

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS - IMUNOLOGIA/DIP

Gabriel Santos Cruz Rodrigues

**A VITAMINA D COMO POTENCIALIZADORA DA ATIVIDADE
ANTIPARASITÁRIA DE MACRÓFAGOS NA INFECÇÃO *IN
VITRO* POR *TRYPANOSOMA CRUZI***

Juiz de Fora

2019

GABRIEL SANTOS CRUZ RODRIGUES

**A VITAMINA D COMO POTENCIALIZADORA DA ATIVIDADE
ANTIPARASITÁRIA DE MACRÓFAGOS NA INFECÇÃO *IN
VITRO* POR *TRYPANOSOMA CRUZI***

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-
Parasitárias, para obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas: Área Imunologia e Doenças Infecto-
Parasitárias

Orientadora: Prof^a Dr^a. Heloísa D'Avila da Silva Bizarro

**Co-orientadoras: Prof^a Dr^a. Juciane Maria de Castro
Prof^a Dr^a. Patrícia Elaine de Almeida**

Juiz de Fora 2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos Cruz Rodrigues, Gabriel.

A Vitamina D como potencializadora da atividade antiparasitária de macrófagos na infecção in vitro por *Trypanosoma cruzi* / Gabriel Santos Cruz Rodrigues. -- 2019.

134 p.

Orientadora: Heloísa D'Avila da Silva Bizarro

Coorientadoras: Juciane Maria de Castro, Patrícia Elaine de Almeida

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Vitamina D. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Macrófago. I. D'Avila da Silva Bizarro, Heloísa, orient. II. Maria de Castro, Juciane, coorient. III. de Almeida, Patrícia Elaine, coorient. IV. Título.

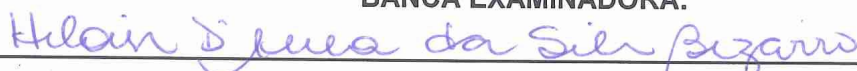
GABRIEL SANTOS CRUZ RODRIGUES

A VITAMINA D COMO POTENCIALIZADORA DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE
MACRÓFAGOS NA INFECÇÃO *IN VITRO* POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 28 / 02 / 2019.

BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a Dr.^a Heloísa D'Avila da Silva Bizarro

Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora



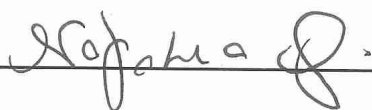
Prof.^a Dr.^a Patricia Elaine de Almeida

Universidade Federal de Juiz de Fora



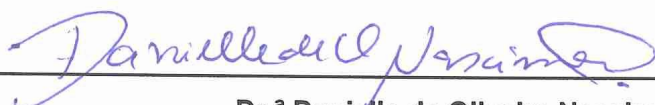
Prof.^a Dr.^a Juciane Maria de Andrade Castro

Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr.^a Natália Roberta Roque

Instituto do Cérebro Paulo Niemayer – RJ



Dr.^a Danielle de Oliveira Nascimento

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente à Universidade Federal de Juiz de Fora e a Pós Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade de desenvolvimento do meu doutorado. Gostaria também de agradecer as agências de fomento que forneceram financiamento a todo meu trabalho.

Diversas pessoas participaram ativamente dessa importante etapa da minha vida e merecem um agradecimento formal. Pessoas que, de suas maneiras, facilitaram esse caminho, tornaram esses dois anos mais leves e partilham comigo desta conquista.

Gostaria de agradecer à minha família, que sempre representou uma fundação firme para meu crescimento, ajudou em minhas escolhas e sempre esteve presente nos momentos mais incertos. Gostaria de agradecê-los por escutarem minhas reclamações, aturarem meu mau humor vindo as vezes do cansaço por experimentos longos de 12 horas ou mais, compreender que natal, ano novo e feriados também são dias de cuidar de animais, fazer experimentos ou as vezes limpar a bagunça do dia anterior e mesmo assim nunca deixar de me apoiar.

Sem dúvida uma pessoa fundamental que conheci ao decorrer de meu doutorado é minha namorada Rafaella que com uma força de vontade e uma capacidade imensa de motivar, sempre fez de tudo pra que eu tirasse o meu melhor de mim, entendeu também o cronograma confuso de um aluno de pós graduação, me acompanhou em experimentos de fim de semana e sempre abriu mão de aproveitar suas próprias férias pra que eu pudesse realizar minhas atividades. Sempre agradecerei a oportunidade de dividir um momento de conquista com ela.

Gostaria de agradecer a minha orientadora Heloísa D' Avila, que me acolheu ainda na graduação, como um aluno de IC que não sabia nada, não tinha nenhuma experiência prática e me ensinou tudo que eu precisei ao longo desse tempo para chegar a este momento. Uma pessoa de competência e paciência raras, que consegue extrair de mim o meu melhor e que esteve

sempre proposta a ajudar, discutir, ensinar e que, sem ela, com certeza não estaria hoje objetivando este título de doutor.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que colaboraram com meu doutorado, as professoras Patrícia Elaine de Almeida e Juciane Castro, por auxiliarem no desenvolvimento e no andamento do meu projeto e estarem sempre abertas para ajudar quando precisei. A turma da imuno que por muitas vezes emprestou reagentes, tirou dúvidas, disponibilizou espaço, em especial a Bárbara que tem me acompanhado nesse projeto. E também a todas as outras pessoas que ajudaram emprestando equipamentos, pipetadoras, gaiolas ou participaram do arranjo de salas e instalação de equipamentos. E por último, mas sem dúvida nenhuma, não menos importante, gostaria de agradecer a toda turma do laboratório de biologia celular, que viveu comigo o meu dia a dia neste período, teve paciência, deu dicas e contribuiu para o meu crescimento dentro de um laboratório e por muitas vezes “quebrou aquele galho” que com certeza fez tudo isso acontecer. Dentre estes, seria injusto da minha parte não destacar a participação do meu grupo de pesquisa, do professor Daniel Toledo e da doutoranda Laíris Cunha e de todos os ICs, pois sem eles não teria feito nem uma pequena parte de tudo que realizei até aqui em meu doutorado. Foram eles que fizeram experimentos noite a dentro, foram na faculdade sábado e domingo, compartilharam da rotina de trato dos animais, dividiram quartos de hotel durante congressos e com uma competência e eficiência notória, me ajudaram a fazer isso acontecer. Sem dúvida essa conquista é tão deles quanto minha.

A todos meu muito obrigado,
Gabriel.

Resumo

A doença de Chagas é um grande problema de saúde, principalmente na região da América do Sul e Central e é caracterizada pela organização mundial de saúde como uma doença negligenciada, sendo sua incidência relacionada com a pobreza e apresentando uma alta taxa de morbimortalidade. A Vitamina D é um hormônio metabolizado pela pele e que pode ser suplementada pela ingestão, que apresenta diversas funções no organismo, dentre as quais, por exemplo, a indução da calcificação óssea. Além disto, já se sabe hoje em dia que a vitamina D tem papel importante na regulação do sistema imunológico, tendo um caráter imunossupressor e a capacidade de induzir a produção de compostos antimicrobianos. Neste trabalho avaliamos o papel da vitamina D frente a infecção experimental *in vitro* de macrófagos peritoniais de camundongos C57/Bl6 por *Trypanosoma cruzi*, durante 24 horas, sendo que para isto, estes grupos receberam também por 24 horas o tratamento com essa vitamina. Nossos resultados demonstram que a vitamina D foi capaz de inibir a formação das organelas chamadas de corpúsculos lipídicos, uma menor formação de IL-10 e um aumento na expressão de iNOS, enzima capaz de metabolizar compostos antimicrobianos e diminuir a expressão de arginase. Demonstramos também que a vitamina D é capaz de impedir a translocação do receptor nuclear PPAR- γ para o núcleo da célula. Este receptor participa da transcrição de diversos genes controladores do metabolismo lipídico e da formação de corpúsculos lipídicos, podendo ser essa a via pela qual a vitamina D capacita macrófagos a eliminar o *T.cruzi*. O uso de agonistas para ativação da via do PPAR-g reverte parcialmente os efeitos observados sobre estas células pelo tratamento com a vitamina D. Como consequência destas alterações, o nosso tratamento demonstrou reduzir quase que totalmente a carga parasitária nos nossos grupos tratados com vitamina D. De maneira geral, nossos dados apontam que a ação específica da vitamina D em macrófagos infectados com *T.cruzi* é capaz de induzir uma ação mais efetiva e específica dos mesmos para eliminação deste microorganismo, sendo consequentemente um provável fator indicador de um bom prognóstico da doença.

Abstract

Chagas disease is a major health problem, especially in South and Central American regions and its known by the World Health Organization as a neglected disease, being related to human poverty and presenting a high ratio of death. Vitamin D is a hormone metabolized in the skin that can be supplemented through ingestion and presents several functions on human organism, among which, for example, induction of bone calcification. Besides that, it's well known today that the vitamin D present important roles in the immune system regulation and homeostasis, having an immunosuppressant character and the ability to induce antimicrobial compounds production. In this study, we evaluated vitamin D role in the experimental infection in peritoneal macrophages of C57/BL6 mice, with *Trypanosoma cruzi*, during 24 hours, being that for this, this groups received also for 24 hours, treatment with this vitamin. Our results showed that vitamin D was able to induce in our macrophage culture, reduced formation of lipid bodies organelles, reduced production of IL-10 and increased expression of iNOS, an enzyme capable of producing antimicrobials compounds, and arginase. We have also shown that vitamin D is able to prevent the translocation of the nuclear PPAR- γ receptor to the cell nucleus. This receptor participates in the transcription of several genes controlling lipid metabolism and formation of lipid droplets, which may be the way in which vitamin D enables macrophages to eliminate *T.cruzi*. The use of agonists to activate the PPAR- γ pathway partially reverses the effects observed on these cells by treatment with vitamin D. As a consequence of these alterations, our treatment has shown to reduce almost totally the parasite load in our treated groups. In general, our data indicate that the specific action of vitamin D in macrophages infected with *T.cruzi* is capable of inducing a more effective and specific action of the same for the elimination of this microorganism, being therefore a probable indicator factor of a good prognosis of the disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. : Vista esquemática das várias formas de desenvolvimento do *T.cruzi*. A: Amastigota , B: Epimastigota, C: Tripomastigota. (De Souza, 2002).

Figura 2. Ciclo de vida do *Tripanossoma cruzi* e sua transmissão vetorial (CDC).

Figura 3. Corpúsculos lipídicos em leucócitos pleurais durante infecção por BCG, após coloração com tetróxido de ósmio. Macrófago *espumoso* de granuloma tuberculoso (direita).

Figura 4: Resumo da atividade da vitamina D ativa sobre alguns importantes grupos celulares participantes da resposta imunológica

Figura 5. Delineamento experimental

Figura 6. Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante infecção *in vitro* por *T. cruzi* por 24h.

Figura 7. Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante infecção *in vitro* por *T. cruzi* por 48h

Figura 8. Quantificação da produção de IL-10 no sobrenadante da cultura de células

Figura 9. Quantificação da produção de TNF- α no sobrenadante da cultura de células.

Figura 10. Quantificação da produção de KC no sobrenadante da cultura de células

Figura 11. Quantificação da expressão de iNOS e NO pelas células em cultura.

Figura 12. Quantificação da expressão de arginase pelas células em cultura

Figura 13. Quantificação da replicação do parasito

Figura 14 – Efeito da via de ativação de PPAR - γ na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante infecção *in vitro* por *T. cruzi* por 24h

Figura 15. Quantificação da produção de IL-10 e TNF- α no sobrenadante da cultura de células.

Figura 16 – Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante infecção *in vitro* por *T. cruzi* por 48h.

Figura 17. Translocação do PPAR- γ para o núcleo em macrófagos durante infecção *in vitro* por *T. cruzi* por 48h

Figura 18 – Quantificação da replicação do parasito

LISTA DE ABREVIATURAS

CLs – corpúsculos lipídicos

COX – ciclooxigenase

IL-1B “Interleukin 1B” – Interleucina 1B

IL-10 “Interleukin 10” – Interleucina 10

IFN- γ - “Interferon gamma” – Interferon gama

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

kDa – Kilodaltons

NK – “Natural Killer” – Células exterminadoras naturais

NO – Óxido Nítrico

OMS – Organização mundial de saúde

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PGE2 – “Prostaglandina E2

T.cruzi – *Trypanosoma cruzi*

TGF-B “Transforming growth factor beta’ – Fator transformador de crescimento beta

Th 17 – “T helper 17” – T auxiliar 17

Th1 – “T Helper 1” – T auxiliar 1

Th2 – “T Helper 2” – T auxiliar 2

TLR – “Toll Like Receptor” – Receptor do tipo Toll

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO

| | | | | | |
|-----|---|---|---------|--------|---------|
| 1.1 | – | Doenças | de | Chagas |14 |
| 1.2 | – | Resposta imunológica ao <i>Trypanosoma cruzi</i> |19 | | |
| 1.3 | – | Corpúsculos lipídicos , prostaglandina E ₂ e a via do PPAR- γ |22 | | |
| 1.4 | – | Vitamina | | D |29 |
| 1.5 | – | Vitamina D e doenças infectoparasitárias |35 | | |

2 - OBJETIVOS

| | | | | |
|-----|---|-----------|-------------|---------|
| 2.1 | – | Objetivo | geral |39 |
| 2.2 | – | Objetivos | específicos |29 |

3 - METODOLOGIA

| | | | |
|-----|---|--|---------|
| 3.1 | – | Animais |41 |
| 3.2 | – | Obtenção de Tripomastigotas – Indução da metaciclogênese |41 |
| 3.3 | – | Eutanásia e lavado pleural |42 |
| 3.4 | – | Infecção dos macrófagos por <i>Trypanosoma cruzi</i> , tratamento com vitamina D e estímulo com Rosiglitazona e GW |42 |
| 3.5 | – | Contagem de corpúsculos lipídicos |43 |
| 3.6 | – | Dosagem de citocinas |44 |
| 3.7 | – | Western Blotting |44 |

| | | | |
|------|---|-------------------------------------|----|
| 3.8 | – | Imunofluorescência..... | |
| | | | 45 |
| 3.9 | – | Dosagem do óxido nítrico..... | 45 |
| 3.10 | – | Gráficos e análise estatística..... | 46 |
| 3.11 | – | Delineamento experimental..... | 46 |

4 - RESULTADOS

4.1 - A formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* é reduzida após tratamento com vitamina D47

4.2 - A produção de IL-10 é reduzida nos grupos tratados com Vitamina D50

4.3 - A expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível é aumentada nos grupos tratados com Vitamina D55

4.4 - A replicação do *Trypanosoma cruzi* é reduzida nos grupos tratados com Vitamina D59

4.5 - A formação de corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em cultura de macrófagos peritoneais é suprimida pela ação do GW e aumentada pela ação da Rosiglitazona61

4.6 - O tratamento com GW estimula tanto a produção de IL-10 quanto a produção de TNF- α nos grupos infectados.....63

4.7 - O tratamento com Rosiglitazona, agonista da via do PPAR- γ (Rosiglitazona) reverteu os efeitos da vitamina D na supressão da formação de corpúsculos lipídicos.....65

4.8 - O tratamento com vitamina D impede parcialmente a translocação para o núcleo do receptor nuclear PPAR- γ67

4.9- O tratamento com Rosiglitazona, agonista da via do PPAR- γ (Rosiglitazona) reverteu os efeitos da vitamina D na replicação dos parasitos

5- **DISCUSSÃO**
.....71

6 - **CONCLUSÕES**
.....81

7 -REFERÊNCIAS82

8 - ANEXOS

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Doença de Chagas

A doença de Chagas representa uma condição infecciosa (com fase aguda ou crônica) classificada como enfermidade negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). É resultante da pobreza humana, ao mesmo tempo que a reproduz, e apresenta elevada carga de morbimortalidade em países endêmicos, incluindo o Brasil, com expressão focal em diferentes contextos epidemiológicos (OMS). A distribuição espacial da doença é limitada primariamente ao continente americano em virtude da distribuição de mais de 140 espécies do inseto vetor (*Triatominae*, *Hemiptera*, *Reduviidae*), daí ser também denominada "tripanossomíase americana". Progressivamente, no entanto, a doença tem alcançado países não endêmicos, mediante o deslocamento de pessoas infectadas e por meio de outros mecanismos de transmissão, como resultado do intenso processo de migração internacional (DIZ *et al*, 2002 ; MONCAYO e SILVEIRA, 2009 , REQUENA-MENDEZ *et al*, 2015)

Esta doença foi descoberta pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas que durante seus estudos de mestrado observou a presença do barbeiro nas casas e pode ver que o mesmo se alimentava de sangue inclusive de várias pessoas, “picando” principalmente os rostos das vítimas por possuir hábitos noturnos. Com base nessas observações, ele dissecou um barbeiro e pôde encontrar o, até então desconhecido, protozoário causador da doença, mandando amostras desse material para seu orientador, o pesquisador Oswaldo Cruz, que o ajudou na identificação a caracterização do protozoário. Oswaldo foi inspiração para Chagas, que nomeou o protozoário descoberto

como *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao seu mestre (COURA, 2009 ; KOBERLE, 1968).

A OMS estima em aproximadamente 8 a 9 milhões o número de pessoas encontram-se infectadas em todo o mundo, a maioria na América Latina. Estimativas recentes para 21 países latino-americanos, com base em dados de 2015, indicavam cerca de 6 a 7 milhões pessoas infectadas por *T. cruzi*, das quais 3.581.423 (62,4%) eram residentes em nações da Iniciativa dos Países do Cone Sul, destacando-se a Argentina (1.505.235), o Brasil (1.156.821) e o México (876.458), seguidos da Bolívia (607.186). Todavia, estes dados divergem de outras estimativas realizadas por diferentes grupos de pesquisa e métodos para definição de infecção por *T. cruzi* em vários países, o que dificulta o estabelecimento exato da prevalência da doença de Chagas nas Américas. No entanto, os autores concordam que o número de infectados é ainda muito expressivo no contexto sanitário e social do continente, requerendo prioridade e atenção por parte dos países (WHO, 2018)

O *Trypanosoma cruzi* pertence a ordem Kinoplastida, a qual compreende organismos flagelados com uma organela denominada cinetoplasto localizado na mitocôndria da célula. O *T. cruzi* está incluído na seção Stercoraria, junto com o grupo de tripanossomatídeos, os quais no seu estágio infeccioso se desenvolvem no trato digestivo do vetor e sua contaminação ocorre através das fezes deste (DE SOUZA, 2002 ; ZAGO *et al*, 2016).

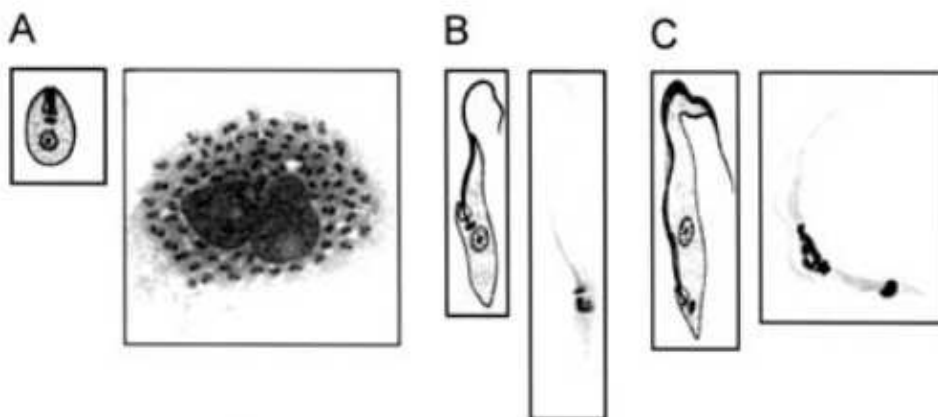


Figura 1: Vista esquemática das várias formas de desenvolvimento do *T. cruzi*. A: Amastigota, B: Epimastigota, C: Tripomastigota. (De Souza, 2002).

Mais de 100 espécies de reservatórios selvagens do parasito foram descritas, por exemplo, marsupiais, morcegos, roedores e primatas não humanos. Dentre os recipientes domésticos, é importante destacar gatos, cachorros, hamsters e porquinhos da índia. Porcos e caprinos também já são documentados como possíveis reservatórios do *Trypanosoma cruzi*. Outros animais como répteis e pássaros não se tornam infectados porque possuem lisinas que destroem o parasito (BARRETTO, 1964; DEANE, 1964; DIAS 2007; PINTO *et al*, 2008).

A transmissão da doença de chagas pode ocorrer através de vários mecanismos, como através de vetores (o principal mecanismo), mas ainda pode ocorrer por meio de transfusão de sangue, via oral através da ingestão de alimentos contaminados, transmissão via parto, acidentes laboratoriais, manejo de animais infectados, transplante de órgãos, transmissão sexual e machucados. Estimasse que a transmissão vetorial corresponda a cerca de 70% dos casos, em países que não apresentem um sistema de controle dos vetores, e que em países nos quais não exista um forte controle em cima de doação e bancos de sangue, que esse meio de transmissão possa corresponder em 20% dos casos (FRAIHA *et al*, 1995; VALENTE *et al*, 1999; PINTO *et al*, 2008).

Para ocorrer a transmissão vetorial, a forma epimastigota não infectante, se divide via fissão binária no intestino do inseto vetor e, posteriormente, se transformam, no intestino grosso, na forma tripomastigota metacíclica, caracterizada por um grande flagelo e por ser a forma infectante. Quando o inseto vetor ingere sangue do hospedeiro mamífero, os tripomastigotas são eliminados pelas fezes. Os parasitos liberados podem penetrar no hospedeiro pela região da picada ou também através do contato com regiões de mucosa. Estes parasitos entram nas células hospedeiras, se transformam nas formas amastigotas replicativas, formando um vacúolo parasitóforo, que posteriormente se rompe e, com isso, os parasitos em sua forma amastigota,

característica pela forma esférica e um flagelo muito diminuto, se liberam no citosol. Essas amastigotas se replicam e se diferenciam em tripomastigotas, que são liberadas pela lise celular novamente na corrente sanguínea do hospedeiro. O ciclo reinicia quando um novo inseto pica o indivíduo infectado e ingere os parasitos que estão no sangue (BONNEY *et al*, 2014 ; BONNEY *et al*, 2008 ; ANDREWS *et al*, 1990).

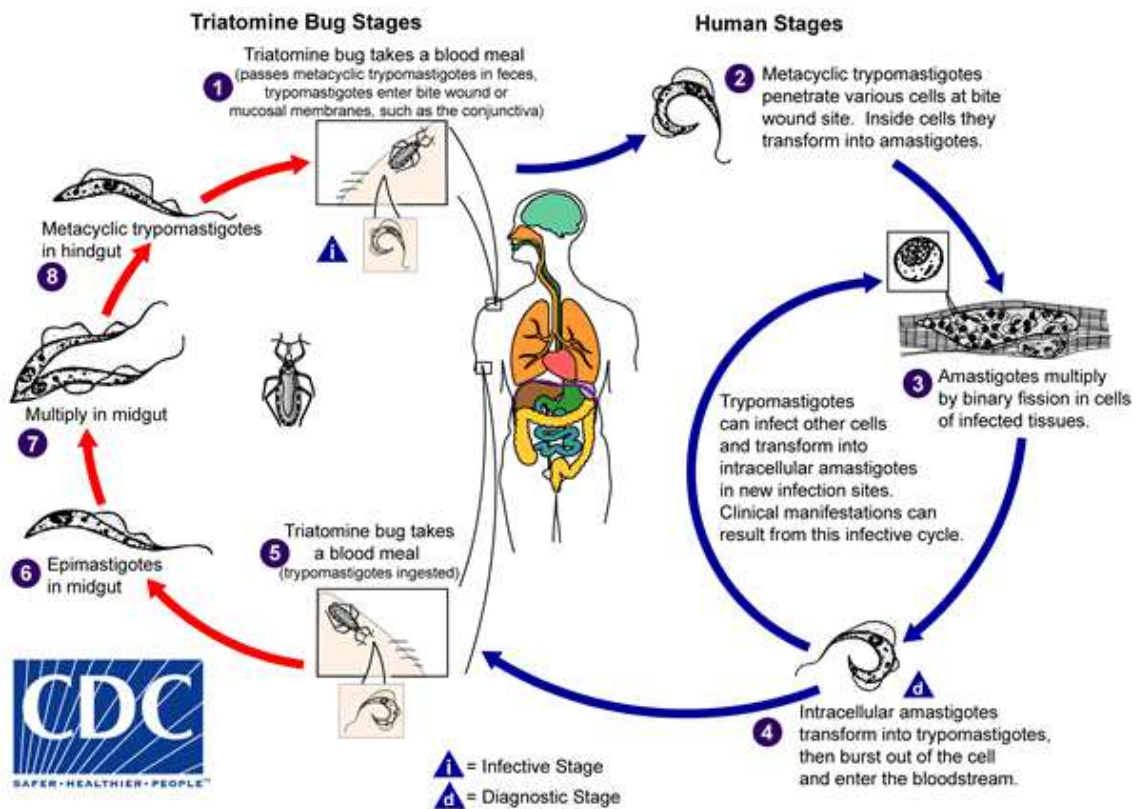


Figura 2: Ciclo de vida do *Tripanossoma cruzi* e sua transmissão vetorial (Center for Disease Control and Prevention /CDC).

Os sintomas da Doença de Chagas são variados, incluindo, febre, aparecimento de gânglios, crescimento do baço e do fígado, alterações elétricas do coração e/ou inflamação das meninges nos casos graves. Na fase aguda, os sintomas duram de três a oito semanas. Na fase crônica, os sintomas estão relacionados a distúrbios no coração e/ou no esôfago e no intestino predominantemente. Cerca de 70% dos portadores permanecem de duas a três décadas na chamada forma assintomática ou indeterminada da doença. Os sintomas da Doenças de Chagas se devem a uma inflamação

duradoura, persistente durante a fase crônica da doença, que leva a destruição de células do órgão afetado, infiltração de linfócitos, e um aumento localizado na produção de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas e óxido nítrico. Esse processo decorre então em um processo de fibrose, que substitui o tecido funcional do órgão por tecido conjuntivo que não apresenta a mesma funcionalidade, levando então a perda de sua função (HUANG *et al*, 1999; MACHADO *et al*, 2008; PARADA *et al*, 1997; RODRIGUEZ-SALAS *et al*, 1998; TEIXEIRA *et al*, 1978).

Um diagnóstico rápido e preciso continua sendo um grande obstáculo ao começo do tratamento. O diagnóstico é complicado devido as características da doença e das suas duas fases distintas. Primeiramente, a fase aguda é predominantemente assintomática e com isso é raramente diagnosticada, apesar de poderem ser encontrados parasitos no sangue. O longo estágio indeterminado que se segue pode durar décadas, através das quais o parasito se esconde e não é facilmente detectado, apesar de iniciar uma infecção crônica no hospedeiro (RASSI *et al*, 2010). Então, cerca de 30-40% destes indivíduos cronicamente infectados vão desenvolver sintomas cardíacos, gástricos ou cardiodigestivos fatais. Esses quadros são característicos pelo paciente apresentar intensa inflamação tecidual, que leva a perda da função dos órgãos e conseqüentemente a morte, caso não haja o tratamento. Por isso, o quanto antes acontecer o diagnóstico da Doença de Chagas e o tratamento se iniciar, mais eficiente este será. Durante o estágio crônico da doença, com pouco ou nenhum parasita circulante, o diagnóstico é realizado através do soro. Os testes mais frequentemente utilizados são o ELISA, a detecção indireta por imunofluorescência e o arranjo de hemoaglutinação indireta (IHA) (EGUEZ *et al*, 2016, RASSI *et al*, 2010; OTANI *et al*, 2009).

O manejo farmacológico da cardiopatia chagásica aguda é o mesmo preconizado para o tratamento da insuficiência cardíaca (IC) em miocardites agudas de outras etiologias, sendo baseado na utilização rotineira da combinação de três tipos de fármacos: diuréticos, inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA) ou bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II (BRA) e betabloqueadores, sempre associados ao tratamento específico da infecção por *T. cruzi* com benznidazol ou nifurtimox (CASTRO *et*

al, 2002 ; BRAZILIAN CONSENSUS ON CHAGAS DISEASE, 2015 ; DIAS, 2016).

A história natural da fase aguda da cardite chagásica por transmissão oral da doença de Chagas ainda não é totalmente conhecida. Os casos mais graves, com disfunção ventricular, derrame pericárdico e fibrilação atrial, tendem a ter pior evolução na fase aguda, necessitando de tratamento em ambiente de terapia intensiva (CASTRO *et al*, 2002)

1.2 – Resposta Imunológica ao *Trypanosoma cruzi*

A ativação de populações específicas de células que apresentam papéis efetores é um processo crítico no controle da parasitemia durante a fase aguda da Doença de Chagas. Existem muitos estudos disponíveis que analisam a resposta imunológica durante a fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, entretanto, ainda existem várias lacunas. Tem sido amplamente demonstrado que a produção de anticorpos, assim como a ativação de certos mecanismos intatos (por exemplo, o sistema complemento), parecem ser essenciais para o controle da replicação do parasito durante a fase aguda da doença. Cabe ressaltar também, que o controle exercido por esses mecanismos é altamente eficiente, uma vez que a parasitemia apresenta níveis muito baixos quando o paciente passa para a fase crônica (KRETTLI, 2009)

Estudos em modelos experimentais de infecção por *T.cruzi* tem demonstrado uma forte resposta imunológica na fase aguda, com a intensa produção de citocinas pró inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , as quais ativam as células, principalmente os macrófagos, para a eliminação do parasito (TEIXEIRA *et al*, 2002 ; DE ANDRADE *et al*, 2018 ; PINTO *et al*, 2018). Esses

dados são corroborados por outros estudos que demonstram que animais *knockouts* para a produção destas citocinas são altamente suscetíveis a esta infecção. Já se foi também demonstrado que animais *knockouts* para a produção de óxido nítrico também apresentam essa susceptibilidade, uma vez que este é produzido após a indução, principalmente, por estas citocinas (TEIXEIRA *et al* , 2002 ; SILVA *et al* , 1995 ; RACHID *et al* , 2019)

Por um lado, essa intensa resposta inflamatória é associada ao controle do parasito na fase aguda, por outro, já foi demonstrado que o hospedeiro nessa fase apresenta uma miocardite (inflamação do tecido cardíaco) aguda, provavelmente também decorrente dessa intensa resposta. Essa resposta é temporária e insuficiente para um controle total da parasitemia e, por isso, muitos estudos tem voltado seu interesse na melhora da resposta efetora das células envolvidas neste processo, como por exemplo, os macrófagos (MARQUES J, *et al* , 2013 ; DUTRA *et al* , 2014).

Macrófagos são uma população heterogênea de células que se adapta, regula e responde aos mais diversos sinais de seu microambiente. Eles exercem diversos papéis essenciais na resposta imunológica fagocitando e eliminando (ou desencadeando um processo que tente eliminar) microorganismos e células mortas ou em processo de morte. Apesar da grande importância dessas células, já se sabe também que a constante e descontrolada ativação destas pode levar a danos ao hospedeiro, participando assim do desenvolvimento de diversas patologias. O fenótipo imunológico destes macrófagos depende de vários fatores, incluindo, por exemplo, fatores imunomodulatórios, como citocinas e produtos microbianos. (VAN GINDERACHTER *et al* , 2006 ; PENA *et al* , 2015; GORDON, 2003). Enquanto as citocinas Th1, como IFN- γ e IL-1 β , e PAMPs, como LPS, induzem uma resposta clássica pró-inflamatória (M1) nessas células, citocinas Th2, como IL-4 e IL-13, produzem uma resposta alternativa (M2). Interessantemente, estas podem variar entre esses dois estados de ativação, apresentando um caráter chamado de plástico, dependendo da variação momentânea destes estímulos (PORCHERAY *et al* , 2009 ; MANTOVANI *et al* , 2010 ; PENAS *et al* , 2015).

A ativação de macrófagos depende também de seu metabolismo, o qual culmina, por exemplo, na geração de compostos que são cruciais para a sua função celular específica. O metabolismo aeróbico que é dependente da fosforilação oxidativa na mitocôndria é essencial para a ativação de macrófagos imunomodulatórios (M2). Por outro lado, o metabolismo anaeróbico, independente da cadeia de fosforilação na mitocôndria gera substratos que produzem mediadores anti-microbianos por parte destes macrófagos (M1). Dentre esses compostos anti-microbianos podemos citar as espécies reativas de oxigênio (ROS) e o óxido nítrico (NO), sendo estas moléculas-chaves produzidas pelos macrófagos M1 em uma montagem efetiva da resposta imunológica do hospedeiro contra parasitos intracelulares, incluindo o *Trypanosoma cruzi* (SUE KOO e NISHA JAIN GARG, 2016 ; GUPTA 2009). O balanço entre estas respostas é essencial no desenvolvimento da patologia, pois enquanto uma resposta M1 é necessária para o controle da parasitemia, uma resposta M2 é essencial para evitar os danos decorrentes de uma resposta inflamatória exarcebada e contínua (MANTOVANI *et al* , 2010)

A transição entre a fase aguda e a fase crônica é acompanhada de uma diminuição da parasitemia no sangue e nos tecidos, bem como uma redução significativa da forte resposta imunológica montada na fase aguda. É bem conhecido o papel de citocinas anti-inflamatórias, dentre as quais destaca-se a IL-10 que apresenta um papel importante na modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias (SOUZA *et al*, 2004 ; WALDEREZ *et al*, 2014). De fato, sabe-se que durante essa mudança de fases e durante o período crônico da Doença de Chagas, o hospedeiro produz IL-10 significativamente (SATHLER-AVELAR *et al*, 2003 ; SOUZA *et al*, 2004), justificando a redução da resposta inflamatória notada nessa etapa. Interessantemente, apesar da produção dessa citocina reduzir o processo inflamatório, este não é reduzido a ponto de se notar na fase crônica um aumento da parasitemia, indicando que esse balanço entre respostas pró- e anti-inflamatória é bem orquestrado, principalmente em pacientes que não desenvolvem os sintomas. Por estes dados, acredita-se que o desenvolvimento da miocardidite clássica, que é um os principais sintomas da Doença de Chagas, deve-se a perda desta

homeostasia imunológica, decorrendo nos característicos danos teciduais (WALDEREZ *et al*, 2014).

Além dos fatores mais conhecidos que participam do balanço dessa resposta imunológica, recentemente tem sido fortemente estudadas organelas conhecidas como corpúsculos lipídicos. Essas organelas são sítios de produção de mediadores lipídicos que participam diretamente, por exemplo, na ativação de macrófagos frente aos mais diversos estímulos e infecções (TOLEDO *et al*, 2016, ALMEIDA *et al*, 2018).

1.3 – Corpúsculos Lipídicos , Prostaglandina E₂ e receptor nuclear PPAR_γ

Corpúsculos lipídicos são organelas com afinidade por tetróxido de ósmio e que apresentam uma monocamada fosfolipídica com centro rico em lipídeos neutros e diversas proteínas. Estas organelas estão presentes em grande parte dos leucócitos e outros tipos celulares, como células endoteliais, fibroblastos e mastócitos (DVORAK , 1993; BOZZA *et al*, 2007).

Os corpúsculos lipídicos recebem diversas denominações na literatura, dependendo do tipo celular, como por exemplo: gotas lipídicas (“lipid droplets”) em adipócitos, glóbulos lipídicos (“lipid globules”) em células mamárias, corpúsculos lipídicos ou partículas lipídicas (“lipid bodies ou particles”) em várias células animais e fungos, e corpos oleosos (“oil bodies”) em sementes de plantas superiores (MARTIN E PARTON, 2005; MURPHY, 2001). No passado, os corpúsculos foram erroneamente confundidos com vacúolos ou fagossomos, pois eram vistos como imagens negativas após colorações que não preservavam lipídios. Atualmente, com o uso de fixação apropriada e coloração ou contraste específicos para lipídios celulares, como *sudan black* ou tetróxido de ósmio, os corpúsculos lipídicos são claramente visualizados tanto

na microscopia de luz, como na microscopia eletrônica de transmissão (Figura 3). Os corpúsculos lipídicos também podem ser reconhecidos através da utilização de marcadores fluorescentes, incluindo *Nile red*, lipídios contendo sondas fluorescentes como ácido pirenododecanóico (P96), e 2-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4-diaza-s-indacene-3-pentanoil)-1-hexadecanoil-sn-glicero-3-fosfato, diammonium salt (β -Bodipy FL C5-HPA) (BOZZA *et al*, 2007).

Os corpúsculos lipídicos são estruturados por proteínas da família perilipina (PLIN), incluindo perilipina/PLIN1, PLIN2/ADRP (do inglês “adipose differentiation-related protein”), PLIN3/TIP47 (do inglês “tail-interacting protein of 47 Kda”), bem como, enzimas metabólicas, algumas quinases envolvidas em processos de sinalização celular e proteínas envolvidas no transporte vesicular, como pequenas GTPases da família Rab, calveolinas e fator de ribosilação do ADP (ARF) (D'AVILA *et al.*, 2008a; D'AVILA *et al.*, 2008b; D'AVILA *et al.*, 2006; BOZZA *et al.*, 2007 ; DVORAK *et al*, 1993 ; ALMEIDA *et al*, 2018). Por sua constituição lipídica e protéica, muitos estudos têm estabelecido que os corpúsculos lipídicos são organelas dinâmicas, que podem atuar como sítios de sinalização intracelular em leucócitos ativados, onde aumentam em número e tamanho em processos inflamatórios. Nos leucócitos, os corpúsculos lipídicos parecem participar da regulação do metabolismo lipídico e do controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios em resposta a infecções (D'AVILA *et al* 2011; BOZZA *et al.*, 2007; D'AVILA *et al.*, 2006; PACHECO *et al.*, 2002).

Estas organelas foram erroneamente caracterizadas por muitos anos como apenas uma organela de reserva de energia, hoje sabe-se que os corpúsculos lipídicos são organelas dinâmicas e com grande importância no controle da síntese de lipídeos e em processos inflamatórios (D'AVILA *et al*, 2008, D'AVILA *et al*, 2006; WAN *et al*, 2007; BOZZA *et al.*, 2007). Assim sendo, corpúsculos lipídicos podem diretamente ou indiretamente estar envolvidos diversas funções celulares, como o metabolismo de lipídeo, o tráfego de membranas, a sinalização intracelular e a produção de mediadores inflamatórios diversos (D'AVILA *et al*, 2006, MENDONÇA *et al*, 2016 ; ALMEIDA *et al*, 2018).

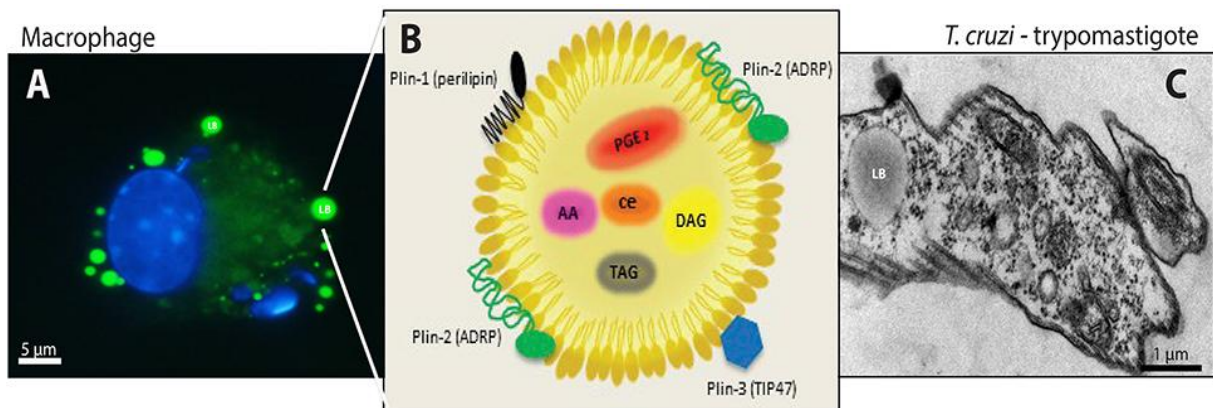


Figura 3 – (A) Corpúsculos Lipídicos (verde) em macrófagos durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* e (C) no próprio *Trypanosoma cruzi* (LB) (B) Modelo esquemático da forma e constituição dos corpúsculos lipídicos, demonstrando suas principais proteínas estruturais de membrana e do núcleo hidrofóbico formado por lipídeos neutros (ALMEIDA *et al*, 2018)

Estas estruturas são também sítio de localização de enzimas formadoras de eicosanóides, como por exemplo, ciclooxigenase-2 e lipooxigenases. De fato, em células participantes de processos inflamatórios e neoplasias, a quantidade e o tamanho destes corpúsculos sofrem um grande aumento (D'AVILA *et al*, 2006 ; D'AVILA *et al*, 2008;). Tanto a formação destes lipídeos, quanto a compartimentalização de enzimas nos corpúsculos lipídicos são processos altamente regulados por processos inflamatórios e envolvidos no aumento da capacidade de leucócitos de formar eicosanóides frente estímulos (MELO *et al*, 2006).

Dentre estes eicosanóides, destaca-se a prostaglandina E₂ (PGE₂), que é uma pequena molécula derivada de ácido araquidônico (AA), produzida por ciclooxigenases, como, por exemplo, a ciclooxigenase constitutivamente ativa 1 (COX1), e COX-2 (isoforma induzível) (JOHANSON *et al*, 2013). Apesar da PGE₂ promover um influxo de neutrófilos, macrófagos e mastócitos para o sítio de inflamação, pela produção de quimiocinas como CXCL8 e CCL2, (NAKAYAMA *et al*, 2006), sua atuação sobre estas diversas células apontam para um papel supressor da atividade inflamatória por parte deste eicosanóide. A PGE₂ reduz a capacidade citotóxica de linfócitos NK, pela redução da

sensibilidade a IL-12, IL-15 e IL-2 e diminuição da produção de IFN- γ por estes (WALKER *et al*, 2004 ; JOSHI *et al*, 2001). Limita também a capacidade de fagocitose de macrófagos alveolares, bem como sua capacidade de eliminação do patógeno pela indução da cinase-M associada a IL-1R, a qual bloqueia a fagocitose mediada por receptor do tipo *scavenger* e a ativação de TNF- α dependente de TLR (Toll-like receptor) (HUBBARD *et al*, 2010).

A PGE₂ também participa ativamente do balanço entre as respostas imunológicas Th1/Th2, sendo que, em baixas quantidades, demonstra a capacidade de levar esta resposta em direção a um perfil Th2/Th17 que mediam processos muito menos danosos aos tecidos (KALINSKI, 2012). Isto ocorre, pois esta atua na inibição da produção de citocinas características do perfil Th1, como IFN- γ , e não em citocinas Th2, como IL-4 e IL-5 (SNIJDEWINT *et al*, 1993). Em altas doses, PGE₂ atua inibindo a produção e a sensibilidade de células T a IL-2, a proliferação e ativação destas. Sendo responsável então, de maneira geral, pelo controle da proliferação e ativação de células NK, células da resposta Th1 (KALINSKI, 2012).

O mecanismo de formação de corpúsculos lipídicos nas células inflamatórias é um evento altamente regulado e depende de vários fatores. O modelo mais aceito sugere que enzimas, como a diaciltransferase DGAT1 e DGAT2, produzem triacilgliceróis (TAG). Além disso, essas enzimas estão envolvidas no metabolismo lipídico localizado em compartimentos específicos do retículo endoplasmático (RE), favorecendo a síntese de lipídios neutros entre os dois folhetos de membrana do RE, produzindo um núcleo lipídico hidrofóbico neutro (BOZZA *et al*, 2009). Depois de atingir um tamanho determinado, CLs em formação carregados com proteínas sem domínios transmembranares, saem do RE para o citoplasma e então os lipídios são revestidos por uma monocamada de fosfolipídios do folheto citoplasmático da membrana do RE (MARTIN E PETON 2005 ; BOZZA *et al*, 2009). Trabalhos do nosso grupo demonstraram que, em macrófagos murinos, a infecção *in vitro* por *T. cruzi* induziu a formação de LBs através do reconhecimento via toll like receptor 2 (TLR-2) (D'AVILA *et al*, 2011). De fato, alguns grupos de pesquisadores identificaram diferentes motivos moleculares deste parasito capaz de ativar TLRs em macrófagos, tais como glicoproteínas parecidas com

mucinas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (tGPI-mucina) presentes na membrana do parasita e capazes de induzir a resposta inflamatória através de ativação de TLR2 (ALMEIDA *et al*, 1993 ; GRAVINA *et al* , 2003).

Durante a infecção por *T. cruzi*, a indução de apoptose, especialmente de linfócitos T e B (FREIRE-DE-LIMA *et al*, 2000; DOS REIS, 2011) e neutrófilos (MAGALHÃES *et al*, 2017) representa um importante mecanismo que contribui para a replicação do parasita, devido aos efeitos imunomoduladores na resposta imune do hospedeiro (DECOTE-RICARDO *et al*, 2017). Conseqüentemente, a depuração fagocítica dessas células apoptóticas por macrófagos tem profundas conseqüências nas respostas imunes inatas e adaptativas em tecidos inflamados (ELLIOTT *et al*, 2017). Além disso, tem sido demonstrado que a formação de CLs durante a infecção por *T. cruzi* em macrófagos é potencializada na presença de apoptóticas (D'AVILA *et al*, 2011). A captação de células apoptóticas através da integrina $\alpha\beta 3$ (receptor de vitronectina) é crítica na indução de CLs durante a infecção por *T. cruzi* (ALMEIDA *et al*, 2018 ; D'AVILA *et al*, 2011).

O processo de formação destas organelas é altamente regulado por diversos fatores e dentre os fatores mais importantes para a regulação deste processo, destaca-se o papel do PPAR- γ . O receptor ativado por proliferador de peroxissoma- γ (PPAR γ) é membro da família de receptores de transcrição nuclear e semelhan um grande grupo diversificado de proteínas dependentes de ligantes que medeiam a ativação e repressão transcricional e que, de maneira semelhante a outros receptores nucleares, eles compreendem um domínio A / B envolvido na ativação transcricional, um domínio C responsável pela ligação ao DNA, um domínio D que serve como uma “articulação” e um domínio E que liga os ligantes e se conecta com a maquinaria de transcrição (VARGA *et al*, 2011, MANGELSDORFF *et al* , 1995).

Expressão do PPAR γ é um evento fundamental na diferenciação de adipócitos, metabolismo de lipídeos e regulação da glicemia (VARGA *et al*, 2011). Os PPARs ativam a transcrição de DNA por ligação a uma sequência de DNA relativamente conservada na proximidade dos genes alvo. Análogo a vários outros receptores nucleares, os PPARs se ligam ao DNA principalmente como um heterodímero com o Retinóide X Receptor RXR. PPARs ativam a

transcrição gênica promovendo a liberação de proteínas co-repressoras e estimulando a ligação de proteínas co-ativadoras, processos que são desencadeados pela ligação do ligante tanto à unidade PPAR quanto à RXR (KERSTEN , 2017). Os ligantes para os PPARs abrangem uma gama de lípidos exógenos e endógenos, incluindo vários ácidos graxos, bem como um grande número de compostos sintéticos. Além disso, alguns dos eicosanóides já citados, originados do metabolismo do ácido araquidônico, como os leucotrienos, os ácidos hidroxieicosatetraenóico (HETEs) e as prostaglandinas também podem ser agonistas efetivos para as isoformas PPAR específicas (KERSTEN, 2017 , GEOGARDI *et al* 2012).

Diversas proteínas associadas aos corpúsculos lipídicos, incluindo membros da família das perilipinas e proteínas transmembrana indutoras do armazenamento de gordura, estão sob controle transcricional direto dos PPARs. A ativação de proteínas associadas aos corpúsculos lipídicos, por PPARs proporciona um mecanismo de conexão entre a captação lipídica e sua capacidade de armazenamento, regulando a formação de corpúsculos lipídicos (RODRIGUEZ E KERSTEN, 2017 , ITABE *et al*, 2017 , ARIMURA *et al*, 2004, KADEREIT *et al*, 2008). De fato, dados do nosso grupo demonstraram que a infecção por BCG em macrófagos levou a uma expressão aumentada de PPAR γ em macrófagos de camundongo e que a expressão de PPAR γ induzida por BCG, a formação de CLs e a produção de PGE $_2$ e TNF- α foram inibidas de forma irreversível em camundongos deficientes em TLR2, demonstrando a importância dessa via no aumento da expressão do PPAR γ (ALMEIDA *et al*, 2009). Como já foi dito, a literatura demonstra que a ativação do PPAR γ regula o acúmulo de lipídeos e a expressão de vários genes envolvidos no metabolismo lipídico incluindo a PLIN2/ADRP (NAGY *et al*, 1998 ; TONTONNOZ *et al*, 1998). Dados da literatura demonstram que o heterodímero PPAR γ :RXR participa de uma via de sinalização que potencializa a captação celular de LDL (do inglês “low density lipoprotein”) através da ativação transcricional do receptor CD36. A modificação oxidativa da partícula de LDL a torna capaz de ligar receptores do tipo scavenger (CD36) e, ao mesmo tempo, converte um componente da partícula, o ácido linoléico, num ativador eficaz do PPAR γ . Assim, como uma consequência de internalização de uma LDL-ox (LDL pós

modificação oxidativa) por endocitose mediada por receptor scavenger, um sinal de ativação para PPAR γ é encaminhado para o núcleo. A ativação transcricional do PPAR γ inicia um “loop” de realimentação positiva que aumenta a expressão do receptor de LDL-ox, o CD36 (NAGY *et al*, 1998 ; TONTONNOZ *et al*, 1998).

Além de ser um importante modulador metabólico, a via de sinalização deste receptor PPAR- γ é para a regulação do sistema imunológico. Estudos ao longo das últimas décadas demonstraram que o PPAR- γ suprime a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células epiteliais, promove o desenvolvimento de macrófagos M2 e aumenta o acúmulo de Treg em sítios inflamatórios, como o tecido adiposo visceral (DESVERGNE e WHALI , 1999)

Evidências indicaram um papel importante dos PPARs no controle de vários tipos de respostas inflamatórias. Essas funções são mediadas em grande parte as habilidades das isoformas PPAR α e PPAR γ , usando mecanismos dependentes de agonistas, para suprimir a atividades de muitos fatores de transcrição ativados, incluindo o fator nuclear-kB (NF-kB), transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs), proteína ativadora 1 (AP1) e fator nuclear de células T ativadas (NFAT) (DAYNES e JONES *et al*, 2002, GOSSET *et al*, 2001). PPAR γ é expresso por macrófagos e células dendríticas, bem como pelas células B e T, estando envolvidos ativamente em aspectos de imunorregulação por meio da capacidade de regular a homeostase energética, composição lipídica de diversas membranas e proliferação celular, por exemplo (ALLEVA *et al*, 2002, SETOGUCHI *et al*, 2001). Estudos da via do PPAR em infecções com *Trypanosoma cruzi* demonstraram que, a ativação desta via com a utilização de agonistas, levou a uma inibição de citocinas pró inflamatórias produzidas por macrófagos, como o TNF- α , a IL-6 e IL-1 β , além de inibir também a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, através da inibição da via do NF-kB. Com isso, a ativação do PPAR- γ em macrófagos infectados com *T.cruzi* levou estes a apresentarem um perfil de polarização M2, incapaz de eliminar o parasito (PENAS *et al*, 2015)

Também já foi demonstrado que ligantes específicos de PPAR γ inibem a produção de muitas citocinas inflamatórias como TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-6, a produção indutível de óxido nítrico, expressão de metaloproteinase

de matriz 9 (MMP9) e de receptores scavenger de macrófagos (MSR) em vários tipos de células, incluindo monócitos, macrófagos e células epiteliais, frente aos mais diversos estímulos, e não somente na infecção pelo *T.cruzi* (DELERIVE *et al*, 2001).

Na infecção *in vivo* pelo *Trypanosoma cruzi*, estudos demonstram que o PPAR- γ está diretamente ligado a regulação das características normais do tecido adiposo. Neste caso ambas as vias lipolítica e lipogênica são profundamente afetadas, uma vez que a expressão de enzimas lipolíticas e enzimas lipogênicas são reguladas negativamente de maneira intensa (GONZÁLES *et al*, 2018). Padrão semelhante foi observado em adipócitos isolados de animais infectados *in vitro* com *Trypanosoma cruzi*. Além disso, o tecido adiposo infectado *in vivo* revela um perfil pró-inflamatório, com aumento da infiltração de leucócitos acompanhada de superexpressão de TNF e IL-6 e diminuição da adiponectina. Surpreendentemente, o fator nuclear PPAR- γ está fortemente diminuído nos adipócitos durante a infecção *in vivo* (GONZÁLES *et al*, 2018).

Sendo assim, o estudo de corpúsculos lipídicos, bem como, a caracterização de moléculas que modulam a sua formação e interfiram na síntese de mediadores inflamatórios derivados desta organela, surge como uma possível alternativa terapêutica para infecções causadas por patógenos intracelulares,

1.4 – Vitamina D

A vitamina D é única entre os hormônios, devido ao fato de poder ser metabolizada na pele, a partir da exposição ao sol. A vitamina D apresenta duas formas, sendo elas a Vitamina D2 (ergocalciferol), que é metabolizada a partir da incidência de raios UV sobre o ergosterol do esporão do trigo e de leveduras, ocorrendo também naturalmente em cogumelos expostos ao sol. A vitamina D3 (colecalciferol) por sua vez, é sintetizada na pele e é abundante

em carne de peixes ricas em óleo, como o salmão. A vitamina D3 comercialmente vendida, como suplemento, é sintetizada a partir do precursor colesterol 7-deidrocolesterol, naturalmente presente na pele ou obtido a partir da lanolina (HOLICK, 2007 ; HOLICK *et al*, 2011 ; TAKIISHI *et al*, 2010).

No início do século passado, a Vitamina D foi considerada um micronutriente, pois a administração oral de uma colher de sopa de óleo de fígado de bacalhau por dia curava as crianças com raquitismo e se acreditava que a mesma atuaria como um co-fator enzimático. Na década de 1930, descobriu-se que a exposição à luz solar ou ultravioleta artificial formava vitamina D3 e que este mecanismo mantinha níveis adequados desta vitamina em seres humanos. Nos meados dos anos 60, esta vitamina começou a ser vista como um hormônio esteróide e seu derivado ativo foi identificado no final desta mesma década. Em 1971, forma ativa da vitamina D foi isolada por Kodicek e Norman e sua estrutura identificada por Holick. Ainda neste mesmo ano, Lawson determinou que este metabólito era produzido no rim a partir do processo de hidrolização, antes de agir nos órgãos-alvo. Iniciava-se então o entendimento deste hormônio complexo, pluripotente, tal como o conhecemos hoje (NORMAN, 2001 ; NISHII E OKANO, 2001 ; PREMAOR E FURLANETTO, 2006).

A vitamina D que é obtida através da alimentação é absorvida no sistema linfático, entrando assim no sistema venoso e, tanto esta, quanto a vitamina D produzida na pele apresenta inicialmente um estado inerte, requerindo que esta molécula passe por dois processos distintos de hidroxilação (o primeiro no fígado e o segundo nos rins) para atingir o seu estado biologicamente ativo (DE LUCA, 2004 ; HOLICK 2007).

Após estes processos a forma ativa da vitamina D (1,25-dihidroxitamina D) interage com o seu receptor específico presente em diversos órgãos do corpo, como intestino, rins e fígado e exerce as mais distintas funções. Dentre as funções mais conhecidas e importantes, podemos citar, por exemplo, a estimulação na absorção de cálcio e fósforo no intestino, de modo que em uma condição de hipovitaminose, apenas 10 a 15% do cálcio e 60% do fósforo é absorvido da alimentação diária, sendo a vitamina D responsável

pelo aumento de 30 a 40% da absorção de cálcio e 80% na absorção de fósforo (HOLICK , 2007 ; HOLICK *et al* 2011, DE LUCA 2004 ; HEANEY 2004).

É notável também a importância desse composto na formação óssea. O 1,25-di-hidroxitamina D interage com seu receptor nos osteoblastos de modo a estimular a expressão do receptor ativador do fator nuclear κ B , que por sua vez, induz monócitos imaturos a se tornar osteoblastos maduros, os quais dissolvem a matriz óssea, produzem osteocalcina e fosfatase alcalina, aumenta o recrutamento de cálcio e outros minerais para os ossos, a diferenciação e a fusão dos precursores em osteoclastos ativos, aumenta ainda a reabsorção de cálcio e fosfato em osso ainda não mineralizado. De fato, o raquitismo é um distúrbio que pode ser causado pela falta de vitamina D, que causa o amolecimento e o enfraquecimento dos ossos (STAVENUITER *et al* , 2005).

Outras importantes funções exercidas pela vitamina D dependem da ação local desta nos receptores específicos de cada tipo de tecido, esta demonstrando então uma grande gama de funções biológicas. Estudos já demonstram que a vitamina D ativa atua através do receptor de vitamina D (VDR), um receptor nuclear polimórfico que modula a expressão de diversos genes envolvidos em processos imunológicos (TAKIISHI *et al*, 2013), como por exemplo, a produção de citocinas (SRVIASTAVA *et al*, 1994; MANOLAGAS *et al*, 1994 ; LEMIRE, 1992). Além das funções supracitadas, outras de suas funções mais bem estudadas e compreendidas de grande importância que são dignas de citação são: a inibição da proliferação celular induzindo a diferenciação terminal ; inibição da angiogênese; estimulação da produção de insulina; inibição da produção da renina (enzima que controla a entrada de sangue nos glomérulos renais); estimulação à produção de catelicidinas por macrófagos (um peptídeo antimicrobiano presente no lisossomo de macrófagos e de extrema importância no controle de parasitos intracelulares, como o *Trypanosoma cruzi* (ADAMS E HEWISON, 2010 ; LIU *et al* 2006 ; BOUILLON *et al* 2008). A produção local de vitamina D em sua forma ativa pode ser responsável pela regulação de até 200 genes, que podem controlar fatores biológicos responsáveis pelos inúmeros benefícios para a saúde que vêm sendo documentados relacionados com a vitamina D (NAGPAL, 2005 ; MOAN J *et al*, 2008).

A deficiência de vitamina D é um dos distúrbios nutricionais mais frequentes atualmente, em todo mundo estimando-se que cerca de um bilhão de pessoas sofram de insuficiência ou deficiência dessa vitamina. No Brasil, embora a maioria da população resida em regiões de adequada exposição solar, a hipovitaminose D também é um problema comum, atingindo pessoas de qualquer idade (SANTOS *et al* 2012 ; OLIVEIRA *et al* 2013). Dentre os principais fatores causadores desse quadro, podemos citar a diminuição da transferência materno-fetal (gestantes com hipovitaminose D e casos de prematuridade), a diminuição da síntese cutânea pela exposição solar inadequada (uso de protetor solar, roupas que cubram quase todo o corpo, presença de poluição atmosférica, variação na latitude e nos tons de pele), a diminuição da absorção intestinal, seja por doenças (doença celíaca, doença inflamatória intestinal, fibrose cística, síndrome do intestino curto) ou por alimentação deficitária e o sequestro da vitamina D no tecido adiposo devido a obesidade (SAGGESE *et al*, 2015 ; SPECKER *et al* , 1985 ; KURIHAYASHI *et al* , 2015).

O baixo nível de vitamina D tem sido implicado na etiologia de doenças auto-imunes tais como esclerose múltipla, artrite reumatóide, diabetes mellitus dependente de insulina e doença inflamatória do intestino. O nível ideal de ingestão de vitamina D necessário para apoiar a função imunológica ideal não é conhecido, mas é provável que seja pelo menos necessário para os ossos saudáveis (YANG *et al*, 2013, SZÉLES *et al* , 2009). Experimentalmente, a deficiência de vitamina D resulta no aumento da incidência de doenças autoimunes. Alguns dados também apontam para um papel da vitamina D no desenvolvimento da autotolerância. O hormônio vitamina D (1,25-dihidroxi vitamina D3) regula a função das células T auxiliares (Th1) e das células dendríticas, ao mesmo tempo que induz a função reguladora das células T. O resultado é uma diminuição na resposta autoimune induzida por Th1 e diminuição da gravidade dos sintomas (KUNDU *et al*, 2014 ; VAN BRUSSEL I , *et al*, 2014)

Um dos mecanismos que veem sendo muito estudado, como dito a cima, é a regulação por parte do calcitriol, de células dendríticas e sua subsequente cadeia de regulação imunológica. Além dos característicos

estímulos imunológicos, as células dendríticas assumem padrões metabólicos diferentes conforme sua ativação, sendo o metabolismo de glicose através da fosforilação oxidativa um importante marcador de células envolvidas em processos tolerogênicos (BSCHADER E BUTCHER, 2016). Quando a 1,25-di-hidroxitamina D é administrada a monócitos humanos submetidos à diferenciação por GM-CSF para criar DC tolerogênicas, um programa de transcrição precoce é iniciado e envolve a fosforilação oxidativa. Ao sustentar a fosforilação oxidativa como um modo de degradação da glicose a VD3 pode apoiar ou favorecer a tolerância imunológica. Este efeito metabólico do VD3 poderia ajudar a explicar a associação da deficiência de VD3 com síndromes autoimunes e os efeitos potencialmente benéficos da suplementação de VD3 (FERREIRA *et al*, 2009; FERREIRA *et al*, 2015) Além disto, é necessária a expressão de “Immunoglobulin-like transcript 3” (ILT3) por DCs para induzir células T reguladoras CD4 + Foxp3 +. Um estudo descobriu que a 1,25-di-hidroxitamina D foi capaz de induzir suprarregulação da expressão de ILT3 em DC humanas imaturas e maduras. Além disso, este hormônio pode atuar na regulação do NF-κB que tem dentre suas funções regular a produção de IL-12, IFN tipo I, CCL7, receptor de quimiocina 22 (CCL22) e a expressão de moléculas MHC de classe II, CD40, CD80, CD86 e ILT3 (ADORINI L *et al*, 2004, ADORINI, 2011). O NF-κB é um regulador do sistema imune, genes inflamatórios e também é um alvo para muitos agentes anti-inflamatórios e imunossupressores, incluindo glicocorticóides e medicamentos anti-inflamatórios que se ligam à mesma família de receptores nucleares como o receptor de vitamina D. DCs humanos tratados com 1,25-di-hidroxitamina D mostraram diminuição da translocação nuclear da subunidade p65 do NF-κB, o que pode explicar alguns dos efeitos antiinflamatórios da Vitamina D. Além de seu potencial para controlar o desenvolvimento de DC, o VD3 modula diretamente as respostas das células T (DONG X *et al*, 2005). A presença de 1,25-di-hidroxitamina D durante a ativação de células T inibe sua proliferação, favorece o desenvolvimento das células. No entanto, os níveis circulantes de 1,25-di-hidroxitamina D in vivo são muito baixos. Para mediar esses efeitos, 25-OH-VD3, a principal forma circulante da vitamina, não ativa a transcrição dependente de VDR. Assim, a 1,25-di-hidroxitamina D deve ser gerada localmente para efetuar a programação das células T, e as DC podem cumprir

essa função: tanto as células dendríticas derivadas de monócitos, quanto subconjuntos humanos derivados de DC in vivo podem gerar e apresentar o hormônio para as células T (HEWISON M *et al*, 2003 , ADORINI *et al*, 2004)

Outros fatores relacionados com a imunoregulação gerada pela vitamina D também já são estudados e conhecidos. Por exemplo, sabe-se que a forma ativa 1,25-di-hidroxitamina D participa da conversão Th1/Th2 e agora no equilíbrio Th17/Treg. Especificamente, a 1,25-di-hidroxitamina D pode inibir o fenótipo Th17 inibindo a transcrição de ROR γ t, IL-17, IL-23R e IL-22 e promover o subgrupo Treg induzindo a expressão de IL-10. Foxp3 e CTLA-4. Além disso, a 1,25-di-hidroxitamina D também pode inibir a expressão de IL-2 e IFN- γ e modular a diferenciação de células Th17 (CHANG *et al*, 2010). A secreção do fator estimulante de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), também é inibida pela 1,25-di-hidroxitamina D . Além disso, a expressão da molécula marcadora Th17 CCR6 é reduzida pela vitamina D, o que, por sua vez, reduz o número de células Th17 que migram em resposta a CCL20. Este hormônio também tem efeitos diretos e potentes sobre as respostas das células B, incluindo indução de apoptose e inibição da proliferação, geração de células B de memória, diferenciação de células plasmáticas e produção de imunoglobulinas (HART *et al*, 2011). De maneira geral, a vitamina D apresenta funções variadas dependendo do subgrupo celular a qual ela esta atuando (Figura 4) e representa um importante mediador inflamatório pra diversas condições médicas importantes.

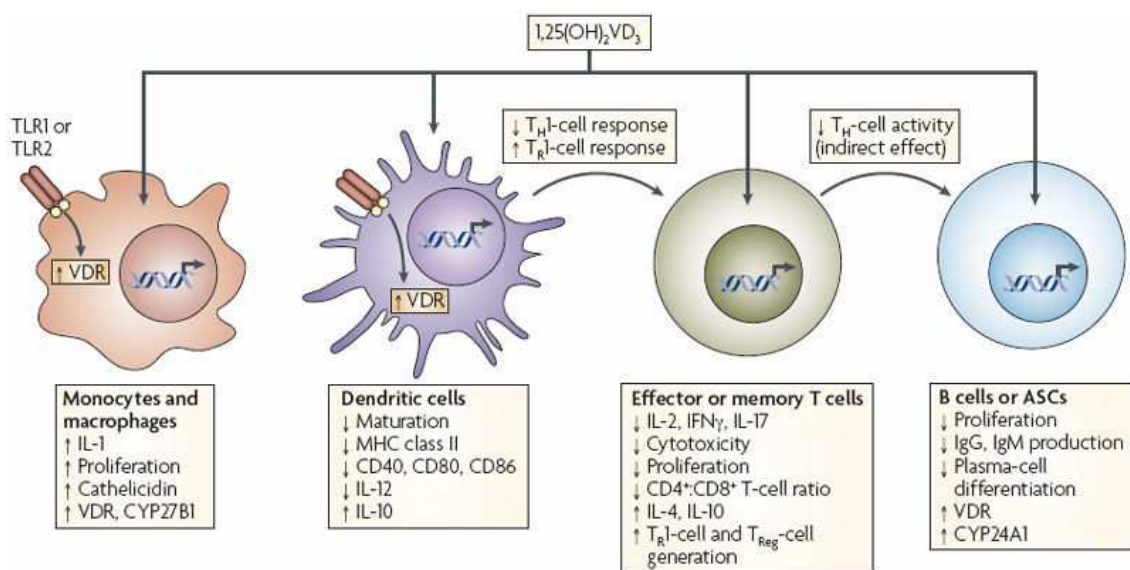


Figura 4: Resumo da atividade da vitamina D ativa sobre alguns importantes grupos celulares participantes da resposta imunológica (HART *et al*, 2011)

A depender de sua gravidade e duração, a hipovitaminose D pode ser assintomática ou se manifestar como atraso do crescimento, atraso do desenvolvimento, irritabilidade, dores ósseas e, quando grave e prolongada, causar hipo-calcemia, hipofosfatemia, hiperfosfatemia, acentuação da elevação do hormônio da paratireoide, raquitismo em crianças e osteomalácia em adolescentes e adultos. Hoje, devido aos estudos ligando a Vitamina D ao funcionamento do sistema imunológico, sabe-se também que o quadro de hipovitaminose pode levar os indivíduos a uma resposta deficitária frente a diversos desafios do ambiente, como por exemplo, infecções por patógenos intracelulares (BINKLEY *et al*, 2010 ; OLIVEIRA *et al* 2013).

1.5 – A vitamina D e doenças infectoparasitárias

Apesar da maioria dos estudos com vitamina D e doenças serem voltados para estudos com relação ao metabolismo ósseo (por exemplo, o já citado raquitismo) e, da literatura comumente a caracterizar como um mediador anti-inflamatório, novos estudos começam a sugerir que a Vitamina D também tenha um papel importante no desenvolvimento de diversos processos patológicos infecciosos, como por exemplo, na tuberculose, nas infecções do trato respiratório, nas infecções pelo vírus influenza e no desenvolvimento da AIDS. Apesar existirem indícios concretos da relação dessa vitamina com o prognóstico de diversas doenças, estudos ainda são necessários para compreender o papel molecular biológico desta nos processos infecciosos (KEARNS *et al*, 2015 ; GINDE *et al*, 2009).

Estudos epidemiológicos são realizados com frequência para relacionar os níveis séricos de vitamina D e a prevalência de doenças respiratórias. Após os surtos de influenza H1N1 em 2009, Edlich *et al*. recomendaram enfaticamente que todos os profissionais de saúde e pacientes fossem testados e tratados para deficiência de vitamina D para evitar a

exacerbação de infecções respiratórias. A vitamina D também reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias, o que pode reduzir o risco de reações de hipersensibilidade na infecção pelo H1N1 (EDLICH *et al*, 2009)

Estudos sugerem também que as propriedades imunomoduladoras da vitamina D influenciam a gravidade aguda de doenças do trato respiratório inferior e podem, assim, proteger contra a asma (JJ CANELL *et al*, 2006). Um recente estudo envolvendo estudantes japoneses encontrou uma incidência reduzida de asma em pessoas que tomavam vitamina D. Além disso, em crianças com asma, a diminuição dos níveis de vitamina D está associada ao aumento da necessidade de tratamento com corticóides. O pior prognóstico de outras infecções virais também são relacionados com os níveis de vitamina D. Estas infecções também constituem uma das principais causas de otite média aguda supurativa recorrente. Em um grupo de 16 crianças submetidas a miringotomia, um procedimento cirúrgico realizado para aliviar os sintomas desta infecção, foram observados níveis de 25 (OH) D abaixo do ideal, sendo que 50% eram deficientes e outros 31% apresentavam níveis insuficientes (BEARD *et al*, 2011, CAYIR *et al*, 2014)

O receptor de vitamina D (VDR) se encontra presente em diversos tipos celulares, como por exemplo em leucócitos e células epiteliais pulmonares e após a sensibilização destas células através dos toll-like receptors (TLRs), este tem sua expressão aumentada, implicando então a importância da vitamina D para a montagem ideal e efetiva de uma resposta imunológica inata (WHITE, 2008).

A maioria dos organismos multicelulares produz peptídeos antimicrobianos (PAMs) e proteínas, que podem matar vírus, fungos, protozoários, bactérias e outros micróbios. Nas pessoas, os PAMs são produzidos em superfícies epiteliais e dentro de células brancas circulantes (ZASLOFF, 2002). Alguns PAMs são expressos constitutivamente, e outros são expressos em resposta a estímulos como lesão tissular (por interleucina-1 e outras citocinas) ou componentes microbianos (como lipopolissacarídeo). Entre os mais bem estudados dos AMPs indutíveis estão as defensinas β humanas 2 e 3 e a LL-37 (também conhecida como catelicidina)(ZANETTI, 2004). Estudos recentes do gene que codifica o LL-37 revelaram que ele contém sítios

para o VDR. A forma ativa da vitamina D aumenta os níveis de LL-37 em neutrófilos humanos. O calcitriol também induz a expressão de LL-37 em queratinócitos em cultura de tecidos e após administração tópica na pele de indivíduos humanos(WANG *et al*, 2004 ; WEBER *et al*, 2005). O trabalho de Liu *et al* , 2006, determinou que dois genes são unicamente expressos em monócitos ativados: o VDR e o CYP 27B1, a enzima que converte o 25-D3 em na forma da vitamina D que se liga ao VDR. De fato, os macrófagos ativados e as células dendríticas expressam CYP27B1 que, diferentemente da enzima renal, não é regulada por sinais homeostáticos de Ca^{2+} , mas é regulada principalmente por estímulos imunes, principalmente IFN- γ e agonistas de receptores de reconhecimento do padrão tipo Toll (TLR). Criticamente, isso faz com que o sistema imunológico responda aos níveis circulantes de vitamina D (LIU *et al*, 2006)

Foi demonstrado também que os monócitos ativados incubados com calcitriol produziram LL-37, eliminando mais eficientemente o *Mycobacterium tuberculosis* quando na presença da vitamina. Liu *et al*. concluíram então que a estimulação de TLR 2/1 em monócitos humanos envolve um circuito intracelular dependente de vitamina D que resulta na expressão de LL-37. O resultado é a capacidade microbicida aumentada do monócito. Este estudo nos diz que aumentando os níveis séricos de vitamina D, se pode aumentar a capacidade de monócitos e macrófagos circulantes para matar certos microorganismos aos quais estão expostos. De fato, estes dados demonstram o porquê do banho de sol ter sido utilizado com até certo sucesso no tratamento da tuberculose durante anos e também pode ser a explicação da susceptibilidade de indivíduos negros ao *Mycobacterium tuberculosis*, mesmo que morem em regiões com grande incidência solar (LIU *et al*, 2006)

A importância da vitamina D, em outros processos infecciosos, começa a ser compreendida quando estudos demonstram que ao se ligar ao seu receptor VDR, ela induz nas células alvo um estímulo para produção de diversos outros compostos relacionados a atividade antimicrobial destas. Já sabe-se que a vitamina D é capaz de estimular a produção de, por exemplo defensinas e óxido nítrico (NO), principalmente em macrófagos e leucócitos multinucleares, como neutrófilos (WANG *et al*, 2004 ; CIORNEI *et al*, 2005 ; ROCKETT *et al*, 1998). Todos estes compostos representam armas efetivas

destas células contra infecções bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias. Frente a infecções extracelulares, por vermes por exemplo, a Vitamina D parece ser capaz de polarizar a resposta imunológica para um perfil Th2, que se apresenta mais eficiente para o combate a tais desafios (ROMANI , 2008 ; DIAZ E ALLEN, 2007).

Além disto a vitamina D tem a capacidade de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias através da indução de citocinas anti-inflamatórias, como por exemplo a IL-10. Isto é muito importante em quadros nos quais os danos causados ao hospedeiro e, que são conseqüentemente relacionados com a mortalidade destes, surgem de uma resposta inflamatória exarcebada que leva a uma destruição tecidual, com a sua conseqüente perda de função, como é o caso da sepse e da pneumonia, por exemplo. Isto poderia então explicar o porque da Vitamina D estar relacionada com a queda de mortalidade neste tipo de doença (CHEUNG *et al*, 2006 ; KELLUM *et al*, 2007).

Também já foi demonstrado e descrito acima que essa vitamina tem a capacidade de impedir a maturação de células dendríticas, suprimir as funções efectoras de IFN- γ em macrófagos, redução da expressão de MCP-1 e IL-6 também nestas células, regular a sinalização de TLRs, suprimir a produção de TNF- α , induzir o desenvolvimento de células T regulatórias e, conseqüentemente, suprimindo a ação de células T efectoras, bem como sua proliferação, participando assim também da resolução do processo inflamatório que poderia ser danoso para o hospedeiro (YIN e AGRAWAL, 2014).

De forma geral, a Vitamina D apresenta um papel imunoregulador em uma visão geral da sua ação na resposta imunológica. E através da indução da produção de produtos antimicrobianos, ela pode induzir um melhor controle de doenças infecciosas intracelulares, como já foi demonstrado e ressaltado acima, por exemplo, no caso da infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (LIU *et al*, 2006). Desta forma, torna-se importante a investigação do papel esta vitamina durante a infecção por *T cruzi*, analisando aspectos celulares e moleculares envolvidos nesta resposta. Além disso, este trabalho poderá elucidar potenciais alvos para realização de imunomodulação terapêutica e traçar um paralelo entre a

deficiência de vitamina D, um dos distúrbios nutricionais mais frequentes em todo mundo, e a suscetibilidade de indivíduos para a infecção por *T cruzi*, contribuindo para o desenvolvimento de agentes imunomoduladores e biofármacos.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo Geral

Investigar o papel da vitamina D na resposta inflamatória durante infecção experimental *in vitro* por *Trypanosoma cruzi* em macrófagos murinos

2.2 - Objetivos Específicos

- Analisar o efeito do tratamento com vitamina D na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais infectados *in vitro* por *T. cruzi*;
- Analisar o efeito do tratamento com vitamina D na síntese de citocinas TNF- α , IL-10 e KC por macrófagos peritoneais infectados *in vitro* por *T. cruzi* ;
- Avaliar o efeito do tratamento com vitamina D na síntese expressão das enzimas iNOS e arginase-1 por macrófagos peritoneais infectados *in vitro* por *T. cruzi*;
- Avaliar o efeito do tratamento com vitamina D na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais infectados *in vitro* por *T. cruzi*
- Investigar o efeito do tratamento com vitamina D replicação de *T. cruzi* em macrófagos peritoneais infectados *in vitro*;
- Investigar o papel da via de sinalização do PPAR- γ na biogênese lipídica, na formação de corpúsculos lipídicos e na síntese de citocinas por macrófagos infectados por *T. cruzi* *in vitro*.

- Investigar o efeito do tratamento com a vitamina D sobre a translocação do receptor nuclear PPAR- γ , na infecção experimental *in vitro* de macrófagos peritoneais por *T.cruzi*.

- Avaliar o efeito da ativação concomitante de PPAR- γ e do tratamento com vitamina D, sobre a formação de corpusculos lipídicos e replicação parasitária em cultura de macrófagos peritoneais.

3 – METODOLOGIA

3.1 - Animais

Foram utilizados camundongos machos C57Bl/6, com idade de 5 a 6 semanas de vida e peso médio variando entre 20 a 25 gramas, obtidos do Centro da Biologia da Reprodução (CBR – UFJF). Estes animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, cobertas com cama de maravalha, com livre acesso à água e ração, em uma sala com temperatura de 22 a 24°C, com ciclos de 12 h luz/escuro. Os animais foram divididos em 5 animais para cada gaiola de 30 x 19 x13 cm ou 10 animais para cada gaiola de 49 x 34 x16 cm e foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo CEUA- UFJF (protocolos 50/2012 e 018/2018).

3.2 - Obtenção de Tripomastigotas – Indução da metaciclogênese

Cultura do *T. cruzi* (cepa DM28c) foi obtida e mantida em laboratório como descrito em (CONTRERAS *et al*, 1985). As culturas de *T. cruzi* foram crescidas e mantidas em Meio de Infusão de Coração e Cérebro suíno (Brain Heart Infusion Medium – BHI) (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) à 27°C em uma estufa B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) por 7 dias, contendo aproximadamente 100% de epimastigotas. No final da fase exponencial de crescimento, os parasitos foram centrifugados à 2200 rpm por 15 minutos à 10°C, ressuspendidos em meio que simula a Urina Artificial de Triatomínio (TAU) (NaCl 190 mM, tampão fosfato 8 Mm pH 6.0, KCl 17 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM), e incubados por 2 h à temperatura ambiente. Os parasitas foram diluídos para concentração final de 5 x 10⁶ ml⁻¹ em TAU suplementado com bicarbonato de sódio 1,4%, 2,5% (v/v), 500

unidades de penicilina (mL-1), 10 mM de L-prolina (meio TAU-P) e incubados à 27°C em garrafas de cultura na incubadora B.O.D por 5 dias, obtendo assim aproximadamente 100% de tripomastigotas metacíclicos (CONTRERAS *et al*, 1985).

3.3 - Eutanásia e lavado peritoneal

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e depois o lavado peritoneal foi realizado com injeção de 5 ml de meio RPMI- 1640, suplementado com 1% de penicilina e estreptomicina, levemente resfriado. O lavado foi coletado, após massagem da cavidade, e armazenado em tubos tipo falcon de 15 mL em gelo.

3.4 - Infecção dos macrófagos por *Trypanosoma cruzi* , tratamento com vitamina D e estímulo com Rosiglitazona e GW

Os macrófagos peritoneais foram plaqueados em placas de 6 ou 24 poços. Para análise de corpúsculos lipídicos foram plaqueadas 5 x 10⁵ células por poço, com lamínulas circulares de vidro no fundo destes, e para análise por Western Blotting foram plaqueados 2 x 10⁶ por poço. As células ressuspendidas em meio RPMI-1640 contendo 2% SFB e 1% de penicilina e estreptomicina foram incubadas a 37°C, em atmosfera de CO₂, durante duas horas para adesão. Após estas duas horas, a placa foi lavada com PBS estéril (3x) para retirada das células não aderidas. Os poços do grupo infectado receberam o *Trypanosoma cruzi* (cepa Dm28c) em uma quantidade de 3 parasitos para 1 macrófago (MOI 3:1). Para estudos da via do PPAR- γ , os macrófagos foram tratados, durante 30 min antes da infecção, com BRL49653 (5 μ M,

Rosiglitazona, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) ou GW9662 (1 μ M, Sigma) a 37 ° C. Os controles veículo. Após o período de 24 horas de infecção, a placa foi novamente lavada para retirada dos parasitos não internalizados, o meio de cultura foi repostado e os poços do grupo tratado receberam Vitamina D (1,25-Dihydroxyvitamin D₃, #D1530, Sigma -Aldrich, Saint Louis, MO, USA) na quantidade de 100nM. Após mais 24 horas de incubação, os sobrenadantes destas culturas foram coletados e substituídos por formalina 3,7% para fixação dos macrófagos aderidos.

Para análise por Western Blotting as células foram lisadas com tampão de amostra e processadas segundo Almeida *et al* 2009, tendo sido preparadas sob condições redutoras e desnaturantes e submetidos a SDS-PAGE, utilizando β -mercaptoetanol como redutor.

Para contagem da replicação parasitária, macrófagos dos grupos infectado e infectado, tratado com vitamina D e/ou estimulados com rosiglitazona foram mantidos até o décimo terceiro dia pós infecção e o número de parasitos no sobrenadante foi quantificado no microscópio de luz, com auxílio da câmara de Neubauer, durante os dias 7 e 10 pós infecção.

3.5 - Contagem dos corpúsculos lipídicos.

As lamínulas fixadas com formalina 3,7% foram então lavadas para com PBS 1x e, posteriormente, receberam propilenoglicol 100% por 5 min. Depois foram incubadas com solução de Oil Red O (Sigma) a 0,5% por 10 min à 60°C. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas e montadas com meio de montagem contendo DAPI(4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) (para observação núcleos). Os corpúsculos lipídicos foram contados através da microscopia de fluorescência, sendo contados o número de CLs em 50 células consecutivas, observados em objetiva de imersão. Foram capturadas imagens dessas lâminas para ilustração do resultado, através de microscopia de fluorescência e câmera Digital XC-50, e do programa CellSens, objetiva de 100x (Olympus, Tokyo, Japan). As figuras foram elaboradas utilizando programa Adobe Photoshop versão S6.

3.6 - Dosagem de citocinas e quimiocinas

A concentração das citocinas TNF- α , IL-10 e KC no sobrenadante das culturas foi determinada por ELISA por meio da utilização de kits Duo set (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA) e os ensaios foram realizados seguindo as recomendações do fabricante. A leitura da densidade ótica foi realizada em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) a 450 nm utilizando o programa Softmax Pro. A quantificação das citocinas foi calculada a partir das curvas padrão, obtidas da diluição seriada dos respectivos recombinantes. Os resultados foram expressos como média \pm EPM.

3.7 - Western Blotting

Macrófagos foram lisados com tampão de amostra (Almeida et al, 2009) para obtenção das proteínas celulares. Essas amostras então foram submetidas a eletroforese em géis de 10% de acrilamida e transferidos para membranas de nitrocelulose que passaram por um bloqueio, para evitar ligações não específicas, com 5% de leite desnatado em TBST (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20). Posteriormente, estas membranas foram incubadas com anticorpos policlonais específicos de coelho anti-arginase I (sc-271430) ou iNOS murina (sc-7271) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) diluídos pra concentração de uso (1:500) em 1% de leite desnatado em TBST. Desta forma, as proteínas de interesse presentes na membrana de nitrocelulose foram identificadas após incubação com anticorpos secundários HRP-conjugados diluídos em TBST, seguido pela detecção de complexos antígeno-anticorpo por sinal quimioluminescente gerado pela reação do HRP do anticorpo secundário com o ECL (E Healthcare, Fairfield, CT, USA, ECL™ Prime Western Blotting System, RPN2232). As

análises foram realizadas utilizando parâmetros de densidade de sinal e tamanho das bandas no filme fotográfico.

3.8 - Imunofluorescência:

Para a imunolocalização de PPAR em macrófagos murinos, dos grupos experimentais controle, infectado e infectado tratado com vitamina D foram fixadas com formalina 3% por 10 minutos. Após as ligações inespecíficas específicas foram bloqueadas com a incubação com solução de bloqueio (1% soro de cabra em PBS 1X) por 1h. Posteriormente as células foram incubadas com anticorpo primário anti-PPAR (clone H100; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) por 1h a temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas 3 x com PBS 1x e as células foram incubadas anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 546 anti-coelho (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Soro de coelho não imune foi usado como controle negativo (The Jackson Laboratory). As lâminas foram analisadas através de microscopia de fluorescência e câmera Digital XC-50, e do programa CellSens, objetiva de 100x (Olympus, Tokyo, Japan). A marcação nuclear foi feita com DAPI (Sigma). As figuras foram elaboradas utilizando programa Adobe Photoshop versão S6.

3. 9 - Dosagem de óxido nítrico

O sobrenadante dos macrófagos peritoneais infectados com *Trypanosoma cruzi* ou não foram recolhidos e a quantificação óxido nítrico produzida foi determinada indiretamente pelo meio de conversão de nitrato e nitrito, pela ação da enzima nitrato redutase e o nitrito quantidade pela reação de Griess (Sulfonilamida em H_3PO_4 5%/ N1-naftil-etilenodiamia dihidroclorato em água destilada). Para reação de Griess adicionou-se 100 μ l de sobrenadante e 100ml do reagen de Griess e após 10 minutos a absorbância foi medida através de leitor de placa a 560nm. A quantidade de nitrito foi

determinada a partir da curva padrão de nitrato de sódio. Os resultados foram expressos como média \pm EPM.

3.10 – Gráficos e Análise Estatística

Os gráficos foram obtidos através do programa GraphPad Prism® 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e os resultados foram expressos como Média \pm EPM e analisados estatisticamente segundo ANOVA seguido pelo teste *t* de Student, com significância de $p < 0.05$.

3.11 – Delineamento experimental

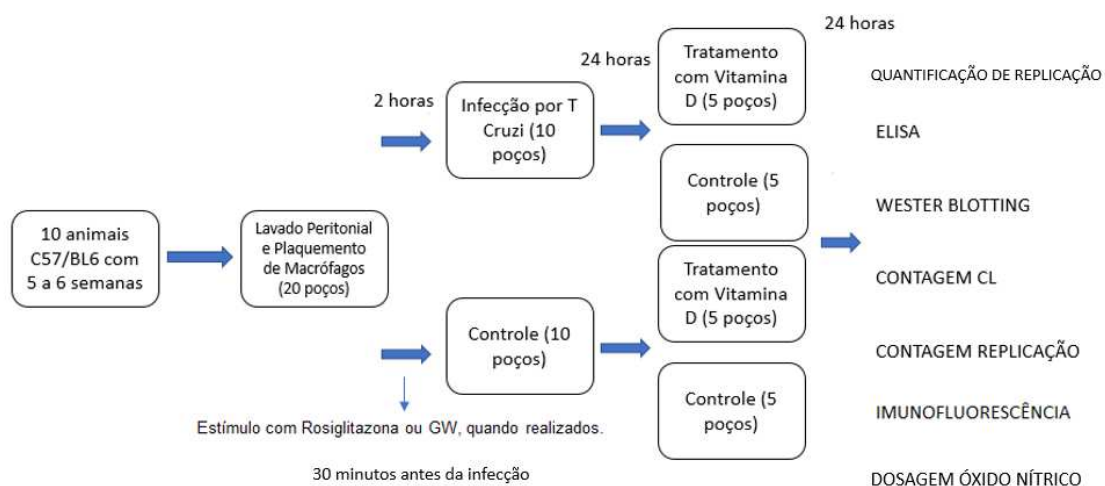


Figura 5. Delineamento experimental

4– RESULTADOS

4.1 – Vitamina D inibe a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*

Corpúsculos lipídicos apresentam papel fundamental no curso de infecções intracelulares e a literatura demonstra que o aumento na quantidade destas organelas aparenta favorecer a persistência da infecção devido ao fato destas organelas serem sítios de produção de mediadores inflamatórios de origem lipídica (RANGEL MORENO *et al*, 2002, DÁVILA *et al*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2009; TOLEDO *et al*, 2016) .

De fato, já foi demonstrado na literatura que em infecções por *Trypanosoma cruzi*, o estímulo leva a uma indução de corpúsculos lipídicos, através da via de sinalização TLR-2 , aumentando a capacidade dessas células de produzir PGE₂, diminuindo a capacidade da célula de combater a infecção, significando, então, uma importante ferramenta de escape e sobrevivência do patógeno (D'AVILA *et al*, 2011).

De modo a averiguar a formação desses CLs durante tratamento com vitamina D, macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl6 foram infectados com *T. cruzi* e, após a internalização dos parasitos (24h) as células foram lavadas e tratados com 100 nM de vitamina D. Após 24h, as células foram então coradas com Oil Red O para contagem do número de corpúsculos lipídicos por macrófago.

Nossos dados demonstraram que a infecção por *T. cruzi* induziu significativamente a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos *in vitro*, entretanto, o grupo que recebeu o tratamento com vitamina D, apresentou uma completa inibição na formação de corpúsculos lipídicos, em comparação com o grupo infectado, de modo a não apresentar diferença significativa do grupo controle não infectado (Figura 7). Na figura 8, é possível observar as diferenças entre o grupo infectado e infectado e tratado com vitamina D. Note que os corpúsculos lipídicos são observados como estruturas arredondadas em vermelho, após coloração com ORO. O núcleo das células foi evidenciado após

coloração com DAPI. No grupo infectado e tratado com vitamina D é possível observar várias células sem nenhum corpúsculo lipídico, enquanto que no grupo infectado praticamente todas as células apresentam a formação destas estruturas.

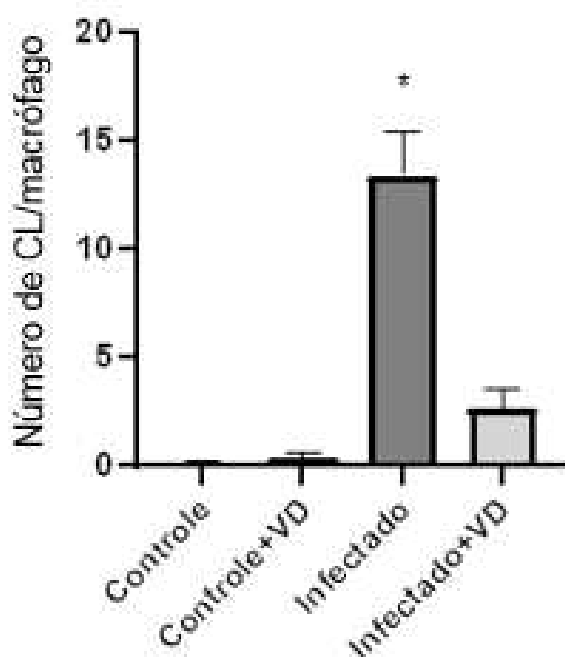


Figura 6 – Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante infecção *in vitro* por *T. cruzi* por 48h. Macrófagos peritoneais foram plaqueados por 2 horas, e, em seguida infectados por *T. cruzi* (MOI 3:1) por 24 horas, após esse período, as células foram tratadas com vitamina D (100 nM) por mais 24 horas. Os CLs formados foram então quantificados por microscopia de luz após coloração por Oil Red O. Como controle foram utilizados macrófagos não infectados e tratados com veículo. O símbolos (*) indicam diferença significativa $p \leq 0,05$ entre os grupos, $n \geq 5$. Gráfico de representativo de 3 experimentos independentes. Os resultados foram expressos em Média \pm EPM.

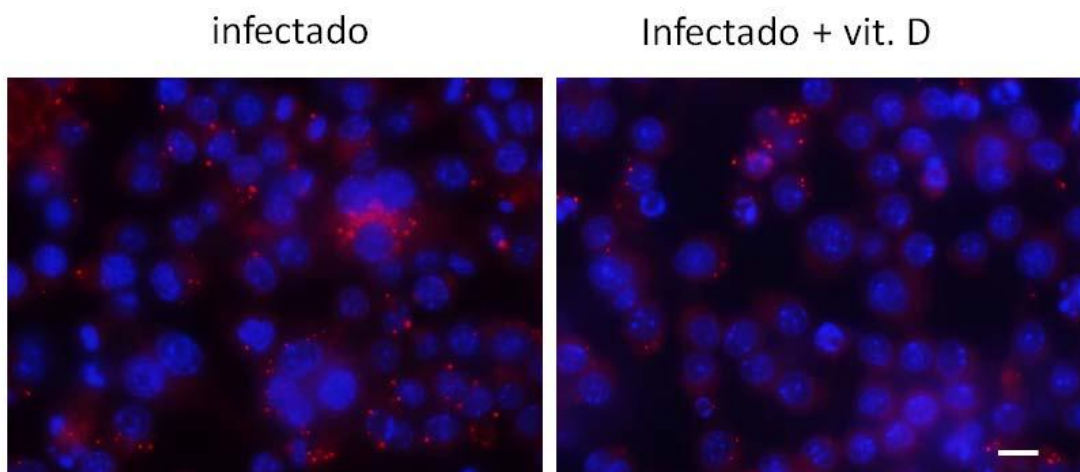


Figura 7. Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante infecção *in vitro* por *T. cruzi* por 48h. Macrófagos peritoneais foram plaqueados por 2 horas, receberam então a infecção (MOI 3:1) por 24 horas e, após esse período, o tratamento com vitamina D por mais 24 horas. Os CLs formados nos macrófagos aderidos em lamínulas redondas no fundo da placa foram então corados por Oil Red O e DAPI (para observação dos núcleos) . As imagens foram capturadas por microscopia de fluorescência. A sobreposição foi realizada através do programa Photoshop S6. Barra= 10 μ m.

4.2 – A produção de IL-10 é reduzida nos grupos tratados com Vitamina D e a produção de KC é aumentada.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, sendo produzida principalmente por macrófagos e linfócitos e sua principal função parece ser a regulação do sistema imune, inibindo significativamente a expressão e/ou síntese de citocinas ou adipocinas pró-inflamatórias por meio de contrarregulação negativa, tendo propriedades anti-inflamatórias multifacetadas, incluindo a inibição da atividade de macrófagos e células T. Através da supressão da via

do IFN- γ , essa citocina pode diminuir a atividade de macrófagos e impedir a liberação de metabólitos tóxicos no espaço intracelular. A IL-10 também é capaz de suprimir uma diferenciação da resposta Th1, bem como polarizar macrófagos para o tipo regulatório de macrófagos, os macrófagos M2 (IP *et al*, 2017 ; VOLPE *et al*, 2008).

Na Doença de Chagas, já se é demonstrado que a IL-10 apresenta um papel distinto durante as diferentes fases da doença. Estudos demonstram que, durante a fase aguda da infecção, uma alta produção de IL-10 está relacionada com o pior controle da replicação do parasito, provavelmente devido a desativação de macrófagos, bem como o desenvolvimento dos sintomas mais graves, como a cardiomiopatia (SILVA *et al*, 1992). Por outro lado, uma alta expressão de IL-10 durante a fase crônica da doença, pode ser um perfil protetor, uma vez que o controle eficiente da resposta imunológica pode evitar os danos teciduais característicos que levam ao desenvolvimento de tais sintomas (GUEDES *et al*, 2009).

A produção de TNF- α por sua vez, está diretamente relacionada com o desenvolvimento ou não dos sintomas mais graves da Doença de Chagas, já sendo demonstrado, por exemplo, que a maior expressão desta citocina pode representar um efeito protetor para o hospedeiro (FERREIRA *et al*, 2003).

A KC é o equivalente murino do CXCL1 humano e é uma quimiocina expressa por macrófagos, neutrófilos e células epiteliais, e tem atividade quimiotática de neutrófilos. O CXCL1 desempenha um papel no desenvolvimento da medula espinal inibindo a migração de precursores de oligodendrócitos e está envolvido nos processos de angiogênese, arteriogênese, inflamação, cicatrização de feridas e tumorigênese (RITZMAN *et al*, 2010, TSAI *et al*, 2002, VRIES *et al*, 2015).

O recrutamento de neutrófilos para o local da infecção é um primeiro passo crítico na resposta imune aos patógenos. Os neutrófilos são altamente fagocíticos e capazes de engolir e destruir muitos invasores microbianos; no entanto, eles também estão ligados ao dano tecidual, que pode ocorrer na liberação extracelular do conteúdo de grânulos neutrofílicos (RITZMAN *et al*, 2010).

Para avaliarmos a produção dessas citocinas, o sobrenadante da cultura de de macrófagos dos grupos experimentais foram coletados e o ELISA foi realizado para detecção destas citocinas. Nossos resultados demonstram que a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* foi capaz de induzir significativamente uma produção de IL-10 (Figura 8), porém não de TNF- α (Figura 9) e que o tratamento com vitamina D foi capaz de reduzir essa produção de IL-10 a níveis que não diferem significativamente do grupo controle. O grupo controle não infectado apresentou níveis abaixo da detecção pelas curvas nestas 2 citocinas analisadas, por isso não foram representados nos graficos. Com relação a KC, não houve diferença estatística entre os grupos controles e infectados, porém o tratamento com vitamina D aumentou significativamente a produção desta citocina em relação ao grupo infectado (Figura 10).

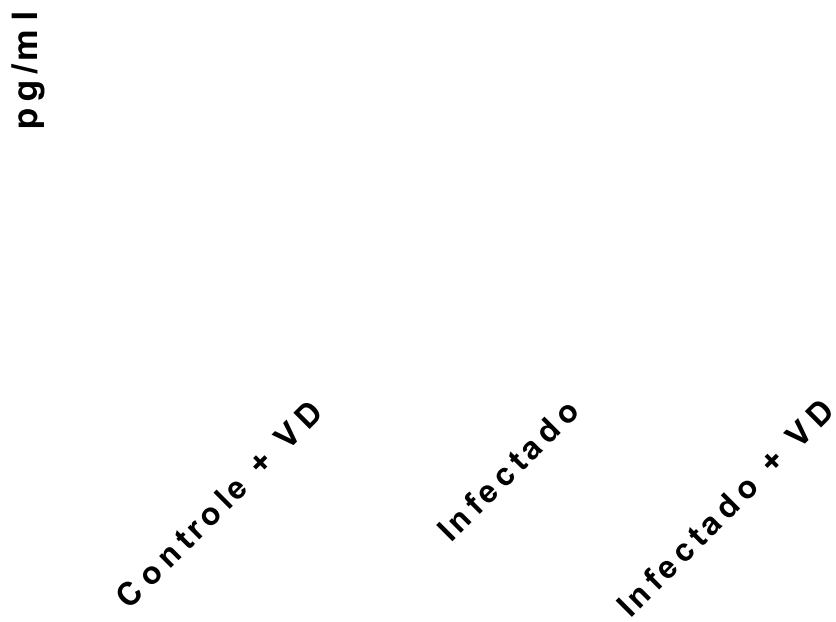


Figura 8. Quantificação da produção de IL-10 no sobrenadante da cultura de células. Macrófagos peritoneais foram plaqueados por 2 horas, receberam então a infecção (MOI 3:1) por 24 horas e, após esse período, o tratamento com vitamina D por mais 24 horas. O sobrenadante desta cultura foi coletado e a IL-10 foi dosada por ELISA. O símbolo (*) indica diferença significativa $p \leq 0,05$ em relação aos grupos sinalizados, $n \geq 5$. Gráfico projetado a partir do programa Graphpad prism 5® utilizando ANOVA. Gráfico de representativo de 3 experimentos independentes. Os resultados foram expressos em Média \pm EPM.

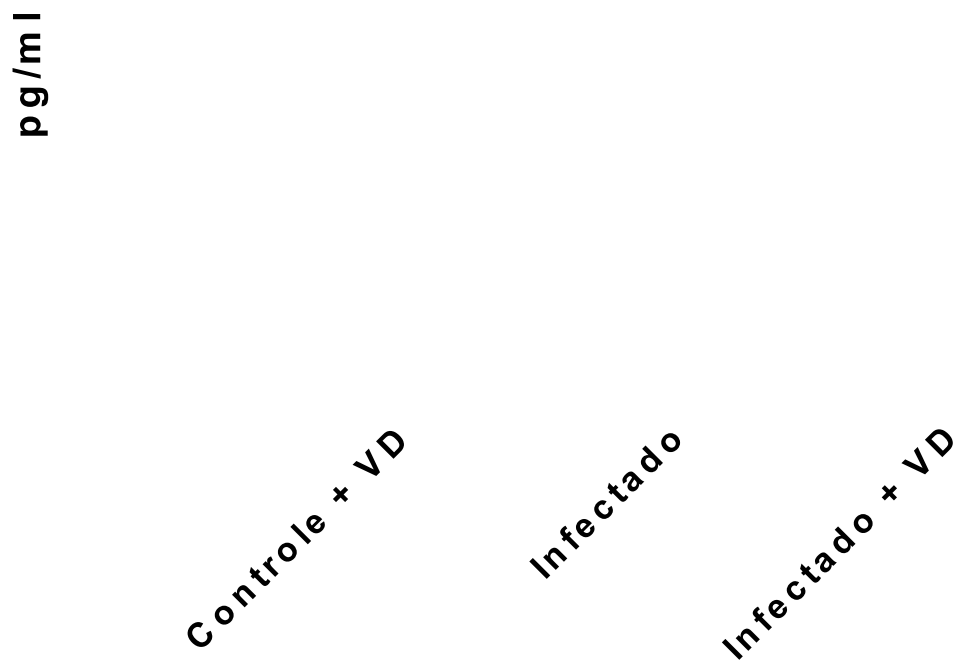


Figura 9. Quantificação da produção de TNF- α no sobrenadante da cultura de células. Macrófagos peritoneais foram plaqueados por 2 horas, receberam então a infecção (MOI 3:1) por 24 horas e, após esse período, o tratamento com vitamina D por mais 24 horas. O sobrenadante desta cultura foi coletado e o TNF- α foi dosado por ELISA.. Gráfico projetado a partir do programa Graphpad prism 5[®] utilizando ANOVA. Gráfico de representativo de 3 experimentos independentes com $n \geq 5$. Os resultados foram expressos em Média \pm EPM.

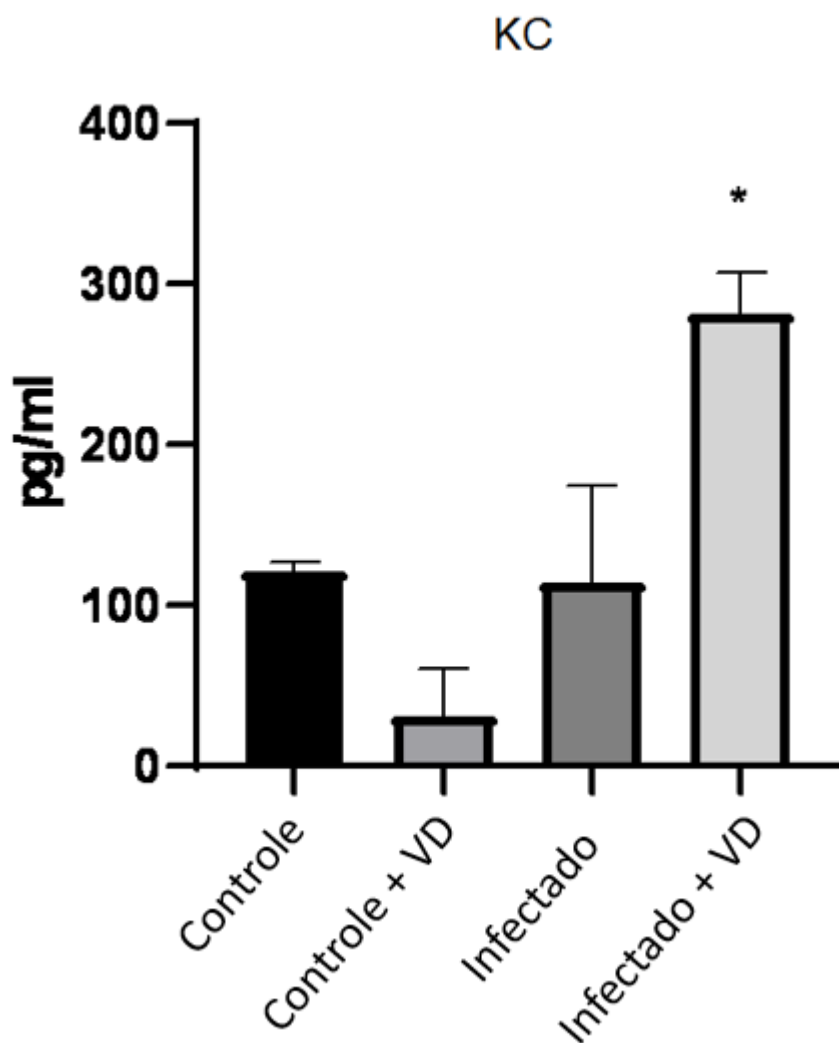


Figura 10. Quantificação da produção de KC no sobrenadante da cultura de células. Macrófagos peritoneais foram plaqueados por 2 horas, receberam então a infecção (MOI 3:1) por 24 horas e, após esse período, o tratamento com vitamina D por mais 24 horas. O sobrenadante desta cultura foi coletado e a KC foi dosada por ELISA, $n \geq 5$. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5® utilizando ANOVA. Os resultados foram expressos em Média \pm EPM.

4.3 – O tratamento com Vitamina D aumenta a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), bem como a produção de óxido nítrico e diminui a expressão de arginase-1.

O óxido nítrico é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxica devido à presença de radical livre (elétron extra) que a torna um agente químico altamente reativo (VESPA et al, 1994).

Na infecção pelo *T. cruzi*, o óxido nítrico é formado a partir do terminal guanidina do átomo de nitrogênio da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), de maneira dependente de, por exemplo, estimulação por enzimas pró inflamatórias, como o IFN- γ . Esta molécula, bem como diversos outros óxidos de nitrogênio produzidos pelos macrófagos são citotóxicos para uma grande variedade de patógenos, principalmente os patógenos intracelulares, como é o caso do parasito deste estudo. De fato, diversos estudos apontam que durante a fase aguda da doença, o controle da parasitemia depende diretamente da produção de óxido nítrico dependente da estimulação por mediadores pró inflamatórios, sendo a montagem correta desta resposta um grande fator de proteção do hospedeiro em relação ao aparecimento de sintomas e o desenvolvimento mais grave da doença (GUEDES *et al*, 2010 ; ALIBERTI *et al*, 1999 ; ALIBERTI *et al*, 2001, MACHADO *et al*, 2000).

Por outro lado, a literatura mostra que a indução de enzima arginase (Arg) -1 em macrófagos conduz a uma maior suscetibilidade à infecção por parasitas da família Trypanosomatidae, havendo dois mecanismos pelos quais o Arg-1 pode neutralizar as funções efetoras em macrófagos (KROPF et al, 2005 ; DAR E HÖLSCHER, 2018) No início, Arg-1 poderia antagonizar a produção de intermediários reativos de nitrogênio (RNI) pela NOS2 através de depleção de L-arginina, o substrato comum desses dois enzimas, ou pela inibição da NOS2 através de metabólitos da via Arg-1. Além disso, a atividade da arginase resulta em um fornecimento de poliaminas capazes de apoiar a proliferação de parasitas intracelulares, sendo então um fator de pior

prognóstico da resposta imunológica ao *T.cruzi* (KROPF *et al*, 2005 ; GOBERT *et al*, 2000).

A fim de avaliar a expressão das enzimas iNOS e arginase-1, amostras de células dos grupos infectados e tratados, e seus respectivos controles, foram processadas para liberação total das proteínas celulares e a amostra então foi submetida à técnica de Western Blotting, conforme TOLEDO *et al* de 2017. Como observado na figura 10, os grupos tratados com vitamina D, tanto o controle não infectado como o grupo infectado, apresentaram maior expressão de iNOS comparado com os grupos não tratados. E, durante a infecção, a vitamina D aumentou a expressão desta proteína, quando comparamos com o grupo infectado não tratado (Figura 11 A e B) . Em contrapartida, a produção de arginase-1 foi reduzida pelo tratamento com vitamina D, tanto nos grupos infectados, quanto nos grupos não infectados, apresentando uma redução significativa em sua expressão no grupo infectado tratado com vitamina D, em relação ao não tratado (Figura 11). Na produção do óxido nítrico por sua vez, foi notada uma tendência de aumento frente ao tratamento com vitamina D, entre os grupos infectados (Figura 12 A e B). Também foram dosados níveis de espécies reativas de oxigênio, na forma de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), porém todos os grupos experimentais ficaram abaixo do nível de detecção da curva, não apresentando produção mensurável na metodologia adotada (dados não demonstrados).

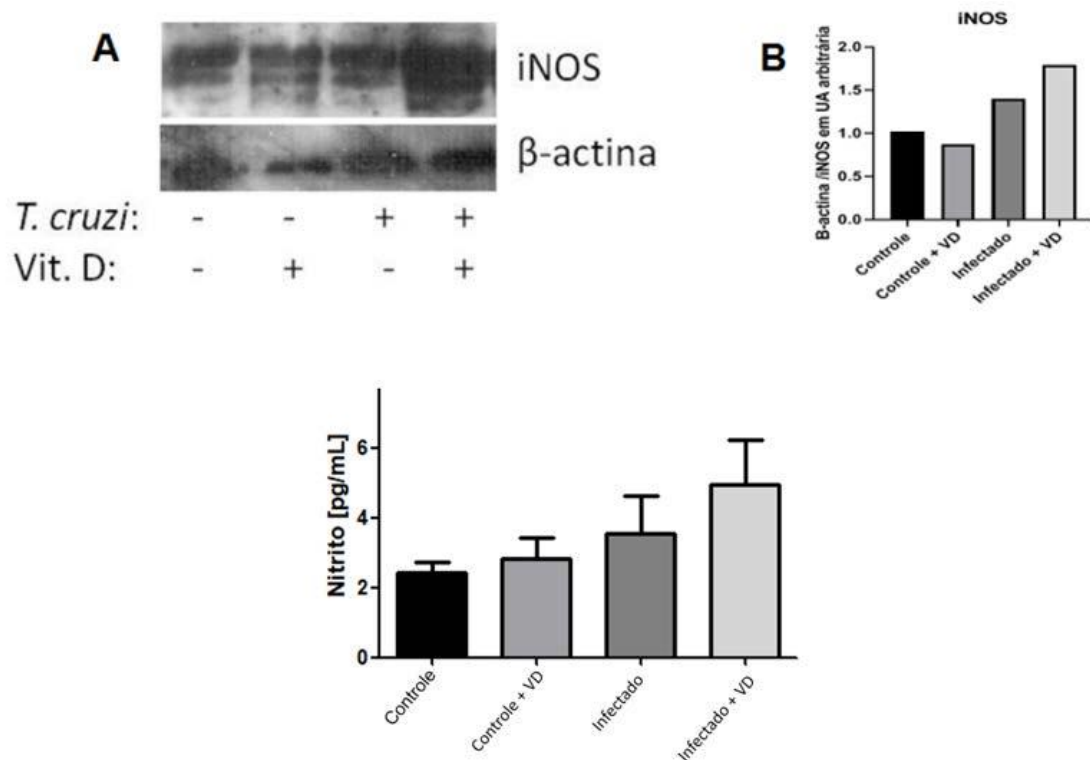


Figura 11. Quantificação da expressão de iNOS e NO pelas células em cultura. Macrófagos peritoneais foram plaqueados por 2 horas, receberam então a infecção (MOI 3:1) por 24 horas e, após esse período, o tratamento com vitamina D por mais 24 horas. (A) As células foram lisadas com tampão de amostra para liberação das proteínas totais celulares e expressão de iNOS foi realizada pela técnica de Western Blotting. (B) o Gráfico representa a análise de densitometria (unidades arbitrárias) das bandas do Western blotting. (C) O NO foi dosado no sobrenadante da cultura através do método de Griess. O símbolo (*) indica diferença significativa $p \leq 0,05$ em relação aos grupos controles, $n \geq 5$. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 6® utilizando ANOVA. Os resultados foram expressos em Média \pm EPM.

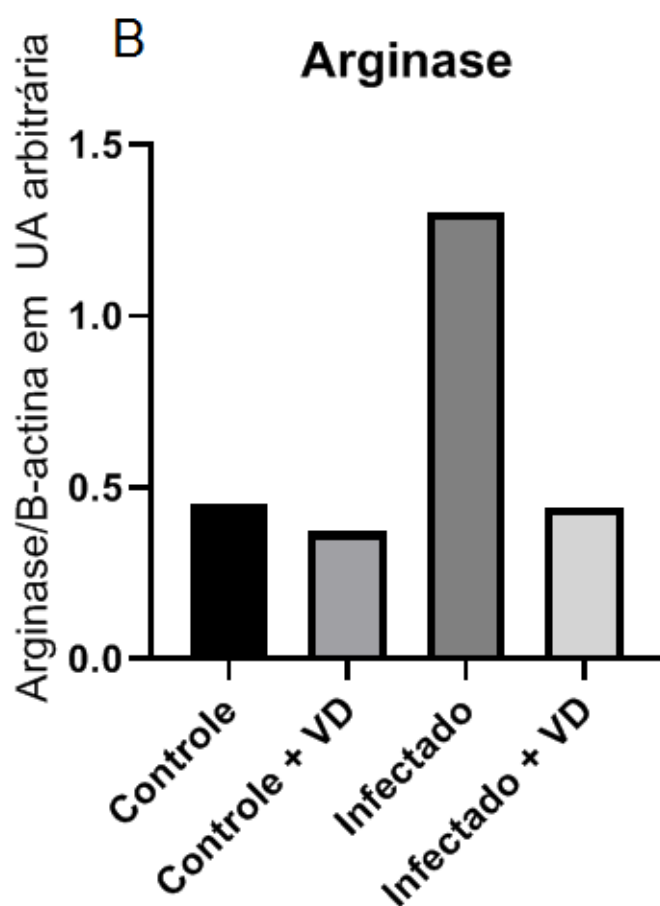
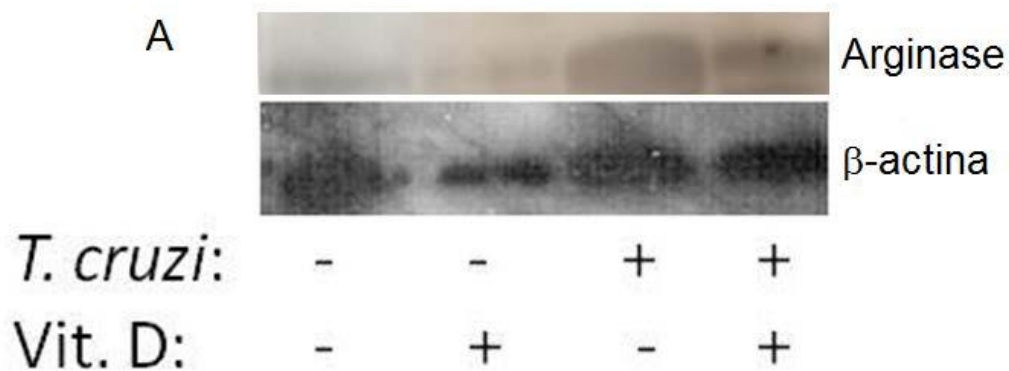


Figura 12. Quantificação da expressão de arginase pelas células em cultura. Macrófagos peritoneais foram plaqueados por 2 horas, receberam então a infecção (MOI 3:1) por 24 horas e, após esse período, o tratamento com vitamina D por mais 24 horas. (A) As células foram lisadas com tampão de amostra para liberação das proteínas totais celulares e expressão de arginase foi realizada pela técnica de Western Blotting. (B) O gráfico representa a análise de densitometria (unidades arbitrárias) das bandas do Western blotting.

4.4 – A replicação do *Trypanosoma cruzi* é reduzida nos grupos tratados com Vitamina D.

Conforme descrito na literatura, a Vitamina D parece exercer um papel com tendências imunossupressoras, uma vez que já é conhecido que ela é capaz de induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias, bem como de reduzir a função de citocinas pró inflamatórias e a expressão receptores ativadores de células efetoras do sistema imunológico, como por exemplo, macrófagos. Ela também se mostra capaz de induzir a diferenciação de células reguladoras. No quadro de doenças nas quais a resposta inflamatória é o fator que causa destruição tecidual e, conseqüentemente, aumenta as complicações da doença, a vitamina D pode ser um fator favorável para redução da mortalidade (KELLUM *et al*, 2007 ; YIN e AGRAWAL, 2014).

Por outro lado, a vitamina D também demonstrou ser capaz de induzir a produção de compostos antimicrobianos por parte de certas células efetoras do sistema imunológico, podendo então por sua vez, também ser importante para o controle de doenças por patógenos intracelulares, uma vez que o estabelecimento desses se deve a sua capacidade de desmontar a resposta que os eliminaria e seria, teoricamente, aumentada pela vitamina. Dentro desse exemplo, investigamos o efeito do tratamento com vitamina D na replicação de *T. cruzi* em macrófagos e sua liberação para o meio extracelular (WANG *et al*, 2004 ; CIORNEI *et al*, 2005 ; THIJSSSEN *et al*, 1986 ; ROCKETT *et al*, 1998).

Nossos dados então demonstram que, o pós-tratamento por 24 horas com vitamina D foi capaz de inibir significativamente a replicação de *T. cruzi* em macrófagos, conforme observado pelo número de parasitos liberados na forma tripomastigota no décimo dia pós infecção (Figura 13). Como controle do efeito da vitamina D sobre o *T. cruzi* diretamente, 5 poços contendo o parasito em suspensão foram tratados com vitamina D. A vitamina D não teve nenhum efeito direto sobre a viabilidade dos parasitos no sobrenadante. Mostrando que a vitamina D não é citotóxica sobre o parasito diretamente (dados não demonstrados).

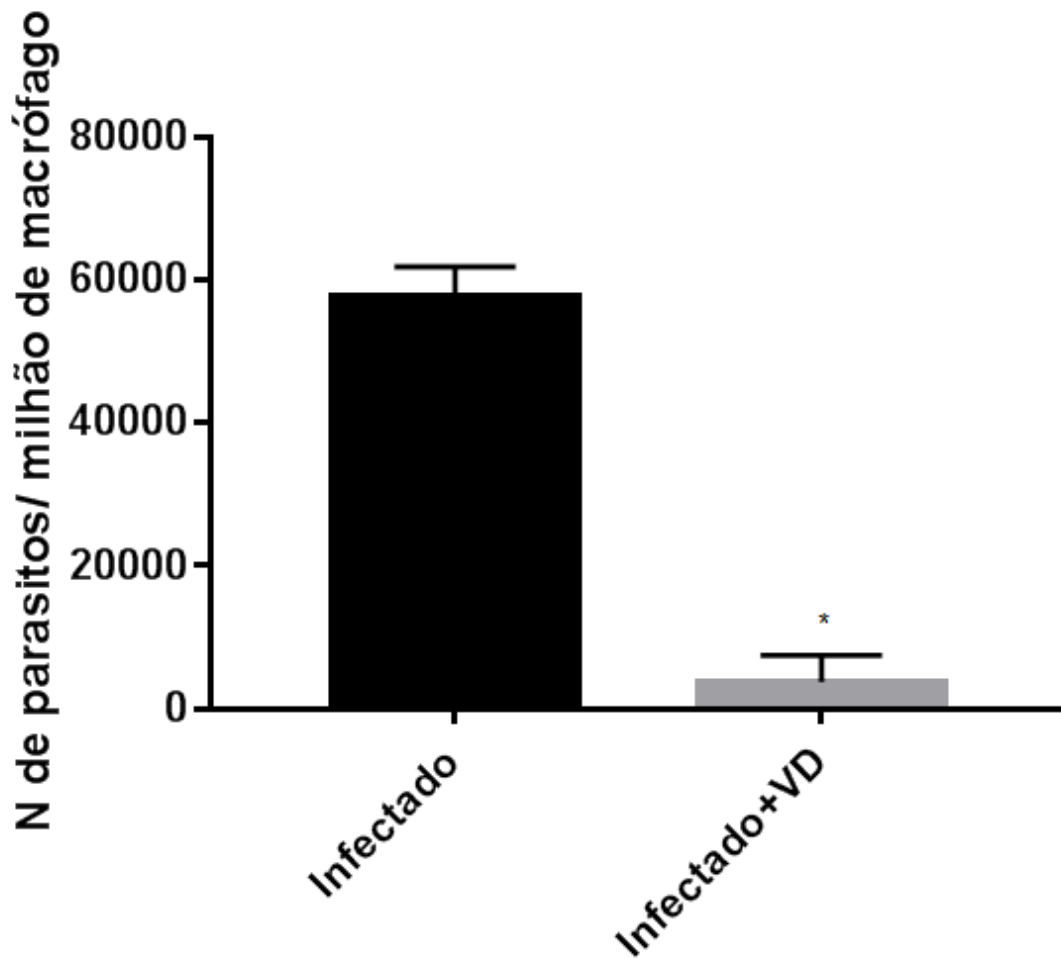


Figura 13 – Efeito da vitamina D na replicação do parasito. Macrófagos peritoneais foram plaqueados por 2 horas, receberam então a infecção (MOI 3:1) por 24 horas e, após esse período, o tratamento com vitamina D por mais 24 horas. No décimo dia após o tratamento, os parasitos no sobrenadante da cultura foram contados para averiguar a liberação destes. * indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos de estudo ($n \geq 5$). Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5®. Os resultados foram expressos como média \pm EPM.

4.5 – A formação de corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em cultura de macrófagos peritoneais é suprimida pela ação do GW 9662 e aumentada pela ação da Rosiglitazona.

A rosiglitazona é um fármaco pertencente à classe química das tiazolidinedionas. Provoca redução dos níveis de glicose circulante e torna as células (hepática, muscular e adiposas) mais sensíveis a insulina. Atua nos receptores da insulina e também reduz a gliconeogênese hepática e por isso é muito utilizada e estudada para tratamento de diabetes tipo 2 (ZHI *et al*, 2019) , apesar de recentemente ter sido proibida sua utilização na Europa, devido aos seus graves efeitos colaterais cardíacos possíveis. A rosiglitazona é um potente agonista da via do PPAR- γ e a literatura demonstrou aumentar a fagocitose macrofágica de protozoários e reduzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por parasitas de monócitos e macrófagos *in vitro* (VARO *et al*, 2017). O GW 9662, por sua vez , é um potente antagonista da via do PPAR- γ , sendo amplamente utilizado para estudos desta via de sinalização (ALMEIDA *et al*, 2009; HILLIARD *et al*, 2019).

Trabalhos anteriores do grupo demonstraram o efeito da ativação de PPAR- γ de corpúsculos lipídicos em infecções por micobactérias (ALMEIDA *et al*, 2009) e o papel do PPAR - γ na resposta imune mediada pela fagocitose de células apoptóticas durante a infecção por *T cruzi* (TEIXEIRA *et al*, 2011). Nós então decidimos investigar se a vitamina D teria algum efeito na sinalização para formação de corpúsculos lipídicos via ativação de PPAR- γ . Inicialmente nós adequamos e padronizamos o modelo descrito por Teixeira *et al* (2011) para o nosso laboratório de pesquisa.

De modo a averiguar a formação dos CLs nos grupos tratados, macrófagos peritoneais de camundongos foram previamente tratados com GW9662 e Rosiglitazona por 30 minutos e, em seguida, infectados com *T. cruzi*. Após 24h, as células foram então coradas com Oil Red O para contagem do número de corpúsculos lipídicos por macrófago.

Nossos resultados demonstraram que na infecção experimental *in vitro* de macrófagos peritoneais por *T cruzi*, o GW9662 foi capaz de inibir significativamente a formação de corpúsculos lipídicos nessas células,

enquanto que a Rosiglitazona teve um efeito indutor da formação destas organelas nos grupos infectados (Fig 14).

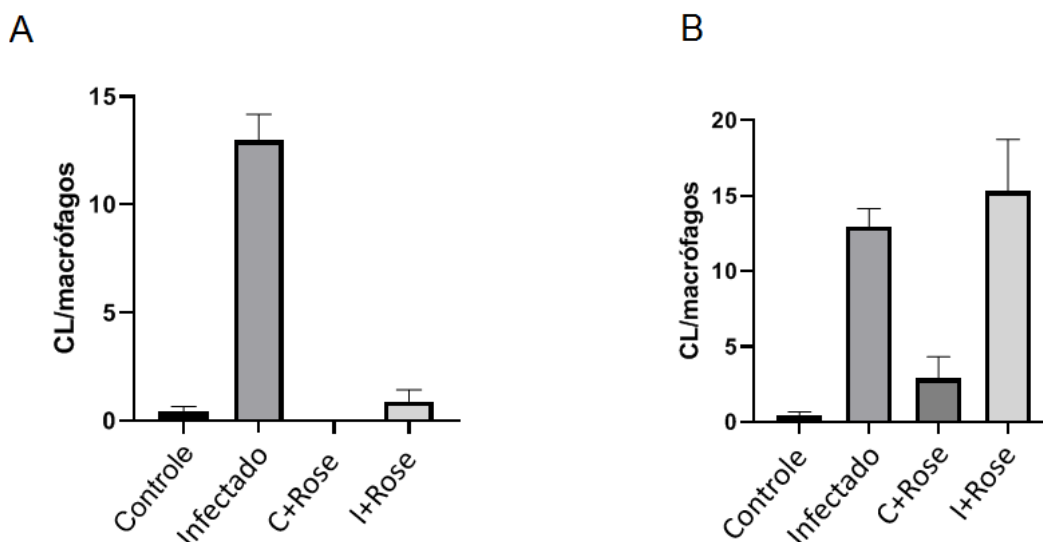


Figura 14 – Efeito da via de ativação de PPAR - γ na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante infecção *in vitro* por *T. cruzi* por 24h. Macrófagos peritoneais foram plaqueados por 2 horas, e meia hora antes da infecção receberam o tratamento com GW ou Rosiglitazona, sendo então realizada a infecção (MOI 3:1) por 24 horas. Os CLs formados foram então quantificados por microscopia de fluorescência (coloração por Oil Red O). Os símbolos (*) indicam diferença significativa $p \leq 0,05$ entre os grupos, $n \geq 5$. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5® utilizando ANOVA. Os resultados foram expressos em Média \pm EPM.

4.6 – O tratamento com GW9662 estimula tanto a produção de IL-10 quanto a produção de TNF- α nos grupos infectados.

Diversos estudos demonstram que a via do PPAR- γ não parece influenciar na produção de diversas citocinas que são produzidas por

macrófagos e são importantes marcadores de uma resposta inflamatória eficaz para eliminação do patógeno. Por exemplo, estudo de Almeida *et al* de 2009, demonstrou que apesar do *Mycobacterium bovis* induzir a via do PPAR- γ , levando a biogênese lipídica e formação de CLs, esta mesma via não parece participar do aumento da produção de citocinas pró inflamatórias induzidas pela infecção, como por exemplo IL-12, TNF- α e IL-6 (ALMEIDA *et al*, 2009).

Por outro lado, estudos mostraram que a ativação do PPAR pode inibir as vias de NF- κ B e MAPK, duas das mais importantes vias de sinalização que regulam as respostas pró-inflamatórias desencadeadas pela ativação de TLR, resultantes também, na produção de citocinas pró inflamatórias (OGAWA *et al*, 2005). Como já foi descrito, o PPAR- γ já foi identificada nas células apresentadoras de antígenos, monócitos e macrófagos e agonistas sintéticos do PPAR incluindo pioglitazona, troglitazona e rosiglitazona mostraram suprimir a produção de citocinas inflamatórias por essas células em diversos quadros inflamatórios, como na diabetes (RICOTE *et al*, 1998 ; JIANG *et al*, 1998).

Para avaliar se os dados descritos por Almeida *et al* (2009) se repetiam na infecção por *T. cruzi*, nós avaliamos o efeito do inibidor desta via, GW 9662, sob a produção de IL-10 e TNF- α . Para avaliarmos a produção dessas citocinas, o sobrenadante da cultura de células de macrófagos infectados e tratados, e do controle não infectado, foi coletado e o ELISA foi realizado para detecção destas citocinas. Demonstramos que o GW foi capaz induzir, na infecção experimental *in vitro* por *T. cruzi*, a produção tanto de IL-10, quanto de TNF- α , nos grupos infectados, não alterando a produção destas citocinas nos grupos não infectados. (Figura 15). A produção de KC não foi alterada pelo pré tratamento com GW9662 (dados não demonstrados).

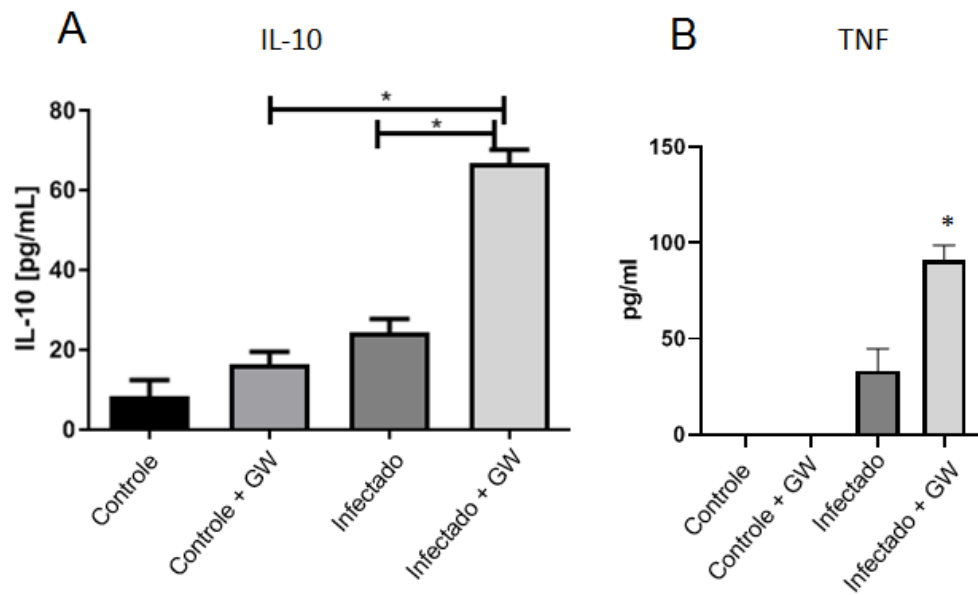


Figura 15. Quantificação da produção de IL-10 e TNF- α no sobrenadante da cultura de células.

Macrófagos peritoneais foram plaqueados por 2 horas, foram pré tratados meia hora antes da infecção com GW 9662 e receberam então a infecção (MOI 3:1) por 24 horas . O sobrenadante desta cultura foi coletado e a IL-10 e TNF- α foram dosadas por ELISA. O símbolo (*) indica diferença significativa $p \leq 0,05$ em relação ao respectivo controle, $n \geq 5$. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5@ utilizando ANOVA. Os resultados foram expressos em Média \pm EPM.

4.7 – O tratamento com Rosiglitazona, agonista da via do PPAR- γ (Rosiglitazona) reverteu os efeitos da vitamina D na supressão da formação de corpúsculos lipídicos.

Estudos já demonstram que a vitamina D é capaz de alterar a via do PPAR- γ podendo sua deficiência levar a importante desorganização estrutural da fibra muscular e acúmulo de gordura dentro e fora das fibras musculares (LI *et al*, 2018). A vitamina D pode também ter importante papel no fígado, regulando a via do PPAR- γ e coordenando a lipogênese e sua deficiência levando à redução da beta-oxidação, predispondo o acúmulo de gordura no fígado (BORGES *et al*, 2018).

Por outro lado, estudos sobre como a vitamina D poderia atuar na via do PPAR- γ em casos de infecções patológicas ainda são escassos, sendo esta relação uma área de estudo recente. Já é demonstrado na literatura que à ativação por agonistas da via do PPAR- γ , reverte efeitos protetores, em certas infecções, associados ao calcitriol, como no caso da hepatite C (LIN *et al*, 2017).

Para investigar se a vitamina D poderia interferir na sinalização via PPAR- γ , infectados foram pre-tratados com Rosiglitazona e tratados com vitaminas D. Indo ao encontro da literatura, nossos resultados demonstram que, o pré tratamento com o agonista da via do PPAR (rosiglitazona) reverteu parcialmente a inibição da vitamina D sobre a formação de corpúsculos lipídicos nos macrófagos (Figura 16).

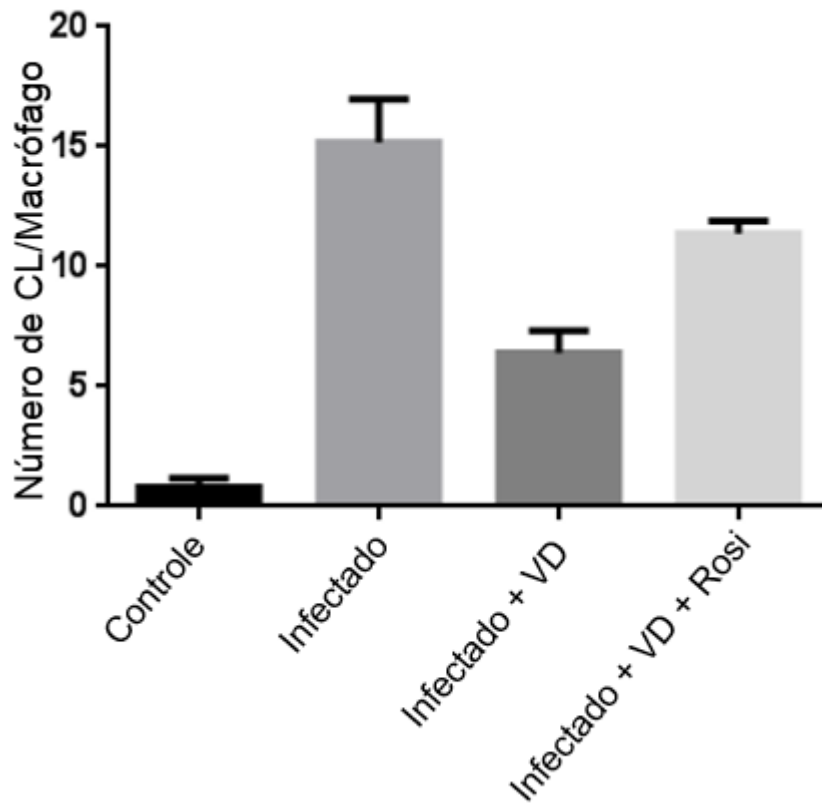


Figura 16 – Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante infecção *in vitro* por *T. cruzi* por 48h. Macrófagos peritonenais foram plaqueados por 2 horas, e meia hora antes da infecção receberam o co-tratamento com Rosiglitazona, sendo então realizada a infecção (MOI 3:1) por 24 horas e, após esse período, o tratamento com vitamina D por mais 24 horas. Os CLs formados foram então quantificados por microscopia de fluorescência (coloração por Oil Red O). Os símbolos (*) indicam diferença significativa $p \leq 0,05$ entre os grupos, $n \geq 5$. Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5® utilizando ANOVA. Os resultados foram expressos em Média \pm EPM.

4.8 – O tratamento com vitamina D impede parcialmente a translocação para o núcleo do receptor nuclear PPAR- γ

O (PPAR) é um membro da família de receptores nucleares ativados por lipídios e tem sido demonstrado que funciona como um regulador transcricional chave da diferenciação celular, inflamação e metabolismo lipídico em macro-fagos e células dendríticas (ALMEIDA *et al*, 2009).

PPARs funcionam como heterodímeros em associação a complexos coativadores que ligam-se em sequencias de DNA chamadas de "elementos responsivos a proliferadores de peroxissomos" presentes no promotor de vários genes alvo, o que leva a transativação ou transrepressão de vários genes, como por exemplo, genes já descritos responsáveis pelo metabolismo lipídico e pela produção de diversos mediadores inflamatórios (TYAGI *et al*, 2011). Especificamente, os receptores PPAR- γ são expressos em diversas células do sistema imunológico, incluindo macrófagos e monócitos (GREENE *et al.*, 1995, BRAISSANT *et al.*, 1996).

O mecanismo de translocação do PPAR- γ para o núcleo celular, aonde ele pode realizar suas funções de regulação gênica pode ter a influência de diversos outros fatores, como por exemplo, a participação de outros fatores de transcrição, como a nocturnina (NOC) , que aparenta mediar este processo de translocação (KAWAI *et al*, 2010).

De fato, sabendo-se da natureza de receptor nuclear do PPAR- γ e da necessidade de sua translocação para o núcleo para que este exerça suas funções reguladoras, é conhecido que a modulação deste processo é importante na modulação desta via como um todo. Para avaliar o efeito da vitamina D nesse processo de translocação, nós realizamos a imunomarcagem do PPAR- γ e marcação dos núcleos celulares com DAPI, conforme descrito por Almeida *et al* (2009). Como demonstrado na figura 16, a infecção induziu a translocação do PPAR- γ para o núcleo das células infectadas. Adicionalmente, nossos resultados demonstraram que a vitamina D foi capaz de impedir parcialmente a translocação do PPAR- γ para o núcleo das células tratadas, assim com observado no grupo controle (Figura 17). Como controle da

imunomarcação, foi utilizado soro de animal não imune, apresentando marcação negativa. O grupo controle tratado com vitamina D apresentou mesmo padrão de marcação que o grupo controle não tratado (dado não demonstrado).

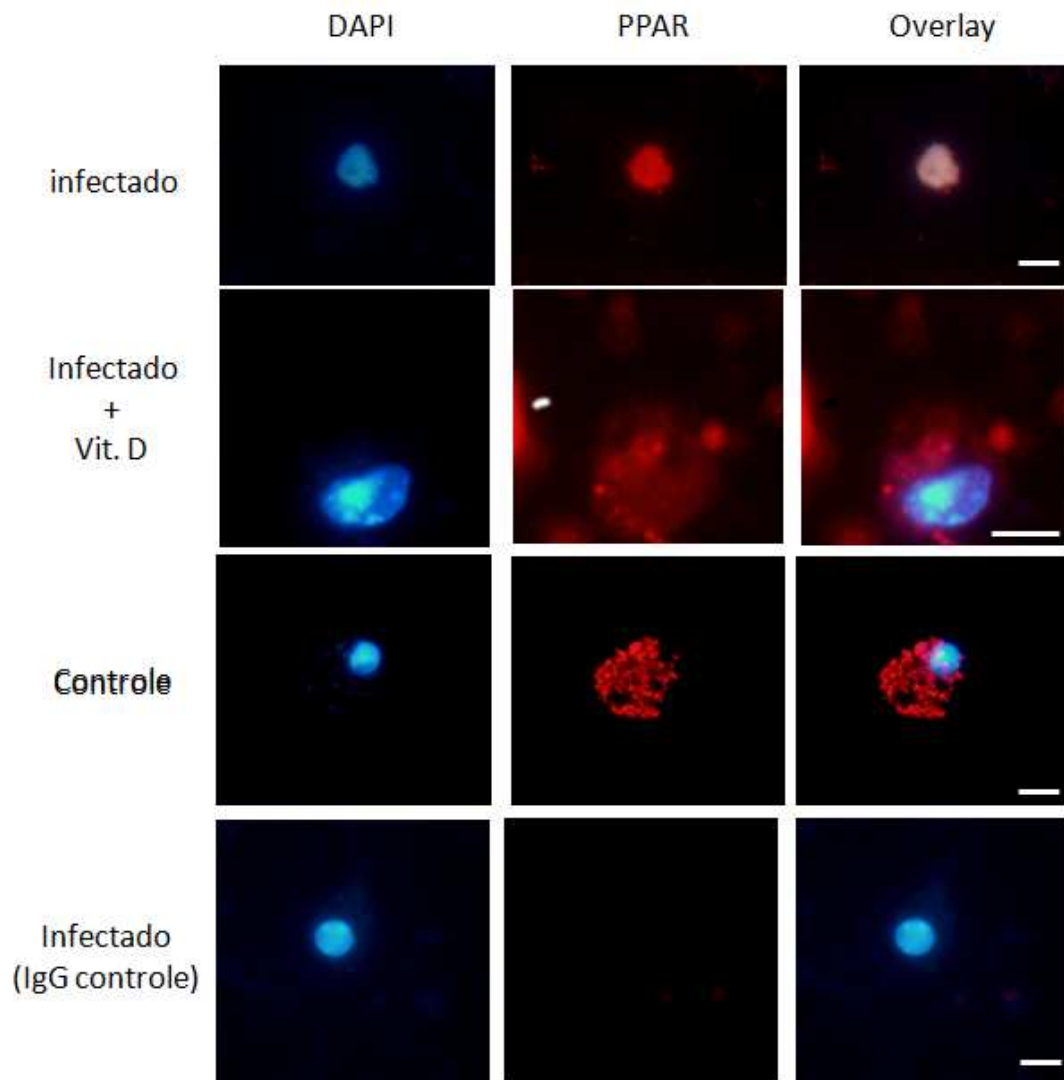


Figura 17. Translocação do PPAR- γ para o núcleo em macrófagos durante infecção *in vitro* por *T. cruzi* por 48h. Para a imunolocalização de PPAR- γ em macrófagos murinos, dos grupos experimentais controle, infectado e infectado tratado com vitamina D foram fixadas com formalina 3% por 10 minutos. Posteriormente as células foram incubadas com anticorpo primário anti-PPAR por 1h a temperatura ambiente. As lâminulas foram lavadas 3 x com PBS 1x e as células foram incubadas anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 546 anti-coelho. As lâminas foram analisadas através de microscopia de fluorescência e câmera Digital XC-50, e do programa CellSens, objetiva de 100x

(Olympus, Tokyo, Japan). A marcação nuclear foi feita com DAPI. As figuras foram elaboradas utilizando programa Adobe Photoshop versão S6. Barra =10µm.

4.9 – O tratamento com Rosiglitazona, agonista da via do PPAR- γ (Rosiglitazona) reverteu os efeitos da vitamina D na replicação dos parasitos

A formação de corpúsculos lipídicos é regulada pela via do PPAR- γ conforme já demonstrado na literatura. A formação destas organelas em macrófagos, representa um pior prognóstico para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória capaz de eliminar diversos patógenos, principalmente intracelulares, como o *T.cruzi* (ALMEIDA *et al*, 2018). Estas organelas são especializadas na produção de mediadores inflamatórios lipídicos que em grandes quantidades, podem levar a supressão da atividade patogênica de macrófagos, como as prostaglandinas. As prostaglandinas (PG) são eicosanóides derivados de AA, que são convertidos por ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) em PGH₂, que por sua vez é convertido *in vivo* e *in vitro* em vários metabólitos de araquidonato, como a PGE₂.

Portanto, a biogênese dos CLs na infecção por *T. cruzi* tem um papel direto na capacidade dos macrófagos sintetizar maiores quantidades de PGE₂, que podem ter um impacto no curso da doença, impedindo a eliminação eficiente do parasito (D'AVILA *et al*, 2011).

Considerando o resultado prévio de que a rosiglitazona foi capaz de reverter a redução da formação de CLs associada ao calcitriol, a importância da biogênese dessa organela para o controle da infecção e os estudos recentes na literatura que demonstram que em algumas infecções específicas, a ativação da via do PPAR por agonistas, é capaz de reverter a proteção oferecida pela vitamina D (SALAMON *et al*, 2014), nossos resultados demonstram que a capacidade do tratamento com vitamina D de impedir a replicação na cultura de macrófagos peritoneais, é revertida parcialmente e significativamente pelo pré-tratamento destas células com a rosiglitazona (Figura 18). De forma interessante, o tratamento com antagonista da via PPAR, o GW, também foi capaz de inibir quase que completamente a replicação do parasito nos macrófagos.

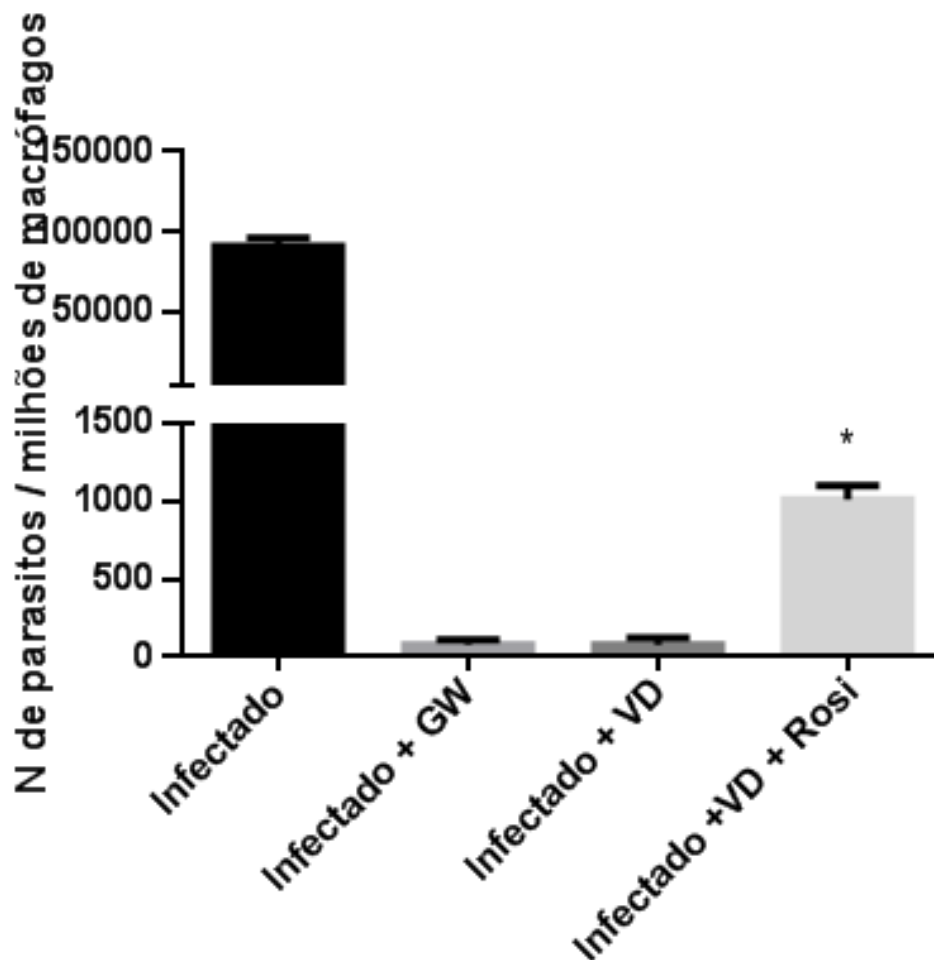


Figura 18 – Quantificação da replicação do parasito. Macrófagos peritoneais foram plaqueados por 2 horas, e meia hora antes da infecção receberam o co-tratamento com GW ou rosiglitazona e foi realizada então a infecção (MOI 3:1) por 24 horas e, após esse período, o tratamento com vitamina D por mais 24 horas. No décimo dia após o tratamento, os parasitos no sobrenadante da cultura foram contados para averiguar a liberação destes. * indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos de estudo ($n \geq 5$). Gráficos projetados a partir do programa Graphpad prism 5®. Os resultados foram expressos como média \pm EPM.

5 – DISCUSSÃO

Atualmente, a doença de Chagas é endêmica em 21 países do continente americano, e estima-se que entre 6 e 7 milhões de pessoas estejam infectadas, embora mais de 90% delas desconheçam a infecção por falta de oportunidade de diagnóstico. Anualmente, ocorrem no mundo mais de 12 mil mortes associadas à doença, que, devido à globalização e a processos de migração descontrolados, também passou a ser importante na Europa e na Ásia (OMS).

No Brasil, estima-se que existam hoje mais de 1 milhão de pessoas infectadas, das quais 60% vivem em áreas urbanas, provocando impactos sociais, previdenciários e assistenciais. Trata-se de gerações de pessoas vivendo com Chagas, a maioria na invisibilidade por não ter sido sequer diagnosticada e, portanto, alheia às possibilidades de tratamentos existentes. Estima-se que no Brasil morram anualmente 6 mil pessoas devido às complicações crônicas da doença. No entanto, pela falta de conhecimento da doença e pelas poucas unidades de saúde a diagnosticar ou notifica-la (na maioria das vezes, a doença de Chagas não é notificada na fase crônica), é possível que exista um grande número casos sem registro (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015).

Se não houver tratamento durante a fase aguda, a doença de Chagas passa a uma fase crônica, geralmente silenciosa. A manifestação dos sintomas pode ocorrer, muitos anos depois como um problema de coração, em 30% dos infectados, ou do sistema digestivo, em 10% dos casos, podendo levar a morte. Devido a isto, estudos ainda são necessários para a compreensão da imunologia da doença, bem como para procura de tratamentos alternativos (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015).

É conhecido que durante a resposta imunológica ao *Trypanosoma cruzi*, diversos mecanismos estão associados com o controle do parasito e podem

estar associados com os quadros silenciosos (assintomáticos) da doença. Estudos já demonstram que o balanço efetivo entre TNF- α e IFN- γ , citocinas pró-inflamatórias que levam, resumidamente, a uma melhor eliminação do patógeno por parte de, por exemplo, macrófagos e IL-10, citocina que aparenta controlar a resposta inflamatória de modo a impedir que esta cause danos aos próprios tecidos corporais, é essencial para o desenvolvimento assintomático da doença (ARAUJO *et al*, 2007 ; DE ARAUJO *et al*, 2012).

De fato a atividade de macrófagos é essencial para o desenvolvimento da patologia, pois estes são essenciais no controle do parasito (macrófagos M1 ricos em espécies reativas de oxigênio, citotóxicas para estes), bem como dão a partida, se não controlada, a uma resposta imunológica exarcebada e duradoura que pode causar danos teciduais e os sintomas característicos da doença (MONTOVANI *et al*, 2010).

A vitamina D por sua vez, começa a receber novos estudos para compreensão do seu papel no sistema imunológico, de modo que ela vem sendo caracterizada como um agente de efeito imunossupressor, uma vez que esta tem a capacidade de induzir a produção de IL-10 sistêmica que por sua vez regula a atividade a expressão de citocinas pró inflamatórias importantes, como por exemplo, o TNF- α (KOBASA *et al*, 2004 ; CHEUNG *et al*, 2002 ; KELLUM *et al*, 2007). Além disto, ja foi demonstrado que a vitamina D tem a capacidade de impedir a maturação de linfócitos T efetores e de células dendríticas apresentadoras de antígenos, de reduzir os receptores para citocinas pró inflamatórias em macrófagos e de induzir a produção de células T regulatórias (YIN e AGRAWAL, 2014). Por outro lado, ao sensibilizar o receptor VDR em diversas células imunológicas, ela induz nestas a produção de diversos compostos antimicrobianos, como por exemplo o óxido nítrico, que apresenta papel chave no controle parasitario em diversas doenças infecciosas intracelulares, como por exemplo, a doença de Chagas (WANG *et al*, 2004 ; CIORNEI *et al*, 2005 ; THIJSSSEN *et al*, 1986 ; ROCKETT *et al*, 1998).

De fato estudos prévios demonstram que, uma síntese mais intensa de calcitriol no caso de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* leva a uma acentuada liberação local de IFN- γ no sítio da infecção, o que levaria a uma

maior atividade de macrófagos, bem como de células natural killer, levando a eliminação da micobacteria (DAVIES *et al*, 1987, CADRANEL *et al*, 1988). No caso da infecção pelo *T. cruzi*, alguns estudos já demonstraram também que animais em situação de hipervitaminose, apresentavam uma menor taxa de mortalidade frente a infecção, bem como menores danos decíduais causados pela doença (ou seja, mais casos assintomáticos), sem apresentar indícios histológicos de intoxicação pela vitamina (SILVA *et al*, 1993).

Afim de estudar a relação da vitamina D com a montagem da resposta imunológica frente a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, macrófagos peritoneais (células, como já supracitado, essenciais nesta resposta e comuns reservatórios do parasito) de camundongos foram infectados por 24 horas com *T. cruzi* e posteriormente tratados 100nM de vitamina D por 24h. Diversos parametros reconhecidamente essenciais na resposta imunológica da doença de Chagas foram avaliados, como por exemplo, a produção de corpúsculos lipídicos, de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-10 e TNF- α), a expressão de óxido nítrico sintase induzível (INOs), de arginase-1, produção de óxido nítrico, bem como as alterações na replicação parasitária decorrente do tratamento com vitamina D.

Primeiramente, nossos dados mostram que dentro destas condições, a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais é capaz de induzir uma formação significativa de corpúsculos lipídicos e que o pós tratamento com vitamina D consegue por sua vez, praticamente reverter esse quadro, suprimindo fortemente esta formação a níveis próximos dos controles não infectados.

Resultados do grupo indicam que infecções por parasitos intracelulares como por exemplo o *Mycobacterium bovis*, induzem a formação de corpúsculos lipídicos e estes são sítios de produção de eicosanóides, resultando na indução da produção de PGE₂, por exemplo. (D'AVILA *at al*, 2006; ALMEIDA *et al*, 2009). A conversão enzimática do ácido araquidônico livre em seus metabólitos oxigenados (PGE₂) no interior dos corpúsculos lipídicos parece favorecer a sobrevivência do patógeno no interior do fagócito, uma vez que o ácido araquidônico livre seria capaz de estimular a nucleação da actina e a maturação do fagossoma nas células infectadas, resultando em significativa

morte da micobacteria (ANES *et al.*, 2003). Desta forma, o aumento da capacidade dos macrófagos de produzir PGE₂ derivada dos corpúsculos lipídicos tem sido relacionado com a inibição de uma resposta protetora por parte do hospedeiro, modulando negativamente a função do macrófago e favorecendo a sobrevivência e replicação do patógeno no interior do fagócito. De fato, estudos já demonstram que a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados com *T. cruzi* facilita o escape do parasito dos mecanismos normais de seu controle (D'AVILA *et al.*, 2011).

Com isto, é possível dizer que a redução da formação destas organelas nessas células reservatório do parasito pode ter como consequência uma melhor atividade antimicrobiana destas, bem como um controle mais efetivo da carga parasitaria.

Foi avaliada também a produção de IL-10 e TNF- α por parte dessas células em consequência à infecção e ao tratamento, como mediadores importantes do balanço entre uma resposta pró-inflamatória e anti-inflamatória, uma vez que a vitamina D é conhecida por seu caráter imunossupressor. (CHANG *et al.*, 2010). Interessantemente, os nossos dados *in vitro* demonstram que a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* foi capaz de induzir uma maior produção da IL-10 por parte dos macrófagos, o que pode ser interpretado como uma estratégia de sobrevivência, uma vez que a IL-10 conhecidamente suprime a função destas células e desmonta uma resposta inflamatória eficiente por parte do hospedeiro. Em adição, o tratamento com vitamina D foi capaz de reverter parcialmente esta produção, suprimindo esta a níveis semelhantes a do grupo controle não infectado. Nossos dados demonstram que, apesar de alguns trabalhos demonstrarem a vitamina D como indutora da produção de IL-10 e conseqüentemente, uma supressora da produção de citocinas pró inflamatórias (BAEKE *et al.*, 2010; BAEKE *et al.*, 2011), que culminaria na desativação de células efetoras do sistema imunológico, no nosso modelo experimental ela foi capaz de inibir a produção desta citocina. Por outro lado, nem a infecção nem o tratamento com a vitamina induziram níveis de TNF- α diferentes dos controles. De fato, com relação TNF- α , em trabalhos do nosso grupo demonstraram que drogas que modularam a formação de corpúsculos lipídicos tiveram pouco efeito ou nenhum efeito na

síntese dessa citocina (D' AVILA et al, 2006; ALMEIDA et al, 2009). Estes achados indicam que a vitamina D pode levar a uma resposta mais efetiva por parte dos macrófagos, para o controle de parasitos intracelulares, modulando a síntese de IL-10 e não de TNF- α . Em seguida avaliamos a expressão da óxido nítrico sintetase (iNOS), a enzima e da produção de óxido nítrico (NO), uma espécie reativa de oxigênio produzida principalmente por macrófagos, com um forte caráter citotóxico e muito importante na eliminação de parasitos nos fagócitos destas células (SCHARTON KERSTEN et al, 1997 ; OGAWA et al, 2017)

Diversos estudos demonstram que a supressão da produção de NO ou o silenciamento da expressão da enzima produtora desse composto, aumenta a susceptibilidade em animais à doenças infecciosas intracelulares, incluindo a doença de Chagas (DAVIS, 2001 ; MARTINS et al, 1998 ; DIEFENBACH et al, 1999). Apesar dos mecanismos moleculares pelos quais o NO apresenta seu efeito citotóxico não serem completamente compreendidos, no caso de infecções por tripanossomatídeos, sabe-se que o NO é capaz de interferir com o metabolismo do parasito, inibindo a atividade da enzima cruzipaína, uma cisteína protease que desempenha papel essencial em diferentes processos do ciclo biológico do *T. cruzi*, tais como crescimento, diferenciação e sobrevivência no organismo hospedeiro (VENTURINI et al, 2000 ; MOTTRAM et al, 1998).

Avaliamos então por Western Blotting a expressão da enzima iNOS nos nossos grupos controle, tratados e infectados e pudemos avaliar que a infecção por *T.cruzi* é capaz de induzir uma maior expressão desta em macrófagos, o que soa como natural, podendo ser interpretado como uma tentativa destas células de eliminar o parasito e que o tratamento com vitamina D foi capaz de aumentar consideravelmente a expressão dessa enzima. Paralelamente, o tratamento com a vitamina aumentou a síntese de NO nas células infectadas e tratadas. Indicando, novamente, que o tratamento com a vitamina parece ser capaz de induzir uma montagem mais efetiva da resposta imunológica por parte dos macrófagos peritoniais infectados por *T cruzi*.

Arginase1 (Arg1) é uma enzima citosólica que hidrolisa a L-arginina em ureia e ornitina e é indutível em muitos tipos de células, incluindo macrófagos e células endoteliais e epiteliais (SCHLEICHER et al, 2016). No

sistema imune, o metabolismo da Arg1, foi conceitualmente ligado a três processos principais. Primeiro, porque a ornitina é um precursor das poliaminas ou prolina necessárias para a proliferação celular ou síntese de colágeno, respectivamente, a expressão de Arg1 é característica para cicatrização de feridas e regeneração tecidual, e quando excessiva a atividade de Arg1 pode causar fibrose de órgãos (BARRON *et al*, 2013). Segundo, a expressão de Arg1 pelas células mielóides pode privar as células T da arginina e, assim, prejudicar sua ativação e proliferação durante as respostas imunes anti-infecciosas ou antitumorais (BOGDAN, 2015; PESCE *et al*, 2009). Terceiro, a Arg1 compete com a óxido nítrico indutível sintase (iNOS) ou com a sintase do NO₂ (NOS2), uma via antimicrobiana e imunorreguladora, que utiliza o substrato comum L-arginina (BOGDAN, 2015; EL-GAYAR *et al*, 2003; RUTSCHMAN *et al*, 2001). Conseqüentemente, a atividade de Arg1 está correlacionada com o aumento de cargas de patógenos em doenças infecciosas (DE MUYLDER *et al*, 2013).

Avaliamos então a expressão da enzima arginase-1 em células infectadas ou não e que receberam ou não o tratamento com vitamina D, através da técnica de Western Blotting. Avaliamos que a infecção com *T. cruzi* é capaz de induzir a produção desta enzima em macrófagos, podendo representar um mecanismo de escape do parasito, tornando estas células menos capazes de eliminar o parasito, constituindo assim um bom reservatório da infecção. Por outro lado, quando estes grupos infectados receberam o tratamento com a vitamina D, foi significativa a redução da produção da arginase-1, indo ao encontro aos nossos dados da dosagem da iNOS, considerando que estas enzimas competem pelo mesmo substrato, conforme descrito. Isto novamente aponta para a capacidade do tratamento com vitamina D em potencializar a atividade antimicrobica de macrófagos, podendo novamente favorecer a eliminação do patógeno.

Tendo em vista as alterações geradas pelo tratamento com vitamina D, nestes fatores imunológicos tão importantes envolvidos no efetivo controle do *T. cruzi* por macrófagos, avaliamos a replicação do parasito nos grupos tratados e controle. Interessantemente, o que encontramos foi que a vitamina D foi capaz de reduzir a praticamente a zero o número de parasitos no sobrenadante de nossas culturas, indicando então uma menor replicação

destes no interior da célula hospedeira, bem como menor escape destes organismos. Este dado por si só já é de extrema significância, porém, se tivermos em vista que a linha de tratamento atual para a doença de Chagas se baseia em controlar a parasitemia em pacientes na fase aguda, e que este controle leva a uma cura da doença ou ao desenvolvimento de uma doença crônica assintomática (II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015), podemos dizer que o pós-tratamento com vitamina D poderá atuar como uma estratégia terapêutica adicional concomitante ao tratamento convencional.

A fim de averiguar um possível mecanismo pelo o qual a vitamina D exerce esse efeito de proteção por nós demonstrado, investigamos então a via de sinalização do PPAR- γ , uma importante via inibitória da atividade de macrófagos, que está relacionada com a biogênese de corpúsculos lipídicos e produção de prostaglandinas em infecções por patógenos intracelulares, como na infecção experimental por *Mycobacterium bovis* (ALMEIDA, et al 2009)

Como já descrito, diversos ligantes e agonistas desta via são capazes de estimular a transcrição de vários genes-alvo via mecanismos dependentes de PPAR- γ e promover a resolução do processo inflamatório como um regulador endógeno do processo inflamatório *in vivo* (GILROY *et al*, 1999 , KIM *et al*, 2017). Além disso, já foi relatado também que a ativação da via do PPAR- γ pode suprimir a atividade de outras importantes vias metabólicas produtoras de citocinas pró-inflamatórias e essenciais para uma montagem eficiente de uma resposta imunológica capacitada para eliminação destes parasitos, como por exemplo, a via do NF- κ B (RICOTE *et al*, 1998). De fato, a ativação desta via leva à resolução de um processo inflamatório e tem sido estudada como potencial alvo terapêutico para doenças auto imunes, por desenvolver um quadro de analgesia nos pacientes (SAGAR *et al*, 2008 ; SAITO *et al*, 2015).

Estudos já demonstraram que a ativação de PPAR- γ aumenta a expressão de genes M2 em macrófagos, induzindo a produção de marcadores característicos deste tipo celular, incluindo arginase, CD206 (receptor de manose) e IL-10 (ODEGAARD *et al*, 2007 ; BOUHLEL *et al*, 2007). De fato, um estudo de Hasegawa-Moriyama e colaboradores, de 2012, demonstrou que a administração de rosiglitazona aumentou a expressão de marcadores específicos de M2, incluindo arginase e IL-10. Considerando dados da literatura

que demonstram que esse balanço entre perfis M1 e M2 de macrófagos é chave para o controle e graus de severidade no desenvolvimento de diversas doenças infecciosas (uma vez que macrófagos M1 são macrófagos capazes de produzir metabólitos capazes de eliminar os patógenos, bem como produzir mediadores que induzem um feedback positivo nessa resposta imunológica pró inflamatória) (KUSAKA *et al*, 2018 ; HALSTEAD *et al*, 2018). Além disso, os nossos resultados do tratamento da vitamina D, que indicam que o calcitriol é capaz de aumentar a expressão de iNOS e síntese de NO, e inibição de arginase, características da polarização de macrófagos para o perfil M1, sendo capazes então de eliminar o parasito, a via do PPAR- γ se apresenta como uma possível via de sinalização intracelular pela qual a vitamina D poderia estar atuando também.

Primeiramente, a fim de confirmar a ação da via do PPAR- γ na formação de corpúsculos lipídicos durante a infecção experimental *in vitro* de macrófagos peritoneais por *T. cruzi*, nós utilizamos de moduladores desta via, sendo o GW 9662 um dos mais potentes antagonistas desta via e a Rosiglitazona, um fármaco agonista. O que nós encontramos foi que conforme descrito na literatura para outros patógenos, como o *Mycobacterium bovis*, a inibição da via do PPAR por GW leva a uma redução significativa na formação de corpúsculos lipídicos. E sua ativação por Rosiglitazona, leva a uma indução também significativa na formação destes corpúsculos lipídicos durante a infecção por *T. cruzi*. Estes dados demonstram a participação desta via na formação de CLs na resposta inflamatória desencadeada pelo *T. cruzi*. Isto é importante, pois como já demonstrado na literatura e aqui já descrito, a formação destas organelas leva a formação de mediadores lipídicos, principalmente prostaglandinas, e estas podem desativar macrófagos os tornando incapazes de eliminar o parasito, sendo este processo de biogênese então relacionado com o favorecimento à sobrevivência do patógeno (D'AVILA *et al*, 2011). Dados da literatura descrevem que a ativação da via do PPAR- γ inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, num mecanismo dependente de sinalização através de TLRs que resultam na inibição do NF- κ B, como é o caso do TNF- α , que é uma citocina capaz de capacitar macrófagos a produzirem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio citotóxicas para os parasitos (JIANG

et al, 1998). Interessantemente, tivemos também como resultado o fato da inibição com GW desta via, ter induzido a produção de IL-10, bem como de TNF- α . O que sugere estar ocorrendo alguma reação secundária específica de certos pontos do processo de infecção e replicação do parasito. Apesar deste dado, todo nosso trabalho e a literatura apontam que a regulação negativa desta via levam para formação de uma resposta com caráter pró-inflamatório. A produção da quimiocina KC, não foi alterada pela utilização do GW 9662 ou da Rosiglitazona

Através do pré-tratamento com a Rosiglitazona, conseguimos demonstrar que este agonista da via do PPAR reverteu os efeitos da vitamina D com relação a formação de corpúsculos lipídicos e replicação de parasitos. De fato, estudos recentes na literatura demonstraram que a vitamina D é capaz de influenciar nessa via de sinalização, sendo sua deficiência um importante fator no aumento da biogênese lipídica em adipócitos, desestruturação muscular e acúmulo de gordura hepática (LI *et al*, 2018 ; BORGES *et al*, 2018).

Interessantemente, conseguimos demonstrar também que o calcitriol é capaz de impedir parcialmente a translocação do PPAR- γ para o núcleo dos macrófagos, impossibilitado assim, especialmente, de se ligar e regular a atividade gênica dos mais diferentes genes controlados pela via, em destaque para nosso trabalho, os genes controladores da biogênese lipídica e da formação de corpúsculos lipídicos (ALMEIDA *et al*, 2009). Com efeito, pelo fato dos receptores da família do PPAR serem receptores nucleares que ao serem estimulados são translocados para o núcleo, aonde então regulam a expressão gênica. A inibição da translocação para o núcleo causado pela vitamina D, regulou negativamente a ação desta via, podendo explicar os efeitos supressores do calcitriol sob esta, descritos na literatura e observados neste trabalho. Sabe-se que alguns outros receptores nucleares, como a NOC, também podem participar deste processo de translocação (KAWAI *et al*, 2010), sendo assim, mais estudos são necessários para demonstrar por quais mecanismos a vitamina D impede este processo de translocação.

Considerando então dados da literatura que demonstram que o balanço entre os perfis de resposta de macrófago (M1 e M2) são essenciais para uma

resposta eficiente contra uma grande gama de parasitos (sendo o perfil M1 o perfil produtor de metabólicos capazes de eliminar parasitos, além de produzir mediadores inflamatórios que polarizam ainda mais esta resposta para um perfil pró inflamatório), incluindo o *T.cruzi* (PENAS et al, 2015), torna-se essencial avaliar qual seria o efeito da via do PPAR na replicação do parasito em cultura, uma vez que, como já foi descrito, a literatura demonstra que esta via participa da polarização da resposta M2, culminando em um perfil de resposta anti-inflamatório e insuficiente para eliminação dos patógenos (ODEGAARD et al, 2007 ; BOUHLEL et al, 2007).

Para tal, nós realizamos o pré-tratamento com Rosiglitazona em grupos de células infectadas que receberam depois o pós-tratamento com vitamina D. Observou-se que este pré tratamento foi capaz de reverter significativamente os efeitos de eliminação parasitária resultantes do tratamento com a vitamina D. Indo ao encontro a nossos próprios dados prévios que demonstraram que o agonista do PPAR foi capaz de reverter parcialmente a supressão da expressão de diversos fatores celulares relacionados com a sobrevivência do parasito intracelularmente.

Em conclusão, nossos dados nos permitem dizer que o tratamento com a vitamina D em macrófagos peritoneais infectados com *T. cruzi* suprime parcialmente a via de sinalização dependente do receptor nuclear PPAR- γ (através do impedimento da translocação deste para o núcleo celular), a produção de citocinas anti-inflamatórias, aumentando por outro lado, a produção de mediadores pró-inflamatórios, como a KC murina. Esta regulação por sua vez, diminui a biogênese de corpúsculos lipídicos, induzindo assim, uma resposta de caráter mais pró-inflamatório, com macrófagos expressando mais iNOS e produzindo maiores níveis de óxido nítrico (marcadores de perfil M1) e menores quantidades de marcadores M2 como arginase e IL-10. De maneira geral, podemos dizer que vitamina D torna os macrófagos mais competentes para eliminação do *Trypanosoma cruzi*, podendo atuar como um tratamento adicional para o controle da infecção, ao mesmo tempo colabora para um melhor prognóstico para o controle da doença hospedeiro.

6 – CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho nos permitem concluir que:

- A vitamina D é capaz de inibir a formação de corpúsculos lipídicos e a síntese de IL-10, induzir a produção de KC, mas não de TNF- α , durante a infecção por *T. cruzi* em macrófagos;
- A vitamina D aumentou a expressão de iNOS, bem como a síntese NO e inibiu a expressão arginase-1 e a replicação do parasito, demonstrando seu papel no aumento da função antiparasitária destas células, típicas de um perfil M1;
- A infecção por *T. cruzi* foi capaz de induzir a formação de corpúsculos nessas células, através da via de sinalização do PPAR- γ . A supressão desta via foi capaz de induzir a produção de IL-10 e TNF- α por parte de macrófagos infectados com *T. cruzi*.
- A vitamina D é capaz de impedir a translocação do receptor nuclear PPAR- γ para o núcleo da célula aonde ele exerce sua função de alterar a transcrição de diversos genes, inclusive vários relacionados com o metabolismo lipídico e a formação de corpúsculos lipídicos.
- Por outro lado, a ativação da via do PPAR- γ é capaz de reverter parcialmente os efeitos da vitamina D sobre a formação de CL e replicação do parasito, em cultura de macrófagos infectados com *T. cruzi*.
- Em conjunto, nossos dados sugerem que a vitamina D teve um papel protetor durante a infecção experimental por *T. cruzi* em macrófagos.

7 – Referências

ADAMS, John S.; HEWISON, Martin. Update in vitamin D. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 2, p. 471-478, 2010.

ADORINI, Luciano et al. Dendritic cells as key targets for immunomodulation by Vitamin D receptor ligands. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 89, p. 437-441, 2004.

ADORINI, Luciano. Control of adaptive immunity by vitamin D receptor agonists. In: **Vitamin D (Third Edition)**. 2011. p. 1789-1809.

ALIBERTI, Júlio CS et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon- γ -and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. **The American journal of pathology**, v. 158, n. 4, p. 1433-1440, 2001.

ALIBERTI, Júlio CS et al. β -Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4819-4826, 1999.

ALLEVA, David G. et al. Regulation of murine macrophage proinflammatory and anti-inflammatory cytokines by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor- γ : counter-regulatory activity by IFN- γ . **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, n. 4, p. 677-685, 2002.

ALMEIDA, Patrícia E. et al. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor γ expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. **The Journal of immunology**, v. 183, n. 2, p. 1337-1345, 2009.

ANDREWS, Norma W. et al. A T. cruzi-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1277-1287, 1990.

ANES, Elsa et al. Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. **Nature cell biology**, v. 5, n. 9, p. 793, 2003.

ARAÚJO, Márcio Sobreira Silva et al. T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-Leishmania (Leishmania) chagasi IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune®. **Vaccine**, v. 27, n. 7, p. 1008-1017, 2009.

ARIMURA, Naoto et al. The peroxisome proliferator-activated receptor γ regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 11, p. 10070-10076, 2004.

BAEKE, Femke et al. The vitamin D analog, TX527, promotes a human CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} regulatory T cell profile and induces a migratory signature specific for homing to sites of inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 1, p. 132-142, 2011.

BAEKE, Femke et al. Vitamin D: modulator of the immune system. **Current opinion in pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 482-496, 2010.

BARRETO, M.P. - Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* nas Américas. **Rev. bras. Malar.**, **16**: 527-552, 1964.

BARRON, Luke et al. Role of arginase 1 from myeloid cells in th2-dominated lung inflammation. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61961, 2013.

BEARD, Jeremy A.; BEARDEN, Allison; STRIKER, Rob. Vitamin D and the anti-viral state. **Journal of Clinical Virology**, v. 50, n. 3, p. 194-200, 2011.

BINKLEY, Neil et al. Low vitamin D status despite abundant sun exposure. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 6, p. 2130-2135, 2007.

BINKLEY, Neil; RAMAMURTHY, Rekha; KRUEGER, Diane. Low vitamin D status: definition, prevalence, consequences, and correction. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 39, n. 2, p. 287-301, 2010.

BOGDAN, Christian. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends in immunology**, v. 36, n. 3, p. 161-178, 2015.

BONNEY, Kevin M. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat?. **Parasite**, v. 21, 2014.

BONNEY, Kevin M.; ENGMAN, David M. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many?. **Current molecular medicine**, v. 8, n. 6, p. 510-518, 2008.

BORGES, Celina Carvalho et al. Vitamin D Deficiency Increases Lipogenesis and Reduces Beta-Oxidation in the Liver of Diet-Induced Obese Mice. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 64, n. 2, p. 106-115, 2018.

BOUHLEL, M. Amine et al. PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. **Cell metabolism**, v. 6, n. 2, p. 137-143, 2007.

BOUILLON, Roger et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocrine reviews**, v. 29, n. 6, p. 726-776, 2008.

BOZZA, Patricia T.; MAGALHÃES, Kelly G.; WELLER, Peter F. Leukocyte lipid bodies—biogenesis and functions in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 6, p. 540-551, 2009.

BOZZA, Patricia T.; MELO, Rossana CN; BANDEIRA-MELO, Christianne. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. **Pharmacology & therapeutics**, v. 113, n. 1, p. 30-49, 2007

BRAISSANT, OLIVIER et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha,-beta, and-gamma in the adult rat. **Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 354-366, 1996.

BSCHEIDER, Michael; BUTCHER, Eugene C. Vitamin D immunoregulation through dendritic cells. **Immunology**, v. 148, n. 3, p. 227-236, 2016.

CADRANEL, Jacques et al. Vitamin D metabolism in tuberculosis. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 138, p. 984-989, 1988.

CANNELL, J. J. et al. Epidemic influenza and vitamin D. **Epidemiology & Infection**, v. 134, n. 6, p. 1129-1140, 2006.

CASTRO, A. et al. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, v. 88, n. 10, p. 894-900, 2002.

CAYIR, Atilla et al. Serum vitamin D levels in children with recurrent otitis media. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 271, n. 4, p. 689-693, 2014.

CHANG, Sun-Young et al. Lack of retinoic acid leads to increased langerin-expressing dendritic cells in gut-associated lymphoid tissues. **Gastroenterology**, v. 138, n. 4, p. 1468-1478. e6, 2010.

CHEUNG, Kenneth MC et al. Association of the Taq I allele in vitamin D receptor with degenerative disc disease and disc bulge in a Chinese population. **Spine**, v. 31, n. 10, p. 1143-1148, 2006.

CIORNEI, Cristina D. et al. Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2845-2850, 2005.

CIORNEI, Cristina D. et al. Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of

analogs of human cathelicidin LL-37. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2845-2850, 2005.

CONTRERAS, Victor T. et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 16, n. 3, p. 315-327, 1985.

COURA, José Rodrigues; DIAS, João Carlos Pinto. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, José Rodrigues; DIAS, João Carlos Pinto. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

D'AVILA, H., MELO, R. C., PARREIRA, G. G., WERNECK-BARROSO, E., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., & BOZZA, P. T. (2006). *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. **The Journal of Immunology**, 176(5), 3087-3097.

D'AVILA, Heloisa et al. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E2 generation and increased parasite growth. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 6, p. 951-961, 2011.

DAR, Mahin Abad; HÖLSCHER, Christoph. Arginase-1 is responsible for IL-13-mediated susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

DAVIES, P. D. O. et al. The effect of anti-tuberculosis chemotherapy on vitamin D and calcium metabolism. **Tubercle**, v. 68, n. 4, p. 261-266, 1987.

D'ÁVILA, H., ALMEIDA, P. E., ROQUE, N. R., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., & BOZZA, P. T. (2007). Toll-like receptor-2-mediated CC chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by Mycobacterium bovis BCG pleurisy. **Infection and immunity**, 75(3), 1507-1511. 78

D'AVILA, H., ROQUE, N. R., CARDOSO, R. M., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., MELO, R. C., & BOZZA, P. T. (2008). Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E2 production by macrophages. **Cellular microbiology**, 10(12), 2589-2604.

DAVIS, Karen L. et al. Novel effects of nitric oxide. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 41, n. 1, p. 203-236, 2001.

DAYNES, Raymond A.; JONES, Dallas C. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 748, 2002.

DE ANDRADE, Micássio Fernandes et al. Involvement of neutrophils in Chagas disease pathology. **Parasite immunology**, v. 40, n. 12, p. e12593, 2018.

DE ARAUJO, F. F. et al. Foxp3+ CD25 high CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. **Immunobiology**, v. 217, n. 8, p. 768-777, 2012.

DE MUYLDER, Géraldine et al. A Trypanosoma brucei kinesin heavy chain promotes parasite growth by triggering host arginase activity. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003731, 2013.

DE VRIES, Petrus J. et al. Tuberous sclerosis associated neuropsychiatric disorders (TAND) and the TAND Checklist. **Pediatric neurology**, v. 52, n. 1, p. 25-35, 2015.

DEANE, L. M. et al. Animal reservoirs of Trypanosoma cruzi in Brazil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 16, n. 1, 1964.

DECOTE-RICARDO, Débora et al. Implication of apoptosis for the pathogenesis of Trypanosoma cruzi infection. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 518, 2017.

DELERIVE, Philippe; FRUCHART, Jean-Charles; STAELS, Bart. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. **Journal of Endocrinology**, v. 169, n. 3, p. 453-459, 2001

DELUCA, Hector F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1689S-1696S, 2004.

DESVERGNE, Béatrice et al. The peroxisome proliferator-activated receptors at the cross-road of diet and hormonal signalling¹. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 65, n. 1-6, p. 65-74, 1998.

DIAS, João Carlos Pinto et al. II Consenso brasileiro em doença de chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. ESP, p. 7-86, 2016.

DIAS, João Carlos Pinto. Globalization, inequity and Chagas disease. **Cadernos de saude publica**, v. 23, p. S13-S22, 2007.

DIAS, João Carlos Pinto; SILVEIRA, Antonio Carlos; SCHOFIELD, Christopher John. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603-612, 2002.

DÍAZ, Alvaro; ALLEN, Judith E. Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. **European journal of immunology**, v. 37, n. 12, p. 3319-3326, 2007.

DIEFENBACH, Andreas et al. Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity. **Science**, v. 284, n. 5416, p. 951-955, 1999.

DONG, Xiangyang et al. Regulation of relB in dendritic cells by means of modulated association of vitamin D receptor and histone deacetylase 3 with the promoter. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 44, p. 16007-16012, 2005.

DOSREIS, G. A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 2, p. 84-90, 2011.

DUTRA, Walderez O. et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite immunology**, v. 36, n. 8, p. 377-387, 2014.

DVORAK, Ann M. et al. Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of

guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. **International archives of allergy and immunology**, v. 101, n. 2, p. 136-142, 1993.

EGÜEZ, Karina E. et al. Rapid diagnostic tests duo as alternative to conventional serological assays for conclusive Chagas disease diagnosis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005501, 2017.

EL-GAYAR, Stefan et al. Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 9, p. 4561-4568, 2003.

ELLIOTT, Michael R.; KOSTER, Kyle M.; MURPHY, Patrick S. Efferocytosis signaling in the regulation of macrophage inflammatory responses. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 4, p. 1387-1394, 2017.

FERREIRA, Gabriela Bomfim et al. Proteome analysis demonstrates profound alterations in human dendritic cell nature by TX527, an analogue of vitamin D. **Proteomics**, v. 9, n. 14, p. 3752-3764, 2009.

FERREIRA, Gabriela Bomfim et al. Vitamin D3 induces tolerance in human dendritic cells by activation of intracellular metabolic pathways. **Cell Reports**, v. 10, n. 5, p. 711-725, 2015.

FERREIRA, Marcelo Simão; ROCHA, Ademir; LUQUETTI, Alejandro Ostermayer. Doença de Chagas. In: **Medicina tropical**. Atheneu, 2003. p. 145-166.

FOUDA, Abdelrahman Y. et al. Arginase 1 promotes retinal neurovascular protection from ischemia through suppression of macrophage inflammatory responses. **Cell death & disease**, v. 9, n. 10, p. 1001, 2018.

FRAIHA NETO, H. et al. Doença de Chagas-endêmica na Amazônia. **An Acad Med Pará**, v. 6, p. 53-57, 1995.

FREIRE-DE-LIMA, Célio G. et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, v. 403, n. 6766, p. 199, 2000.

GILROY, Derek W. et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nature medicine**, v. 5, n. 6, p. 698, 1999.

GINDE, Adit A.; LIU, Mark C.; CAMARGO, Carlos A. Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population, 1988-2004. **Archives of internal medicine**, v. 169, n. 6, p. 626-632, 2009.

GOBERT, Alain P. et al. L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. **Infection and immunity**, v. 68, n. 8, p. 4653-4657, 2000.

GONZÁLEZ, Florencia B. et al. Immune response triggered by *Trypanosoma cruzi* infection strikes adipose tissue homeostasis altering lipid storage, enzyme profile and adipokine expression. **Medical microbiology and immunology**, p. 1-16, 2018.

GORDON, Siamon. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23, 2003.

GOSSET, Philippe et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. **European journal of immunology**, v. 31, n. 10, p. 2857-2865, 2001.

GRAVINA, Humberto D. et al. Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63100, 2013.

GREENE, M. E. et al. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. **Gene expression**, v. 4, n. 4-5, p. 281-299, 1995.

GUEDES, Paulo MM et al. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- γ , TNF- α , and low IL-10 production during the acute infection phase. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 130, n. 1, p. 43-52, 2009.

GUEDES, Paulo MM et al. Nitric oxide donor trans-[RuCl ([¹⁵] aneN4) NO] ²⁺ as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 2, p. 270-282, 2010.

GUPTA, Shivali; WEN, Jian-Jun; GARG, Nisha Jain. Oxidative stress in Chagas disease. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2009, 2009.

HALSTEAD, E. Scott et al. GM-CSF overexpression after influenza A virus infection prevents mortality and moderates M1-like airway monocyte/macrophage polarization. **Respiratory research**, v. 19, n. 1, p. 3, 2018.

HART, Prue H.; GORMAN, Shelley; FINLAY-JONES, John J. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D?. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 9, p. 584, 2011.

HEANEY, Robert P. Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1706S-1709S, 2004.

HEWISON, Martin et al. Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 11, p. 5382-5390, 2003.

HOLICK, Michael F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911-1930, 2011.

HOLICK, Michael F. Vitamin D deficiency. **N Engl j Med**, v. 2007, n. 357, p. 266-281, 2007.

HUANG, Huan et al. Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in Trypanosoma cruzi-infected mice. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 31, n. 1, p. 75-88, 1999.

HUBBARD, Leah LN et al. A role for IL-1 receptor-associated kinase-M in prostaglandin E2-induced immunosuppression post-bone marrow transplantation. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 11, p. 6299-6308, 2010.

IP, WK Eddie et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science**, v. 356, n. 6337, p. 513-519, 2017.

ITABE, Hiroyuki et al. Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 83, 2017.

JIANG, Chengyu; TING, Adrian T.; SEED, Brian. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 82, 1998.

JOHANSSON, Jenny U. et al. Suppression of inflammation with conditional deletion of the prostaglandin E2 EP2 receptor in macrophages and brain microglia. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 40, p. 16016-16032, 2013.

JOSHI, Pratibha C. et al. Prostaglandin E2 suppressed IL-15-mediated human NK cell function through down-regulation of common γ -chain. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 885-891, 2001.

KADEREIT, Dieter et al. **Use of substituted cyclopropane acid derivatives for producing drugs for use in the treatment of metabolic syndrome**. U.S. Patent Application n. 11/759,510, 21 fev. 2008.

KALINSKI, Pawel. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 1, p. 21-28, 2012.

KAWAI, Masanobu et al. A circadian-regulated gene, Nocturnin, promotes adipogenesis by stimulating PPAR- γ nuclear translocation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 23, p. 10508-10513, 2010.

KAWAURA, Akihiko et al. Inhibitory effect of long term 1 α -hydroxyvitamin D3 administration on Helicobacter pylori infection. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 38, n. 2, p. 103-106, 2006.

KEARNS, Malcolm D. et al. Impact of vitamin D on infectious disease. **The American journal of the medical sciences**, v. 349, n. 3, p. 245-262, 2015.

KELLUM, John A. et al. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. **Archives of internal medicine**, v. 167, n. 15, p. 1655-1663, 2007.

KERSTEN, Sander; STIENSTRA, Rinke. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. **Biochimie**, v. 136, p. 75-84, 2017.

KIM, Dong-Hyeon et al. Dual function of Lactobacillus kefir DH5 in preventing high-fat-diet-induced obesity: direct reduction of cholesterol and upregulation of PPAR- α in adipose tissue. **Molecular nutrition & food research**, v. 61, n. 11, p. 1700252, 2017.

KÖBERLE, Fritz. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Advances in parasitology**, v. 6, p. 63-116, 1968.

KRETTLI, Antoniana Ursine. The utility of anti-trypomastigote lytic antibodies for determining cure of Trypanosoma cruzi infections in treated patients: an overview and perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 142-151, 2009.

KROPF, Pascale et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 8, p. 1000-1002, 2005.

KUNDU, Rhiannon et al. Regulation of CYP 27 B 1 and CYP 24 A 1 hydroxylases limits cell-autonomous activation of vitamin D in dendritic cells. **European journal of immunology**, v. 44, n. 6, p. 1781-1790, 2014.

KURIHAYASHI, Aline Yukari et al. Vitamin A and D status among child participants in a food supplementation program. **Cadernos de saude publica**, v. 31, n. 3, p. 531-542, 2015.

KUSAKA, Yu et al. Potential Role of Gr-1+ CD8+ T Lymphocytes as a Source of Interferon- γ and M1/M2 Polarization during the Acute Phase of Murine Legionella pneumophila Pneumonia. **Journal of innate immunity**, v. 10, n. 4, p. 328-338, 2018.

LEMIRE, Jacques M.; INCE, Ann; TAKASHIMA, Masayoshi. 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ attenuates expression of experimental murine lupus of MRL/1 Mice. **Autoimmunity**, v. 12, n. 2, p. 143-148, 1992.

LI, Yue et al. PPAR- γ and Wnt regulate the differentiation of MSCs into adipocytes and osteoblasts respectively. **Current stem cell research & therapy**, v. 13, n. 3, p. 185-192, 2018.

LIU, Philip T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1770-1773, 2006.

LIU, Philip T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1770-1773, 2006.

MACHADO, Fabiana S. et al. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by Trypanosoma cruzi-infected cardiac myocytes. **Microbes and infection**, v. 10, n. 14, p. 1558-1566, 2008.

MACHADO, Fabiana S. et al. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, n. 24, p. 3003-3008, 2000.

MANGELSDORF, David J.; EVANS, Ronald M. The RXR heterodimers and orphan receptors. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 841-850, 1995.

MANOLAGAS, S. C. et al. Vitamin D and the hematolymphopoietic tissue: a 1994 update. In: **Seminars in nephrology**. 1994. p. 129-143.

MANTOVANI, Alberto et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **The Journal of pathology**, v. 229, n. 2, p. 176-185, 2013.

MARQUES, Juan et al. ECG manifestations of the biggest outbreak of Chagas disease due to oral infection in Latin-America. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 101, n. 3, p. 249-254, 2013.

MARTIN, Sally; PARTON, Robert G. Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2005. p. 163-174.

MARTINS, Gislaine A. et al. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Immunology letters**, v. 63, n. 2, p. 113-120, 1998.

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

MOAN, Johan et al. Solar radiation, vitamin D and survival rate of colon cancer in Norway. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 78, n. 3, p. 189-193, 2005.

MONCAYO, Álvaro; SILVEIRA, Antonio Carlos. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 17-30, 2009.

MOTTRAM, Jeremy C.; BROOKS, Darren R.; COOMBS, Graham H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. **Current opinion in microbiology**, v. 1, n. 4, p. 455-460, 1998.

MURPHY, Denis J.; HERNÁNDEZ-PINZÓN, Inmaculada; PATEL, Kanu. Role of lipid bodies and lipid-body proteins in seeds and other tissues. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, n. 4, p. 471-478, 2001.

NAGPAL, Sunil; NA, Songqing; RATHNACHALAM, Radhakrishnan. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. **Endocrine reviews**, v. 26, n. 5, p. 662-687, 2005.

NAGY, Laszlo et al. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . **Cell**, v. 93, n. 2, p. 229-240, 1998.

NAKAYAMA, Takayuki et al. Prostaglandin E2 promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. **Journal of leukocyte biology**, v. 79, n. 1, p. 95-104, 2006.

NISHII, Y.; OKANO, T. History of the development of new vitamin D analogs: studies on 22-oxacalcitriol (OCT) and 2 β -(3-hydroxypropoxy) calcitriol (ED-71). **Steroids**, v. 66, n. 3, p. 137-146, 2001.

NORMAN, Anthony W.; ISHIZUKA, Seiichi; OKAMURA, William H. Ligands for the vitamin D endocrine system: different shapes function as agonists and antagonists for genomic and rapid response receptors or as a ligand for the plasma vitamin D binding protein. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 76, n. 1, p. 49-59, 2001.

ODEGAARD, Justin I. et al. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1116, 2007.

OGAWA, Motohiko et al. Nitric oxide enhanced the growth of an obligate intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi* in murine macrophages. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 335-340, 2017.

OGAWA, Sumito et al. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 707-721, 2005.

OLIVEIRA, Renata MS et al. Association of vitamin D insufficiency with adiposity and metabolic disorders in Brazilian adolescents—Corrigendum. **Public health nutrition**, v. 16, n. 8, p. 1525-1525, 2013.

OTANI, Marcia M. et al. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. **Transfusion**, v. 49, n. 6, p. 1076-1082, 2009.

PACHECO, Patrícia et al. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 11, p. 6498-6506, 2002.

PARADA, Henry et al. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. **International journal of cardiology**, v. 60, n. 1, p. 49-54, 1997

PEÑA, Imanol et al. New compound sets identified from high throughput phenotypic screening against three kinetoplastid parasites: an open resource. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

PENAS, Federico et al. Treatment in vitro with PPAR α and PPAR γ ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from T. cruzi-infected mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 5, p. 893-904, 2015.

PINTO, Ana Yecê das Neves et al. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 602-614, 2008.

PINTO, Bruna et al. The Role of Co-Stimulatory Molecules in Chagas Disease. **Cells**, v. 7, n. 11, p. 200, 2018.

PORCHERAY, F. et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 142, n. 3, p. 481-489, 2005

PREMAOR, Melissa Orlandin; FURLANETTO, Tania Weber. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia= Brazilian archives of endocrinology and metabolism. São Paulo. Vol. 50, n. 1 (fev. 2006), p. 25-37, 2006.**

RACHID, Milene Alvarenga et al. Effect of blockade of nitric oxide in heart tissue levels of Renin Angiotensin System components in acute experimental Chagas disease. **Life sciences**, 2019.

RANGEL MORENO, Javier et al. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunology**, v. 106, n. 2, p. 257-266, 2002.

RASSI JR, Anis; RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

REQUENA-MÉNDEZ, Ana et al. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003540, 2015.

RICOTE, Mercedes et al. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 79, 1998.

RITZMAN, Anna M. et al. The chemokine receptor CXCR2 ligand KC (CXCL1) mediates neutrophil recruitment and is critical for development of experimental Lyme arthritis and carditis. **Infection and immunity**, v. 78, n. 11, p. 4593-4600, 2010.

ROCKETT, Kirk A. et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of Mycobacterium tuberculosis in a human macrophage-like cell line. **Infection and immunity**, v. 66, n. 11, p. 5314-5321, 1998.

ROCKETT, Kirk A. et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of Mycobacterium tuberculosis in a human macrophage-like cell line. **Infection and immunity**, v. 66, n. 11, p. 5314-5321, 1998.

RODRIGUEZ-SALAS, LUIS A. et al. Echocardiographic and clinical predictors of mortality in chronic Chagas' disease. **Echocardiography**, v. 15, n. 3, p. 271-277, 1998.

ROMANI, Luigina et al. Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. **Nature**, v. 451, n. 7175, p. 211, 2008.

ROMANI, Luigina. Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. **Sabouraudia**, v. 46, n. 6, p. 515-529, 2008.

RUTSCHMAN, Robert et al. Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 4, p. 2173-2177, 2001.

SAGAR, D. R.; KENDALL, D. A.; CHAPMAN, V. Inhibition of fatty acid amide hydrolase produces PPAR- α -mediated analgesia in a rat model of inflammatory pain. **British journal of pharmacology**, v. 155, n. 8, p. 1297-1306, 2008.

SAGGESE, Giuseppe et al. Vitamin D in childhood and adolescence: an expert position statement. **European journal of pediatrics**, v. 174, n. 5, p. 565-576, 2015.

SALAMON, Hugh et al. Cutting edge: vitamin D regulates lipid metabolism in Mycobacterium tuberculosis infection. **The Journal of Immunology**, p. 1400736, 2014.

SANTOS, Betânia R. et al. Vitamin D deficiency in girls from South Brazil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants. **BMC pediatrics**, v. 12, n. 1, p. 62, 2012.

SATHLER-AVELAR, R. et al. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with Trypanosoma cruzi. **Scandinavian journal of immunology**, v. 58, n. 6, p. 655-663, 2003.

SCHARTON-KERSTEN, Tanya M. et al. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen Toxoplasma gondii. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 7, p. 1261-1274, 1997.

SCHLEICHER, Ulrike et al. TNF-mediated restriction of arginase 1 expression in myeloid cells triggers type 2 NO synthase activity at the site of infection. **Cell reports**, v. 15, n. 5, p. 1062-1075, 2016.

SETOGUCHI, Keigo et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. **The Journal of clinical investigation**, v. 108, n. 11, p. 1667-1675, 2001.

SILVA, Joao S. et al. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to Trypanosoma cruzi infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infection and immunity**, v. 63, n. 12, p. 4862-4867, 1995.

SILVA, Marcelo E. et al. Vitamin D overload and experimental Trypanosoma cruzi infection: parasitological and histopathological aspects. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 104, n. 1, p. 175-181, 1993.

SNIJDEWINT, F. G. et al. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 12, p. 5321-5329, 1993.

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

SOUZA, Wanderley. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 269-285, 2002.

SPECKER, Bonny L.; TSANG, Reginald C.; HOLLIS, Bruce W. Effect of race and diet on human-milk vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. **American Journal of Diseases of Children**, v. 139, n. 11, p. 1134-1137, 1985.

SRVIASTAVA, M. D.; DELUCA, H.; AMBRUS, J. L. Inhibition of IL-6 and IL-8 production in human fibroblast cell lines by 1, 25 (OH)₂ vitamin D₃ and two of its analogs with lower calcemic activity. **Research communications in chemical pathology and pharmacology**, v. 83, n. 2, p. 145-150, 1994.

STAVENUITER, Andrea WD et al. A novel rat model of vitamin D deficiency: safe and rapid induction of vitamin D and calcitriol deficiency without hyperparathyroidism. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

SZÉLES, Lajos. Nuclear receptors modulate immune functions in dendritic cells.

TAKIISHI, Tatiana et al. Effects of vitamin D on antigen-specific and non-antigen-specific immune modulation: relevance for type 1 diabetes. **Pediatric diabetes**, v. 14, n. 2, p. 81-89, 2013.

TAKIISHI, Tatiana et al. Vitamin D and diabetes. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 39, n. 2, p. 419-446, 2010.

TEIXEIRA, Antonio RL et al. *Trypanosoma cruzi*-sensitized T-lymphocyte mediated 51CR release from human heart cells in Chagas' disease. **The**

American journal of tropical medicine and hygiene, v. 27, n. 6, p. 1097-1107, 1978.

TEIXEIRA, Livia .Modulação da formação de corpúsculos lipídicos e resposta imune do hospedeiro mediada pela fagocitose de células apoptóticas frente a infecção por T cruzi: participação do receptor PPAR gama. **Dissertação de mestrado**,. 2011 Fiocruz.

TEIXEIRA, Mauro M.; GAZZINELLI, Ricardo T.; SILVA, João S. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 6, p. 262-265, 2002.

TOLEDO, Daniel AM et al. Lipid Body Organelles within the Parasite Trypanosoma cruzi: A Role for Intracellular Arachidonic Acid Metabolism. **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0160433, 2016.

TONTONOZ, Peter et al. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 241-252, 1998.

TYAGI, Sandeep et al. The peroxisome proliferator-activated receptor: a family of nuclear receptors role in various diseases. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 4, p. 236, 2011.

VALENTE, Sebastião Aldo da Silva; VALENTE, Vera da Costa; FRAIHA NETO, Habib. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 395-398, 1999.

VAN BRUSSEL, Ilse et al. Tolerogenic dendritic cell vaccines to treat autoimmune diseases: can the unattainable dream turn into reality?. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 2, p. 138-150, 2014.

VAN GINDERACHTER, JO A. et al. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. **Immunobiology**, v. 211, n. 6, p. 487-501, 2006.

VARGA, Tamas; CZIMMERER, Zsolt; NAGY, Laszlo. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 8, p. 1007-1022, 2011.

VARO, Rosauro et al. Safety and tolerability of adjunctive rosiglitazone treatment for children with uncomplicated malaria. **Malaria journal**, v. 16, n. 1, p. 215, 2017.

VENTURINI, Giorgio et al. Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 270, n. 2, p. 437-441, 2000.

VESPA, G. N.; CUNHA, Fernando Q.; SILVA, Joao S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infection and immunity**, v. 62, n. 11, p. 5177-5182, 1994.

VOLPE, Elisabetta et al. A critical function for transforming growth factor- β , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human TH-17 responses. **Nature immunology**, v. 9, n. 6, p. 650-657, 2008.

WALKER, William; ROTONDO, Dino. Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12-and interleukin-18-induced natural killer cell interferon- γ synthesis. **Immunology**, v. 111, n. 3, p. 298-305, 2004.

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

WANG, Qinwen; ROWAN, Michael J.; ANWYL, Roger. β -amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 27, p. 6049-6056, 2004.

WANG, Yuqin et al. Antibacterial activities of the cathelicidins prophenin (residues 62 to 79) and LL-37 in the presence of a lung surfactant preparation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2097-2100, 2004.

WEBER, Gunther. Vitamin D induces the antimicrobial protein hCAP18 in human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 124, p. 1080-1082, 2005.

WHITE, John H. Vitamin D signaling, infectious diseases, and regulation of innate immunity. **Infection and immunity**, v. 76, n. 9, p. 3837-3843, 2008.

World Health Organization. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. WHO: technical report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization; 2012. (WHO Technical Report Series, 975).

YANG, Chen-Yen et al. The implication of vitamin D and autoimmunity: a comprehensive review. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 45, n. 2, p. 217-226, 2013.

YIN, Kai; AGRAWAL, Devendra K. Vitamin D and inflammatory diseases. **Journal of inflammation research**, v. 7, p. 69, 2014.

ZAGO, María Paola et al. Tci Isolates of Trypanosoma cruzi exploit the antioxidant network for enhanced intracellular survival in macrophages and virulence in mice. **Infection and immunity**, v. 84, n. 6, p. 1842-1856, 2016.

ZASLOFF, Michael. Sunlight, vitamin D, and the innate immune defenses of the human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, n. 5, p. xvi, 2005.

ZHI, Shao-ce et al. Rosiglitazone Inhibits Activation of Hepatic Stellate Cells via Up-Regulating Micro-RNA-124-3p to Alleviate Hepatic Fibrosis. **Digestive diseases and sciences**, p. 1-11, 2019.

8 - ANEXOS



Lipid Bodies as Sites of Prostaglandin E2 Synthesis During Chagas Disease: Impact in the Parasite Escape Mechanism

Patrícia E. de Almeida^{1*}, Daniel A. M. Toledo², Gabriel S. C. Rodrigues¹ and Heloisa D'Avila^{1*}

¹ Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, ² Minas Gerais Federal Institute, Belo Horizonte, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

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

Reviewed by:

Eden Ramalho Ferreira,
Federal University of São Paulo, Brazil
Juliana Dutra Barbosa Da Rocha,
University of Toronto, Canada
Laura Noelia Cariddi,
National University of Rio Cuarto,
Argentina

*Correspondence:

Heloisa D'Avila
davila.bizarro@uff.edu.br
Patrícia E. de Almeida
patricia.almeida@uff.edu.br

Specialty section:

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

Received: 30 January 2018

Accepted: 05 March 2018

Published: 20 March 2018

Citation:

Almeida PE, Toledo DAM,
Rodrigues GSC and D'Avila H (2018)
Lipid Bodies as Sites of Prostaglandin
E2 Synthesis During Chagas Disease:
Impact in the Parasite Escape
Mechanism. *Front. Microbiol.* 9:499.
doi: 10.3389/fmicb.2018.00499

During Chagas disease, the *Trypanosoma cruzi* can induce some changes in the host cells in order to escape or manipulate the host immune response. The modulation of the lipid metabolism in the host phagocytes or in the parasite itself is one feature that has been observed. The goal of this mini review is to discuss the mechanisms that regulate intracellular lipid body (LB) biogenesis in the course of this parasite infection and their meaning to the pathophysiology of the disease. The interaction host–parasite induces LB (or lipid droplet) formation in a Toll-like receptor 2-dependent mechanism in macrophages and is enhanced by apoptotic cell uptake. Simultaneously, there is a lipid accumulation in the parasite due to the incorporation of host fatty acids. The increase in the LB accumulation during infection is correlated with an increase in the synthesis of PGE₂ within the host cells and the parasite LBs. Moreover, the treatment with fatty acid synthase inhibitor C75 or non-steroidal anti-inflammatory drugs such as NS-398 and aspirin inhibited the LB biogenesis and also induced the down modulation of the eicosanoid production and the parasite replication. These findings show that LBs are organelles up modulated during the course of infection. Furthermore, the biogenesis of the LB is involved in the lipid mediator generation by both the macrophages and the parasite triggering escape mechanisms.

Keywords: *T. cruzi*, lipid droplets, prostaglandin, infectious diseases, inflammation, lipid mediators, parasite replication, Chagas disease

INTRODUCTION

Chagas disease represents an infectious condition classified by the World Health Organization (WHO) as a neglected illness. It is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and presents several symptoms, leading to a continuous inflammatory process that results in the replacement of functional health tissues by connective tissue, and thereafter, function loss of tissues and organs, which may lead to death (Teixeira et al., 1978, 2002; Parada et al., 1997; Rodriguez-Salas et al., 1998; Huang et al., 1999; Machado et al., 2008).

Studies in *T. cruzi* experimental infection models have established a strong immunological response in the acute phase, characterized by an intense infiltration of activated macrophages with the ability to process and present antigens, cytokines synthesis, and give co-stimulatory signals

demonstrating their essential function in innate immune responses, in order to control the parasite multiplication and elimination (Teixeira et al., 2002). A distinguishing aspect of Chagas disease-triggered macrophages is the increased numbers of distinct cytoplasmic organelles called lipid bodies (LBs) (Figure 1) (Melo et al., 2003; D'Avila et al., 2011).

Lipid bodies are lipid rich-organelles that have been found in almost all organisms from bacteria to humans (Alvarez et al., 1996; Waltermann et al., 2005; Murphy, 2012). In mammals, LBs are found in the major part of leukocytes and other cellular types, such as endothelial cells, fibroblasts, and mastocytes (Dvorak et al., 1993; Bozza et al., 2007) and can be involved directly or indirectly in numerous cellular functions, such as lipid metabolism, membrane traffic, intracellular signaling and the production of several inflammatory mediators (Bozza et al., 2007). LBs within infected cells are involved in the production of inflammatory mediators which can potentially inhibit the host Th1 response, thus, modulating parasite growth (Snijdwint et al., 1993; Kalinski, 2012). Interestingly, a recent study established that *T. cruzi* LBs are also active and producing immunosuppressive inflammatory mediators which may represent not only an evasion strategy but also a survival factor exhibited by the parasite (Toledo et al., 2016).

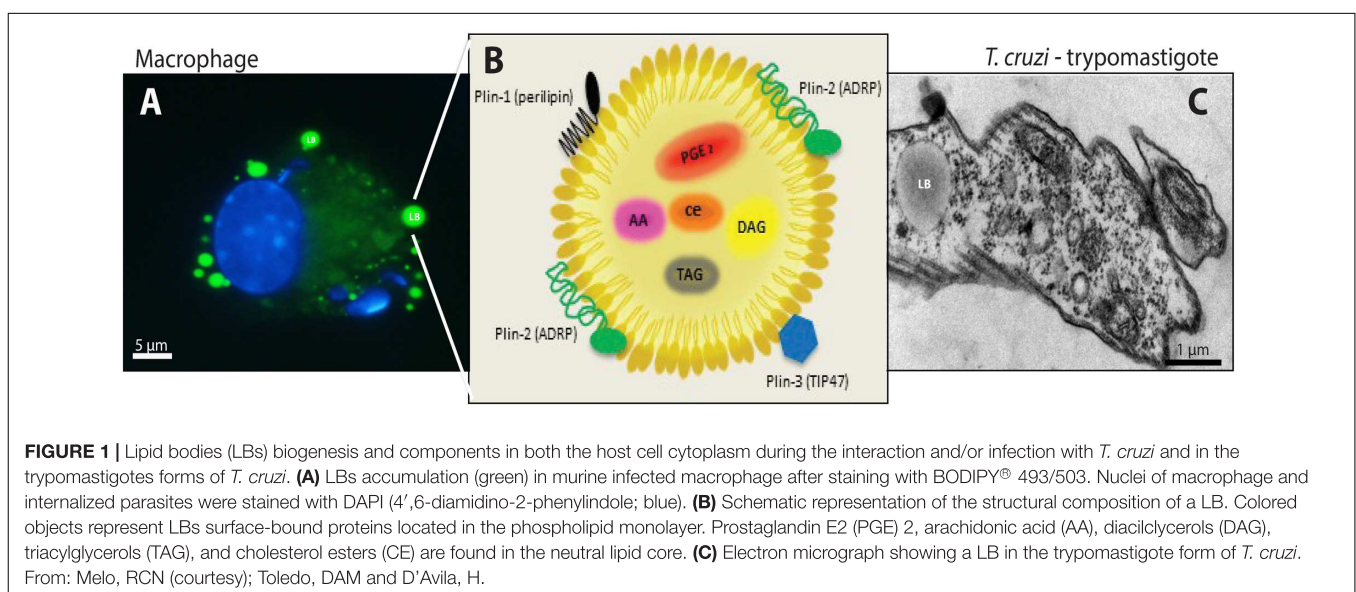
The purpose of this mini review is to present the recent progress in elucidating the structure, formation mechanisms and functions of intracellular LBs within both infected host cells and the protozoan parasite *T. cruzi*, as well as their impact on the host response and parasite escape mechanism during Chagas disease.

LIPID BODY CHARACTERIZATION AND STRUCTURE

Lipid bodies, also known as lipid droplets or adiposomes, are multi-functional organelles associated with lipid homeostasis in virtually all cells (Figure 1). Although, the cellular and molecular

mechanisms of LBs biogenesis remain to be determined; it is currently known that the endoplasmic reticulum (ER) structure may have an important role during LB biogenesis. In eukaryotic cells, LBs are formed *de novo* from the ER (Jacquier et al., 2011; Kassan et al., 2013; Choudhary et al., 2015). The most accepted model suggests that it was as a *building model*, where enzymes, such as diacyltransferase DGAT1 and DGAT2, produce triacylglycerols (TAG). Moreover, these enzymes are involved in lipid metabolism localized in specific compartments of the ER, favoring the synthesis of neutral lipid between the two membrane leaflets of the ER, producing a hydrophobic neutral lipid core (Murphy and Vance, 1999; Bozza et al., 2009; Walther et al., 2017). After reaching a determined size, nascent LBs carried with proteins lacking trans-membrane spanning domains bud off from ER into the cytoplasm and finally the lipids are coated by a phospholipid monolayer from the cytoplasmic leaflet of the ER membrane (Murphy, 1999, 2001; Martin and Parton, 2005; Bozza et al., 2009; Walther et al., 2017).

In general, the LB structure consists of a neutral lipid core, containing TAG and cholesterol ester (CE) in its majority, surrounded by an outer monolayer of phospholipids because LBs besides being heterogeneous organelles also lack a true delimiting unit membrane structure (Tsuchi-Sato et al., 2002). Moreover, LBs are structured by perilipin (PLIN) family proteins, including perilipin/PLIN1, PLIN2/ADRP (adipose differentiation-related protein), PLIN3/TIP47 (tail-interacting protein of 47 KDa) (Figure 1B) (Brasaemle et al., 1997; Wolins et al., 2006; Dalen et al., 2007; Welte, 2007). The protein content can be diverse once proteomic studies have shown ribosomal, mitochondrial, and vesicular transport proteins, such as Ras-associated binding protein (RAB)s, ADP-ribosylation factor (ARF)s, caveolins and ER components compartmentalized in the LBs, suggesting their role in fusion and fission with other LBs or organelles, as well as cell signaling and inflammatory mediator proteins under different



conditions. However, the lipid and protein content depend on the cell type and condition of the cellular activation (Dvorak et al., 1993; Bozza et al., 1997; Yu et al., 1998, 2000; Wu et al., 2000; Fujimoto et al., 2001; Chen et al., 2002; Umlauf et al., 2004; Ozeki et al., 2005; Bartz et al., 2007; Bostrom et al., 2007; Hodges and Wu, 2010).

LIPID BODY FORMATION DURING *T. cruzi* INFECTION

The mechanism of formation of LBs in host cells is a highly regulated event. Upon leukocytes activation LBs are formed rapidly in response to different stimuli and pathological conditions, such as infection by distinct pathogens: mycobacteria (Cardona and Ausina, 2000; D'Avila et al., 2006; Almeida et al., 2009, 2014; Mattos et al., 2010, 2011), virus (Ferguson et al., 2017) or protozoan, such as *T. cruzi* (Melo et al., 2003; D'Avila et al., 2011), *Leishmania major* (Rabhi et al., 2016), *L. amazonensis* (Pinheiro et al., 2009; Lecoecur et al., 2013), and *Toxoplasma gondii* (Gomes et al., 2014; Mota et al., 2014).

During *in vivo* studies in *T. cruzi* infection, it was demonstrated that this disease promotes an important inflammatory response featured by intense macrophage migration to the infectious sites, mainly the heart (Melo and Machado, 2001; Melo et al., 2003). Melo et al. (2006) showed LBs enhancement in inflammatory macrophages associated with increased myocardial parasitism (Melo et al., 2006). Moreover, during *T. cruzi* infection, LBs show a diversity electron-density, which suggest a diverse composition associated with recruitment and/or *in situ* production of lipid inflammatory mediators (Melo et al., 2003, 2006).

In macrophages, the *T. cruzi* internalization potentiates LB biogenesis; however, the phagocytosis is neither sufficient nor essential for triggering the biogenesis. It has been demonstrated that after a 24 h period of infection with *T. cruzi*, peritoneal macrophages with internalized parasites, as well as non-parasitized cells show increased number of LBs compared to control (D'Avila et al., 2011). Although not fully elucidated, the formation of LBs in host macrophages seems to involve the pathogen recognition by surface receptors, as well as paracrine signaling that soluble factors secreted by parasites or infected cells might induce LB biogenesis in non-parasitized cells.

Our group demonstrated that, in murine macrophages, the *in vitro T. cruzi* infection induced LBs formation through recognition via toll like receptor 2 (TLR-2) (Figure 2) (D'Avila et al., 2011). In fact, some groups of researchers have identified different molecular motifs from this parasite able of activating TLRs in macrophages, such as Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins (tGPI-mucin) present in the parasite membrane and capable of inducing the inflammatory response through an activation of TLR2 (Almeida et al., 1999; Campos et al., 2001; Gravina et al., 2013). However, the identification of downstream signaling pathways involved in this processes

during *T. cruzi* infection needs to be more elucidated. TLR4 has also been involved in the immune response during the first stage of infection (Rodrigues et al., 2012); nonetheless, it was not able to mediate the LB formation in macrophages (D'Avila et al., 2011).

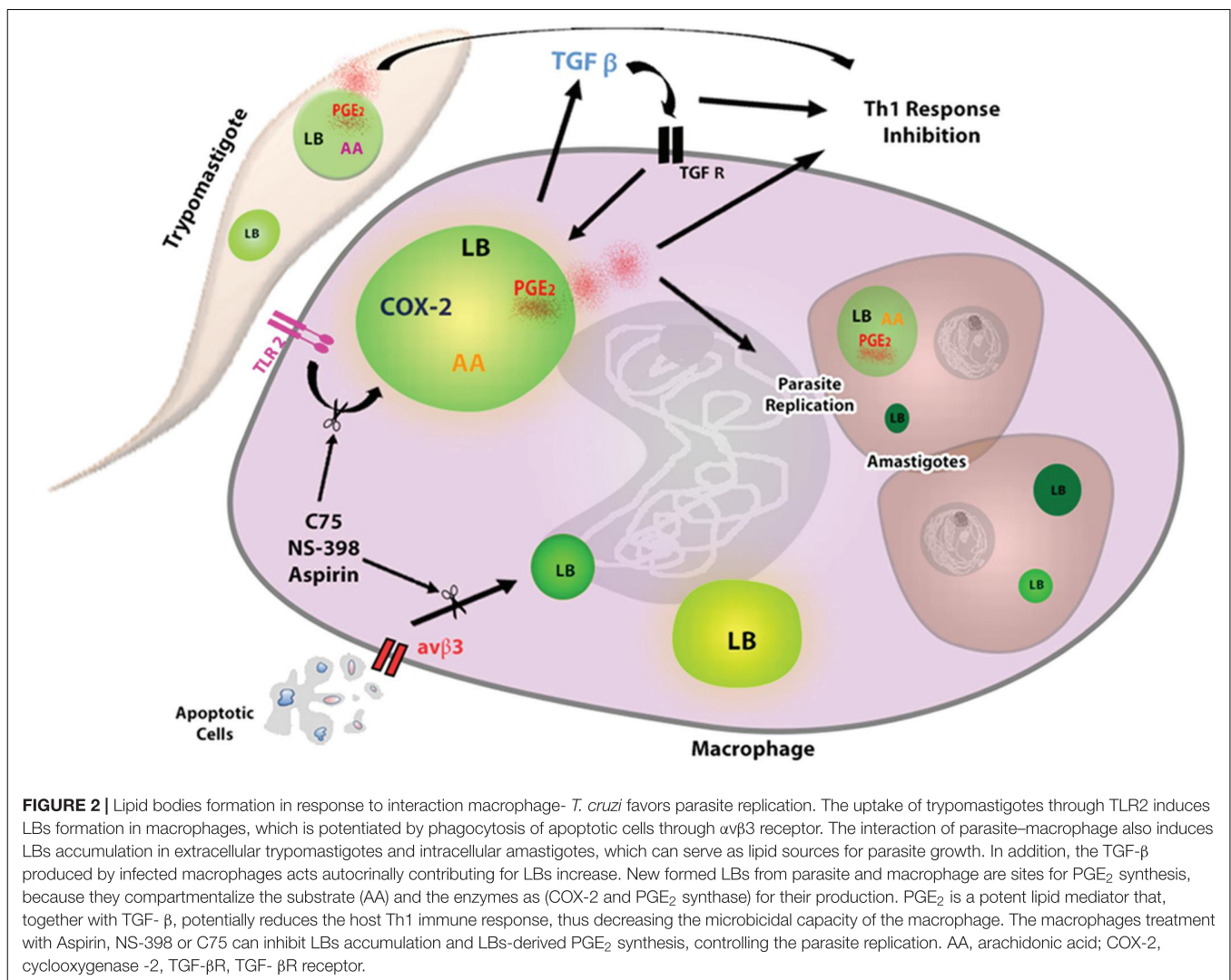
During *T. cruzi* infection, the induction of apoptosis, especially of T and B lymphocytes (Freire-de-Lima et al., 2000; DosReis, 2011) and neutrophils (Magalhaes et al., 2017) represents an important mechanism that contributes to the parasite replication, due to the immunomodulatory effects on the host immune response (Decote-Ricardo et al., 2017). Consequently, the efferocytosis or phagocytic clearance of these apoptotic cells by macrophages has profound consequences on innate and adaptive immune responses in inflamed tissues (Elliott et al., 2017). Moreover, it has been shown that the formation of LBs during *T. cruzi* infection in macrophages is potentiated in the presence of apoptotic, but not necrotic or living cells (D'Avila et al., 2011).

The uptake of apoptotic cells through the $\alpha_v\beta_3$ integrin (vitronectin receptor) is critical in the induction of LBs during *T. cruzi* infection (Figure 2). In addition, the treatment with flavoridin, a desintegrin that blocks binding via $\alpha_v\beta_3$, completely abolished the LB-formation induced by the apoptotic cells uptake (D'Avila et al., 2011). Furthermore, some groups have shown that the interaction of apoptotic cells and phagocytic cells induces the production of cytokines such as IL-10 and TGF- β (Voll et al., 1997; Xiao et al., 2006, 2008) causing these cells to be more permissive to *T. cruzi* infection (Freire-de-Lima et al., 2000; D'Avila et al., 2011). Studies *in vitro* have shown that the TGF- β produced by macrophages could induce LBs in these cells. The use anti-TGF β 1 neutralizing antibody inhibited the secretion of TGF- β , and abolished the LB formation induced by this cytokine, demonstrating that this mediator can directly trigger LB formation (Figure 2) (D'Avila et al., 2011). Even though the attachment of other co-receptors cannot be ruled out, these data suggest that efferocytosis by macrophages through $\alpha_v\beta_3$ receptor triggers TGF- β 1-dependent potentiating the LB biogenesis.

LIPID BODY FORMATION IN THE PROTOZOAN *T. cruzi*

In recent years, it has become of interest the study of the biogenesis, structure, composition, and function of LBs formed within protists parasites, such as *T. cruzi*. These parasites are able to acquire host lipids or to codify their own lipid biosynthesis machinery, thus allowing LBs biogenesis independently of their host (D'Avila et al., 2012; Herker and Ott, 2012).

Toledo et al. (2016) showed that metacyclic trypomastigote forms from *T. cruzi*, co-cultured with peritoneal macrophages for 1 h had enhanced LB biogenesis, suggesting that the interaction of infective forms of parasite with inflammatory host leukocytes such as macrophages might quickly modulate the LB formation in the *T. cruzi* (Figure 2). Moreover, ultrastructural analyses of LBs from amastigote forms inside macrophages, showed the presence of a typical monolayer



of phospholipids with varied electron-density, similar for the one of the mammals cells. In addition, the electron density was dependent on the cell activation state and the LBs from the amastigotes inside heart macrophages, during *in vivo* infection, were more electron-dense, than the LBs from peritoneal macrophages, during *in vitro* infection (Toledo et al., 2016).

Furthermore, it has been showed that the arachidonic acid (AA) is a potent inductor of LB formation in eukaryotic cells (Weller et al., 1991b; Bozza et al., 1996) and that these organelles incorporate AA, mostly esterified in phospholipids (Weller and Dvorak, 1985; Weller et al., 1991a). Interestingly, trypomastigotes forms of *T. cruzi* stimulated by AA *in vitro* presented an enhanced number of LBs when compared to unstimulated parasites in a time- and dose-dependent manner, with a peak at 24 h of *in vitro* stimulation. Raman spectroscopy and MALDI-TOF mass spectroscopy confirmed that both parasites stimulated by AA can incorporate a higher content of unsaturated fatty acids, such as AA inside parasite LBs (Toledo et al., 2016). These organelles, formed as the outcome of host interaction, suggest that the high

content of AA can be captured from host cell by the parasite (Figure 2).

LIPID BODIES ARE SPECIALIZED IN THE EICOSANOIDS SYNTHESIS IN BOTH PARASITE AND HOST CELLS

As described before, LBs can accumulate AA, suggesting that these LBs are potentially efficient to initiate intracellular signaling pathways that culminate in the formation of lipid inflammatory mediators, such as eicosanoids (Weller and Dvorak, 1985; Weller et al., 1991a). Prostaglandins (PG) are eicosanoids derived from AA, which are converted by cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) into PGH₂, which in turn is converted *in vivo* and *in vitro* into various arachidonate metabolites, such as PGD₂, PGE₂, and PGE_{2a} (Hayaishi and Urade, 2002; Miller, 2006). The PGE₂ sustains homeostatic functions and mediates pathogenic mechanisms, including the inflammatory response associated with parasitic disease (Kubata et al., 2007). In fact, previous

works documented LBs as sites of compartmentalization of eicosanoid-forming enzymes (Yu et al., 1998; Bozza et al., 2002; D'Avila et al., 2006, 2011), and *in situ* production of eicosanoids, such as leukotrienes and prostaglandins, were really identified in these organelles within activated cells during an inflammatory situation (Bandeira-Melo et al., 2001; Pacheco et al., 2002; Vieira-de-Abreu et al., 2005; D'Avila et al., 2006).

Earlier works have demonstrated that macrophages infected by *T. cruzi* were positively immunostained for COX-2, and COX-2 expression was increased when macrophages were co-cultured with apoptotic cells (Freire-de-Lima et al., 2000; D'Avila et al., 2011). In addition, D'Avila et al. (2011) confirmed that COX-2 is localized within LBs as well as in the perinuclear membrane in infected cells. Using Eicosacell technique, a strategy developed for direct *in situ* immunolocalization of eicosanoid synthesis (Bandeira-Melo et al., 2011), new formed PGE₂ was produced in LBs induced by *T. cruzi* infection in the presence of apoptotic cells (D'Avila et al., 2011).

After the findings on the synthesis of PGE₂ in LB-induced by *T. cruzi* in macrophages, it was showed that LBs from trypomastigotes forms of *T. cruzi*, are capable to incorporate AA and might be sources of PGE₂ synthesis, suggesting an activation of the AA cascade and a likely pathway for PGE₂ production in the parasite (Toledo et al., 2016). Moreover, the parasites produce PGs, like eukaryotic cells possessing the enzymatic machineries for PG biosynthesis (Dauguschies and Joachim, 2000; Kubata et al., 2002; Noverr et al., 2003). However, the homologs of mammalian COX have not been found in any parasitic protozoan so far, although proteins called COX-like enzymes, that are similar to the mammalian COX-1 and COX-2 have already been identified (Kubata et al., 2002). Indeed, trypomastigotes forms of *T. cruzi*, stimulated by AA led to quantitative increases in LBs biogenesis in parallel with PGE₂ secretion and PGE₂ synthase expression (Toledo et al., 2016). Thus, the co-localization of LB and PGE₂ sites within stimulated trypomastigotes, give credence to the LBs as organelles to the sites for newly formed PGE₂ during the activation (Toledo et al., 2016). This is also true for the *T. cruzi* infection in macrophages (D'Avila et al., 2011). These data suggest that LBs may be the source of lipid and inflammatory mediators, in response to the host-parasite interaction. Furthermore, PGE₂ may be a powerful immunomodulator and acts in the immunosuppression that occurs during *T. cruzi* infection, indicating a function for PGs from *T. cruzi* in the Chagas disease pathogenesis.

LIPID BODY INHIBITION AS INFECTION CONTROL STRATEGY

Based on the effects that *T. cruzi* infection and apoptotic cell uptake cause on LBs formation in the host cell, it has been investigated whether modulation of the formation of this organelle could impact the replication of the parasite (D'Avila et al., 2011). It was tested the effect of two non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), aspirin (COX-1

and COX-2 inhibitor) and NS-398 (COX-2 inhibitor) which, in addition to their COX inhibitory effect, also inhibit COX-independent LB formation (Bozza et al., 1996, 2002). Both aspirin and NS-398 inhibited the LB biogenesis in infected macrophages in the presence or absence of apoptotic cells, suppressing the *T. cruzi* effects on LB-derived PGE₂ synthesis, and reversing the enhancement on parasite replication induced by apoptotic cells (Figure 2). Therefore, the biogenesis of the LBs in both the *T. cruzi* infection and in the parasite interaction has a direct role in the ability of the macrophages to synthesize increased amounts of PGE₂, which may have an impact on the course of the disease (D'Avila et al., 2011).

In parallel, LB biogenesis seems to request *de novo* lipid synthesis in a cellular mechanism controlled by fatty acid synthase (Schmid et al., 2005; D'Avila et al., 2006; Accioly et al., 2008). Therefore, the fatty acid synthase inhibitor C75 significantly inhibited LB biogenesis induced by *T. cruzi* infection, with or without the uptake of apoptotic cells, through a mechanism independent of the inhibition of the COX-2 enzyme (Figure 2). Remarkably, it was demonstrated that the treatment with C75 also reversed the parasite replication in macrophages as well as the formation of LBs (D'Avila et al., 2011).

In conclusion, it is safe to say that these organelles show an important role in the inflammatory response, especially against intracellular pathogens, since their biogenesis leads to the production of inflammatory mediators, suppressing the macrophage effectiveness to respond and reduce its capacity to eliminate the parasite and control the infection. In this mini review, we analyzed the structure, composition and function of the LBs in the parasite and host cell during *T. cruzi* infection (Melo et al., 2003; D'Avila et al., 2011). The increases in LB numbers in *T. cruzi*, associated with changes in LB ultrastructure highlight the fact that LBs parasites are also plastic, dynamic and active organelles, which are efficient in modifying their structure and composition in line with immune cell activation mechanisms.

CONCLUDING REMARKS

Studies have investigated the intriguing formation of LBs, both in the host cell and in the parasite itself (D'Avila et al., 2011; Toledo et al., 2016). Newly formed host LBs are distinguished for their efficiency to synthesize lipid inflammatory mediators, such as PGE₂ and to compartmentalize eicosanoid-forming enzymes, such as COX-2 (Yu et al., 1998; Bozza et al., 2002; D'Avila et al., 2006, 2011).

Host leukocytes LBs triggered by *T. cruzi* infection and increased by the phagocytosis of apoptotic cells are accepted not only as inflammatory organelles and structural markers of parasite-induced cell activation, but also as organelles efficient in the orchestration of the host cell metabolism (D'Avila et al., 2011). A recent work supports the idea that the *T. cruzi* itself is capable of producing LB-derived PGE₂ after contact with the host cell to facilitate its own survival (Toledo et al., 2016). This is evidence that parasites have adapted to their

lipid hosts modulation mechanisms by taking advantage of the cellular metabolism favoring the diseases progression. However, the effects of modulating the formation of LBs by distinct drugs and their influence in the control of parasite replication experimentally, suggest mechanisms that could help in the discovery of new effective therapies for Chagas disease.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PA and HD drafted and edited the manuscript. DMT edited the figures. PA, DMT, GR, and HD wrote and approved the final version of the paper.

REFERENCES

- Accioly, M. T., Pacheco, P., Maya-Monteiro, C. M., Carrossini, N., Robbs, B. K., Oliveira, S. S., et al. (2008). Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res.* 68, 1732–1740. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1999
- Almeida, I. C., Gazzinelli, R., Ferguson, M. A., and Travassos, L. R. (1999). Trypanosoma cruzi mucins: potential functions of a complex structure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94(Suppl. 1), 173–176. doi: 10.1590/S0074-02761999000700023
- Almeida, P. E., Roque, N. R., Magalhaes, K. G., Mattos, K. A., Teixeira, L., Maya-Monteiro, C., et al. (2014). Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by *Mycobacterium bovis* BCG infection. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 97–107. doi: 10.1016/j.bbaliip.2013.10.008
- Almeida, P. E., Silva, A. R., Maya-Monteiro, C. M., Torocsik, D., D'Avila, H., Dezso, B., et al. (2009). *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J. Immunol.* 183, 1337–1345. doi: 10.4049/jimmunol.090365
- Alvarez, H. M., Mayer, F., Fabritius, D., and Steinbuchel, A. (1996). Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630. *Arch. Microbiol.* 165, 377–386. doi: 10.1007/s002030050341
- Bandeira-Melo, C., Phoofolo, M., and 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. doi: 10.1074/jbc.M101436200
- Bandeira-Melo, C., Weller, P. F., and Bozza, P. T. (2011). Eicosacell - an immunofluorescent-based assay to localize newly synthesized eicosanoid lipid mediators at intracellular sites. *Methods Mol. Biol.* 689, 163–181. doi: 10.1007/978-1-60761-950-5_10
- Bartz, R., Zehmer, J. K., Zhu, M., Chen, Y., Serrero, G., Zhao, Y., et al. (2007). Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J. Proteome Res.* 6, 3256–3265. doi: 10.1021/pr070158j
- Bostrom, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Lidberg, U., Johansson, B. R., et al. (2007). SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat. Cell Biol.* 9, 1286–1293. doi: 10.1038/ncb1648
- Bozza, P. T., Magalhaes, K. G., and Weller, P. F. (2009). Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 540–551. doi: 10.1016/j.bbaliip.2009.01.005
- Bozza, P. T., Melo, R. C., and Bandeira-Melo, C. (2007). Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol. Ther.* 113, 30–49. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.06.006
- Bozza, P. T., Pacheco, P., Yu, W., and Weller, P. F. (2002). NS-398: cyclooxygenase-2 independent inhibition of leukocyte priming for lipid body formation and enhanced leukotriene generation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 67, 237–244. doi: 10.1054/plef.2002.0425
- Bozza, P. T., Payne, J. L., Morham, S. G., Langenbach, R., Smithies, O., and Weller, P. F. (1996). Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 11091–11096. doi: 10.1073/pnas.93.20.11091
- Bozza, P. T., Yu, W., and Weller, P. F. (1997). Mechanisms of formation and function of eosinophil lipid bodies: inducible intracellular sites involved in arachidonic acid metabolism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92(Suppl. 2), 135–140. doi: 10.1590/S0074-02761997000800018
- Brasaemle, D. L., Barber, T., Wolins, N. E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E. J., and Londos, C. (1997). Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J. Lipid Res.* 38, 2249–2263.
- Campos, M. A., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procopio, D. O., et al. (2001). Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* 167, 416–423. doi: 10.4049/jimmunol.167.1.416
- Cardona, P. J., and Ausina, V. (2000). Histopathology of tuberculosis. Approximation to the clinical course of lung lesions in animal experimentation models induced with aerosols. *Arch. Bronconeumol.* 36, 645–650. doi: 10.1016/S0300-2896(15)30087-9
- Chen, J. S., Greenberg, A. S., and Wang, S. M. (2002). Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell. Biochem.* 86, 784–791. doi: 10.1002/jcb.10266
- Choudhary, V., Ojha, N., Golden, A., and Prinz, W. A. (2015). A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the ER. *J. Cell Biol.* 211, 261–271. doi: 10.1083/jcb.201505067
- D'Avila, H., Freire-de-Lima, C. G., Roque, N. R., Teixeira, L., Barja-Fidalgo, C., Silva, A. R., et al. (2011). Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E(2) generation and increased parasite growth. *J. Infect. Dis.* 204, 951–961. doi: 10.1093/infdis/jir432
- D'Avila, H., Melo, R. C., Parreira, G. G., Werneck-Barroso, E., Castro Faria Neto, H. C., and Bozza, P. T. (2006). *Mycobacterium bovis* BCG induces TLR 2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J. Immunol.* 176, 3087–3097. doi: 10.4049/jimmunol.176.5.3087
- D'Avila, H., Toledo, D. A., and Melo, R. C. (2012). Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-*Trypanosoma cruzi* interplay during innate immune responses. *Mediators Inflamm.* 2012:478601. doi: 10.1155/2012/478601
- Dalen, K. T., Dahl, T., Holter, E., Arntsen, B., Londos, C., Sztalryd, C., et al. (2007). LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 210–227. doi: 10.1016/j.bbaliip.2006.11.011
- Dauguschies, A., and Joachim, A. (2000). Eicosanoids in parasites and parasitic infections. *Adv. Parasitol.* 46, 181–240. doi: 10.1016/S0065-308X(00)46009-4
- Decote-Ricardo, D., Nunes, M. P., Morrot, A., and Freire-de-Lima, C. G. (2017). Implication of apoptosis for the pathogenesis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Front. Immunol.* 8:518. doi: 10.3389/fimmu.2017.00518

FUNDING

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq).

ACKNOWLEDGMENTS

GR is a Ph.D. candidate supported by a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) fellowship. The authors would like to thank Cassiana M. Boya for the English language revision.

- DosReis, G. A. (2011). Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 44, 84–90. doi: 10.1590/S0100-879X2011007500005
- Dvorak, A. M., Weller, P. F., Harvey, V. S., Morgan, E. S., and Dvorak, H. F. (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, 136–142. doi: 10.1159/000236511
- Elliott, M. R., Koster, K. M., and Murphy, P. S. (2017). Efferocytosis signaling in the regulation of macrophage inflammatory responses. *J. Immunol.* 198, 1387–1394. doi: 10.4049/jimmunol.1601520
- Ferguson, D., Zhang, J., Davis, M. A., Helsley, R. N., Vedin, L. L., Lee, R. G., et al. (2017). The lipid droplet-associated protein perilipin 3 facilitates hepatitis C virus-driven hepatic steatosis. *J. Lipid Res.* 58, 420–432. doi: 10.1194/jlr.M073734
- Freire-de-Lima, C. G., Nascimento, D. O., Soares, M. B. P., Bozza, P. T., Castro-Faria-Neto, H. C., De Mello, F. G., et al. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403, 199–203. doi: 10.1038/35003208
- Fujimoto, T., Kogo, H., Ishiguro, K., Tauchi, K., and Nomura, R. (2001). Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new "membrane domain" in the cell. *J. Cell Biol.* 152, 1079–1085. doi: 10.1083/jcb.152.5.1079
- Gomes, A. F., Magalhaes, K. G., Rodrigues, R. M., de Carvalho, L., Molinaro, R., Bozza, P. T., et al. (2014). *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN- γ and PGE2. *Parasit. Vectors* 7:47. doi: 10.1186/1756-3305-7-47
- Gravina, H. D., Antonelli, L., Gazzinelli, R. T., and Ropert, C. (2013). Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 8:e63100. doi: 10.1371/journal.pone.0063100
- Hayashi, O., and Urade, Y. (2002). Prostaglandin D2 in sleep-wake regulation: recent progress and perspectives. *Neuroscientist* 8, 12–15. doi: 10.1177/107385840200800105
- Herker, E., and Ott, M. (2012). Emerging role of lipid droplets in host/pathogen interactions. *J. Biol. Chem.* 287, 2280–2287. doi: 10.1074/jbc.R111.300202
- Hodges, B. D., and Wu, C. C. (2010). Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets. *J. Lipid Res.* 51, 262–273. doi: 10.1194/jlr.R003582
- Huang, H., Chan, J., Wittner, M., Jelicks, L. A., Morris, S. A., Factor, S. M., et al. (1999). Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 75–88. doi: 10.1006/jmcc.1998.0848
- Jacquier, N., Choudhary, V., Mari, M., Toulmay, A., Reggiori, F., and Schneider, R. (2011). Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 124(Pt 14), 2424–2437. doi: 10.1242/jcs.076836
- Kalinski, P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J. Immunol.* 188, 21–28. doi: 10.4049/jimmunol.1101029
- Kassan, A., Herms, A., Fernandez-Vidal, A., Bosch, M., Schieber, N. L., Reddy, B. J., et al. (2013). Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains. *J. Cell Biol.* 203, 985–1001. doi: 10.1083/jcb.201305142
- Kubata, B. K., Duzenko, M., Martin, K. S., and Urade, Y. (2007). Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites. *Trends Parasitol.* 23, 325–331. doi: 10.1016/j.pt.2007.05.005
- Kubata, B. K., Kabututu, Z., Nozaki, T., Munday, C. J., Fukuzumi, S., Ohkubo, K., et al. (2002). A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 196, 1241–1251. doi: 10.1084/jem.20020885
- Lecoeur, H., Giraud, E., Prevost, M. C., Milon, G., and Lang, T. (2013). Reprogramming neutral lipid metabolism in mouse dendritic leukocytes hosting live *Leishmania amazonensis* amastigotes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2276. doi: 10.1371/journal.pntd.0002276
- Machado, F. S., Souto, J. T., Rossi, M. A., Esper, L., Tanowitz, H. B., Aliberti, J., et al. (2008). Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. *Microbes Infect.* 10, 1558–1566. doi: 10.1016/j.micinf.2008.09.009
- Magalhaes, L. M. D., Viana, A., de Jesus, A. C., Chiari, E., Galvao, L., Gomes, J. A., et al. (2017). Distinct *Trypanosoma cruzi* isolates induce activation and apoptosis of human neutrophils. *PLoS One* 12:e0188083. doi: 10.1371/journal.pone.0188083
- Martin, S., and Parton, R. G. (2005). Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 163–174. doi: 10.1016/j.semcdb.2005.01.007
- Mattos, K. A., D'Avila, H., Rodrigues, L. S., Oliveira, V. G., Sarno, E. N., Atella, G. C., et al. (2010). Lipid droplet formation in leprosy: toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 87, 371–384. doi: 10.1189/jlb.0609433
- Mattos, K. A., Lara, F. A., Oliveira, V. G., Rodrigues, L. S., D'Avila, H., Melo, R. C., et al. (2011). Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell. Microbiol.* 13, 259–273. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01533.x
- Melo, R. C., D'Avila, H., Fabrino, D. L., Almeida, P. E., and Bozza, P. T. (2003). Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell* 35, 59–67. doi: 10.1016/S0040-8166(02)00105-2
- Melo, R. C., Fabrino, D. L., Dias, F. F., and Parreira, G. G. (2006). Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflamm. Res.* 55, 342–348. doi: 10.1007/s00011-006-5205-0
- Melo, R. C., and Machado, C. R. (2001). *Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. *Exp. Parasitol.* 97, 15–23. doi: 10.1006/expr.2000.4576
- Miller, S. B. (2006). Prostaglandins in health and disease: an overview. *Semin. Arthritis Rheum.* 36, 37–49. doi: 10.1016/j.semarthrit.2006.03.005
- Mota, L. A., Roberto Neto, J., Monteiro, V. G., Lobato, C. S., Oliveira, M. A., Cunha, M., et al. (2014). Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associate with the parasitophorous vacuole and decrease their microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 767–774. doi: 10.1590/0074-0276140119
- Murphy, D. J. (1999). Production of novel oils in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 175–180. doi: 10.1016/S0958-1669(99)80031-7
- Murphy, D. J. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog. Lipid Res.* 40, 325–438. doi: 10.1016/S0163-7827(01)00013-3
- Murphy, D. J. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma* 249, 541–585. doi: 10.1007/s00709-011-0329-7
- Murphy, D. J., and Vance, J. (1999). Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem. Sci.* 24, 109–115. doi: 10.1016/S0968-0004(98)01349-8
- Noverr, M. C., Erb-Downward, J. R., and Huffnagle, G. B. (2003). Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 517–533. doi: 10.1128/CMR.16.3.517-533.2003
- Ozeki, S., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Hatano, N., Taniguchi, H., and Fujimoto, T. (2005). Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J. Cell Sci.* 118(Pt 12), 2601–2611. doi: 10.1242/jcs.02401
- Pacheco, P., Bozza, F. A., Gomes, R. N., Bozza, M., Weller, P. F., Castro-Faria-Neto, H. C., et al. (2002). Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular loci involved in eicosanoid metabolism. *J. Immunol.* 169, 6498–6506. doi: 10.4049/jimmunol.169.11.6498
- Parada, H., Carrasco, H. A., Anez, N., Fuenmayor, C., and Inglessis, I. (1997). Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int. J. Cardiol.* 60, 49–54. doi: 10.1016/S0167-5273(97)02952-5
- Pinheiro, R. O., Nunes, M. P., Pinheiro, C. S., D'Avila, H., Bozza, P. T., Takiya, C. M., et al. (2009). Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect.* 11, 181–190. doi: 10.1016/j.micinf.2008.11.006
- Rabhi, S., Rabhi, I., Trentin, B., Piquemal, D., Regnault, B., Goyard, S., et al. (2016). Lipid droplet formation, their localization and dynamics during *Leishmania major* macrophage infection. *PLoS One* 11:e0148640. doi: 10.1371/journal.pone.0148640
- Rodrigues, M. M., Oliveira, A. C., and Bellio, M. (2012). The immune response to *Trypanosoma cruzi*: role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development. *J. Parasitol. Res.* 2012:507874. doi: 10.1155/2012/507874

- Rodriguez-Salas, L. A., Klein, E., Acquatella, H., Cataliotti, F., Davalos, V. V., Gomez-Mancebo, J. R., et al. (1998). Echocardiographic and clinical predictors of mortality in chronic Chagas' Disease. *Echocardiography* 15, 271–278. doi: 10.1111/j.1540-8175.1998.tb00607.x
- Schmid, B., Rippmann, J. F., Tadayyon, M., and Hamilton, B. S. (2005). Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 1073–1082. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.01.067
- Snijdewint, F. G., Kalinski, P., Wierenga, E. A., Bos, J. D., and Kapsenberg, M. L. (1993). Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J. Immunol.* 150, 5321–5329.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., and Fujimoto, T. (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty acid composition. *J. Biol. Chem.* 277, 44507–44512. doi: 10.1074/jbc.M207712200
- Teixeira, A. R., Teixeira, G., Macedo, V., and Prata, A. (1978). Trypanosoma cruzi-sensitized T-lymphocyte mediated 51CR release from human heart cells in Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 1097–1107. doi: 10.4269/ajtmh.1978.27.1097
- Teixeira, M. M., Gazzinelli, R. T., and Silva, J. S. (2002). Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. *Trends Parasitol.* 18, 262–265. doi: 10.1016/S1471-4922(02)02283-3
- Toledo, D. A., Roque, N. R., Teixeira, L., Milan-Garces, E. A., Carneiro, A. B., Almeida, M. R., et al. (2016). Lipid body organelles within the parasite Trypanosoma cruzi: a role for intracellular arachidonic acid metabolism. *PLoS One* 11:e0160433. doi: 10.1371/journal.pone.0160433
- Umlauf, E., Csaszar, E., Moertelmaier, M., Schuetz, G. J., Parton, R. G., and Prohaska, R. (2004). Association of stomatin with lipid bodies. *J. Biol. Chem.* 279, 23699–23709. doi: 10.1074/jbc.M310546200
- Vieira-de-Abreu, A., Assis, E. F., Gomes, G. S., Castro-Faria-Neto, H. C., Weller, P. F., Bandeira-Melo, C., et al. (2005). Allergic challenge-elicited lipid bodies compartmentalize in vivo leukotriene c4 synthesis within eosinophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33, 254–261. doi: 10.1165/rcmb.2005-0145OC
- Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R., and Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390, 350–351. doi: 10.1038/37022
- Waltermann, M., Hinz, A., Robenek, H., Troyer, D., Reichelt, R., Malkus, U., et al. (2005). Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up. *Mol. Microbiol.* 55, 750–763. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04441.x
- Walther, T. C., Chung, J., and Farese, R. V. Jr. (2017). Lipid droplet biogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33, 491–510. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060608
- Weller, P. F., and Dvorak, A. M. (1985). Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. *Blood* 65, 1269–1274.
- Weller, P. F., Monahan-Earley, R. A., Dvorak, H. F., and Dvorak, A. M. (1991a). Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils: subcellular isolation and analysis of arachidonic incorporation. *Am. J. Pathol.* 138, 141–148.
- Weller, P. F., Ryeom, S. W., Picard, S. T., Ackerman, S. J., and 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. doi: 10.1083/jcb.113.1.137
- Welte, M. A. (2007). Proteins under new management: lipid droplets deliver. *Trends Cell Biol.* 17, 363–369. doi: 10.1016/j.tcb.2007.06.004
- Wolins, N. E., Brasaemle, D. L., and Bickel, P. E. (2006). A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett.* 580, 5484–5491. doi: 10.1016/j.febslet.2006.08.040
- Wu, C. C., Howell, K. E., Neville, M. C., Yates, J. R. III., and McManaman, J. L. (2000). Proteomics reveal a link between the endoplasmic reticulum and lipid secretory mechanisms in mammary epithelial cells. *Electrophoresis* 21, 3470–3482. doi: 10.1002/1522-2683(20001001)21:16<3470::AID-ELPS3470>3.0.CO;2-G
- Xiao, Y. Q., Freire-de-Lima, C. G., Janssen, W. J., Morimoto, K., Lyu, D., Bratton, D. L., et al. (2006). Oxidants selectively reverse TGF-beta suppression of proinflammatory mediator production. *J. Immunol.* 176, 1209–1217. doi: 10.4049/jimmunol.176.2.1209
- Xiao, Y. Q., Freire-de-Lima, C. G., Schiemann, W. P., Bratton, D. L., Vandivier, R. W., and Henson, P. M. (2008). Transcriptional and translational regulation of TGF-beta production in response to apoptotic cells. *J. Immunol.* 181, 3575–3585. doi: 10.4049/jimmunol.181.5.3575
- Yu, W., Bozza, P. T., Tzizik, D. M., Gray, J. P., Cassara, J., Dvorak, A. M., et al. (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, 1078–1085.

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

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



Identification of Piecemeal Degranulation and Vesicular Transport of MBP-1 in Liver-Infiltrating Mouse Eosinophils During Acute Experimental *Schistosoma mansoni* Infection

Felipe F. Dias¹, Kátia B. Amaral¹, Kássia K. Malta¹, Thiago P. Silva¹, Gabriel S. C. Rodrigues¹, Florence M. Rosa², Gisele O. L. Rodrigues³, Vivian V. Costa^{4,5}, Hélio Chiarini-Garcia⁶, Peter F. Weller⁷ and Rossana C. N. Melo^{1,7*}

¹ Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, ² Laboratory of Parasitology, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, ³ Laboratory of Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁴ Center for Drug Research and Development of Pharmaceuticals, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁵ Research Group in Arboviral Diseases, Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁶ Laboratory of Reproduction and Structural Biology, Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁷ Division of Allergy and Inflammation, Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School Boston, Boston, MA, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Paige Lacy,
University of Alberta, Canada

Reviewed by:

Todd Davidson,
MedImmune, United States
Axel Lorentz,
University of Hohenheim, Germany

*Correspondence:

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

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Innate Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 06 July 2018

Accepted: 06 December 2018

Published: 20 December 2018

Citation:

Dias FF, Amaral KB, Malta KK, Silva TP, Rodrigues GSC, Rosa FM, Rodrigues GOL, Costa VV, Chiarini-Garcia H, Weller PF and Melo RCN (2018) Identification of Piecemeal Degranulation and Vesicular Transport of MBP-1 in Liver-Infiltrating Mouse Eosinophils During Acute Experimental *Schistosoma mansoni* Infection. *Front. Immunol.* 9:3019. doi: 10.3389/fimmu.2018.03019

Eosinophils have been long associated with helminthic infections, although their functions in these diseases remain unclear. During schistosomiasis caused by the trematode *Schistosoma mansoni*, eosinophils are specifically recruited and migrate to sites of granulomatous responses where they degranulate. However, little is known about the mechanisms of eosinophil secretion during this disease. Here, we investigated the degranulation patterns, including the cellular mechanisms of major basic protein-1 (MBP-1) release, from inflammatory eosinophils in a mouse model of *S. mansoni* infection (acute phase). Fragments of the liver, a major target organ of this disease, were processed for histologic analyses (whole slide imaging), conventional transmission electron microscopy (TEM), and immunonanogold EM using a pre-embedding approach for precise localization of major basic protein 1 (MBP-1), a typical cationic protein stored pre-synthesized in eosinophil secretory (specific) granules. A well-characterized granulomatous inflammatory response with a high number of infiltrating eosinophils surrounding *S. mansoni* eggs was observed in the livers of infected mice. Moreover, significant elevations in the levels of plasma Th2 cytokines (IL-4, IL-13, and IL-10) and serum enzymes (alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase) reflecting altered liver function were detected in response to the infection. TEM quantitative analyses revealed that while 19.1% of eosinophils were intact, most of them showed distinct degranulation processes: cytolysis (13.0%), classical and/or compound exocytosis identified by granule fusions (1.5%), and mainly piecemeal degranulation (PMD) (66.4%), which is mediated by vesicular trafficking. Immunonanogold EM showed

a consistent labeling for MBP-1 associated with secretory granules. Most MBP-1-positive granules had PMD features ($79.0 \pm 4.8\%$). MBP-1 was also present extracellularly and on vesicles distributed in the cytoplasm and attached to/surrounding the surface of emptying granules. Our data demonstrated that liver-infiltrating mouse eosinophils are able to degranulate through different secretory processes during acute experimental *S. mansoni* infections with PMD being the predominant mechanism of eosinophil secretion. This means that a selective secretion of MBP-1 is occurring. Moreover, our study demonstrates, for the first time, a vesicular trafficking of MBP-1 within mouse eosinophils elicited by a helminth infection. Vesicle-mediated secretion of MBP-1 may be relevant for the rapid release of small concentrations of MBP-1 under cell activation.

Keywords: schistosomiasis, eosinophil degranulation, major basic protein-1, granuloma, inflammation, liver, immunogold electron microscopy, piecemeal degranulation

INTRODUCTION

Eosinophils are innate immune cells with a broad distribution in tissues and notably associated with allergic and helminth parasitic diseases [reviewed in (1–3)]. Increase in the numbers of eosinophils has long been reported during the acute phase of schistosomiasis, a neglected tropical disease of great clinical and socioeconomic relevance (4–7). The etiological agents of human schistosomiasis are trematode worms of the genus *Schistosoma* with most species, including *Schistosoma mansoni*, the only one that occurs in the Americas, affecting mainly the liver and the intestines (8). Human infection with this parasite causes significant chronic morbidity with the development of a granulomatous reaction and severe tissue inflammation, which can lead to life-threatening hepatosplenomegaly [reviewed in (9)].

There is considerable debate on the role of eosinophils during schistosomiasis. It remains uncertain if eosinophils act as major effector cells against the parasite; as immunomodulators of the immune response; as participants in tissue homeostasis and metabolism, which could favor establishment and maintenance of parasitic worms in their hosts, or merely as operators in remodeling and clearance of debris following injury (7, 10–14).

Eosinophil responses to inflammatory and/or immunoregulatory situations are underlined by the ability of these cells to release granule-stored products, that is, to degranulate (15). Direct attention to events of eosinophil degranulation during schistosomiasis mansoni has been paid in earlier studies. Several authors showed *in vitro* that eosinophils, operating via antibody-dependent cytotoxicity, exert damage to schistosomula of *S. mansoni* (16, 17). This effect was attributable, at least in part, to degranulation and release of granule contents, especially to major basic protein (MBP), a typical cationic protein stored pre-synthesized in secretory (specific) granules, onto the surface of the parasite (18). In fact, the toxicity of MBP and Eosinophil Peroxidase/Eosinophil Protein X (EPO/EPX) has given support to the effector function of eosinophils in defense of the host to helminthes, although evidence for such importance have arisen just from *in vitro* data (reviewed in 13). Within *S. mansoni* egg-induced granulomas, there are well-defined clusters

of eosinophils and other inflammatory cells embedded in a collagen-rich extracellular matrix around mature parasite eggs (7, 19), but there is a lack of clarity regarding the degranulation patterns of eosinophils and its significance in both humans and mouse models.

Here, we performed a comprehensive *in vivo* study to investigate the secretory processes involved in eosinophil degranulation during the acute phase of schistosomiasis mansoni in mice. By using conventional transmission electron microscopy (TEM), which is the only technique with resolution suitable to clearly identify and distinguish between different modes of cell secretion (20) and immunogold EM for detecting MBP-1 subcellular localization, we identified, for the first time, a major vesicle-mediated secretory process for MBP-1 release underlying the responses of eosinophils to the infection.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Infection in Mice

Swiss Webster mice aged 70 days were inoculated or not (12 mice per group) with a single inoculum of cercariae of *S. mansoni* (100 cercariae/mouse), LE strain. Cercariae were harvested from infected *Biomphalaria glabrata* snails, washed, counted, and injected subcutaneously into each mouse by an experienced technician. *S. mansoni* LE strain used in the experiments was originally isolated from a patient in Belo Horizonte, Brazil, and has been maintained in successive passages through *Biomphalaria glabrata* snails and hamsters (*Mesocricetus auratus*) at the Laboratory of Schistosomiasis (Department of Parasitology, UFMG, Brazil). Infected animals and respective uninfected controls from the same age were euthanized at 55 days of infection (acute phase) (5). Infection was confirmed by findings of parasite eggs in the rodent feces at week five of infection (21).

Ethics Statement

This study was carried out in full accordance with all international and Brazilian accepted ethic guidelines and was approved by the Oswaldo Cruz Foundation Ethics Committee on Animal Use [CEUA-Comissão de Ética no Uso de Animais,

under the protocol 32/2012). CEUA follows the Brazilian national guidelines recommended by the National Council for Animal Experimentation-CONCEA (*Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal*). Mice experimentally infected and uninfected controls were monitored daily for survival and well-being status (home cage evaluation, body condition, skin lesions, mobility and other general conditions) (22). No animals died prior to the experimental endpoint (55 days of infection).

Collection of Samples

Experimentally infected animals and their respective uninfected controls were anesthetized, euthanized, and blood samples and organ fragments were collected for different studies as below. Animals were euthanized by exsanguination (full bleed) under deep anesthesia by cardiac puncture. The anesthetic protocols included ketamine (100 mg/mL) combined with acepromazine (10 mg/mL) at a ratio of 9:1 (dose of 0.15 mL/100 g body weight) (23). Blood samples were collected by cardiac puncture without anti-coagulant for enzyme determinations or with heparin for cytokine evaluations. Another group of infected and non-infected animals ($n = 4$ for each group) was euthanized in a CO₂ chamber at the same day for peritoneal lavage (PL).

Antibody Reagents

Rat monoclonal anti-mouse IgG2a MBP-1 (clone 14.7.4) (Lee Laboratories; Mayo Clinic, Scottsdale, AZ) whose MBP-1 specificity has been well validated in previous studies (24–26) and irrelevant isotype control monoclonal antibodies IgG (Abcam; Cambridge, MA) were used for the ultrastructural immunodetection studies at concentration of 20 µg/mL. The secondary antibody used for immunoEM was an affinity-purified goat anti-rat Fab fragment conjugated to 1.4-nm gold particles (1:100, Nanogold, Nanoprobes, Stony Brook, NY).

Liver Enzymes Determinations

To evaluate the serum enzymes reflecting liver function, blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min and analyzed in a Roche Cobas Mira Plus Chemistry Analyzer (Roche Diagnostics®, IN, USA) as before (27). Assay Kits for measurement of the levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) (Bioclin®, Belo Horizonte, MG, Brazil) were used according to the manufacturer's instructions. A total of 24 samples were evaluated from mice (12 from infected animals and 12 from uninfected of the same age). Results were expressed as units/liter (U/L).

Cytokine Determinations

To investigate the Th2 profile immune response during the acute phase of the disease, plasma from *S. mansoni*-infected and control animals were processed for cytokine (IL-4, IL-10, IL-13) analyzes by ELISA assay (DuoSet® ELISA Development System, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. After blood centrifugation (3000 rpm for 10 min at 4°C), plasma was collected and frozen at –80°C for subsequent processing.

For ELISA assay, the plates were incubated with 50 µL of capture antibody, diluted in PBS (0.15 M NaCl) at RT, overnight.

Next day, the plates were washed three times with washing buffer (0.05% Tween® 20 in PBS), blocked with 150 µL of PBS-BSA (bovine serum albumin) 10% for 1 h and washed as before. Samples or cytokine patterns (50 µL) were diluted in PBS-BSA and incubated at 4°C, overnight. Next day, the plates were washed as above and incubated with the detection antibody (50 µL) for 2 h at RT, followed by 50 µL of streptavidin conjugated to peroxidase for 20 min protected from exposure to light. After washing, the reaction was revealed by adding 50 µL of substrate [H₂O₂: tetramethylbenzidine (TMB)] (1:1) for 20–40 min and blocked with 50 µL of sulfuric acid (H₂SO₄ 2N). Samples were read in a SPECTRAMAX 190 Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) at 450 nm.

Preparation and Quantification of the Peritoneal Lavage Fluid Cellularity

The numbers and types of cells recruited from the bone marrow to the peritoneal cavity were determined by PL. PL fluid was recovered following injection of 5 mL of 0.02M PBS, pH 7.4, and cells were counted in a Neubauer chamber after dilution (1:40) in Turk solution (2% acetic acid solution). Additionally, cytocentrifuged preparations (100 µL of PL fluid/slide) were obtained in a Cytospin 4 Shandon (Thermo Scientific Corporation, Waltham, MA) at 450 rpm for 5 min at room temperature and stained with a routine hematology stain (Panótico Rápido kit, Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). Cells (100/slide) were counted in an Olympus BX-41 microscope (Tokyo, Japan) at a magnification of 1,000x.

Histopathology and Histoquantitative Analyses

Liver samples from uninfected and infected mice (6 animals/group) were removed from the right lobe and divided into approximately 5 mm³ fragments, which were immediately fixed in 4% paraformaldehyde in buffered phosphate, pH 7.3, 0.1 M overnight at 4°C (28). Next day, the specimens were transferred to a 0.1 M phosphate buffer solution, pH 7.3 and kept in this solution at 4°C for further histological processing. Samples were then dehydrated, embedded in glycolmethacrylate resin (GMA) (Leica Historesin Embedding Kit, Leica Biosystems, Heidelberg, Germany) as before (28) and cut at 3 µm-thick sections using a Leica microtome RM2155. This histological approach combines optimal fixation and processing for visualization and quantification of inflammatory processes. Three sections per animal were obtained at an interval of 300 µm between sections to ensure analysis of different granulomas. Sections were stained with hematoxylin-eosin (Sigma-Aldrich) for qualitative and quantitative evaluation of granulomas and other parameters.

Histological slides from livers were scanned using a 3D Scan Panoramic Histech scanner (3D Histech Kft. Budapest, Hungary) connected to a computer (Fujitsu Technology Solutions GmbH, Munich, Germany). This scanner enables a resolution of 0.23 µm per pixel. Tissue section areas were analyzed using Panoramic Viewer 1.15.2 SP2 RTM (3D Histech kft.) and Histoquant (3D Histech kft.) softwares, which provide

a morphometric detailed analysis with precise measurements of different histological parameters, including areas and types of granulomas at high resolution of entire histological slides (19).

The following morphometric parameters were evaluated and quantitated in the liver: (i) Distribution and types of granulomas as previously described (19); (ii) Area taken by granulomas: the total area related to the granulomatous response was measured in three sections per animal. The area occupied by different types of granulomas was also specified. A total of 203 granulomas was recorded. (iii) Area taken by non-granulomatous inflammatory infiltrates: the total area occupied by infiltrates was measured in three sections per animal; (iv) Number of parasite eggs in the liver per mm² of tissue; (v) number of eosinophils per total area of granuloma.

Additionally, the proportion of eosinophils was estimated in hepatic granuloma types. For this, the number of eosinophils was counted among 400 immune cells in three randomly chosen granulomas per cell section from each animal. Considering that three sections were studied per animal ($n = 6$ animals), a total of 54 granulomas was analyzed for this eosinophil quantification.

Conventional TEM

For conventional TEM, hepatic and intestinal (small and large) fragments were prepared as in previous works (19, 29). Tissue was fixed in a mixture of freshly prepared aldehydes [1% paraformaldehyde and 1.25% glutaraldehyde (EM grade, 50% aqueous, Electron Microscopy Sciences-EMS, Hatfield, PA)] in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, at room temperature (RT). After 2 h, fragments were sliced into small pieces of 1 mm³ and fixed in the same fixative overnight at 4°C. Next, the fragments were washed twice in 0.1 M sodium phosphate buffer for 4 h each at 4°C and kept in the same buffer at 4°C for further processing. All fragments were post-fixed in 1% osmium tetroxide in Sym-Collidine buffer, pH 7.4, for 2 h at RT. After washing with sodium maleate buffer, pH 5.2, they were stained en bloc in 2% uranyl acetate (EMS) in 0.05 M sodium maleate buffer, pH 6.0, for 2 h at RT and washed in the same buffer as before prior to dehydration in graded ethanols and acetone, and infiltration and embedding with a propylene oxide-Epon sequence (Eponate 12 Resin; Ted Pella, Redding, CA, USA). After polymerization at 60°C for 16 h, thin sections were cut using a diamond knife on an ultramicrotome (Leica, Bannockburn, IL). Sections were mounted on uncoated 200-mesh copper grids (Ted Pella) before staining with lead citrate and viewed with a transmission electron microscope (CM 10; Philips, or Tecnai G2-20-ThermoFischer Scientific/FEI 2006, Eindhoven, the Netherlands) at 60–80 KV. Electron micrographs from different experiments ($n = 3$) were randomly taken at different magnifications to study the ultrastructural features of secretory granules and other subcellular morphological aspects.

Tissue Preparation for Immunonanogold Electron Microscopy (immunoEM)

For immunoEM, liver fragments were immediately fixed in fresh 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) (0.02 M sodium phosphate buffer, 0.15 M sodium chloride, pH 7.4) (30). Samples were fixed for 4 h at RT, washed in PBS,

immersed in 30% sucrose in PBS overnight at 4°C, embedded in OCT compound (Miles, Elkhart, IN), and stored in -180°C liquid nitrogen for subsequent use.

Pre-embedding Immunonanogold EM

As detailed before (30), pre-embedding immunolabeling was carried out before standard EM processing (postfixation, dehydration, infiltration, resin embedding and resin sectioning). All labeling steps were carried out at RT on cryosections as before (30) as follows: a) one wash in 0.02 M PBS, pH 7.4, 5 min; (b) immersion in 50 mM glycine in 0.02 M PBS, pH 7.4, 10 min; (c) incubation in a mixture of PBS and BSA (PBS-BSA buffer; 0.02 M PBS plus 1% BSA) containing 0.1% gelatin (20 min) followed by PBS-BSA plus 10% normal goat serum (NGS) (30 min) – (this step is crucial to block non-specific Ab binding sites); (d) incubation with primary Ab (1 h); (e) blocking with PBS-BSA plus NGS (30 min); (f) incubation with secondary Ab (1 h); (g) washing in PBS-BSA (three times of 5 min each); (h) postfixation in 1% glutaraldehyde (10 min); (i) five washings in distilled water; (j) incubation with HQ silver enhancement solution in a dark room according to the manufacturer's instructions (Nanoprobes) (10 min). This step enables a nucleation of silver ions around gold particles. These ions precipitate as silver metal and the particles grow in size facilitating observation under TEM; (k) three washings in distilled water; (l) immersion in freshly prepared 5% sodium thiosulfate (5 min); (m) postfixation with 1% osmium tetroxide in distilled water (10 min); (n) staining with 2% uranyl acetate in distilled water (5 min); (o) embedding in Eponate (Eponate 12 Resin; Ted Pella); (p) after polymerization at 60°C for 16 h, embedding was performed by inverting eponate-filled plastic capsules over the slide-attached tissue sections; and (q) separation of eponate blocks from glass slides by brief immersion in liquid nitrogen. Thin sections were cut using a diamond knife on an ultramicrotome (Leica). Sections were mounted on uncoated 200-mesh copper grids (Ted Pella) before staining with lead citrate and viewed with a transmission electron microscope (CM 10; Philips) at 60 kV. Two controls were performed: (1) primary Ab was replaced by an irrelevant Ab, and (2) primary Ab was omitted. Electron micrographs were randomly taken at different magnifications to study the entire cell profile and subcellular features.

TEM Quantitative Analysis of Eosinophils

For quantitative studies of secretory granules, electron micrographs randomly taken from eosinophils infiltrated into infected livers were evaluated after conventional preparation for TEM. A total of 148 electron micrographs showing the entire cell profile and nucleus were analyzed to determine the total number of secretory granules per cell section. Moreover, different magnifications from the same cell were taken to identify ultrastructural changes indicative of PMD, classical exocytosis and/or cytolysis. A total of 2,868 secretory granules were counted, and the numbers of intact, emptying and fused granules were established per cell section. Intact granules were observed as membrane-bound organelles full of contents without evident ultrastructural changes. Emptying granules, that is, undergoing losses of their contents, were indicative of the PMD process,

and were identified as enlarged granules with lucent areas in their cores, matrices or both and/or disassembled contents in the absence of granule fusions (20, 31). Granules fused with each other and/or with the plasma membrane were indicative of classical exocytosis (32). The process of cytolysis was recognized by partial or total loss of the plasma membrane integrity and/or extracellular deposition of intact granules (31). For controls, tissue eosinophils randomly distributed in the small and large intestine from uninfected animals were also analyzed by TEM.

Additionally, the total number of specific granules positive for MBP-1 was quantitated in electron micrographs obtained from the liver after ultrastructural immunolabeling for this protein. These analyses were done in clear cross-cell sections (total of 9 cells, $n = 218$ granules) exhibiting the entire eosinophil cell profile, intact plasma membranes and nuclei as previously performed for single-cell analyses at high resolution of immunogold-labeled eosinophils (32). All quantitative studies were done using the *Image J* software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Finally, the total number of round large, cytoplasmic vesicles was evaluated per cell section. A total of 755 vesicles was enumerated in 19 randomly taken electron micrographs showing the entire cell profile and nucleus from both infected and uninfected tissue eosinophils.

Statistical Analyses

ANOVA followed by Turkey multiple comparisons test, or Kruskal-Wallis test was performed using GraphPad Prism version 7.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California, www.graphpad.com). Significance was $P < 0.05$.

RESULTS

The Liver Pathology Induced by *S. mansoni*

Schistosomiasis mansoni is characterized by a robust egg-induced granulomatous inflammation in the liver [reviewed in (33)]. Granulomas are formed around the eggs that are lodged in the presinusoidal capillary venules of this organ; and hepatomegaly, secondary to granulomatous inflammation, occurs early in the evolution of this disease (33). In the mouse model used in the present work, well-characterized granulomas associated with hepatomegaly were clearly observed (Supplementary Figure 1). While the body weights of the infected animals did not show significant difference when compared to the controls (42.7 ± 1.3 g and 40 ± 0.8 g for the infected and control groups respectively, mean \pm SEM, $n = 6$ animals/group), the livers were significantly increased (4.3 ± 0.2 g vs. 1.5 ± 0.05 g for infected and control groups respectively, mean \pm SEM, $n = 6$ animals/group, $P < 0.0001$).

To study liver histopathology in more detail, we used a histological approach that combines optimal fixation and processing with a plastic resin (glycolmethacrylate) embedding, which provides better tissue resolution than conventional paraffin embedding (28) with optimal visualization of inflammatory processes including granulomas (27). Sections obtained from glycolmethacrylate-embedded liver fragments

were then analyzed by whole slide imaging (WSI), which enables scanning and imaging of entire histological slides (Figure 1A). The resulting digital images have high resolution and offer access to all areas on the slide, thus allowing reliable assessment of the number, evolutionary types, frequency and areas of granulomas (19).

By applying WSI, we found three main types of granulomas: pre-granulomatous exudative (PE); necrotic-exudative (NE) and exudative-productive (EP) (Figures 1B–D), as previously demonstrated by our group for this experimental model (19). In the PE stage (Figure 1B), inflammatory cells are

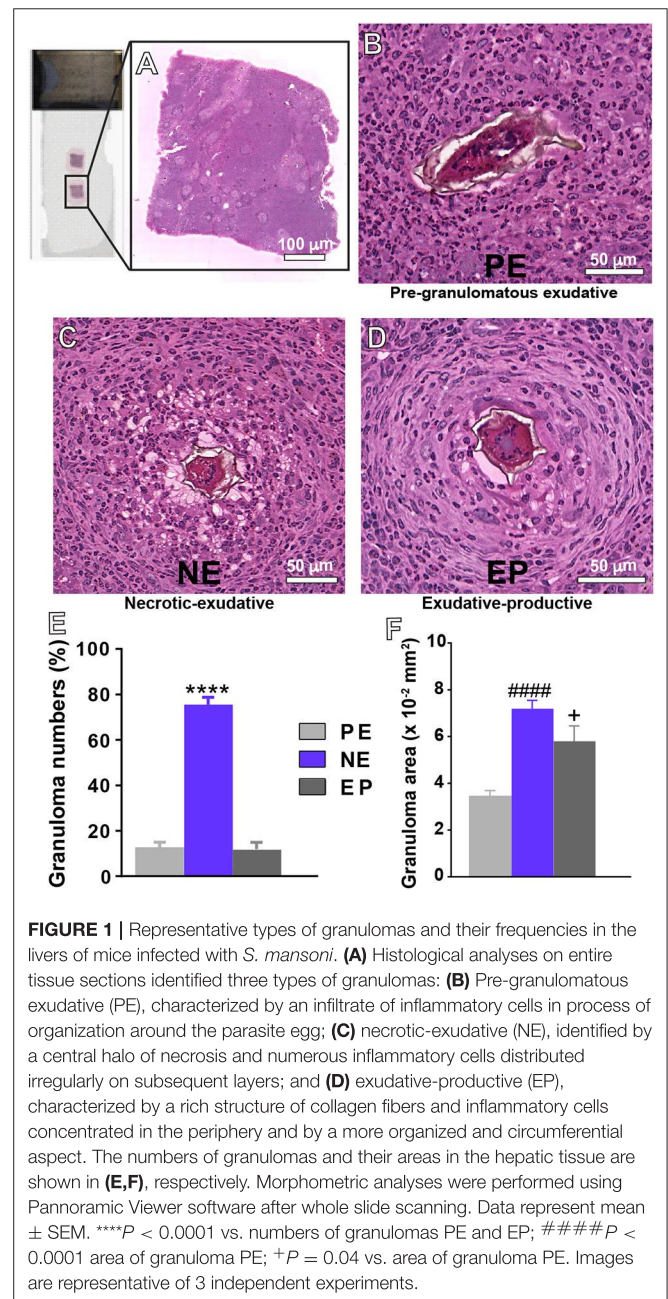


FIGURE 1 | Representative types of granulomas and their frequencies in the livers of mice infected with *S. mansoni*. (A) Histological analyses on entire tissue sections identified three types of granulomas: (B) Pre-granulomatous exudative (PE), characterized by an infiltrate of inflammatory cells in process of organization around the parasite egg; (C) necrotic-exudative (NE), identified by a central halo of necrosis and numerous inflammatory cells distributed irregularly on subsequent layers; and (D) exudative-productive (EP), characterized by a rich structure of collagen fibers and inflammatory cells concentrated in the periphery and by a more organized and circumferential aspect. The numbers of granulomas and their areas in the hepatic tissue are shown in (E,F), respectively. Morphometric analyses were performed using Panoramic Viewer software after whole slide scanning. Data represent mean \pm SEM. **** $P < 0.0001$ vs. numbers of granulomas PE and EP; ##### $P < 0.0001$ area of granuloma PE; + $P = 0.04$ vs. area of granuloma PE. Images are representative of 3 independent experiments.

in process of organization around the egg while the other stages (Figures 1C,D) are associated with a more organized circumferential structure in which clusters of inflammatory cells such as eosinophils, lymphocytes and macrophages are intermixed with collagen fibers (34, 35). After recording 203 granulomas, we detected that the NE type, identified by a central halo of necrosis and numerous inflammatory cells distributed irregularly on subsequent layers, was the most frequent type of granuloma (Figures 1C–E). Because the sizes of granulomas greatly vary in target tissues, we next measured the tissue area taken by granulomas in the liver. The NE type showed the largest area (Figure 1F). The area occupied by the EP type was significantly higher than that occupied by the PE type (Figure 1F), although these two types of granulomas did not differ in terms of numbers (Figure 1E). Next, the percentage of granuloma area in relation to the entire tissue was obtained. We found that the percentage of hepatic tissue taken by inflammatory granulomatous processes represented $7.7 \pm 1.3\%$ (mean \pm SEM, $n = 6$ animals) of the liver while the number of parasite eggs in this organ was $2.08 \pm 0.5/\text{mm}^2$ of tissue. Additionally, we measured the area taken by inflammatory infiltrates (non-granulomatous), which represented $35.1 \pm 1.1\%$ (mean \pm SEM, $n = 6$ animals). In conjunction, the inflammatory response (non-granulomatous and granulomatous) occupied $42.8 \pm 2.4\%$ (mean \pm SEM) of the hepatic tissue, thus denoting a remarkably compromised liver.

Accordingly, significant increases in the levels of the serum enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) reflecting altered liver function (7, 36, 37) were detected in response to the infection (Table 1). We observed approximately 3- and 4-fold elevations, respectively, in response to the acute *S. mansoni* infection (Table 1).

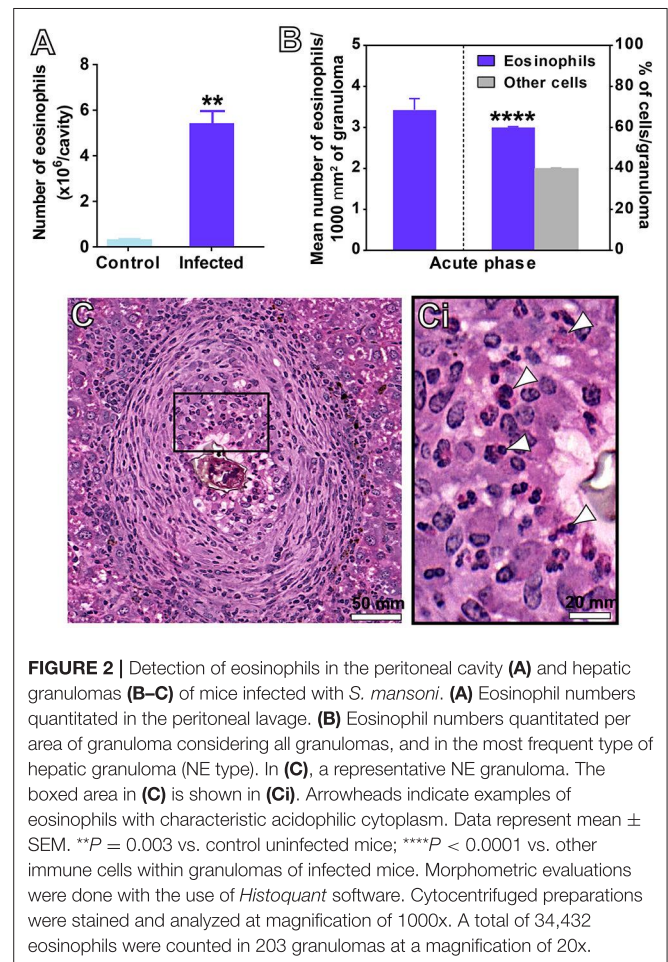
Detection of Th2 Cytokines in Response to *S. mansoni* Infection

The continuous antigenic stimulation resulting from the trapped eggs in target organs leads to a pronounced inflammatory response at 6–8 weeks post-infection associated with a dominant CD4+ T cell-dependent immune response [reviewed in (38)]. The interleukins (IL) IL-4, IL-10, and IL-13 are dominant cytokines driving this reaction (38). In fact, by analyzing these cytokines in the plasma, we detected significantly higher

levels of them in infected compared to uninfected animals (Supplementary Figure 2).

Eosinophils Are Actively Recruited and Represent the Main Inflammatory Cell Population Within *S. mansoni* Infection-Induced Granulomas

During the acute schistosomiasis, increases in the numbers of eosinophils can be detected in the circulation, peritoneal cavity and target tissues (4, 5, 7, 10). Our quantitative analyses of eosinophils in the PL showed that the number of these cells was 15 times higher in the peritoneal fluid collected from infected animals than in controls (4.8 ± 1.1 for infected vs. 0.3 ± 0.02 for control, mean \pm SEM, $P = 0.003$, $n = 4$ animals/group) (Figure 2A). Eosinophils were also quantitated within NE granulomas, which, as noted here (Figure 1E) and before (19), represent the most frequent stage of granuloma found in this model of acute schistosomiasis. A total of 34,432 eosinophils was counted. By applying two morphometric evaluations in whole sections, that is, assessment of the eosinophil numbers per granuloma area and proportion of eosinophils per granuloma, we found that these cells corresponded to $60.1 \pm 0.3\%$



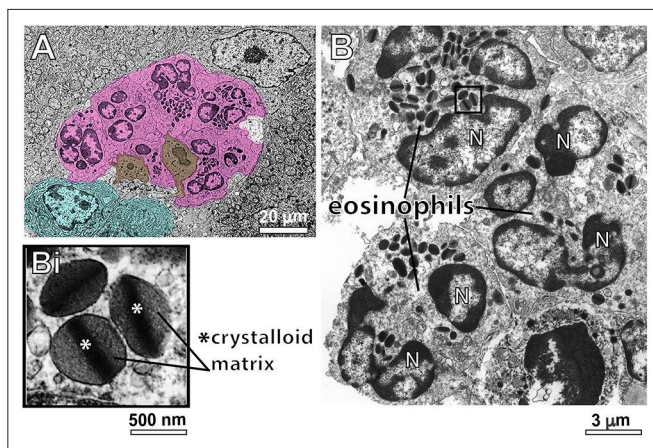


FIGURE 3 | Conventional TEM shows infiltrating eosinophils in the liver of *S. mansoni*-infected mice. **(A)** A representative electron micrograph of the hepatic tissue in low magnification shows a group of eosinophils (colored in pink) in close contact with each other and with neutrophils (brown) and plasma cells (blue). In **(B)**, eosinophils exhibit their typical ultrastructure with a lobulated nucleus (N) and a robust cytoplasmic population of specific granules with a unique morphology—an internal well-defined electron-dense crystalline core and an outer electron-lucent matrix (seen in higher magnification in **Bi**).

(mean \pm SEM) of all immune cells within NE granulomas (**Figures 2B,C,Ci**).

Infiltrating Eosinophils Degranulate Through Different Degranulation Patterns

Having confirmed the striking number of eosinophils in hepatic granulomas with WSI, we investigated morphological features of these cells at high resolution. For this, liver fragments were processed for conventional TEM. First, eosinophils with typical ultrastructure, that is, exhibiting a polylobed nucleus and a prominent population of cytoplasmic secretory granules with an electron dense crystalloid core surrounded by an electron lucent matrix were easily identified as isolated cells or forming tight groups of cells (**Figure 3**). Eosinophils were in contact with each other and/or with cells such as neutrophils, plasma cells and lymphocytes (**Figure 3**).

Second, we sought to identify and characterize ultrastructural signs underlying degranulation (as described in material and methods) in infiltrated eosinophils. We found that while 19.1% of eosinophils were intact (**Figure 4A**), most eosinophils (66.4%) exhibited predominantly features of PMD (**Figures 4Ai–iii,B**). Characteristic features of cytolysis (**Figure 4C**) were observed in 13.0% of eosinophils (**Figure 4B**) and just 1.5% (**Figure 4B**) showed classical or compound exocytosis (**Figure 5**).

Third, we wondered if the numbers of intact and emptying secretory granules in infected eosinophils would differ from values shown by resting cells. Because eosinophils are not normally found in the liver, we analyzed the ultrastructure of eosinophils distributed in the intestinal tract of uninfected animals (**Supplementary Figure 3**). A total of 131 cells showing intact plasma membranes, that is, not undergoing cytolysis, was evaluated. Our quantitative analysis revealed a significant

increase of emptying, non-fused granules (49.5 ± 1.9 /cell section for infected vs. 32.3 ± 6.9 /cell section for control, mean \pm SEM, $P = 0.003$, $n = 2868$ secretory granules) and a significant reduction of intact granules in response to the acute schistosomiasis ($P = 0.001$) (**Figure 4D**), thus confirming the ability of these cells to secrete mostly through PMD.

PMD Is the Predominant Secretory Process of MBP-1 Release by *S. mansoni*-Activated Eosinophils

MBP-1 is the main cationic protein stored as preformed pool within eosinophil secretory granules and considered a hallmark for these cells. Because MBP-1 has been associated with the immunopathogenesis of various helminthic diseases, including schistosomiasis *mansoni* [reviewed in (39)], we next investigated the structural mechanism of MBP-1 release by applying pre-embedding immunogold EM. This methodology has proved to be very effective in localizing immune mediators in human eosinophils and other cells from the immune system (30, 32, 40).

We observed a clear labeling for MBP-1 in the entire population of inflammatory eosinophils while other infiltrated immune cells were completely negative (**Figure 6**). Infected cells, for which the primary antibody was replaced by an irrelevant antibody or omitted (**Supplementary Figure 4**), were negative. MBP-1 positivity was mostly associated with eosinophil secretory granules (**Figure 7**). By using software for quantitating granules, we detected that the majority of them ($84.0 \pm 2.5\%$, mean \pm S.E.M, $n = 9$ cells) in each eosinophil section was labeled for MBP-1 and that most of these labeled granules were undergoing PMD (**Figure 7A**), that is, showing disassembled cores, enlargement, matrix coarsening and/or reduced electron-density (**Figures 7B–E**).

Identification of a Vesicular Trafficking of MBP-1 Within *S. mansoni*-Triggered Eosinophils in the Liver

When human eosinophils are activated by inflammatory stimuli, there is a significant increase of cytoplasmic large vesicles termed Eosinophil Sombrero Vesicles (EoSvs), which are involved in the transport of granule-derived products (15, 31, 41). The existence of EoSvs-like vesicles in mouse eosinophils is unknown. By performing conventional TEM in the liver from infected animals, we noticed, for the first time, the presence of numerous round, reasonably large (~ 80 – 150 nm) vesicles in the cytoplasm of inflammatory eosinophils (highlighted in pink in **Figures 4A, 8B**). By enumerating a total of 755 vesicles in infected and uninfected tissue eosinophils, we found a significant increase of these vesicles in infected compared to uninfected cells (68.1 ± 7.3 /cell section for infected vs. 14.2 ± 3.5 /cell section for control, mean \pm SEM, $P < 0.0001$, $n = 19$ cells) (**Figure 8A**).

Next, we analyzed the population of these vesicles after ultrastructural immunolabeling for MBP-1. Our single-cell analyses at high resolution were revealing in demonstrating MBP-1-positive vesicles distributed in the cytoplasm and attached to or surrounding the surface of emptying granules

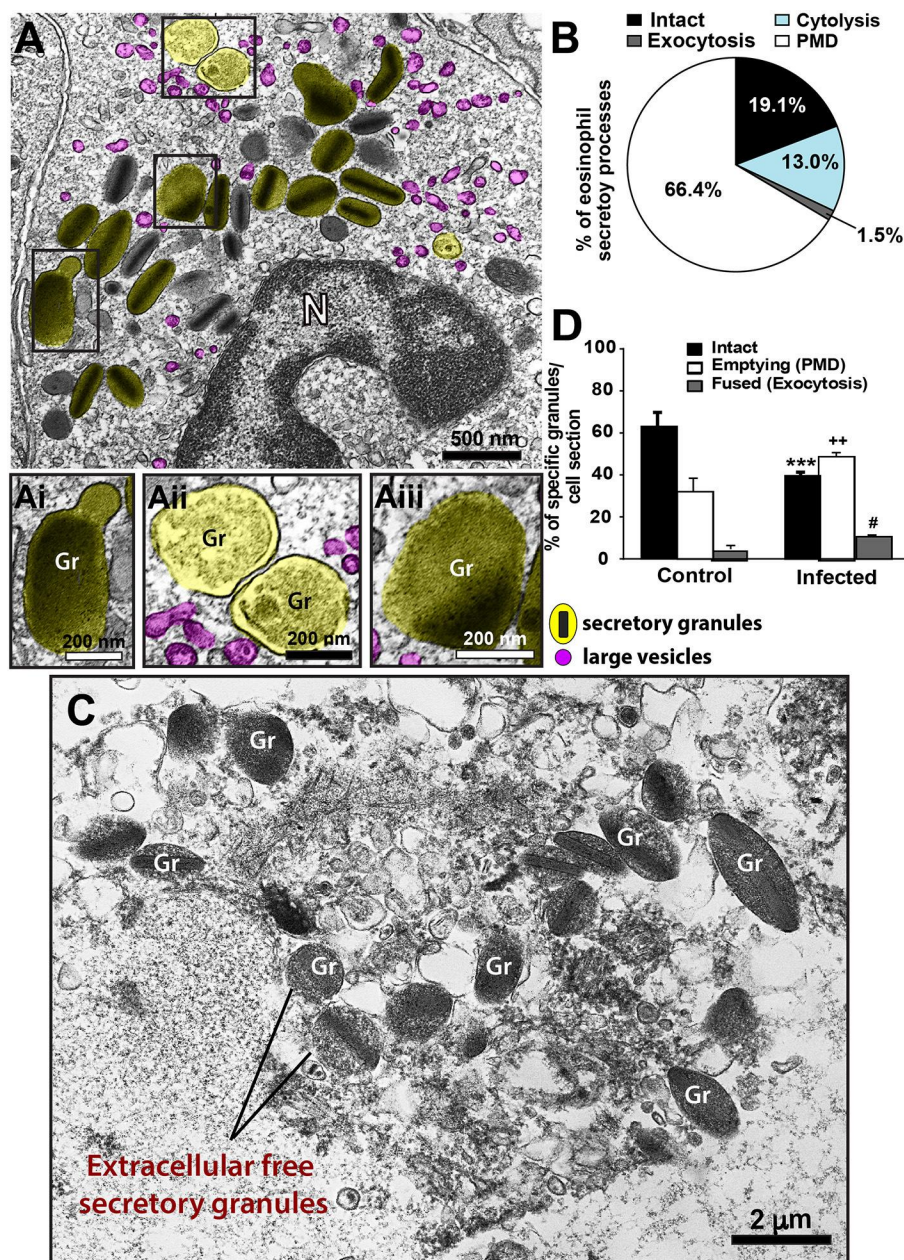
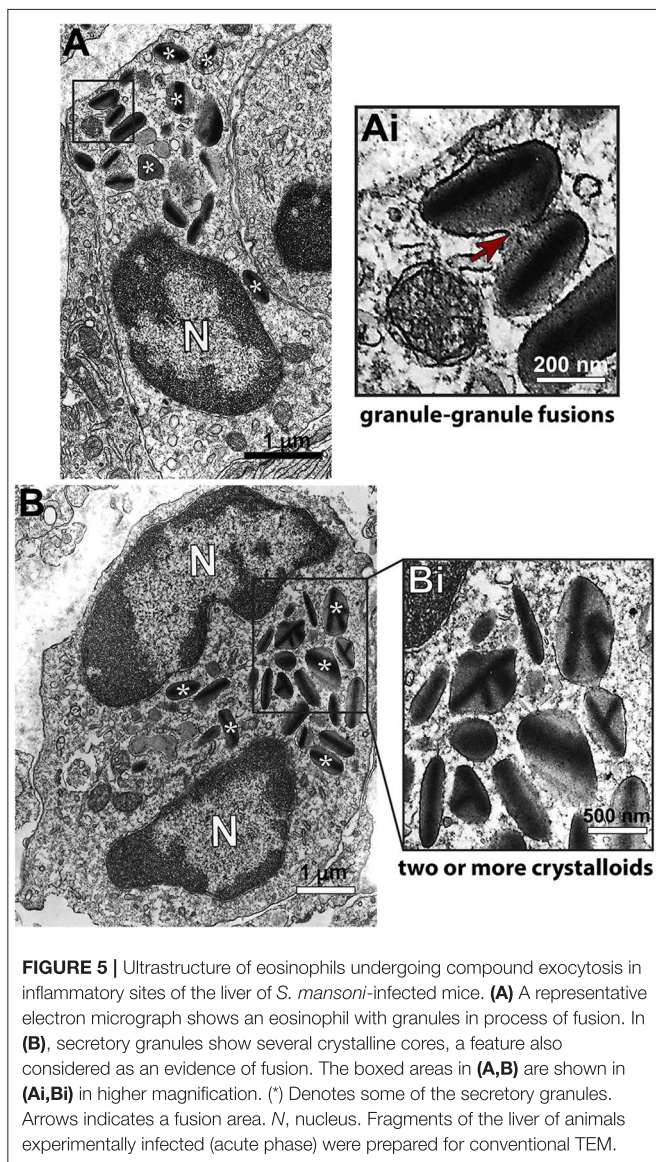


FIGURE 4 | Ultrastructural features of eosinophil degranulation in inflammatory sites of the liver of *S. mansoni*-infected mice. **(A)** A representative eosinophil shows PMD, characterized by the presence of emptying, non-fused secretory granules. The population of eosinophil specific granules is colored in yellow while large vesicles are highlighted in pink. The boxed areas in **(A)** are shown in **(Ai–Aiii)** in higher magnification. **(Ai–Aiii)** Note structural signs of PMD such as granule enlargement and disarrangement of granule cores and matrices. **(B)** Quantification of the secretory patterns shown *in vivo* by hepatic eosinophils in response to the acute infection. In **(C)**, an eosinophil in advanced stage of cytolysis shows extracellular free secretory granules (Gr). **(D)** Most eosinophil secretory granules undergo structural changes indicative of PMD compared to that in uninfected mice. Data represent mean \pm SEM. One hundred eight electron micrographs showing the entire cell profile and nucleus were analyzed and 2868 secretory granules were counted. *** $P = 0.001$ vs. intact granules, ** $P = 0.003$ vs. emptying granules, # $P = 0.03$ vs. fused granules of uninfected mice. Gr, secretory granule. N, nucleus. Fragments of the liver of animals experimentally infected (acute phase) and intestines (for uninfected controls) were prepared for conventional TEM.

(Figure 8B). Computational analyses showed that ~20% of all cytoplasmic vesicles from the same size range were carrying MBP-1 **(Figure 8Bi)**. Altogether, our findings consistently demonstrate the occurrence of a secretory process based on

vesicular trafficking as a main mechanism for MBP-1 release in response to the acute schistosomiasis in mice. Accordingly, MBP-1 immunolabeling was also detected in the extracellular matrix **(Figure 8B, arrows)**. Interestingly, the deposits of MBP-1 were

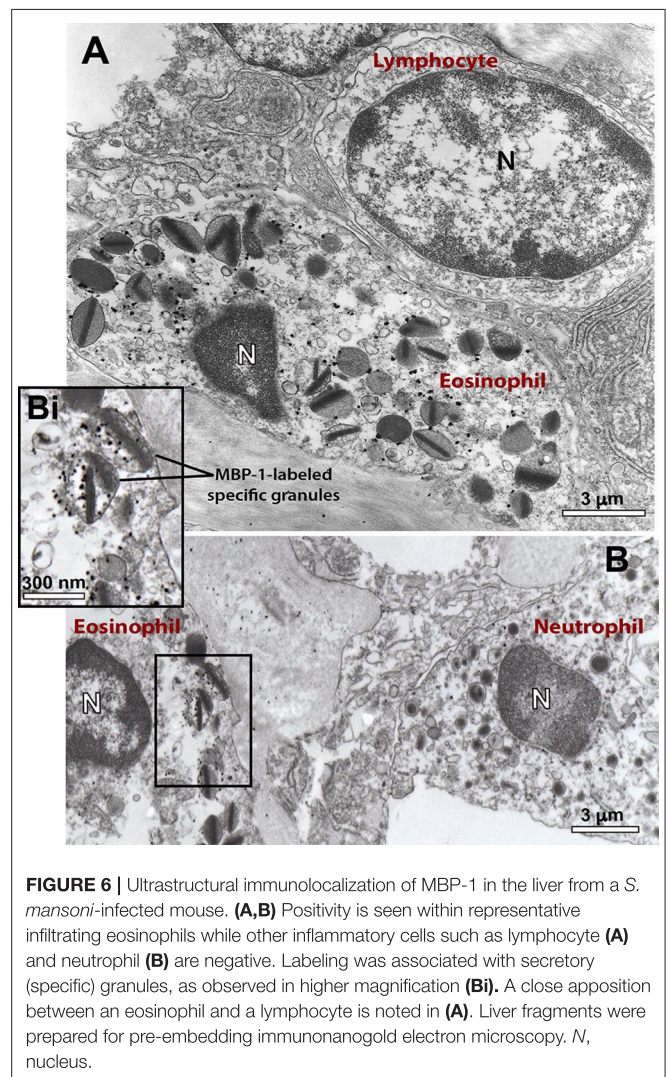


not massive, but dispersed in the extracellular matrix (**Figure 8B**, arrows).

DISCUSSION

Expansion and recruitment of eosinophils is a central feature of the host response to the *S. mansoni* infection. How these cells release their products in target organs of this disease is unknown. Our study describes marked eosinophil degranulation *in vivo* in the liver triggered by schistosomiasis *mansoni* in mice and identifies, for the first time, PMD as the main mode of eosinophil secretion. We also provide direct evidence that MBP-1 is transported in the cytoplasm of infiltrating eosinophils and released through a vesicular trafficking in response to the acute infection.

In this work, we explore the ability of inflammatory eosinophils to degranulate in a murine model of schistosomiasis



mansoni. Acute schistosomiasis is characterized by a systemic hypersensitivity reaction against the migrating schistosomula and eggs (42). During the first 3–5 weeks, the host is exposed to migrating immature parasites while at weeks 5–6, the parasite matures and begins to produce eggs, which is associated with a Th2 response (reviewed in 39). All classical parameters confirmatory of the acute infection, such as hepatomegaly, high density of eggs in a target organ; well-characterized granulomatous inflammation around deposited eggs; alteration of liver enzymes, increased levels of Th2 cytokines and extensive eosinophil infiltration were consistently demonstrated in this model. Moreover, our detailed analysis of granuloma formation in infected mice corroborates the prevalence of the NE granuloma, which is greatly enriched in inflammatory cells and it is also the major granuloma type found during the acute schistosomiasis *mansoni* in humans (42).

Acute schistosomiasis in mice led to substantial degranulation of infiltrating eosinophils in the liver through PMD. PMD is a frequent secretory process of human eosinophils observed *in vivo* in varied human inflammatory and other disorders

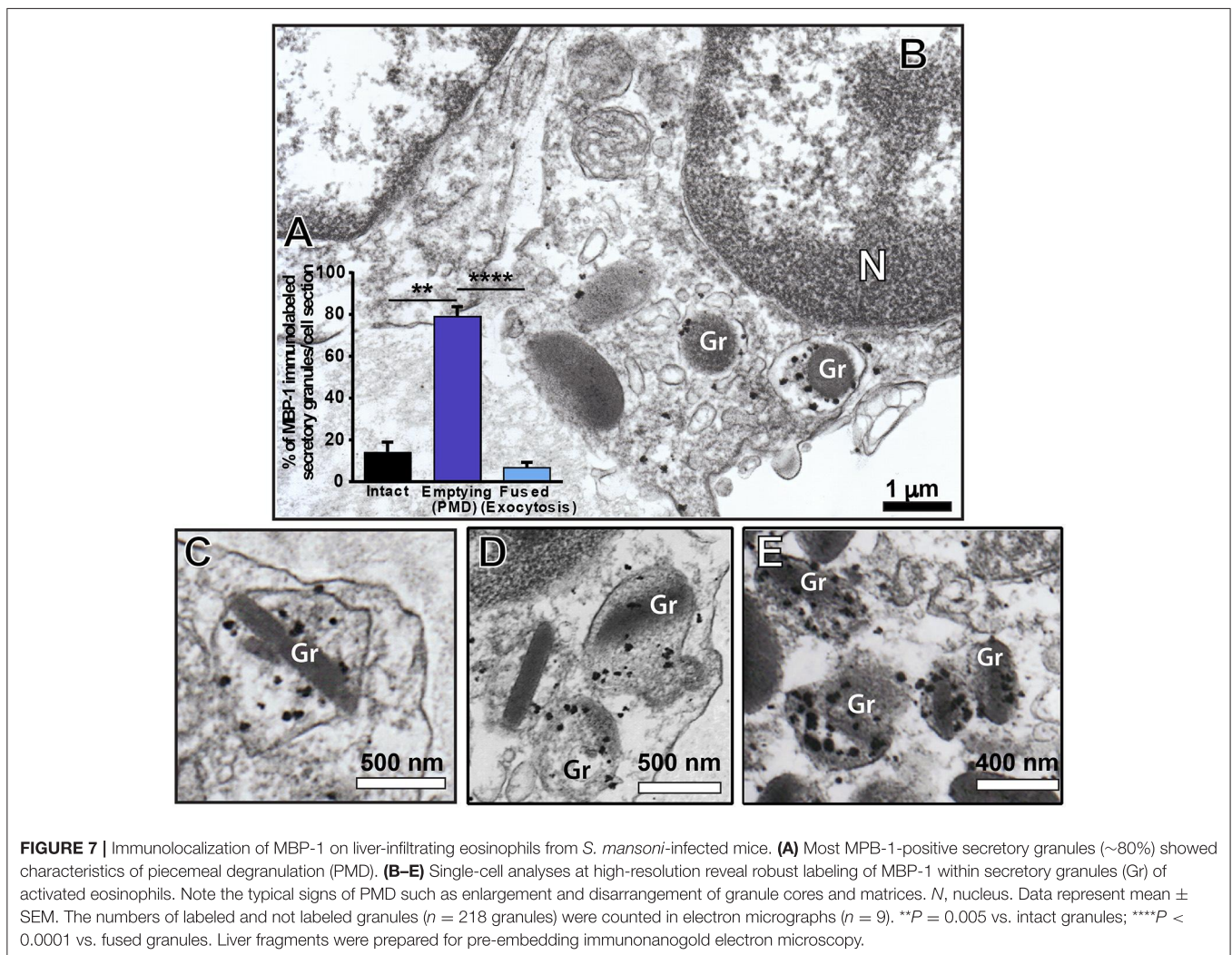


FIGURE 7 | Immunolocalization of MBP-1 on liver-infiltrating eosinophils from *S. mansoni*-infected mice. **(A)** Most MBP-1-positive secretory granules (~80%) showed characteristics of piecemeal degranulation (PMD). **(B–E)** Single-cell analyses at high-resolution reveal robust labeling of MBP-1 within secretory granules (Gr) of activated eosinophils. Note the typical signs of PMD such as enlargement and disarrangement of granule cores and matrices. *N*, nucleus. Data represent mean \pm SEM. The numbers of labeled and not labeled granules ($n = 218$ granules) were counted in electron micrographs ($n = 9$). $**P = 0.005$ vs. intact granules; $****P < 0.0001$ vs. fused granules. Liver fragments were prepared for pre-embedding immunonanogold electron microscopy.

such as asthma (43); nasal polyposis (44); allergic rhinitis (44, 45); ulcerative colitis (44); Crohn's disease (44); atopic dermatitis (46); functional dyspepsia (47), gastric carcinoma (48); shigellosis (49) and cholera (50), but this is the first time that it is clearly recognized during the acute infection with *S. mansoni*. In this mode of secretion, eosinophils release granule contents, but retain their granule containers [reviewed in (51)]. PMD is identified mainly by structural disarrangement of the granules cores and matrices within granules delimited by intact membranes, but other subtle signs such as granule matrix coarsening and granule enlargement can additionally indicate PMD occurrence in mouse eosinophils (52) (**Figure 4**). In fact, there have been controversies that mouse eosinophils are not able to “degranulate” in some mouse models of allergic airway inflammation (24, 53, 54). In our work using detailed ultrastructural analyses to examine mouse eosinophils in a “classic” host-response model of murine schistosomiasis, we provide definitive findings for the *in vivo* capacity of mouse eosinophils, like human eosinophils, to undergo PMD.

To compare the extent of the secretory processes shown by infiltrating eosinophils in the liver of infected animals, we used resident intestinal eosinophils as controls since eosinophils are not resident cells of the liver. Hepatic inflammatory eosinophils had significantly higher numbers of secretory granules with PMD features compared to the eosinophil population of the intestinal tract (**Figure 4D**). However, it should be highlighted that this population showed considerable PMD (**Figure 4D**), which can be explained by the fact that intestinal eosinophils are phenotypically distinct from blood eosinophils and exhibit an activated phenotype based on their cytokine expression and degranulation status (55). In fact, eosinophils that reside in the gastrointestinal tract are required for the homeostatic intestinal immune responses, including IgA production through secretion of cytokines (56, 57) and constitutively express antigen presentation markers (58). Thus, intestinal eosinophils are more active and consequently with a higher activity of secretion.

In addition to PMD, our quantitative EM analyses revealed that 13% of liver-infiltrating eosinophils exhibited different degrees of cytolysis (**Figures 4B,C**), which deposits cell-free

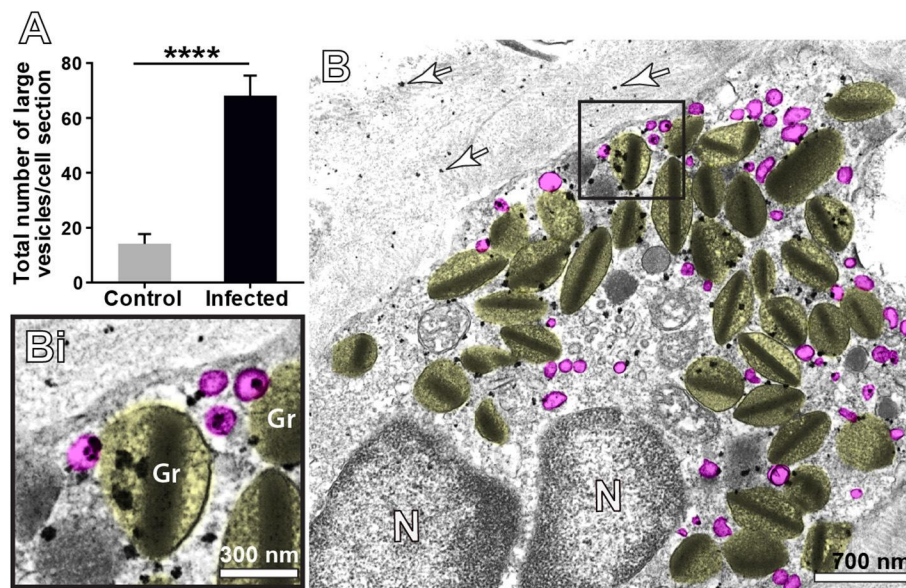


FIGURE 8 | Vesicular trafficking of MBP-1 in the cytoplasm of inflammatory eosinophils in the liver of *S. mansoni*-infected mice. **(A)** The acute infection induces a prominent formation of cytoplasmic, large (80–150 nm) round vesicles (highlighted in pink in **B**. Note in **Bi**) that immunolabeling for MBP-1 is clearly associated with several of these vesicles in addition to secretory granules (Gr, highlighted in yellow). Arrows indicate extracellular deposition of MBP-1. Data represent mean \pm SEM. The numbers of vesicles ($n = 755$) were counted in a total of 19 electron micrographs, after conventional processing for TEM. **** $P < 0.0001$ vs. control group. For immunolabeling of MBP-1, liver fragments were prepared for pre-embedding immunogold electron microscopy.

secretory granules in the surrounding tissue [reviewed in (31)]. Cytolysis is a physiologically important mode of eosinophil secretion because the specific granules remain active even after cell death (31). Cytolysis is defined ultrastructurally by physical rupture of the cell and is morphologically distinct from both apoptosis and necrosis (46, 59). More recently, another form of cell death—pyroptosis—, which is mediated by caspase-1 (60), was identified in hepatic eosinophils isolated from a mouse model of *S. mansoni* infection (61). Because cell disruption is also a feature of pyroptotic cells (60), we cannot rule out that part of the cytolytic eosinophil population found by our EM analyses may be undergoing pyroptosis.

Formation of large secretory vesicles (EoSVs) that arise from eosinophil specific granules and contain granule proteins and cytokines is another indication of PMD and has been documented in human eosinophils [reviewed in (51, 62)] but heretofore not in mouse eosinophils. Moreover, amplified formation of EoSVs is considered a morphological feature of activated human eosinophils (15, 41). For example, eosinophils stimulated with CCL11/eotaxin-1 or tumor necrosis factor alpha (TNF- α) show increased numbers of cytoplasmic EoSVs (40) as well as do naturally activated eosinophils from patients with hypereosinophilic syndrome when compared to normal donors (63). Our present quantitative EM studies demonstrate, for the first time, that *S. mansoni*-triggered mouse eosinophils have an augmented population of large (80–150 nm) round vesicles, analogous to EoSVs found in human eosinophils (15). As with human EoSVs, these large vesicles from mouse eosinophils are seen distributed in the cytoplasm and clearly associated with

secretory granules, but these vesicles do not exhibit the same typical tubular morphology of human EoSVs (**Figures 4A,Aii, 8B,Bi**).

MBP has been extensively detected extracellularly in inflammatory sites of eosinophil-associated human diseases (64–68), including schistosomiasis mansoni (69). Here, we also observed extracellular localization of MBP in the liver elicited by the acute *S. mansoni* infection in mice (**Figure 8B**). MBP extracellular deposition comes from degranulating eosinophils, which can release their products via, as noted, cytolysis, classical/compound exocytosis and/or PMD. Because PMD was detected in most infiltrated eosinophils (66.4%) and relies on vesicular transport of granule products, we were expecting to find granule-mobilized MBP in association with cytoplasmic vesicles. Indeed, our single-cell analyses using very small gold particles (1.4 nm) for membrane microdomains access enabled labeling of MBP-1 on intracellular vesicles of eosinophils in the livers of *S. mansoni*-infected animals (**Figures 7, 8**). Therefore, it is clear that part of the cytoplasmic vesicle population is trafficking MBP-1 within inflammatory eosinophils for extracellular release. In fact, deposits of MBP-1 were dispersed in the extracellular matrix (**Figure 8**), which is compatible with gradual vesicle-mediated release of this protein. Vesicular secretion of MBP was also described in human activated eosinophils *in vitro* (63), but this is the first report on this secretory pathway in mice and in association with a parasitic disease *in vivo*.

What is the meaning of PMD and the release of MBP-1 through PMD during acute schistosomiasis? Eosinophils produce an array of granule-stored immune mediators that

are known to be key regulators in diverse physiological and pathological processes (3) and are a source of both pro-inflammatory and immune regulatory cytokines (70). In contrast to classical and compound exocytosis, whereby whole granule contents are extruded *in toto*, PMD enables extracellular delivery of specific mediators in small amounts (“piece-by-piece”) through a vesicular trafficking. Gradual release of immune mediators, including MBP-1, by inflammatory eosinophils may be involved with immunoregulatory functions of these cells during schistosomiasis. MBP, in addition to be classically associated with parasite killing, has been implicated with the regulation of cytokine responses during helminth infections (71).

In fact, there is increasing evidence that eosinophils exert a role of immunoregulation in both adaptive and innate immunity including in the context of parasitic diseases [reviewed in (12, 72)]. It is now well documented that eosinophils have key immunoregulatory functions as professional antigen-presenting cells and as modulators of CD4(+) T cell, dendritic cell, B cell, mast cell, neutrophil, and basophil functions(72). Of interest, our comprehensive ultrastructural analyses revealed direct contact of eosinophils undergoing PMD with other immune cells such as neutrophils (Figure 3A), plasma cells (Figure 3A), and lymphocytes (Figure 6A). It is documented that eosinophils are able to modulate the functions of other leukocytes [reviewed in (2)] and our findings showing eosinophil interactions with other immune cells may represent such capacity.

Our results shed light on the ill-understood *in vivo* roles of eosinophils, underlined by their degranulation ability, in target organs of the *S. mansoni* infection. The current view of eosinophils as effector cells, able to kill parasites through massive discharge of granule products, is beginning to change. However, the meaning of eosinophil cell-to-cell interactions and if PMD represent a subtle immunomodulatory contribution of eosinophils in both experimental and human schistosomes awaits further investigation.

Lastly, it is important to highlight the emerging role of eosinophils in tissue homeostasis and repair (3). Sustained PMD-mediated secretion of infiltrating eosinophils during acute schistosomiasis might additionally be associated with the competence of these cells to promote a tissue repair response. Particularly in the liver, the functions of eosinophils and type-2 cytokine signaling were studied in the context of experimental tissue regeneration (73). It was demonstrated that type 2 immune responses related to eosinophils and IL-4/IL-13, via IL-4R α in hepatocytes, stimulated liver regeneration after experimental injury (73). Thus, it is clear that eosinophils have unanticipated functions *in vivo* and their roles during eosinophilic diseases such as schistosomiasis have been more difficult to establish.

REFERENCES

1. Rothenberg ME. Eosinophils in the new millennium. *J Allerg Clin Immunol.* (2007) 119:1321–2. doi: 10.1016/j.jaci.2007.03.035
2. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol.* (2013) 13:9–22. doi: 10.1038/nri3341

In summary, our findings identify PMD as the main secretory process of inflammatory eosinophils in the liver of *S. mansoni*-infected mice, with detection of granule-derived vesicular transport of MBP-1 in response to the infection. Vesicle-mediated release of MBP-1 and other immune mediators, such as cytokines stored within eosinophil granules may be associated with an immunoregulatory function of eosinophils, but the definitive roles of these cells in the parasitic immune response remains to be recognized. Our present work also expands our understanding of the ultrastructural aspects of mouse eosinophils, their ability to degranulate and the basic mechanisms that underlie the functioning of these cells in this experimental model.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RM provided the study supervision and prepared the manuscript. FD, KA, KM, and TS performed experiments. FD prepared the figures. GSCR, FD, VC, and GOLR performed cytokine analyses. RM, PW, HC-G, and FR provided critical editing of the manuscript. All authors contributed in part to writing and editing the manuscript and approved the final version.

FUNDING

This work was supported by the National Institute of Health (NIH) grants R37AI020241 to PW, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) grants 477475/2013-2, 469995/2014-9 and 434914/2018-5 to RM and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil, grant CBB-APQ-03647-16) to RM.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the Centro de Microscopia (UFMG, Brazil) and Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI, ICB, UFMG) for the use of their facilities and the Laboratory of Schistosomiasis (Department of Parasitology, UFMG, Brazil) for infection of the animals. We are grateful to the late Dr. James Lee (Mayo Clinic, Scottsdale, Arizona) for providing the MBP-1 antibody.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.03019/full#supplementary-material>

3. Weller PF, Spencer LA. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol.* (2017) 17:746–60. doi: 10.1038/nri.2017.95
4. Mahmoud AA, Warren KS, Graham RC Jr. Antieosinophil serum and the kinetics of eosinophilia in Schistosomiasis mansoni. *J Exp Med.* (1975) 142:560–74. doi: 10.1084/jem.142.3.560

5. Borojevic R, Stocker S, Grimaud JA. Hepatic eosinophil granulocytopenia in murine experimental Schistosomiasis mansoni. *Br J Exp Pathol.* (1981) 62:480–9.
6. Lenzi HL, Pacheco RG, Pelajo-Machado M, Panasco MS, Romanha WS, Lenzi JA. Immunological system and *Schistosoma mansoni*: co-evolutionary immunobiology. What is the eosinophil role in parasite-host relationship? *Mem Inst Oswaldo Cruz* (1997) 92 (Suppl. 2):19–32. doi: 10.1590/S0074-02761997000800005
7. Swartz JM, Dyer KD, Cheever AW, Ramalingam T, Pesnick L, Domachowski JB, et al. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood* (2006) 108:2420–7. doi: 10.1182/blood-2006-04-015933
8. WHO. *Schistosomiasis. Progress Report 2001–2011 and Strategic Plan 2012–2020.* World Health Organization (2011).
9. Hams E, Aviello G, Fallon PG. The schistosoma granuloma: friend or foe? *Front Immunol* (2013) 4:89. doi: 10.3389/fimmu.2013.00089
10. Lenzi HL, Lenzi JA, Sobral AC. Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. *Braz J Med Biol Res.* (1987) 20:433–5.
11. Meeusen EN, Balic A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol Today* (2000) 16:95–101. doi: 10.1016/S0169-4758(99)01607-5
12. Cadman ET, Lawrence RA. Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection? *Parasite Immunol.* (2010) 32:1–19. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01147.x
13. Huang L, Appleton JA. Eosinophils in Helminth Infection: defenders and dupes. *Trends Parasitol.* (2016) 32:798–807. doi: 10.1016/j.pt.2016.05.004
14. Tweyongyere R, Namanya H, Naniima P, Cose S, Tukahebwa EM, Elliott AM, et al. Human eosinophils modulate peripheral blood mononuclear cell response to *Schistosoma mansoni* adult worm antigen *in vitro*. *Parasite Immunol.* (2016) 38:516–22. doi: 10.1111/pim.12336
15. Melo RCN, Weller PF. Contemporary understanding of the secretory granules in human eosinophils. *J Leukoc Biol.* (2018) 104:85–93. doi: 10.1002/JLB.3MR1217-476R
16. Glauert AM, Butterworth AE, Sturrock RF, Houba V. The mechanism of antibody-dependent, eosinophil-mediated damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni in vitro*: a study by phase-contrast and electron microscopy. *J Cell Sci.* (1978) 34:173–92.
17. Capron M, Torpier G, Capron A. *In vitro* killing of *S. mansoni* schistosomula by eosinophils from infected rats: role of cytophilic antibodies. *J Immunol.* (1979) 123:2220–30.
18. Glauert AM, Butterworth AE. Morphological evidence for the ability of eosinophils to damage antibody-coated schistosomula. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* (1977) 71:392–5. doi: 10.1016/0035-9203(77)90036-0
19. Amaral KB, Silva TP, Dias FF, Malta KK, Rosa FM, Costa-Neto SF, et al. Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. *PLoS ONE* (2017) 12:e0184696. doi: 10.1371/journal.pone.0184696
20. Melo RCN, Dvorak AM, Weller PF. Contributions of electron microscopy to understand secretion of immune mediators by human eosinophils. *Microsc Microanal.* (2010) 16:653–60. doi: 10.1017/S1431927610093864
21. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. *Puerto Rico J Pub Health Trop Med.* (1934) 9:283–9.
22. Burkholder T, Foltz C, Karlsson E, Linton CG, Smith JM. Health evaluation of experimental laboratory mice. *Curr Protoc Mouse Biol.* (2012) 2:145–65. doi: 10.1002/9780470942390.mo110217
23. Hawk CT, Leary SL, Morris TH. *Formulary for Laboratory Animals.* Ames, IA: Blackwell (2005).
24. Denzler KL, Farmer SC, Crosby JR, Borchers M, Cieslewicz G, Larson KA, et al. Eosinophil major basic protein-1 does not contribute to allergen-induced airway pathologies in mouse models of asthma. *J Immunol.* (2000) 165:5509–17. doi: 10.4049/jimmunol.165.10.5509
25. Marietta E, Black K, Camilleri M, Krause P, Rogers RS III, David C, et al. A new model for dermatitis herpetiformis that uses HLA-DQ8 transgenic NOD mice. *J Clin Invest.* (2004) 114:1090–7. doi: 10.1172/JCI200421055
26. Ochkur SI, Jacobsen EA, Protheroe CA, Biechele TL, Pero RS, McGarry MP, et al. Coexpression of IL-5 and eotaxin-2 in mice creates an eosinophil-dependent model of respiratory inflammation with characteristics of severe asthma. *J Immunol.* (2007) 178:7879–89. doi: 10.4049/jimmunol.178.12.7879
27. Amaral KB, Silva TP, Malta KK, Carmo LA, Dias FF, Almeida MR, et al. Natural *Schistosoma mansoni* infection in the wild reservoir *Nectomys squamipes* leads to excessive lipid droplet accumulation in hepatocytes in the absence of liver functional impairment. *PLoS ONE* (2016) 11:e0166979. doi: 10.1371/journal.pone.0166979
28. Fabrino DL, Leon LL, Genestra M, Parreira GG, Melo RCN. Rat models to investigate host macrophage defense against *Trypanosoma cruzi*. *J Innate Immunol.* (2011) 3:71–82. doi: 10.1159/000320641
29. Melo RCN. Depletion of immune effector cells induces myocardial damage in the acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: ultrastructural study in rats. *Tissue Cell* (1999) 31:281–90. doi: 10.1054/tice.1999.0040
30. Melo RCN, Morgan E, Monahan-Earley R, Dvorak AM, Weller PF. Pre-embedding immunogold labeling to optimize protein localization at subcellular compartments and membrane microdomains of leukocytes. *Nat Protoc.* (2014) 9:2382–94. doi: 10.1038/nprot.2014.163
31. Spencer LA, Bonjour K, Melo RCN, Weller PF. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. *Front Immunol.* (2014) 5:496. doi: 10.3389/fimmu.2014.00496
32. Carmo LAS, Bonjour K, Ueki S, Neves JS, Liu L, Spencer LA, et al. CD63 is tightly associated with intracellular, secretory events chaperoning piecemeal degranulation and compound exocytosis in human eosinophils. *J Leukoc Biol.* (2016) 100:391–401. doi: 10.1189/jlb.3A1015-480R
33. Chuah C, Jones MK, Burke ML, McManus DP, Gobert GN. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends Parasitol.* (2014) 30:141–50. doi: 10.1016/j.pt.2013.12.009
34. Lenzi HL, Kimmel E, Schechtman H, Pelajo-Machado M, Romanha WS, Pacheco RG, et al. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (1998) 93 (Suppl. 1):141–51. doi: 10.1590/S0074-02761998000700020
35. Lenzi HL, Kimmel E, Schechtman H, Pelajo-Machado M, Vale BS, Panasco MS, et al. Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. *Braz J Med Biol Res.* (1999) 32:639–43. doi: 10.1590/S0100-879X1999000500018
36. Barakat R, Abou El-Ela NE, Sharaf S, El Sagheer O, Selim S, Tallima H, et al. Efficacy and safety of arachidonic acid for treatment of school-age children in *Schistosoma mansoni* high-endemicity regions. *Am J Trop Med Hyg.* (2015) 92:797–804. doi: 10.4269/ajtmh.14-0675
37. Yu YR, Ni XQ, Huang J, Zhu YH, Qi YF. Taurine drinking ameliorates hepatic granuloma and fibrosis in mice infected with *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* (2016) 6:35–43. doi: 10.1016/j.ijpddr.2016.01.003
38. Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol.* (2002) 2:499–511. doi: 10.1038/nri843
39. Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem.* (2014) 289:17406–15. doi: 10.1074/jbc.R113.546218
40. Carmo LAS, Bonjour K, Spencer L, Weller PF, Melo RCN. Single-cell analyses of human eosinophils at high resolution to understand compartmentalization and vesicular trafficking of interferon-gamma. *Front Immunol.* (2018) 9:1542. doi: 10.3389/fimmu.2018.01542
41. Melo RCN, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF. Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. *J Leukoc Biol.* (2008) 83:229–36. doi: 10.1189/jlb.0707503
42. Lambertucci JR. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2010) 105:422–35. doi: 10.1590/S0074-02762010000400012
43. Karawajczyk M, Seveus L, Garcia R, Bjornsson E, Peterson CG, Roomans GM, et al. Piecemeal degranulation of peripheral blood eosinophils: a study of allergic subjects during and out of the pollen season. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2000) 23:521–9. doi: 10.1165/ajrcmb.23.4.4025
44. Erjefalt JS, Greiff L, Andersson M, Adelroth E, Jeffery PK, Persson CG. Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. *Thorax* (2001) 56:341–4. doi: 10.1136/thorax.56.5.341
45. Ahlstrom-Emanuelsson CA, Greiff L, Andersson M, Persson CG, Erjefalt JS. Eosinophil degranulation status in allergic rhinitis: observations before

- and during seasonal allergen exposure. *Eur Respir J.* (2004) 24:750–7. doi: 10.1183/09031936.04.00133603
46. Cheng JF, Ott NL, Peterson EA, George TJ, Huke MJ, Gleich GJ, et al. Dermal eosinophils in atopic dermatitis undergo cytolytic degeneration. *J Allergy Clin Immunol.* (1997) 99:683–92. doi: 10.1016/S0091-6749(97)70031-9
 47. Vanheel H, Vicario M, Boesmans W, Vanuytsel T, Salvo-Romero E, Tack J, et al. Activation of eosinophils and mast cells in functional dyspepsia: an ultrastructural evaluation. *Sci Rep.* (2018) 8:5383. doi: 10.1038/s41598-018-23620-y
 48. Caruso RA, Jeni A, Fedele F, Zuccala V, Riccardo M, Parisi E, et al. Degranulation patterns of eosinophils in advanced gastric carcinoma: an electron microscopic study. *Ultrastruct Pathol.* (2005) 29:29–36. doi: 10.1080/019131290882303
 49. Raqib R, Moly PK, Sarker P, Qadri F, Alam NH, Mathan M, et al. Persistence of mucosal mast cells and eosinophils in *Shigella*-infected children. *Infect Immun.* (2003) 71:2684–92. doi: 10.1128/IAI.71.5.2684-2692.2003
 50. Qadri F, Bhuiyan TR, Dutta KK, Raqib R, Alam MS, Alam NH, et al. Acute dehydrating disease caused by *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 induce increases in innate cells and inflammatory mediators at the mucosal surface of the gut. *Gut* (2004) 53:62–9. doi: 10.1136/gut.53.1.62
 51. Melo RCN, Weller PF. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histol Histopathol.* (2010) 25:1341–54. doi: 10.14670/HH-25.1341
 52. Shamri R, Melo RCN, Young KM, Bivas-Benita M, Xenakis JJ, Spencer LA, et al. CCL11 elicits secretion of RNases from mouse eosinophils and their cell-free granules. *FASEB J.* (2012) 26:2084–93. doi: 10.1096/fj.11-200246
 53. Stelts D, Egan RW, Falcone A, Garlisi CG, Gleich GJ, Kreutner W, et al. Eosinophils retain their granule major basic protein in a murine model of allergic pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (1998) 18:463–70. doi: 10.1165/ajrcmb.18.4.2957
 54. Malm-Erfjelt M, Persson CG, Erfjelt JS. Degranulation status of airway tissue eosinophils in mouse models of allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2001) 24:352–9. doi: 10.1165/ajrcmb.24.3.4357
 55. Straumann A, Kristl J, Conus S, Vassina E, Spichtin HP, Beglinger C, et al. Cytokine expression in healthy and inflamed mucosa: probing the role of eosinophils in the digestive tract. *Inflamm Bowel Dis.* (2005) 11:720–6. doi: 10.1097/01.MIB.0000172557.39767.53
 56. Jung Y, Wen T, Mingler MK, Caldwell JM, Wang YH, Chaplin DD, et al. IL-1beta in eosinophil-mediated small intestinal homeostasis and IgA production. *Mucosal Immunol.* (2015) 8:930–42. doi: 10.1038/mi.2014.123
 57. Berek C. Eosinophils: important players in humoral immunity. *Clin Exp Immunol.* (2016) 183:57–64. doi: 10.1111/cei.12695
 58. Xenakis JJ, Howard ED, Smith KM, Olbrich CL, Huang Y, Anketell D, et al. Resident intestinal eosinophils constitutively express antigen presentation markers and include two phenotypically distinct subsets of eosinophils. *Immunology* (2018) 154:298–308. doi: 10.1111/imm.12885
 59. Ueki S, Melo RCN, Ghiran I, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. *Blood* (2013) 121:2074–83. doi: 10.1182/blood-2012-05-432088
 60. Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immun Rev.* (2011) 243:206–14. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01044.x
 61. Palacios-Macapagal D, Connor J, Mustelin T, Ramalingam TR, Wynn TA, Davidson TS. Cutting edge: eosinophils undergo caspase-1-mediated pyroptosis in response to necrotic liver cells. *J Immunol.* (2017) 199:847–53. doi: 10.4049/jimmunol.1601162
 62. Melo RCN, Weller PF. Vesicular trafficking of immune mediators in human eosinophils revealed by immunoelectron microscopy. *Exp Cell Res.* (2016) 347:385–90. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.08.016
 63. Melo RCN, Spencer LA, Perez SA, Neves JS, Bafford SP, Morgan ES, et al. Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein. *Lab Invest.* (2009) 89:769–81. doi: 10.1038/labinvest.2009.40
 64. Khan DA, Cody DT II, George TJ, Gleich GJ, Leiferman KM. Allergic fungal sinusitis: an immunohistologic analysis. *J Allergy Clin Immunol.* (2000) 106:1096–101. doi: 10.1067/mai.2000.110929
 65. Messmer EM, May CA, Stefani FH, Welge-Luessen U, Kampik A. Toxic eosinophil granule protein deposition in corneal ulcerations and scars associated with atopic keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol.* (2002) 134:816–21. doi: 10.1016/S0002-9394(02)01726-9
 66. Ponikau JU, Sherris DA, Kephart GM, Kern EB, Congdon DJ, Adolphson CR, et al. Striking deposition of toxic eosinophil major basic protein in mucus: implications for chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* (2005) 116:362–9. doi: 10.1016/j.jaci.2005.03.049
 67. Mueller S, Aigner T, Neureiter D, Stolte M. Eosinophil infiltration and degranulation in oesophageal mucosa from adult patients with eosinophilic oesophagitis: a retrospective and comparative study on pathological biopsy. *J Clin Pathol.* (2006) 59:1175–80. doi: 10.1136/jcp.2005.031922
 68. Peterson KA, Cobell WJ, Clayton FC, Krishnamurthy C, Ying J, Pease LFIII, Saffari H, et al. Extracellular eosinophil granule protein deposition in ringed esophagus with sparse eosinophils. *Dig Dis Sci.* (2015) 60:2646–53. doi: 10.1007/s10620-015-3665-1
 69. Kephart GM, Andrade ZA, Gleich GJ. Localization of eosinophil major basic protein onto eggs of *Schistosoma mansoni* in human pathologic tissue. *Am J Pathol.* (1988) 133:389–96.
 70. Spencer LA, Szela CT, Perez SA, Kirchhoffer CL, Neves JS, Radke AL, et al. Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *J Leukoc Biol.* (2009) 85:117–23. doi: 10.1189/jlb.0108058
 71. Specht S, Saefelt M, Arndt M, Endl E, Dubben B, Lee NA, et al. Lack of eosinophil peroxidase or major basic protein impairs defense against murine filarial infection. *Infect Immun.* (2006) 74:5236–43. doi: 10.1128/IAI.00329-06
 72. Akuthota P, Wang HB, Spencer LA, Weller PF. Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. *Clin Exp Allergy* (2008) 38:1254–63. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.03037.x
 73. Goh YP, Henderson NC, Heredia JE, Red Eagle A, Odegaard JI, Lehwald N, et al. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2013) 110:9914–9. doi: 10.1073/pnas.1304046110
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Dias, Amaral, Malta, Silva, Rodrigues, Rosa, Rodrigues, Costa, Chiarini-Garcia, Weller and Melo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.