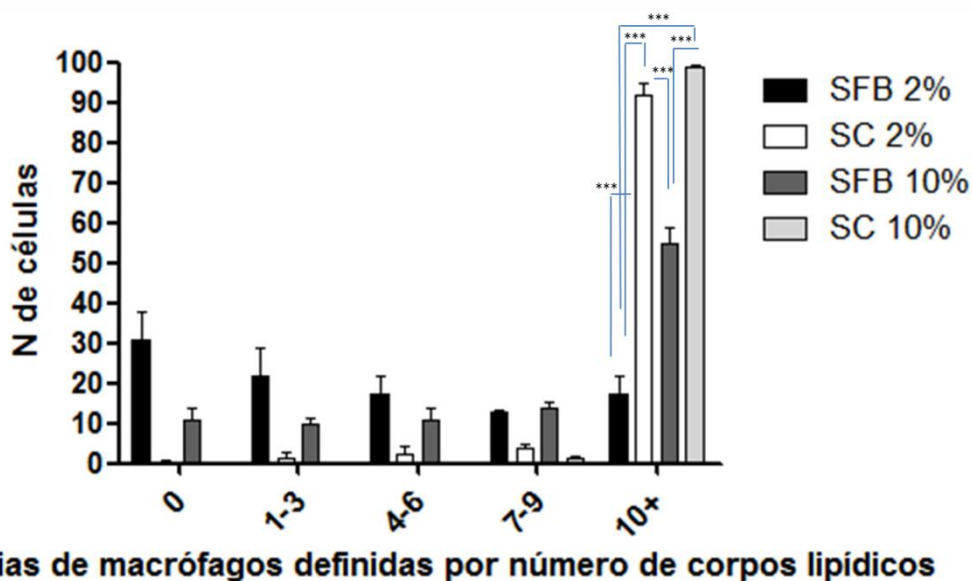


Figura 4. Corpos lipídicos em macrófagos J774-A1. Número de células (N de células) por categoria de macrófagos J774-A1 definida por número de corpos lipídicos (CL) após cultivo com 2 e 10% de soro fetal bovino (SFB) ou soro de camundongo (SC) por 24 h. Média e desvio padrão de três experimentos. ***Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P < 0,001$).

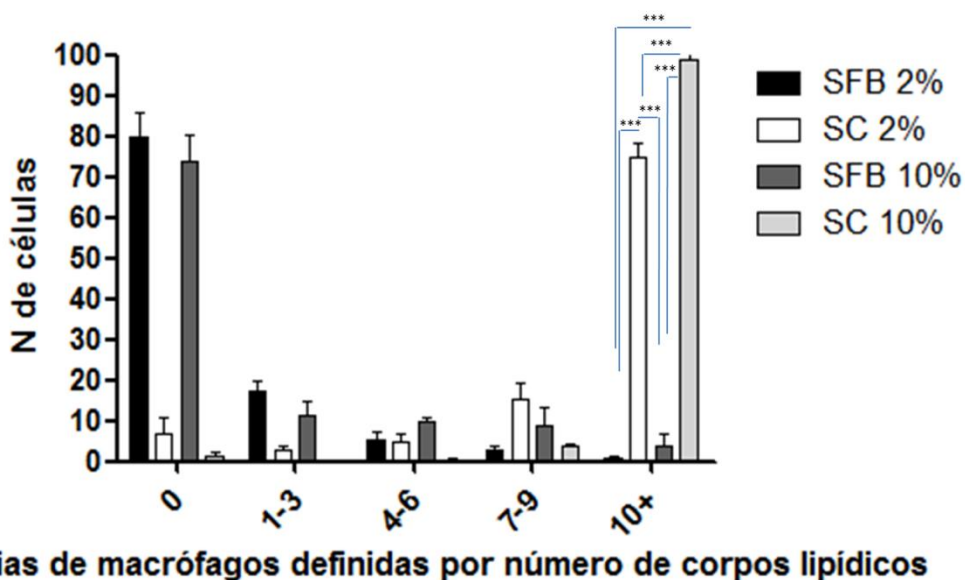
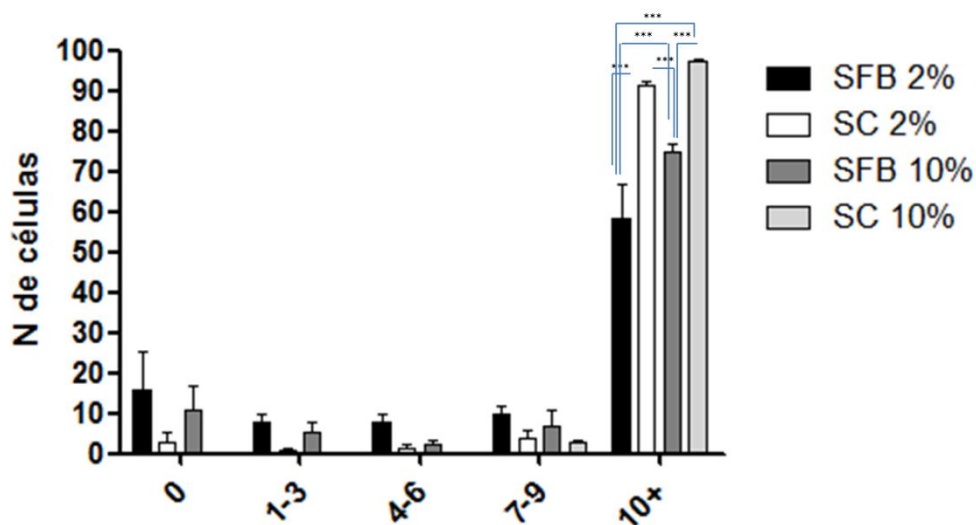


Figura 5. Corpos lipídicos em macrófagos medulares. Número de células (N de células) por categoria de macrófagos medulares definida por número de corpos lipídicos (CL) após cultivo com 2 e 10% de soro fetal bovino (SFB) ou soro de camundongo (SC) por 24 h. Média e desvio padrão de três experimentos.***Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P < 0,001$).



Categorias de macrófagos definidas por número de corpos lipídicos

Figura 6. Corpos lipídicos em macrófagos alveolares. Número de células (N de células) por categoria de macrófagos alveolares definida por número de corpos lipídicos (CL) após cultivo com 2 e 10% de soro fetal bovino (SFB) ou soro de camundongo (SC) por 24 h. Média e desvio padrão de três experimentos.***Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P < 0,001$).

4.3.3.3 – Soro de camundongo é capaz de induzir corpos lipídicos em macrófagos de rato e de galinha

4.3.3.3.1 - Macrófagos de rato

O SC gerou CL em macrófagos de rato (MoRt) de maneira proporcional à quantidade de soro utilizada na cultura (Figura 7 B). Macrófagos de camundongo (MoCam) cultivados com 2% de soro de rato (SR) apresentaram poucos CL, porém utilizando 10% desse soro em cultura esse disparo foi mais expressivo (Figura 7 A). SC disparou menor gênese de CL nos MoRt do que o SR (Figura 7 B). Apesar de haver geração de CL em MoRt cultivados com SR, a geração de CL pelo SC em macrófagos de camundongo (MoCam) foi maior (Figura 7 A e B). Este fato pode ser constatado em MoCam cultivados com 10% de SR quando comparado ao MoRt cultivado com 10% de SC (Figura 7 A e B). O grande poder indutor de CL pelo SC também pode ser observado no cultivo de MoCam com 10% de SC comparado ao cultivo de MoRt com 10% de SR e no cultivo de MoCam com 2% de SR comparado ao cultivo de MoRt com 2% de SC (Figura 7). MoRt cultivados com 10% de SC apresentou um

pouco mais da metade do número de CL, comparado a MoCam cultivados com 2% de SC (Figura 7 A e B). O SR também possui capacidade de disparar gênese de CL, sendo mais notável em macrófagos de rato. Isto pode ser claramente observado quando comparado o número de CL de MoRt cultivado com 2% de SR com MoCam cultivados com a mesma concentração de SR (Figura 7 A e B). Ambos os soros possuem capacidade de gerar CL sendo maior quando ocorre homologia do soro com a célula como em MoCam comparado com MoRt cultivados com 10% de SR ou MoCam cultivado com 2% de SR ou de SC (Figura 7). Ao cultivar MoCam com 10% de SC e MoRt com 10% de SR houve geração de grande número de CL em ambos os macrófagos, não havendo nenhuma diferença significativa entre eles, ou seja, quando ocorre homologia do soro com as células (Figura 7). O poder da homologia, entre soro e macrófagos, na geração de CL também pode ser observado em MoRt cultivados com 10% de SC comparado a MoRt cultivado com 2% de SR, onde também não houve nenhuma diferença significativa (Figura 7).

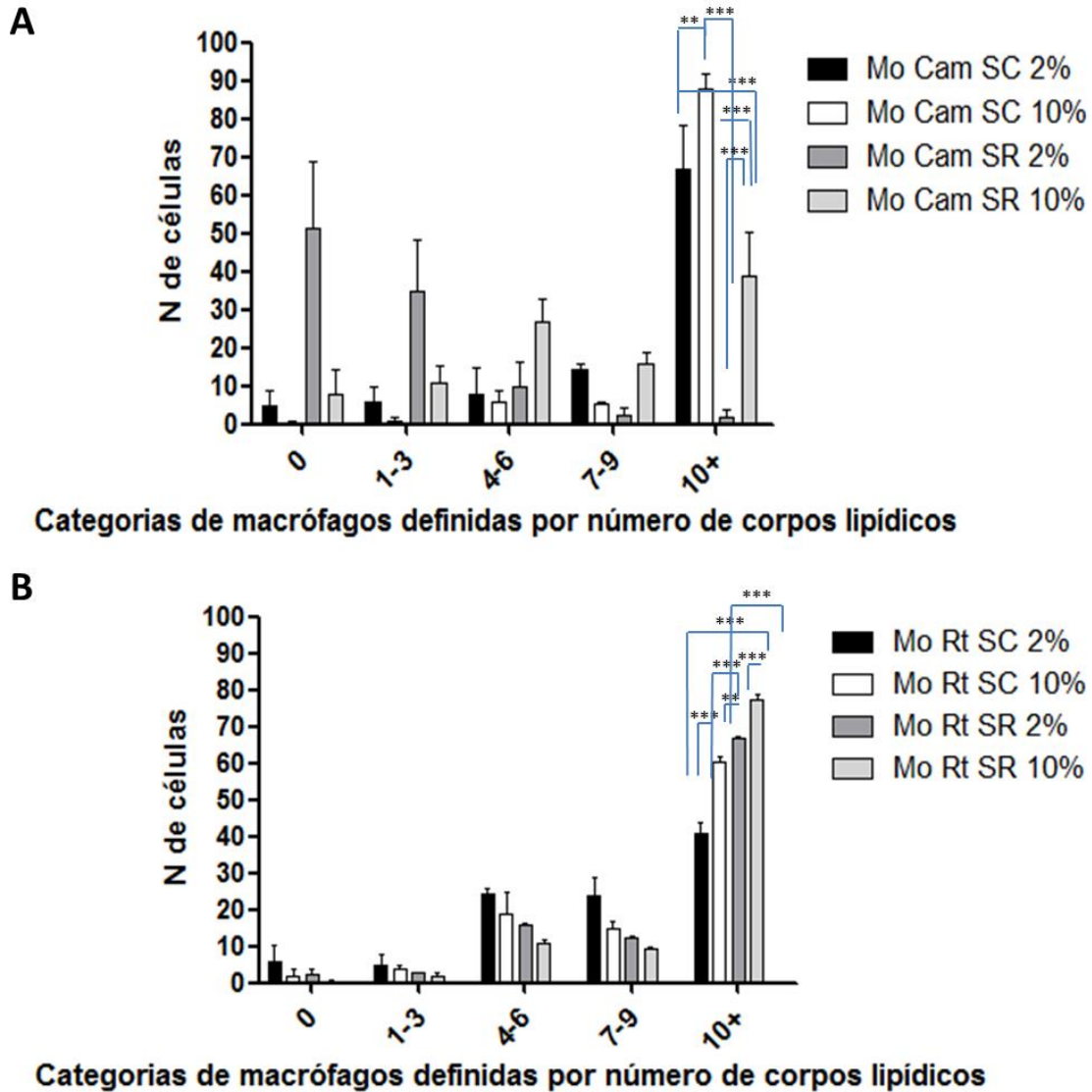
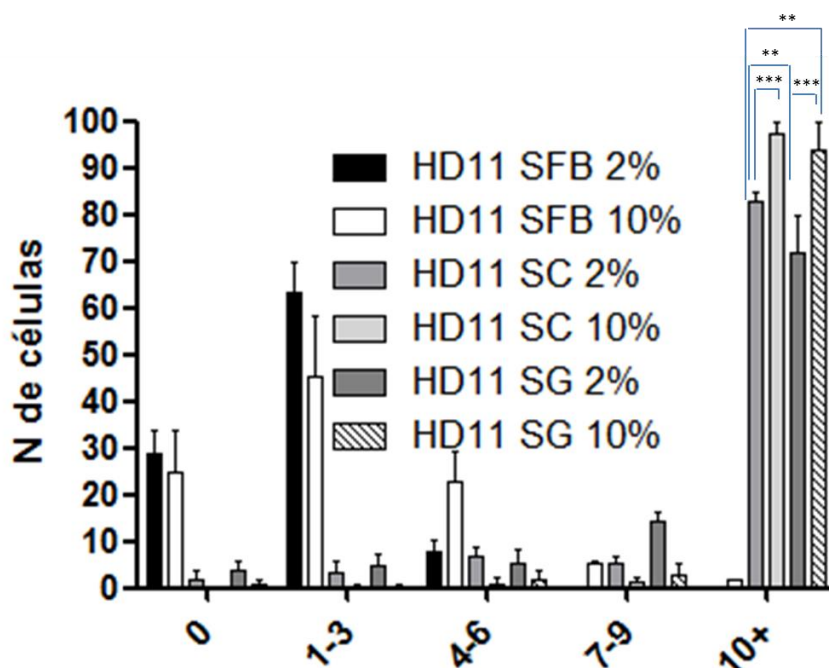


Figura 7. Corpos lipídicos em macrófagos peritoneais de camundongo e de rato. Número de células (N de células) por categoria de macrófagos peritoneais de camundongo (A) ou de rato (B) definida por número de corpos lipídicos (CL) após cultivo com 2 e 10% de soro de camundongo (SC) ou soro de rato (SR) por 24 h. Média e desvio padrão de três experimentos. ***Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P < 0,001$). **Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P < 0,01$)

4.3.3.3.2- Macrófago de galinha (HD11)

O SC induziu CL na linhagem HD11 de macrófagos de galinha (Figura 8). A indução de CL em células HD11 foi maior com 2% de SC comparada a 2% de SG (Figura 8). Aumento no número de CL foi observado com aumento na concentração de 2 para 10% em ambos os soros. A indução de CL

utilizando 10% de SC e SG foi similar (Figura 8). SFB induziu muito pouco CL na linhagem HD11 (Figura 8).



Categorias de macrófagos definidas por número de corpos lipídicos

Figura 8. Corpos lipídicos em macrófagos de HD11. Número de células (N de células) por categoria de macrófagos HD11 definida por número de corpos lipídicos (CL) após cultivo com 2 e 10% de soro de camundongo (SC) ou soro de galinha (SG) por 24 h. Média e desvio padrão de três experimentos. ***Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P < 0,001$); **Valor significativamente diferente entre os soros de acordo com o teste ANOVA ($P < 0,01$).

4.3.4- Discussão

SC dispara a gênese de CL macrófagos peritoneais de camundongo, o que provavelmente leva a alta produção de PGE_2 , decorrente baixa produção de NO, diminuindo, conseqüentemente, o poder microbicida destes macrófagos (Mota *et al.*, 2014). O grande poder indutor de CL pelo SC possibilita a utilização desse soro como modelo de estudo da gênese desta organela, a qual vem ganhando destaque. O estudo da gênese desta organela tem se mostrado importante para o entendimento dos mecanismos que levam a sua geração, bem como mobilização dos lipídios presentes em seu interior, crucial para controle desse processo, auxiliando no tratamento e prevenção de doenças

relacionadas ao metabolismo lipídico. A cinética de geração de CL em macrófagos peritoneais cultivados com SC mostrou aumento progressivo do número de CL ao longo de 24h de cultivo, notável nos tempos de 8, 12 e 24 h de cultivo. Ainda não se sabe se a indução de CL pelo SC se deve a um ou mais fatores presentes neste soro. A presença de CL em macrófagos recém-obtidos do peritônio de camundongos confirma a presença destas organelas como constitutivas de células envolvidas em processos inflamatórios (Bozza *et al.*, 2009). Todos os modelos de biogênese de CL apresentam o RE como ponto de partida (Robenek *et al.*, 2006; Bozza *et al.*, 2009; Ohsaki *et al.*, 2009; Beller *et al.*, 2010; Melo *et al.*, 2013). Em macrófagos peritoneais de camundongos a associação de CL ao RE foi claramente observada. Foi possível observar não somente porções da membrana do RE rodeando o CL (Figura 2 C- seta) como também apenas uma das faces da membrana do RE (Figura 2 D- seta), não permitindo, portanto, a clara observação se a formação do CL ocorre dentro (Ohsaki *et al.*, 2009) ou ao longo do RE (Robenek *et al.*, 2006). Também foi observada a presença de uma estrutura no interior do CL semelhante a membranas e porções amorfas (Figura 2 H - seta), validando a geração de CL por possível incorporação de membrana (Melo *et al.*, 2013). Além disso, foi observada claras diferenças na osmiofilia de CL, em que CL apresentaram diferentes contrastes. Isso pode ser referente a diferentes estágios de maturação do CL, bem como variação do conteúdo lipídico (Cheng, *et al.*, 2009; Fujimoto & Parton, 2011).

Métodos de preparação de amostra específicos para observação do CL são essenciais para seu estudo (Ohsaki *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2011). Haja vista que os métodos tradicionais com reagentes a base de solventes orgânicos resultam na remoção de lipídios destas organelas impossibilitando o estudo (Ohsaki *et al.*, 2005). Alguns métodos de fixação e coloração para microscopia (Cheng *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2011 a e b; Melo *et al.*, 2013) têm sido desenvolvidos permitindo melhor estudo da biogênese de CL. Mesmo utilizando os métodos tradicionais de preparação para microscopia eletrônica, específica para lipídios, a extração de lipídios pode ocorrer (Figura 2 G). Portanto, é importante o estudo de métodos que permitam preparações melhores para que o estudo da gênese ocorra obtendo mais informações sobre esta organela.

O cultivo de macrófagos de origem murina com SC têm sido relatado desde a década de 80. Crocker *et al.*, (1988) observaram que SC aumenta a expressão de hemaglutinina em macrófagos murinos *in vitro*. Nosso grupo também relatou que o cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo com SC apresenta aumento na expressão de sialoadesina, receptor do ácido siálico (Monteiro *et al.*, 2005). Isto facilitou não só a associação aumentada de, como também invasão facilitada em macrófagos murinos por *Trypanosoma cruzi*, cuja superfície é coberta por ácido siálico (Monteiro *et al.*, 2005). O cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo com SC além de apresentar aumento de sialoadesina também apresentou grande número de CL (Mota *et al.*, 2014). Sabendo disso, levantamos a hipótese de que o cultivo de outras linhagens de macrófagos murinos com SC levaria a gênese de CL. A formação de CL em macrófagos murinos tem sido observada em estudos para demonstração da formação de células espumosas. Dentre as linhagens murino utilizadas estão RAW 264 (Berg & Petty, 1988; Chen *et al.*, 2002), J774-A1 (Tabas *et al.*, 1985; Mahlberg *et al.*, 1990; Mori *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2009), macrófagos peritoneais de camundongos (Brown *et al.*, 1979, Pataki *et al.*, 1992; Klinkner *et al.*, 1995; Hakamata *et al.*, 1998, a e b; Choi *et al.*, 2009). A formação de CL também foi observada em macrófagos medulares em infecções por *Mycobacterium avium* que induziam a formação de células espumosas (Caire-Brändli, *et al.*, 2014). Já a formação de CL em macrófagos alveolares tem sido relacionada a doenças do sistema respiratório (Köksal *et al.*, 2005). Para que a geração de CL seja possível nestas células, indutores de natureza lipídica (Klinkner *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2002; de Assis *et al.*, 2003; Schmitz & Grandl, 2008; Choi *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009), hormônios (Maya-Monteiro *et al.*, 2008) e outros indutores são utilizados (Bozza *et al.*, 2009).

Sabendo do poder indutor de CL em macrófagos peritoneais de camundongos e que estas células, sob indução, são capazes de gerar CL, o cultivo das linhagens RAW 264, J774-A1, macrófagos medular e alveolar com SC foi realizado. Todas essas linhagens de macrófagos murinos testadas apresentaram maior número de CL quando cultivadas com SC em relação ao SFB. Também foi observado em todas as linhagens que 2% de SC gerou significativamente mais CL que 10% de SFB. Isto demonstra o poder indutor de CL pelo SC em outras linhagens de macrófagos murinos além do macrófago

peritoneal. Nas linhagens J774-A1 e alveolar não foi observada maior geração de CL ao aumentar a concentração do SC de 2 % para 10%, pois provavelmente o uso de 2% de SC disparou indução de CL muito próxima a capacidade limite destes macrófagos. No entanto, para as linhagens RAW 264 e medular o aumento da concentração de SC aumentou o número desta organela, indicando que existe sensibilidade de concentração na capacidade indutora de CL pelo SC.

Com a indução de CL em diferentes linhagens de macrófagos murinos pelo SC foi levantada a questão do poder de indução em espécies mais distantes filogeneticamente. Partindo de MoRt, mais próximos a camundongos, e de galinha, mais distantes. SC disparou menor gênese de CL nos MoRt do que o SR indicando especificidade de espécies entre os macrófagos e os soros. O transporte de lipídios é realizado através de proteínas carreadoras (Mahley *et al.*, 1984). Devido à homologia soro versus célula o reconhecimento destas proteínas pelos receptores presentes nas células facilitaria a internalização de lipídios culminando na geração de CL. Em homologia MoRt cultivado com SR ou MoCam cultivado com SC, a indução de CL pelo SC em MoCam é maior. O SR também possui capacidade de disparar gênese de CL, sendo mais notável em macrófagos de rato (espécie-específico – homologia entre o soro e célula). Ambos os soros possuem capacidade de gerar CL sendo o SC um indutor de CL mais potente de acordo com as linhagens testadas.

O SC induziu CL na linhagem HD11 de macrófagos de galinha. A indução de CL em células HD11 foi maior com 2% de SC comparada a 2% de SG. Isso demonstra o poder indutor de CL pelo SC não somente em linhagens murino e de rato como também em espécies filogeneticamente mais distantes, inclusive de outras classes de vertebrado, como macrófagos de galinha HD11. Portanto, o SC tem fatores indutores de CL que podem ser mais genéricos atuando em linhagens de macrófagos de espécies homólogas ou não.

4.3.5. Conclusão

SC tem grande poder indutor de CL. Macrófagos peritoneais de camundongo apresentam grande número de CL após 24 h de cultivo em SC. A facilidade de disparo da gênese de CL pelo SC, torna possível sua utilização

em modelos de estudo de geração de CL. A biogênese de CL ocorre não somente em linhagens murino, como também em macrófagos de espécies de rato e galinha. SR também dispara a gênese de CL em MoRt cultivado com SR, favorecendo a homologia soro X células como fator facilitador do processo geração de CL. Porém SC é o maior indutor de CL em todas as linhagens testadas.

4.3.6. Referências

- Accioly, M.T., Pacheco, P, Maya-Monteiro, C.M., Carrossini, N., Robbs, B.K., Oliveira, S.S., Kaufmann, C., Morgado-Diaz, J.A., Bozza, P.T., Viola, J.P. (2008). Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res.* 68:1732-1740.
- Bartz R, Zehmer JK, Zhu M, Chen Y, Serrero G, et al. (2007) Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J Proteome Res.* 6: 3256–3265.
- Beller, M., Thiel, K., Thul, P.J., Jäckle, H. (2010). Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus. *FEBS Lett.* 584:2176-2182.
- Berg, K.A., Petty, H.R. (1988). Cholesteryl ester handling by RAW264 macrophages: response to native and acetylated low density lipoprotein. *Mol Cell Biochem.* 84:29-40.
- Bozza, P.T., Magalhães, K.G., Weller, P.F. (2009) Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 1791:540-551.
- Bozza, P.T., Viola, J.P.B. (2010) Lipid droplets in inflammation and cancer. Prostaglandins, Leukot. and Essent. *Fatty Acids* 82:243-250.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., Krieger, M., Ho, Y.K., Anderson, R.G. (1979). Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J Cell Biol.* 82:597-613.
- Caire-Brändli, I., Papadopoulos, A., Malaga, W., Marais, D., Cnaan, S., Thilo, L., de Chastellier, C. (2014). Reversible lipid accumulation and associated division arrest of *Mycobacterium avium* in lipoprotein-induced foamy macrophages may resemble key events during latency and reactivation of tuberculosis. *Infect Immun.* 82:476-490.
- Cheng, J., Fujita, A., Ohsaki, Y., Suzuki, M., Shinohara, Y., Fujimoto, T. (2009). Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets. *Histochem Cell Biol.* 132:281-291.
- Choi *et al.*, 2009
- Crocker, P.R., Hill, M., Gordon, S. (1988). Regulation of a murine macrophage haemagglutinin (sheep erythrocyte receptor) by a species-restricted serum factor. *Immunol.* 65:515-522.
- de Assis, E.F., Silva, A.R., Caiado, L.F., Marathe, G.K., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M., McIntyre, T.M., Bozza, P.T., de Castro-Faria-Neto, H.C. (2003). Synergism between platelet-activation factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during

- low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *J Immunol.* 171:2090-2098.
- Farese, R.V. Jr., Walther, T.C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-CT. *Cell.* 139: 855–860.
- Fujimoto, T., Parton, R.G. (2011). Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(3). pii: a004838.
- Greenspan, P.; Mayer, E.P.; Fowler, S.D. (1985) Nile Red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 100:965-973.
- Hakamata, H., Miyazaki, A., Sakai, M., Matsuda, H., Suzuki, H., Kodama, T., Horiuchi, S. (1998 a). Isolation of macrophage-like cell mutants resistant to the cytotoxic effect of oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res.* 39:482-494.
- Hakamata, H., Miyazaki, A., Sakai, M., Sakamoto, Y.I., Horiuchi, S. (1998 b). Cytotoxic effect of oxidized low density lipoprotein on macrophages. *J Atheroscler Thromb.* 5:66-75.
- Klinkner, A.M., Waites, C.R., Kerns, W.D., Bugelski, P.J. (1995). Evidence of foam cell and cholesterol crystal formation in macrophages incubated with oxidized LDL by fluorescence and electron microscopy. *J Histochem Cytochem.* 43:1071-1078.
- Köksal, D., Ozkan, B., Simsek, C., Köksal, A.S., Agackýran, Y., Sasmaz, N. (2005). Lipid-laden alveolar macrophage index in sputum is not useful in the differential diagnosis of pulmonary symptoms secondary to gastroesophageal reflux. *Arch Med Res.* 36:485-489.
- Mahlberg, F.H., Glick, J.M., Jerome, W.G., Rothblat, G.H. Metabolism of cholesteryl ester lipid droplets in a J774 macrophage foam cell model. (1990). *Biochim Biophys Acta.* 1045:291-298.
- Mahley, R.W., Innerarity, T.L., Rall, S.C., Jr., Weisgraber, K.H. (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 25:1277-1294.
- Martin, S., Parton, R.G. (2006). Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:373–378.
- Maya-Monteiro, C.M., Almeida, P.E., D'Ávila, H., Martins, A.S., Rezende, A.P., Castro-Faria-Neto, H., Bozza, P.T. (2008). Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J Biol Chem* 283:2203-2210.
- Melo, R.C., D'Ávila, H., Bozza, P.T., Weller, P.F. (2011a). Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. *Methods Mol Biol.* 689:149-161
- Melo, R.C., D'Ávila, H., Wan, H.C., Bozza, P.T., Dvorak, A.M., Weller, P.F. (2011b). Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *J Histochem Cytochem.* 59:540-556.
- Melo, R.C., Paganoti, G.F., Dvorak, A.M., Weller, P.F. (2013). The internal architecture of leukocyte lipid body organelles captured by three-dimensional electron microscopy tomography. *PLoS One.* 8:e59578.
- Monteiro, V.G., Lobato, C.S., Silva, A.R., Medina, D.V., de Oliveira M.A., Seabra, S.H., de Souza, W., DaMatta, R.A. (2005). Increased association of *Trypanosoma cruzi* with sialoadhesin positive mice macrophages. *Parasitol Res.* 97:380-385.

- Mori, M., Itabe, H., Higashi, Y., Fujimoto, Y., Shiomi, M., Yoshizumi, M., Ouchi, Y., Takano, T. (2001). Foam cell formation containing lipid droplets enriched with free cholesterol by hiperlipidemic serum. *J Lip Res.* 42:1771-1781.
- Mota, L.A.M., Roberto-Neto, J., Monteiro, V.G., Lobato, C.S.S., Oliveira, M.A., Cunha, M., D'Avila, H., Seabra, S.H., Bozza, P.T., DaMatta, R.A. (2014). Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associates to the parasitophorous vacuole and lower microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109:767-774.
- Murphy, D.J., Vance, J. (1999). Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci.* 24:109–115.
- Murphy, S., Martin, S., Parton, R.G. (2009). Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochim Biophys Acta.* 1791:441-447.
- Murphy, D.J. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma* 249: 541–585.
- Ohsaki Y, Maeda T, Fujimoto T (2005) Fixation and permeabilization protocol is critical for the immunolabeling of lipid droplet proteins. *Histochem Cell Biol.* 124: 445–452.
- Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y., Fujita, A., Fujimoto, T. (2009). Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochim Biophys Acta.* 1791:399-407.
- Pataki, M., Lusztig, G., Robenek, H. (1992). Endocytosis of oxidized LDL and reversibility of migration inhibition in macrophage-derived foam cells in vitro. A mechanism for atherosclerosis regression? *Arterioscler Thromb.* 12:936-944.
- Robenek, H., Hofnagel, O., Buers, I., Robenek, M.J., Troyer, D., Severs, N.J. (2006). Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *J Cell Sci.* 119:4215–4224.
- Robenek, M.J., Severs, N.J., Schlattmann, K., Plenz, G., Zimmer, K.P., Troyer, D., Robenek, H. (2004). Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *Faseb J.* 18:866–868.
- Schmitz, G., Grandl, M. (2008). Lipid homeostasis in macrophages – implications for atherosclerosis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 160:93-125.
- Seabra, S.H., de Souza, W. & DaMatta, R.A., (2002). *Toxoplasma gondii* inhibits nitric oxide production by activated mouse macrophages. *Exp Parasitol.* 100: 62-70.
- Silva, A.R., Pacheco, P., Vieira-de-Abreu, A., Maya-Monteiro, C.M., D'Alegria, B., Magalhães, K.G., de Assis, E.F., Bandeira-Melo, C., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T. (2009). Lipid bodies in oxidized LDL-induced foam cells are leukotriene-synthesizing organelles: a MCP-1/CCL2 regulated phenomenon. *Biochim Biophys Acta.* 1791:1066-1075.
- Suzuki, M., Shinohara, Y., Ohsaki, Y., Fujimoto, T. (2011). Lipid droplets: size matters. *J Electron Microsc.* 60 (Suppl. 1):S101-S116.
- Tabas, I., Weiland, D.A., Tall, A.R. (1985). Unmodified low density lipoprotein causes cholesteryl ester accumulation in J774 macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82:416-420.
- Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T (2002) The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem* 277: 44507–44512.

- Walther, T.C., Farese, R.V.Jr. (2009). The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 1791:459-466.
- Wan HC, Melo RCN, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF (2007) Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J* 21: 167–178.

5. Considerações Finais

Macrófagos são células importantes para a defesa e homeostasia dos organismos (Gordon, 2002; Geissman *et al.*, 2010). Estas células desempenham papel central em processos aterogênicos como moduladores tanto do metabolismo lipídico como da resposta imune (Lusis, 2000; Glass & Witztum, 2001; Shibata & Glass, 2009). Tem sido observado acúmulo de lipídios em macrófagos, em estruturas intracelulares denominadas CL, responsáveis pela formação de placas ateroscleróticas na parede de artérias (Martin e Parton, 2005) e em resposta a patógenos intracelulares e em inflamação (Gomes *et al.*, 2014; Elamin *et al.*, 2012; Bozza *et al.*, 2009). Apesar do avanço dos últimos anos em vários aspectos do estudo da origem, constituição e funcionalidade dos CL, estas organelas são pouco entendidas (Yang *et al.*, 2012; Gross & Silver, 2014). Portanto, o estudo de macrófagos ricos em CL é crucial para melhor entendimento de sua biologia. Em nosso modelo, macrófagos são cultivados com SC o que gera grande número de CL. Usando esses macrófagos, avaliamos a capacidade microbicida após infecção com *T. gondii* e sua interação com CL, caracterizamos parcialmente o SC em relação ao SFB na tentativa de desvendar fatores responsáveis pela geração de CL, e verificamos o potencial do SC em induzir CL em outras linhagens de macrófagos e sua associação com RE durante a gênese. Dito isto, algumas colocações sobre as perspectivas futuras foram elaboradas.

5.1- Alterações dos macrófagos pelo cultivo com soro de camundongo

Macrófagos cultivados com SC tem a tendência de se espalharem em uma única direção apresentando aparência tipo fibroblasto, enquanto os macrófagos cultivados com SFB apresentam espalhamento mais estrelado. Também foi verificado que o macrófago cultivado com SC é menos microbicida que o macrófago SFB, gerando menos NO e mais PGE₂. Isso resulta em menor crescimento de *T. gondii* nesses macrófagos, quando comparado aos macrófagos cultivados com SFB.

Em 2000, Mills *et al.*, mostraram diferentes perfis de ativação de macrófagos denominando-os de M1 e M2, nos quais os macrófagos M1 foram ativados classicamente respondendo com produção de NO, enquanto os macrófagos M2 aumentam o metabolismo de arginina, com consequente

conversão em ornitina. Nesse trabalho foi utilizado TGF- β 1, inibidor da resposta imunológica, resultando na inibição da produção de NO (Ding *et al.*, 1990; Vodovotz *et al.*, 1993), na cultura de macrófagos levando estas células a diferentes espalhamentos (Mills *et al.*, 2000). Macrófagos cultivados com fator de transformação do crescimento- β 1 (TGF- β 1) em meio sem soro apresentam morfologia de células tipo fibroblasto. Essa transformação eventualmente ocorre em macrófagos em cultura devido à drástica redução de arginina no meio (Carrel & Eveling, 1926; Godoy *et al.*, 1989). Além disso, estas células apresentaram menor produção de NO (Mills *et al.*, 2000). Esses resultados se assemelham ao macrófago cultivado com SC, tanto na morfologia, quanto na produção de NO. Portanto, o fenótipo de espalhamento e produção de NO descrito após o cultivo dos macrófagos com SC pode envolver TGF- β 1. Com isso iremos verificar a participação de TGF- β 1 nas diferentes morfologias dos macrófagos cultivados com SC e SFB, utilizando anticorpo anti-TGF- β 1 (neutralizante) e meio sem soro, com SC ou SFB com o intuito de verificar a influência desta citocina no espalhamento e produção de NO destes macrófagos.

Outra característica observada nos macrófagos SC era a permanência de sua morfologia intacta por mais tempo em cultura, comparados aos macrófagos SFB (dados não mostrados). Isso pode ser devido ao perfil de ativação observado nos macrófagos SFB, os quais são mais microbicidas provavelmente levando-o a uma exaustão e consequente destruição destes macrófagos. Macrófagos M1 e M2 não somente diferem na habilidade de serem ativados no sentido clássico, mas também geram respostas qualitativamente diferentes ao mesmo estímulo, em que linhagens do tipo M1 são mais facilmente ativadas para produzir NO que macrófagos de linhagens do tipo M2 (Mills *et al.*, 2000). Verificar o perfil de citocinas destes macrófagos seria interessante, uma vez que macrófagos cultivados com SC possuem numerosos CL, os quais são locais de geração de PGE₂. Este mediador inflamatório inibe a produção de linfócitos Th1, mas não de Th2 (Betz & Fox, 1990). PGE₂ também inibe a capacidade microbicida de macrófagos reduzindo a produção de fator de necrose tumoral-alfa e NO (D'Ávila *et al.*, 2008). Gomes *et al.* (2014) demonstraram que a infecção por *T. gondii* dispara a gênese de CL em células musculares, correlacionada positivamente com o aumento da

geração de PGE₂, altos níveis de IFN- γ e redução gradual de IL-12 durante o cultivo. Isso sugere que os macrófagos cultivados com SC podem também apresentar um perfil de citocinas similar.

Sabendo da necessidade lipídica de *T. gondii* e dos diversos mecanismos de desvio de lipídios da célula hospedeira para esse parasito (Charron & Sibley, 2000; Coppens, 2006; Coppens *et al.*, 2006) é importante verificar nos macrófagos cultivados com SC a associação de CL ao VP contendo *T. gondii* de forma mais contundente utilizando tomografia (Kroster *et al.*, 1997) e reconstrução 3D (Schatten & Ris, 2004). Estas técnicas têm sido utilizadas na reconstrução da arquitetura interna de CL de leucócitos (Melo *et al.*, 2013) e de fatores de replicação viral (Paul & Bartenschlager, 2013) o que tem contribuído de maneira singular no esclarecimento de várias questões. Apesar de termos descrito a associação de CL de macrófagos cultivados com SC com o VP, as técnicas utilizadas foram rotineiras (Mota *et al.*, 2014). Portanto, a caracterização espacial de CL e VP no citoplasma dessas células e como essa localização espacial entre essas estruturas é alterada ao longo da infecção pode revelar aspectos importantes de como *T. gondii* modula em seu favor constituintes das células hospedeiras. Outra abordagem importante seria utilização de lipídios exógenos marcados, tomando como ponto de partida lipídios presentes no SC, identificados através da TLC, traçando seu caminho desde sua captação até o aparecimento em CL dos macrófagos e eventualmente em *T. gondii*.

Vários compostos e inibidores, como drogas não esteroidais, têm sido descritos como capazes de inibir a formação de CL (Bozza *et al.*, 1996 a e b, 2002; Vieira-de-Abreu *et al.*, 2005), porém nenhum inibidor específico foi ainda identificado, possivelmente pelo fato da geração de CL poder ocorrer por diversas vias de sinalização dependendo de vários estímulos e do tipo celular. Algumas vias de sinalização intracelular que disparam a geração de CL em leucócitos estão descritas na literatura (Bozza *et al.*, 2009; Maya-Monteiro *et al.*, 2008; de Assis *et al.*, 2003; Pacheco *et al.*, 2002 ; Bandeira-Melo *et al.*, 2001; Bozza *et al.*, 1996, 1997, 1998). Macrófagos cultivados com SC e tratados com indometacina, inibidor não esteroidal da produção de PGE₂, aumentou a capacidade microbicida deste macrófago (Mota *et al.*, 2014). Outras drogas não esteroidais, como aspirina e NS-398 podem ser utilizadas

pra certificar a modulação negativa da capacidade microbicida de macrófagos cultivados com SC. Esse raciocínio é baseado nos resultados obtidos utilizando indometacina, a qual reverte a redução da capacidade microbicida dos macrófagos cultivados com SC após infecção com *T. gondii* (Mota et al., 2014), e com a correlação direta como inibidores da geração de CL e da produção de PGE₂ de maneira independente da ciclooxigenase-2 (Bozza et al., 1996; 2002). A verificação da capacidade microbicida dessas células seria realizada não somente pela medição da produção de NO, como também de PGE₂ e crescimento de *T. gondii*. Realizar a localização da enzima formadora de PGE₂ (D'Ávila et al., 2006) nos CL também seria outra maneira de verificar a função e participação do CL na modulação da ação microbicida do macrófago cultivado com SC. Ademais, a análise de outros fatores microbicidas como a produção de radical de oxigênio via citometria de fluxo por marcação com Diidrorrodamina 123 (Richardson et al., 1998) seria importante na caracterização do potencial microbicida de macrófagos cultivados com SC e SFB.

Prosseguindo a análise da capacidade microbicida do macrófago cultivado com SC, podemos utilizar outro microorganismo intracelular obrigatório como *Chlamydia trachomatis*. Essa bactéria também se utiliza de CL (Cocchiario & Valdivia, 2009) e tem sido descrita em diversos estudos genômicos, assim como tem sido identificadas e caracterizadas proteínas envolvidas em seu mecanismo de evasão (Cocchiario & Valdivia, 2009). Foi observada proliferação de CL na periferia da inclusão contendo a bactéria (Kumar et al., 2006) e a sua translocação intacta para o lúmen da inclusão (Cocchiario et al., 2008). Estas observações indicam que a absorção do CL como um todo, e seu material associado, pela inclusão pode ser uma alternativa geral estratégica para a aquisição de nutrientes, contornando a necessidade de fusão da membrana. Sabendo, portanto, da interação de *Chlamydia* spp. com CL, esta bactéria seria importante na confirmação da capacidade microbicida de macrófagos cultivados com SC, bem como estudo de seu comportamento e reprodução. Outros microorganismos, como os protozoários *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*, assim como bactérias extracelulares (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) e intracelulares (*Mycobacterium bovis*), também podem ser utilizados para confirmar a redução

da capacidade microbicida dos macrófagos cultivados com SC observada após interação com *T. gondii* (Mota et al., 2014).

5.2- Fatores do soro de camundongo que induzem corpos lipídicos

A leptina, hormônio/citocina derivada de adipócito, também gera CL em macrófagos via sinalização envolvendo PI3K e mTOR (*mammalian target of rapamycin* - alvo da rapamicina em mamíferos). A leptina ativa células do sistema imune e modula o metabolismo e estoque lipídico destas células induzindo a geração de CL (Maya-Monteiro *et al.*, 2008). Em estado alimentado, os níveis deste hormônio encontram-se aumentados, em contrapartida a estados de restrição alimentar. Dito isto, uma análise da participação direta da leptina através do uso de inibidores via mTOR (como rapamicina), bem como sua medição diretamente do plasma sanguíneo de camundongos submetidos ou não à restrição e a diferentes ciclos de alimentação/restrrição alimentar/retorno da alimentação, verificando juntamente a geração de CL, pode revelar a participação desse hormônio/citocina na geração de CL por SC.

Diversos fatores são responsáveis pelo disparo da gênese de CL em leucócitos (Bozza *et al.*, 2009). Muitos destes fatores são lipídicos como ácido oleico, ácido aracdônico, dentre outros (Bozza *et al.*, 1996; Weller *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 2002; Huang & Chen, 2006; van Manen *et al.*, 2005). Uma abordagem elucidativa seria a purificação de CL dos macrófagos cultivados com SC e a caracterização de seu conteúdo lipídico bem como correlação entre o conteúdo destas organelas com a composição do SC. Várias abordagens de purificação desta organela foram realizadas e a mais recente foi descrita por Mannik *et al.*,(2014).

Outra abordagem experimental seria o cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo com outros soros como de cabra (Paranjape, 2004) e até mesmo meio sem soro (Gstraunthaler, 2003) utilizando os lipídios já conhecidos da constituição do SC, nas mesmas proporções, com o intuito de verificar a geração de CL. Além disso, outra abordagem é variar a proporção dos lipídios em meio sem soro e avaliar o poder da gênese de CL.

Haja vista o poder de geração de CL pelo SC, o cultivo de macrófagos murinos como macrófago alveolar, medular, RAW e J774A-1, e até mesmo de outras espécies como rato, coelho e galinha com SC seria uma maneira de

testar o poder de indução desta organela pelo SC. O cultivo de macrófago RAW com ácido oleico tem sido utilizado como modelo de estudo de aterosclerose (Chen *et al.*, 2002).

Portanto, o estudo mais aprofundado do conteúdo e dos possíveis indutores de CL presentes no SC é relevante na utilização de macrófagos cultivados com SC como modelo de estudo da gênese desta organela, composição protéica e possíveis funções desempenhadas por esta organela.

5.3- Gênese e poder indutor de corpos lipídicos pelo SC

Embora várias hipóteses sobre o processo de formação de CL tenham sido propostos e discutidos (Murphy *et al.*, 1999.; Zweytick *et al.* 2000; Wältermann *et al.*, 2005 a; Bozza *et al.*, 2009; Murphy 2012) nenhum destes modelos é suficientemente comprovado pelos instrumentos de análise disponíveis. Novas técnicas têm emergido (Ohsaki *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2013) com o intuito de desvendar o processo de gênese desta dinâmica organela, envolvida em diversos processos no interior da célula bem como em algumas doenças (Murphy 2012; Bozza & Viola *et al.*, 2010; Reue 2011). No entanto, é possível que não exista apenas um modelo de gênese de CL, já que possivelmente ocorre alteração com o tipo celular e o indutor utilizado.

Várias moléculas têm sido descritas como indutores de CL, importantes em modelos de estudo desta organela (Bozza *et al.*, 2009; Walther & Farese, 2009). SC induz grande número de CL em macrófagos peritoneais de camundongo (Mota *et al.*, 2014). No intuito de verificar a gênese de CL no modelo usado nesse estudo, observamos envolvimento do RE. No entanto, as observações ainda são preliminares e mais análises localizando a glicose-6-fosfatase, marcador citoquímico específico para RE, contribuirão para o esclarecimento do envolvimento desta organela na gênese de CL. Ainda dentro do melhor entendimento da gênese de CL no modelo de estudo, a análise do complexo de Golgi com a localização da tiaminopirofosfatase também pode mostrar como se dá a participação desta organela nesse processo, já que um dos modelos propostos elícita a secreção de CL via complexo de Golgi (Murphy & Vance, 1999).

Verificamos que a indução de CL pelo SC em macrófagos vai além das espécies murino, alcançando macrófagos de rato e de galinha. O fator indutor

de CL presente neste soro ainda não é conhecido, apesar do conjunto de tratamentos aplicados no SC sugerir participação da indução de CL tanto por fatores proteicos quanto por fatores lipídicos, haja vista que variações na temperatura do SC (por aquecimento ou por ciclos de congelamento e descongelamento) leva a queda na indução desta organela; enquanto que cultivo com lipídios extraídos do SC levam ao aumento de CL. O fato da indução da gênese ocorrer em outras linhagens de macrófagos murinos e de espécies como rato e galinha mostra que o fator indutor de CL presente no SC pode ser uma molécula conservada entre vertebrados como uma lipoproteína ou até mesmo múltiplos fatores podem estar envolvidos neste processo, como a participação da leptina.

6. Conclusão

- O cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo com SC induz muitos CL.
- A presença desta organela torna os macrófagos cultivados com SC menos microbicidas possivelmente pela desativação celular como consequência da alta produção de PGE_2 e menor de NO ou disponibilidade de suprimento lipídico, decorrente da associação de CL ao VP, proporcionando maior crescimento de *T. gondii*.
- O fator indutor de CL também está presente no plasma de camundongo.
- SC obtido de camundongos submetidos à regime de restrição alimentar apresentou diminuição na indução de CL, assim como a submissão do SC a diferentes temperaturas.
- O uso de C75, inibidor da ácido graxo sintase, diminuiu a formação de CL.
- A análise de lipídios por TLC mostrou maiores concentrações e variações lipídicas no SC, comparado ao SFB.
- A gênese de CL em macrófagos cultivados com SC é progressiva alcançando pico em 24 h.
- Observação ultraestrutural do CL mostrou associação ao RE, sendo possível local de gênese de CL, assim como variações na osmiofilia do CL.

- SC é capaz de disparar gênese de CL em macrófagos murinos RAW 264, J774-A1, medular e alveolar e em macrófagos de ratoe de galinha (linhagem HD11).
- SC é um potente indutor de CL podendo ser utilizado em estudos de gênese e funcionalidade desta organela.

7. Referências

- Adams, L.B., Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Krahenbuhl, J.L. (1990). Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J. Immunol.*144:2725-2729.
- Al-Faraj, H.H., Al-Aboodi, I., Al-Sawafi, A., Al-Busaidi, N., Woodhouse, N. (2014). Insulin resistance and its correlation with risk factors for developing diabetes mellitus in 100 omani medical students. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 14:e393-6.
- Altmann, R. (1890). *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen* (Leipzig: Veit).
- Anes, E., Kühnel, M.P., Bos, E., Moniz-Pereira, J., Habermann, A., Griffiths, G. (2003). Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nat Cell Biol.* 5:793-802.
- Arisqueta, L., Nuñez-García, M., Ogando, J., García-Arcos, I., Ochoa, B., Aspichueta, P., Fresnedo, O., Rueda, Y. (2013). Involvement of lipid droplets in hepatic responses to lipopolysaccharide treatment in mice. *Biochim. Biophys. Acta.*1831:1357-1367.
- Auger, M.J. & Ross, J.A. (1992).The biology of the macrophage. In *The Macrophage*. (C.E. Lewis and J.O'D. McGee, eds) IRL Press, New York, NY. 1-74.
- Azzouz, N., Rauscher, B., Gerold, P., Cesbron-Delauw, F., Dubremetz, J. F.and Schwarz, R. T. (2002). Evidence for *de novo* sphingolipid biosynthesis in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 32:677-684.
- Bahrami, E., Mirmoghtadaee, P., Ardalan, G., Zarkesh-Esfahani, H., Tajaddini, M.H., Haghjooy-Javanmard, S., Najafi, H., Kelishadi, R. (2014). Insulin and leptin levels in overweight and normal-weight Iranian adolescents: The CASPIAN-III study. *J Res Med Sci.* 19:387-390.
- Bandeira-Melo, C., Bozza, P.T., & Weller, P.F., (2002). The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J Allergy Clin Immunol.* 109:393-400.
- Bandeira-Melo, C., Phoofolo, M., Weller, P.F. (2001). Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. *J Biol Chem.* 276:22779-22787.
- Bandeira-Melo, C., Weller, P.F., Bozza, P.T. (2011). Identifying intracellular sites of eicosanoid lipid mediator synthesis with EicosaCell assays. *Methods Mol Biol.* 717:277-289.

- Bartz, R., Zehmer, J.K., Zhu, M., Chen, Y., Serrero, G., Zhao, Y., Liu, P. (2007), Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J Proteome Res* 6:3256-3265.
- Beller, M., Thiel, K., Thul, P.J., Jäckle, H. (2010). Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus. *FEBS Lett.* 584:2176-2182.
- Betz, M., Fox, B.S. (1990). Regulation and development of cytochrome c-specific IL-4-producing T cells. *J Immunol.* 145:1046-1052.
- Betz, M., Fox, B.S. (1991). Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol.* 146:108-113.
- Binns, D., Januszewski, T., Chen, Y., Hill, J., Markin, V.S., Zhao, Y., Gilpin, C., Chapman, K.D., Anderson, R.G., Goodman, J.M., (2006). An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *J. Cell. Biol.* 175:719-731.
- Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Barber, T., Coxey, R.A., Takeda, T., Rondinone, C.M., Theodorakis, J.L., Greenberg, A.S., Londos, C. (1995). Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res* 36:1211-1226.
- Bougnères, L., Helft, J., Tiwari, S., Vargas, P., Chang, B.H., Chan, L., Campisi, L., Lauvau, G., Hugues, S., Kumar, P., Kamphorst, A.O., Dumenil, A.M., Nussenzweig, M., MacMicking, J.D., Amigorena, S., Guermonprez, P. (2009). A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. *Immunity* 31: 232–244.
- Bozza, P. T., Yu, W., Cassara, J., Weller, P.F. (1998). Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. *J Leukoc Biol.* 64:563-569.
- Bozza, P. T., Yu, W., Penrose, J. F., Morgan, E. S., Dvorak, A. M., Weller, P.F. (1997). Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med.* 186:909-920.
- Bozza, P. T., Pacheco, P., Yu, W., Weller, P.F. (2002). NS-398: cyclooxygenase independent inhibition of leukocyte priming for lipid body formation and enhanced leukotriene generation. *Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids.* 67:237-244.
- Bozza, P.T., Bandeira-Melo, C. (2005). Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100 Suppl 1:113-120.
- Bozza, P.T., Magalhães, K.G., Weller, P.F. (2009). Leukocyte lipid bodies – Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 1791: 540-551.
- Bozza, P.T., Melo, R.C.N., Bandeira-Melo, C. (2007). Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther.* 113:30–49.
- Bozza, P.T., Payne, J.L., Goulet, J.L., Weller, P.F. (1996 b). Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J Exp Med.* 183:1515-1525.
- Bozza, P.T., Payne, J.L., Morham, S.G., Langenbach, R., Smithies, O., & Weller, P.F. (1996 a). Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11091-11096.

- Bozza, P.T., Viola, J.P. (2010). Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 82:243-250.
- Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R (2004) Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 279:46835–46842.
- Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, Gruia-Gray J, Kimmel AR, Londos C (2000) Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem* 275:38486-38493.
- Brasaemle, D.L., Barber, T., Wolins, N.E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E.J., & Londos C. (1997). Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res*. 38:2249–2263.
- Brown DA (2001) Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol* 11:R446-449.
- Caffaro CE, Boothroyd JC (2011) Evidence for host cells as the major contributor of lipids in the intravacuolar network of *Toxoplasma*-infected cells. *Eukaryot Cell* 10:1095-1099.
- Carrel, A., Ebeling, A. H. (1926). The transformation of monocytes into fibroblasts through the action of Rous virus. *J Exp Med*. 43:461.
- Charron, A.J., Sibley, L.D. (2002). Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*. 115:3049–3059.
- Chen, J.S., Greenberb, A.S., & Wang, S.M. (2002). Oleic acid-induced PCK isoenzyme translocation in RAW 264.7 Macrophages. *J Cell Biochem*. 86:784-791.
- Cheng, J., Fujita, A., Ohsaki, Y., Suzuki, M., Shinohara, Y., Fujimoto, T. (2009). Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets. *Histochem Cell Biol*. 132: 281–291.
- Choi, S.H., Harkewicz, R., Lee, J.H., Boullier, A., Almazan, F., Li, A.C., Witztum, J.L., Bae, Y.S., Miler, Y.I. (2009). Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake. *Circ Res*.104:1355-1363.
- Chow *et al.*, 1999
- Cocchiario JL, Kumar Y, Fischer ER, Hackstadt T, Valdivia RH. (2008) Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the *Chlamydia trachomatis* parasitophorous vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9379–9384.
- Cocchiario, J.L., Valdivia, R.H. (2009). New insights into Chlamydia intracellular survival mechanisms. *Cell Microbiol*. 11:1571-1578.
- Cole, N.B., Murphy, D.D., Grider, T., Rueter, S., Brasaemle, D., Nussbaum, R.L. (2002). Lipid droplet binding and oligomerization properties of Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *J Biol Chem*. 277:6344-6352.
- Coppens, I. (2006). Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis. *Cell Microbiol*. 8:1-9.
- Coppens, I., Dunn, J.D., Romano, J.D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J.C., Joiner, K.A. (2006). *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell*. 125:261-274.
- Coppens, I., Dunn, J.D., Romano, J.D., Pypaert, M., Zhang, H., Boothroyd, J.C., Joiner, K.A. (2006). *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* 125:261-274.

- Coppens, I., Joiner, K. (2003). Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* entry by modulating organelle discharge. *Mol Biol Cell*. 14: 3804-3820.
- D'Ávila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, Melo RC, Dosreis GA, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT (2011) Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E generation and increased parasite growth. *J Infect Dis* 204: 951–961.
- D'Ávila H, Roque NR, Cardoso RM, Castro-Faria-Neto HC, Melo RCN, Bozza PT (2008) Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. *Cell Microbiol* 10:2589–2604.
- D'Ávila H, Toledo DA, Melo RC (2012) Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-*Trypanosoma cruzi* interplay during innate immune responses. *Mediators Inflamm* 2012:478601.
- D'Ávila, H., Maya-Monteiro, C.M., Bozza, P.T. (2008). Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int. Immunopharmacol.* 8:1308-15.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., Taylor, P.R. (2013) Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology*. 14:986-995.
- D'Ávila, H., Melo, R.C., Parreira, G.G., Werneck-Barroso, E., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T. (2006) *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol*. 176:3087-3097.
- de Assis, E.F., Silva, A.R., Caiado, L.F., Marathe, G.K., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M., McIntyre, T.M., Bozza, P.T., de Castro-Faria-Neto, H.C. (2003). Synergism between platelet-activation factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *J Immunol*. 171:2090-2098.
- Ding, A., C. F. Nathan, J. Graycar, R. Derynck, D. J. Stuehr, and S. Srinivasan. (1990). Macrophage deactivating factor and transforming growth factors- β 1, - β 2, and - β 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . *J. Immunol*. 145:940-944.
- Dougherty & McBride, 1984
- Dubey, J.P.; Lindsay, D.S., Speer, C. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol*. 11: 267-299.
- Ducharme, N.A., Bickel, P.A. (2008) Minireview: lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology*. 149:942-949.
- Dvorak 2005
- Dvorak, A.M., (1993). Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 101:136-42.
- Dvorak, A.M., Ackerman, S.J., Weller, P.F. (1991). Subcellular morphology and biochemistry of eosinophils. In Harris JR (ed) *Blood Cell Biochem.*, New York, Plenum Publishing. 2:237-344.
- Dvorak, A.M., Hammel, L., Schulman, E.S., Peters, S.P., Macglashan, D.W.J., Pyre, K., Harvey, V.S., Galli, S.J., Lichtstein, L.M. (1983). Lipid bodies:

- cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J. Immunol.* 131:2965-2976.
- Dvorak, A.M., Morgan, E.S., Weller, P.F. (2003). RNA is closely associated with human mast cell lipid bodies. *Histol. Histopathol.* 18:943-968.
- Edfeldt, K., Swedenborg, J., Hansson, G.K., Yan, Z.Q. (2002). Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 105:1158-1161.
- Ehrenman K, Seghal A, Lige B, Stedman TT, Joiner KA, Coppens I (2010) Novel roles for ATP-binding cassette G transporters in lipid redistribution in *Toxoplasma*. *Mol Microbiol* 76:1232-1249.
- Elamin, A.A., Stehr, M., Singh, M. (2012) Lipid droplets and *Mycobacterium leprae* infection. *Journal of Pathogens* 2012:361374.
- Else, K.J., Finkelman, F.D. (1998). Intestinal nematode parasites, cytokines
- Farese, R.V., Farese Jr., R.V., Walther, T.C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell.* 139:855-860.
- Farese, R.V.Jr., Walther, T. C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139:855-860.
- Foussard, F., Leriche, M. A., Dubremetz, J. F. (1991). Characterization of lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitol.* 102 Pt 3:367-370.
- Freire-de-Lima, C.G., Nascimento, D.O., Soares, M.B., Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C., de Melo, F.G., DosReis, G.A., Lopes, M.F. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* 403:199–203. Erratum 404:904.
- Fu *et al.*, 2014
- Fujimoto, Y., Itabe, H., Sakai, J., Makita, M., Noda, J., Mori, M., Higashi, Y., Kojima, S., Takano, T. (2004). Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochem. Biophys. Acta.* 1644:47-59.
- Funk, J.L., Feingold, K.R., Moser, A.H., Grunfeld, C. (1993). Lipopolysaccharide stimulation of RAW 264.7 macrophages induces lipid accumulation and foam cell formation. *Atherosclerosis.* 98:67-82.
- Galli, S., Dvorak, A.M., Peters, S.P., Schulman, E.S., Macglasham, D. W., Isomura, V., Pyre, K., Harvey, V. S., Lichtenstein, L.M., Dvorak, H.F., (1985). Widely distributed cytoplasmic structures that represent preferential nonmembrane repositories of exogenous [H3] arachidonic acid incorporated by mast cells, macrophages and others cell types. IN: Bailey, J.M (Ed.), Prostaglandin, Leukotrienes, and Lipoxins. Plenum, New York, 221-239.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 327:656-661.
- Glass, C.K., Witztum, J.L. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell.* 104:503-516.
- Godoy, M., Geuskens, M., Van Marck, E. A., Borojevic, R., Van Gansen, P. (1989). Schistosomiasis and in vitro transdifferentiation of murine peritoneal macrophages into fibroblastic cells. *Parasitol Res.* 76:150-161.
- Goldszmid RS, Coppens I, Lev A, Caspar P, Mellman I, Sher A (2009) Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. *J Exp Med* 206:399-410.

- Gomes, A.F., Magalhães, K.G., Rodrigues, R.M., de Carvalho, L., Molinaro, R., Bozza, P.T., Barbosa, H.S. (2014). *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN-g and PGE2. *Parasit Vectors*. 7:47.
- Gordon, S. (2002). Pattern Recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*. 111: 927–930.
- Gordon, S., Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 5:953-964.
- Greenberg, A.S., Egan, J.J., Wek, S.A., Garty, N.B., Blanchette-Mackie, E.J., Londos, C. (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem*. 266:11341:11346.
- Gross, D.A, Silver, D.L. (2014). Cytosolic lipid droplets: From mechanisms of fat storage to disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. 49:304-326.
- Gstraunthaler, G. (2003). Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX*. 20:275-281.
- Günthner & Anders (2013)
- Guo, Y., Cordes, K.R., Farese, R.V., Farese Jr, R.V., Walther, T.C. (2009) Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci* 122:749-752.
- Gupta, N., Zahn, M.M., Coppens, I., Joiner, K.A. & Voelker, D.R. (2005). Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J. Biol. Chem*. 280:16345-16353.
- Heid, H.W., Moll, R., Schwetlick, I., Rackwitz, H.R., Keenan, T.W. (1998). Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res*. 294:309-321.
- Herranz P, de Lucas R, Pérez-Espanã L, Mayor M (2008) Lipodystrophy syndromes. *Dermatol Clin* 26:569-78.
- Holliman, R.E. (1997). Toxoplasmosis, behaviour and personality. *J Infec*. 35: 105-110.
- Huang, W.C, Chen, J.S. (2006). Nitric Oxide-independent lipid metabolism in RAW 264.7 macrophages loaded with oleic acid. *Cell Biol Int*. 30: 947-951.
- Jackson, K.E., Klonis, N., Ferguson, D.J., Adisa, A., Dogovski, C., Tilley, L. (2004). Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 54:109–122.
- Jacobs, A.T., Ignarro, L.J. (2003). Cell density-enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages mediated by interferon-beta. *Nitric Oxide*. 8:222-230.
- Khor, V.K., Shen, W.J., Kraemer, F.B. (2013). Lipid droplet metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 16:632-637.
- Konige, M., Wang, H., Sztalryg, C. (2014). Role of adipose specific lipid droplet proteins in maintaining whole body energy homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 1842:393-401.
- Koster, A.J., Grimm, R., Typke, D., Hegerl, R., Stoschek, A., Walz, J., Baumeister, W. (1997). Perspectives of molecular and cellular electron tomography. *J Struct Biol* 120: 276–308.
- Kraemer, F.B. (2013). Lipid droplet metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 16:632-637.

- Kumar Y, Cocchiari J, Valdivia RH. (2006). The obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* targets host lipid droplets. *Curr Biol*.16:1646–1651.
- Laliberté, J., Carruthers, V.B. (2008). Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *65*:1900-1915.
- Larigauderie, G., Furman, C., Furman, C., Jaye, M., Lasselin, C., Copin, C., Fruchart, J.C., Castro, G., Rouis, M. (2004). Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:504-510.
- Li, Y., Qu, X., Yang, H., Kang, L., Xu, Y., Bai, B., Song, W. (2005). Bifidobacteria DNA induces murine macrophages activation in vitro. *Cell Mol Immunol*. 2:473-478.
- Liu *et al.*, 2013
- Liu P, Ying Y, Zhao Y, Mundy DI, Zhu M, Anderson RG (2004) Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem* 279:3787-3792.
- Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*. 407:233-241.
- Magno, R.C., Lemgruber, L., Vommaro, R.C., De Souza, W., Attias, M. (2005). Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc Res Tech*. 67:45-52.
- Mannik, J. Meyers, A., Dalhaimer, P. (2014). Isolation of cellular lipid droplets: two purification techniques starting from yeast cells and human placentas. *J Vis Exp*. 86 doi: 10.3791/50981.
- Martin, S., Parton, R. G. (2006). Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 7: 373-378.
- Martin, S., Parton, R.G. (2005). Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. *Semin Cell Dev Biol*. 16:163-174.
- Martinez, F.O, Helming, L., Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*. 27:451-83.
- Martinez-Botas, J., Anderson, J.B., Tessier, D., Lapillonne, A., Chang, B.H., Quast, M.J., Gorenstein, D., Chen, K.H., Chan, L. (2000). Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice. *Nat Genet*. 26:474-479.
- Martinez, F.O, Sica, A., Mantovani, A., Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 13: 453-461.
- Maya-Monteiro, C.M., Almeida, P.E., D'Ávila, H., Martins, A.S., Rezende, A.P., Castro-Faria-Neto, H., Bozza, P.T. (2008). Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J Biol Chem* 283:2203-2210.
- Melo RCN, D'Avila H, Fabrino DL, Almeida PE, Bozza P (2003) Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell* 35:59–67.
- Melo RCN, Fabrino DL, Dias FF, Parreira GG (2006) Lipid bodies: Structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflamm Res* 55:342–348.

- Melo, R.C., Dvorak, A.M. (2012). Lipid Body-Phagosome Interaction in Macrophages during Infectious Diseases: Host Defense or Pathogen Survival Strategy? *PLoS Pathog* 8:e1002729.
- Melo, R.C., Paganoti, G.F., Dvorak, A.M., Weller, P.F. (2013). The internal architecture of leukocyte lipid body organelles captured by three-dimensional electron microscopy tomography. *PLoS One*. 8:e59578.
- Miller, Y.I., Choi, S.H., Fang, L., Harkewicz, R. (2009). Toll-like receptor-4 and lipoprotein accumulation in macrophages. *Trends Cardiovasc*. 19:227-232.
- Miller, Y.I., Choi, S.H., Fang, L., Tsimikas, S. (2010). Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis. *Subcell Biochem*. 51:229-251.
- Miller, Y.I., Choi, S.H., Wiesner, P., Bae, Y.S. (2012). The SYK side of TLR4: signalling mechanisms in response to LPS and minimally oxidized LDL. *Br J Pharmacol*. 167:990-999.
- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol*. 164:6166-6173.
- Mosser & Edwards, 2008
- Mota, L.A.M., Roberto-Neto, J., Monteiro, V.G., Lobato, C.S.S., Oliveira, M.A., Cunha, M., D'Avila, H., Seabra, S.H., Bozza, P.T., DaMatta, R.A. (2014). Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associates to the parasitophorous vacuole and lower microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 109:767-774.
- Mullick, A.E., Tobias, P.S., Curtiss, L.K. (2005). Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. *J Clin Invest*. 115:3149-3156.
- Murphy, D. J. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res*. 40: 325-438.
- Murphy, D.J. & Vance, J. (1999). Mechanism of lipid-body formation. *Trends Biochem. Sci*. 24:109-115.
- Murphy, D.J. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma*. 249:541–585. Khor, V.K., Shen, W.J, Nakaar, V., Ngo, H.M., Aaronson, E.P., Coppens, I., Stedman, T.T. & Joiner K.A. (2003). Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci*. 116(Pt 11):2311-20.
- Nakamura, N. & Fujimoto, T. (2003). Adipose differentiation-related protein has two independent domains for targeting to lipid droplets. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 306:333-338.
- Nishikawa, Y., Quittnat, F., Stedman, T.T., Voelker, D.R., Choi, J.Y., Zahn, M., *et al.* (2005). Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. *Cell Microbiol*. 7:849-867.
- Ohsaki, Y., Suzuki, M., Fujimoto, T. (2014). Open questions in lipid droplet biology. *Chem Biol*. 21:86-96.
- Ozeki, S., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Hatano, N., Taniguchi, H., Fujimoto, T. (2005). Rab 18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to endoplasmic reticulum-derived membrane. *J Cell Sci*. 118 :2601-2611.
- Pacheco, P., Bozza, F.A., Gomes, R.N., Bozza, M., Weller, P.F., Castro-Faria-Neto, H.C., and Bozza, P.T. (2002). Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol*. 169:6498.

- Paranjape, S. (2004). Goat serum: an alternative to fetal bovine serum in biomedical research. *Indian J Exp Biol.* 42:26-35.
- Paul, D., Bartenschlager, R. (2013). Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol.* 2:32-48.
- Ploegh HL (2007) A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 448:435-438.
- Pol, A., Gross, S.P., Parton, R.G. (2014) Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins and sites. *J. Cell Biol.* 204:635-646.
- Portugal, L.R., Fernandes, L.R., Pietra Pedroso, V.S., Santiago, H.C., Gazzinelli, R.T., Alvarez-Leite, J.I. (2008). Influence of low-density lipoprotein (LDL) receptor on lipid composition, inflammation and parasitism during *Toxoplasma gondii* infection. *Microbes Infect.* 10:276-284.
- Pu, J., Ha, C.W., Zhang, S., Jung, J.P., Huh, W.K., Liu, P. (2011). Interatomic study on interaction between lipid droplets and mitochondria. *Protein Cell.* 2:487-496.
- Quitnat F, Nishikawa Y, Stedman TT, Voelker DR, Choi JY, Zahn MM, Murphy RC, Barkley RM, Pypaert M, Joiner KA, Coppens I (2004) On the biogenesis of lipid bodies in ancient eukaryotes: synthesis of triacylglycerols by a *Toxoplasma* DGAT1-related enzyme. *Mol Biochem Parasitol*138:107-122.
- Renz, H., Gong, J.H., Schmidt, A., Nain, M., Gemsa, D. (1998). Release of tumor necrosis factor alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. *J Immunol.* 141: 2388-2393.
- Richardson, M.P., Ayliffe, M.J., Helbert, M., Davies, E.G. (1998). A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J Immunol Methods.* 219:187-193.
- Reue, K. (2011). A thematic review series: lipid droplet storage and metabolism: from yeast to man. *J Lipid Res.* 52:1865-1868.
- Robenek, H., Hofnagel, O., Buers, I., Robenek, M.J., Troyer, D., Severs, N.J. (2006). Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *J. Cell. Sci.* 119:4215-4224.
- Robibaro *et al.*, 2002
- Ross, R., (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 362:801-809.
- Saka, H.A., Valdivia, R. (2012). Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28:411-437.
- Schatten, H., Ris, H. (2004). Three-dimensional imaging of *Toxoplasma gondii*-host cell interactions within the parasitophorous vacuole. *Microsc Microanal.* 10:580-585.
- Schmitz & Grandl 2008
- Schwab, J.C., Beckers, C.J.M. & Joiner, K.A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91:509-513.
- Seabra, S.H., de Souza, W. & DaMatta, R.A., (2002). *Toxoplasma gondii* inhibits nitric oxide production by activated mouse macrophages. *Exp Parasitol.* 100: 62-70.
- Seghal, A., Bettiol, S., Wenk, M.R., Pypaert, M., Kaasch, A., Blader, I., *et al.* (2005). Peculiarities of host cholesterol transport to the unique intracellular vacuole containing *Toxoplasma*. *Traffic.* 6:1125-1141.

- Shibata, N., Glass, C.K. (2009). Regulation of macrophage function in inflammation and atherosclerosis. *J Lipid Res.* 50 Suppl:S277-281.
- Sibley, 2011
- Sinai, A. P., Webster, P., Joiner, K. A. (1997). Association of the host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cel. Sci.* 110: 2117-2128.
- Sinai, A.P. (2008). Biogenesis of and activities at *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. *Subcell Biochem* 47:155-164.
- Sinai, A.P., Joiner, K.A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol.* 154:95-108.
- Sonda, S., Ting, L.M., Novak, S., Kim, K., Mher, J.J., Farese, R.V., Jr, *et al.* (2001). Cholesterol esterification by host and parasite is essential for optimal proliferation of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 276:34434-34440.
- Stehr, M., Elamin, A.A., Singh, M. (2012). Cytosolic lipid formations formed during infection by viral and bacterial pathogens. *Microb Infect.* 14:1227-1237.
- Sturley, S.L., Hussain, M.M. (2012). Lipid droplet formation on opposing sides of the endoplasmic reticulum. *J Lipid Res.* 53:1800-1810.
- Suzuki, M., Shinohara, Y., Ohsaki, Y., Fujimoto, T. (2011). Lipid droplets: size matters. *J. Electron Microsc.* 60 (Suppl. 1):S101-S116.
- Sztalryd, C., Kimmel, A.R. (2014). Perilipins: lipid droplet coat proteins adapted for tissue-specific energy storage and utilization, and lipid cytoprotection. *Tamura et al.*, 2008
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., Fujimoto, T. (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem.* 277: 44507-44512.
- Tenter, A.M., Heckerth, A.R., Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 30(12-13):1217-58. Erratum in *Int J Parasitol* 2001. 31:217-220.
- Thiam, A. R., Farese, R. V., Jr. and Walther, T. C. (2013). The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat.Rev. Mol. Cell. Biol.* 14: 775-786.
- Thiele, C., Spandl, J. (2008). Cell biology of lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol.* 20:378-385.
- Umlauf, E., Csaszar, E., Moertelmaier, M., Schuetz, G.J., Parton, R.G., Prohaska, R. (2004). Association of stomatin with lipid bodies. *J Biol Chem.* 279:23699-23709.
- van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., Langevoort, H.L. (1972). The Mononuclear Phagocyte System: a new classification of macrophages, monocytes and their precursors cell. *Bull Wld Hlth Org.* 46: 845-852.
- van Manen, H.J., Kraan, Y.M., Roos, D., Otto, C. (2005). Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 10159-10164.
- Vieira-de-Abreu, A., Amendoeira, F.C., Gomes, G.S., Zanon, C., Chedier, L.M., Figueiredo, M.R., Kaplan, M.A., Frutuoso, V.S., Castro-Faria-Neto, H.C., Weller, P.F., Bandeira-Melo, C., Bozza, P.T. (2005). Anti-allergic properties of the bromeliaceae *Nidularium procerum*: inhibition of eosinophil activation influx. *Int.Immunopharmacol.* 5:1966-1974.

- Vodovotz, Y., Bogdan, C., Paik, J., Xie, Q. W., Nathan, C. 1993. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor b. *J. Exp. Med.* 178:605.
- Wältermann, M., Hinz, A., Robenek, H., Troyer, D., Reichelt, R., Malkus, U., Galla, H.J., Kalscheuer, R., Stöveken, T., von Landenberg, P., Steinbüchel, A. (2005 a). Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up. *Mol Microbiol.* 55:750-763.
- Wältermann, M., Steinbüchel, A. (2005). Neutral lipid bodies in prokaryotes: recent insights into structure, formation, and relationship to eukaryotic lipid depots. *J Bacteriol.* 187:3607-3619.
- Walther, T.C., Farese, R.V.Jr. (2009). The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 1791:459-466.
- Wan HC, Melo RCN, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF (2007) Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J* 21:167–178.
- Weller, P.F., Ackerman, S.J., Nicholson-Weller, A., Dvorak, A.M. (1989). Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. *Am J Pathol.* 135:947-959.
- Weller, P.F., Bozza, P.T., Yu, W., Dvorak, A.M. (1999). Cytoplasmic lipid bodies in eosinophils: central roles in eicosanoid generation. *Int Arch Allergy Immunol.* 118:450-452.
- Weller, P.F., Dvorak, A.M. (1985). Arachidonate acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. *Blood.* 65:1269-1274.
- Weller, P.F., Monahan-Earley, R.A., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M. (1991a). Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. *Am J Pathol.* 138:141-148.
- Weller, P.F., Ryeom, S.W., Picard, S.T., Acherman, S.J., Dvorak, A.M. (1991b). Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils : formation induced by cis-insaturated fatty acids and mediated by protein Kinase C. *J Cell Biol.* 113:137-146.
- Wilfling, F., Haas, J.T., Walther, T.C., Farese Jr, R.V. (2014) Lipid droplet biogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 29:39-45.
- Wilson, E. (1896). *The Cell in Development and Inheritance* (New York: Macmillan).
- Xu, W., Yu, L., Zhou, W., Luo, M. (2006). Resistin increases lipid accumulation and CD36 expression in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 351:376–382.
- Yang, L., Ding, Y., Chen, Y., Zhang, S., Huo, C., Wang, Y., Yu, J., Zhang, P., Na, H., Zhang, H., Ma, Y. and Liu, P. (2012) The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans. *J. Lipid. Res.* 53: 1245-1253.
- Yona, S., Kim, K.W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, D.A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity.* 38:79-91.
- Yu, W., Bozza, P.T., Tzizik, D.M., Gray, J.P., Cassara, J., Dvorak, A.M., Weller, P.F., (1998). Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol.* 152:759-769.

- Yu, W., Cassara, J., and Weller, P.F. (2000). Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood*. 95:1078.
- Zweytick, D., Athenstaedt, K., Daum, G. (2000). Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochem Biophys Acta*. 1469:101-120.