

## POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DA FOSFATIDILSERINA NA INDUÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS

**Roberto J.<sup>1</sup>, Mota L.M.A.<sup>2</sup>, Arnholdt A.C.V.<sup>3</sup>, DaMatta R.A.<sup>4</sup>,**

<sup>1</sup>UENF/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, joarobertoneto@hotmail.com.br

<sup>2</sup>UENF/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, lauramirandamota@yahoo.com.br

<sup>3</sup>UENF/ Laboratório de Biologia do Reconhecer, arnholdt@uenf.br

<sup>4</sup>UENF/ Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, renato@uenf.br

**Resumo** - Corpos lipídicos são organelas ricas em lipídeo, estão presentes em vários tipos celulares e são moduladas por sinalização específica. A interação de macrófago com células apoptóticas ou parasitos induz corpos lipídicos. Como em células apoptóticas e alguns parasitos ocorre a exposição de fosfatidilserina, é possível que este fosfolipídeo esteja envolvido na indução de corpos lipídicos. Para testar essa hipótese, utilizou-se *Crithidia deanei*, um tripanosomatídeo não patogênico ao humano sadio que tem sido utilizado como modelo em biologia celular. Foi estabelecida a fase exponencial e estacionária da curva de crescimento da *C. deanei* e não observado alteração morfológica ao longo do cultivo. Interação desse protozoário cultivado por 3 e 8 dias com macrófagos foi realizada e corpos lipídicos quantificados. Foi verificado que *C. deanei* de 8 dias induz mais corpos lipídicos. Ademais, a *C. deanei* cultivada por mais tempo, expõem fosfatidilserina. Portanto, é possível que a exposição de fosfatidilserina seja responsável pela indução de corpos lipídicos.

**Palavras-chave:** Corpos Lipídicos, macrófagos, fosfatidilserina, *Crithidia deanei*.

**Área do Conhecimento:** Parasitologia

### Introdução

Corpos lipídicos (CL) são organelas ricas em lipídios, presentes em vários tipos celulares (BOZZA et al., 2007; WALTERMANN et al., 2005). Durante muitos anos foi atribuído ao CL a função de armazenamento; todavia, estudos recentes têm mostrado outras funções (BOZZA et al., 2009; D'AVILA et al., 2008a).

Havendo sinalização específica, o número de CL é alterado (BOZZA et al., 2007). Interação *in vitro* de *Mycobacterium smegmatis* ou *Trypanosoma cruzi* com macrófagos induz aumento de CL (D'AVILA et al., 2008a; MELO et al., 2006). No entanto, não se sabe os mecanismos moleculares que induzem CL. A interação de macrófagos com neutrófilos apoptóticos também induz CL

(D'AVILA et al., 2008b). Uma característica de células apoptóticas é a exposição na membrana plasmática da fosfatidilserina (PS) (FADOK et al., 1992). O *T. cruzi* também expõem PS que pode estar envolvida nos mecanismos de escape desse parasita (DAMATTA et al., 2007). A *Crithidia deanei* é um tripanosomatídeo modelo não patogênico para humanos sadios (DE AZEVEDO-MARTINS et al., 2007). Pretende-se verificar se a interação desse protozoário com macrófagos induz CL e se a PS está envolvida neste processo.

### Metodologia

Macrófagos foram obtidos de lavado peritoneal de camundongos Suíços adultos utilizando Hank's. O lavado foi semeado sobre

lamínulas redondas em placa de 24 poços. Após 1 h de adesão, as células foram lavadas e foi adicionado *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) contendo 2% de soro fetal bovino (SFB). Alguns macrófagos, logo após adesão, interagiram com  $1 \times 10^6$  protozoários por poço durante 2 h, foram lavados, cultivados por 24 h em DMEM contendo 2% de SFB e o número de corpos lipídicos foi avaliado. Como controle macrófagos foram cultivados somente com SFB.

*C. deanei* foi obtida a partir de culturas axênicas (MATTEOLI et al., 2009); o protozoário foi cultivado em 4,5 ml de meio Warren's contendo 10% de SFB. O crescimento da *C. deanei* foi acompanhado durante 21 dias para determinar a curva de crescimento. A cada dia, foram retiradas alíquotas de 100µl de três tubos independentes no qual as células cresciam. Parte da alíquota (10 µl) foi diluída em líquido de contagem e o número de células avaliado em câmara de Neubauer. Com a outra parte da alíquota, foi realizado um esfregaço em lâmina, fixado com metanol, corado com Giemsa e observado em microscópio ótico. O protozoário foi centrifugado (2100g, 10 min, 25°C) no terceiro e oitavo dia de cultivo, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em DMEM (MATTEOLI et al., 2009). O parasito foi contado em câmara de Neubauer.

Com o passar dos dias, protozoários em cultivo axênico morrem (por necrose) perdendo o batimento flagelar e decantam. Para obtenção de células necróticas e testes de indução de CL, *C. deanei* foi cultivada durante 15 dias, retiraram-se ou foram retiradas separadamente células da parte superior do tubo (vivas) e o sedimento do fundo do tubo (mortas). Interação com macrófagos foi realizada com células vivas e necróticas em paralelo.

*C. deanei* cultivada em diferentes dias foi centrifugada (700g, por 5 min). Após a centrifugação foram ressuspenso em tampão

anexina (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4), quantificadas na câmara de Neubauer e ajustadas para 200 ul contendo  $1 \times 10^6$  parasitos. Os parasitos foram divididos em 4 grupos: **a-** parasitos puros, **b-** parasitos com iodeto de propídeo (PI-1µg/ml), **c-** parasitos com anexina V – alexa 488 nm (5 µg/ml), e **d-** parasitos com PI e anexina V – alexa 488 nm. Tampão anexina foi adicionado até completar 500µl em todos os grupos. Um controle positivo da marcação de anexina – V foi realizado com parasitas mortos. Esses parasitas foram mortos com tratamento em PBS contendo 1% triton-x 100 e 3% de formaldeído recém preparado. Os grupos de células foram lidos no citômetro de fluxo (Excalibur BD).

## Resultados

A curva de crescimento de *C. deanei* foi estudada para determinar a fase de crescimento exponencial e estacionário, pois a exposição de PS varia conforme essa fase como já descrito para *Leishmania sp.* (WANDERLEY et al., 2006; ZANDBERGEN et al., 2006). A curva de crescimento teve aumento exponencial até o 4º dia, seguido de redução acentuada no 6º dia, manutenção do número de células até o 10º dia com redução gradual até o 21º (Figura 1). Não houve alteração morfológica dos protozoários ao longo do cultivo (dados não mostrados). O 3º e o 8º dia de cultivo foram escolhidos para a interação com macrófagos e verificação de indução de CL.

O cultivo com SFB foi usado como controle negativo, pois induz pouco CL (figura 2A e, 2D). As figuras 2B e 2E indicam que a *C. deanei* cultivada por três dias induz mais CL no macrófago em relação ao cultivado com SFB. Ademais, a interação com *C. deanei* cultivada por oito dias induz mais CL do que as cultivadas por três dias (Figura 2C e 2F). Em cultivo axênico o número de células

necróticas aumenta com o tempo, portanto, essas células poderiam estar induzindo os CL nas interações realizadas com *C. deanei* no 8º dia de cultivo. No entanto, a interação de macrófagos com *C. deanei* necrótica não foi capaz de induzir CL (Figura 3).

Por fim, analisou-se a exposição de PS na *C. deanei* cultivada ao longo da curva de crescimento. Verificou-se que pequena população de células expõe PS na membrana após o 3º dia de cultivo e que esta população tende a aumentar com o tempo de cultivo (Figura 4).

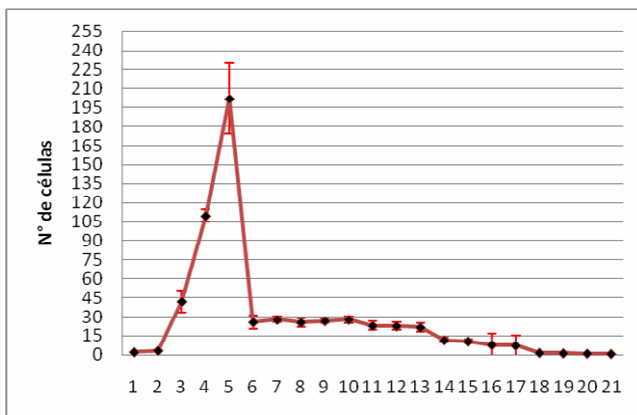


Figura 1. Curva de crescimento de *Crithidia deanei*. O crescimento foi acompanhado pela contagem diária durante 21 dias. Os números apresentados no eixo Y são multiplicados por 10<sup>6</sup> e os do eixo X se referem aos dias. Experimento representativo de dois em triplicata.

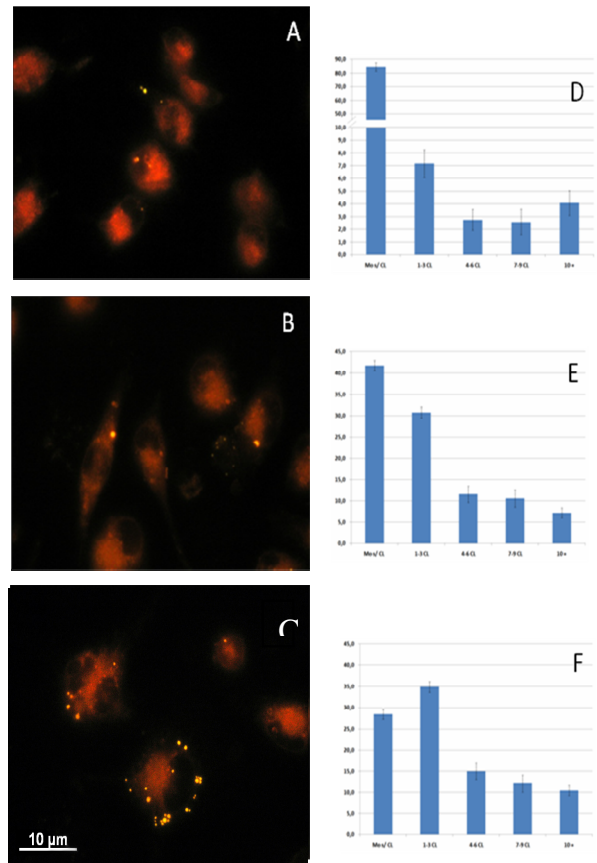


Figura 2. Macrófagos peritoneais de camundongo (Mo) cultivados por 24 h em DMEM. (A), suplementado com 2% SFB. (B), suplementado com 2% SFB e interação com *Crithidia deanei* 3 dias de cultivo. (C), suplementado com 2% SFB e interação com *C. deanei* 8 dias de cultivo. Experimento realizado 4 vezes em triplicata.

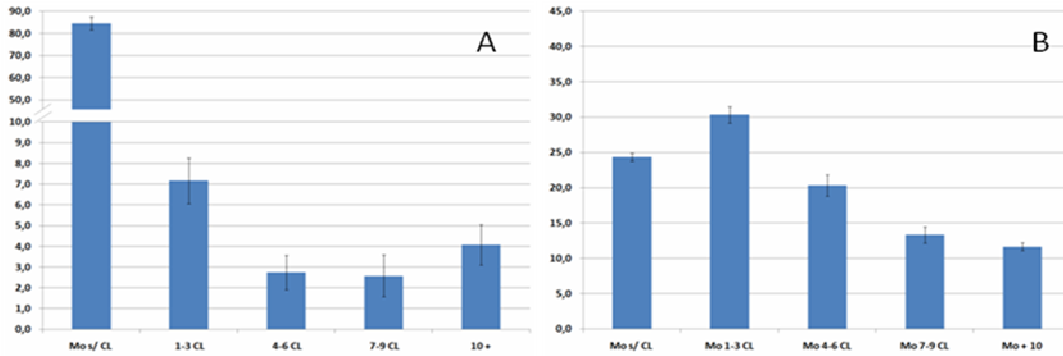


Figura 3. Quantificação de corpos lipídicos de macrófagos peritoneais de camundongo (Mo) cultivados por 24 h em DMEM. (A) Suplementado com 2% de SFB e interação com *Crithidia deanei* necróticas e (B) suplementado com 2% de SFB e interação com *C. deanei* vivas. Experimento realizado 3 vezes em triplicata.

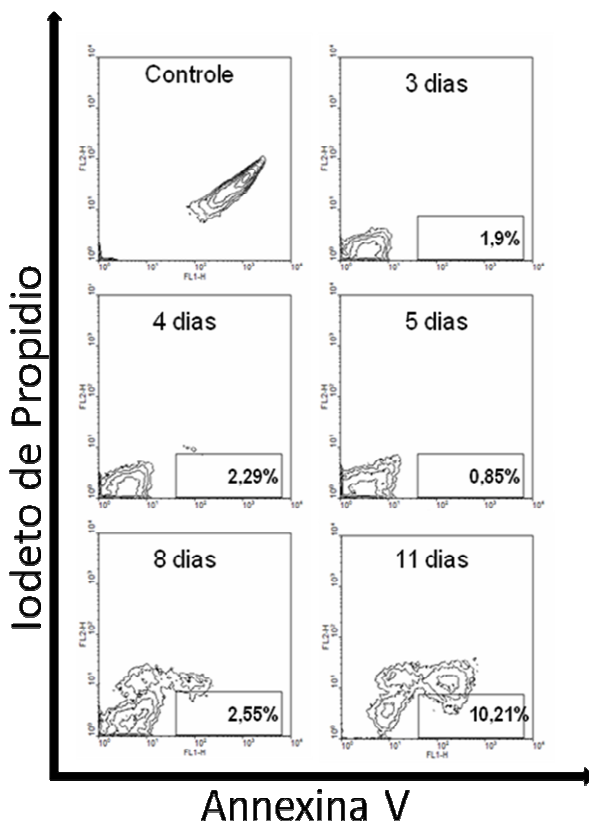


Figura 4. Exposição de fosfatidilserina por citometria de fluxo de *Crithidia deanei* ao longo do cultivo axênico. A análise foi realizada com *C. deanei* cultivadas por 3, 4, 5, 8 e 11 dias, como controle foi utilizada *C. deanei* morta. PI: Iodeto de propideo. SS: Side Scatter. FS: Forward Scatter. Experimento realizado duas vezes.

## Discussão

A hipótese desse trabalho é de que a exposição de PS por protozoários está envolvida na geração de CL em macrófagos. Para responder essa pergunta, estudou-se a *C. deanei* um tripanosomatídeo modelo (DE AZEVEDO-MARTINS et al., 2007). O primeiro passo foi determinar a fase exponencial e estacionária do crescimento axênico desse protozoário, pois é na fase estacionária que ocorre exposição de PS na *Leishmania* sp (WANDERLEY et al., 2006; ZANDBERGEN et al., 2006). O estudo da curva de crescimento de *C. deanei* determinou a fase exponencial e estacionária. Curiosamente não houve alteração da morfologia das células, fato comum em tripanosomatídeos em cultivo axênico (FARIA-E-SILVA et al., 1996).

Confirmou-se que o cultivo com SFB induz minimamente CL (MOTA, 2009). Ademais, a interação de macrófagos com *C. deanei* na fase exponencial induziu mais CL no macrófago do que os cultivado somente com SFB. A indução de CL nos macrófagos foi maior quando foi realizada interação com *C. deanei* na fase estacionária. Esses resultados demonstram que a interação com *C. deanei* foi capaz de gerar CL nos macrófagos e que o tempo de cultivo



desse protozoário aumentou a indução de CL. Esse último resultado favorece a hipótese do trabalho. No entanto, em cultivo axênico o número de células necróticas aumenta com o tempo, portanto, essas células poderiam estar induzindo os CL. Contudo, verificou-se que a interação com *C. deanei* necrótica não induziu CL nos macrófagos. Portanto, a possibilidade de *C. deanei* da fase estacionária induzir mais CL nos macrófagos pode ser devido a exposição de PS. Sabendo que células apoptóticas expõem PS na membrana plasmática (FADOK et al., 1992) e que também induzem CL (D'AVILA et al., 2008b), investigou-se a exposição desse fosfolípido em *C. deanei*. A análise por citometria de fluxo revelou que com o tempo de cultivo parte da população de *C. deanei* expõem PS na membrana. Portanto, é possível que esta população seja responsável pela indução de CL justamente devido a exposição de PS. Novos experimentos estão sendo realizados para confirmar tal hipótese.

### Conclusão

Mesmo não sendo patogênico para indivíduos sadios *C. deanei* induz CL em macrófagos. Esse protozoário cultivado por 8 dias induziu mais CL quando comparado ao de 3 dias. Células necróticas que normalmente se apresentam em culturas envelhecidas, e que poderiam induzir CL em macrófagos durante a interação com *C. deanei* de 8 dias de cultivo, não induzem esta organela. A exposição de PS na membrana plasmática de *C. deanei* aumenta com o tempo de cultivo. Esses resultados sugerem que a PS exposta na membrana de *C. deanei* pode estar envolvida na indução de CL em macrófagos.

### Referências

BOZZA PT, MAGALHÃES KG, WELLER PF. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and

functions in inflammation. **Biochim Biophys Acta.** 6: 540-5. 2009.

BOZZA PT, MELO RC, BANDEIRA-MELO C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. **Pharmacol Ther**;113, 30–49. 2007.

DAMATTA RA, SEABRA SH, DEOLINDO P, ARNHOLDT AC, MANHÃES L, GOLDENBERG S, DE SOUZA W. *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. **Microbiol Lett.** 266, 29-33. 2007.

D'AVILA H, MAYA-MONTEIRO CM, BOZZA PT. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. **I. Immuno.** 8, 1308-15. 2008

D'AVILA H, ROQUE NR, CARDOSO RM, CASTRO-FARIA-NETO HC, MELO RC, BOZZA PT. Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. **Cell Microbiol** 10, 2589-604. 2008b

DE AZEVEDO-MARTINS AC, FROSSARD ML, DE SOUZA W, EINICKER-LAMAS M, MOTTA MC. Phosphatidylcholine synthesis in *Crithidia deanei*: the influence of the endosymbiont. **Microbiol Lett.** 275:229-36. 2007

FADOK VA, VOELKER DR, CAMPBELL PA, COHEN JJ, BRATTON DL, HENSON PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J Immunol.** 148(7):2207-16. 1992

FARIA-E-SILVA PM, SOARES MJ, DE SOUZA W. Proliferative opisthomastigote forms in *Herpetomonas roitmani* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Parasitol Res.** 82:125-9. 1996

MATTEOLI FP, D'AVILA-LEVY CM, SANTOS LO, BARBOSA GM, HOLANDINO C, BRANQUINHA MH,

SANTOS AL. Roles of the endosymbiont and leishmanolysin-like molecules expressed by *Crithidia deanei* in the interaction with mammalian fibroblasts. **Exp Parasitol.** 121:246-53. 2009

MELO RC, FABRINO DL, DIAS FF, PARREIRA GG. Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. **Inflamm. Res.** 55, 342-8. 2006

MOTA LAM. Macrófagos peritoneais de camundongo cultivados com soro homólogo apresentam grande número de corpos lipídicos e ação microbicida reduzida contra *Toxoplasma gondii*. Tese de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do CBB, UENF, 2009.

VAN ZANDBERGEN G, BOLLINGER A, WENZEL A, KAMHAWI S, VOLL R, KLINGER M, MÜLLER A, HÖLSCHER C, HERRMANN M, SACKS D, SOLBACH W, LASKAY T. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 103,13837-42. 2006

WÄLTERMANN M, HINZ A, ROBENEK H, TROYER D, REICHELT R, MALKUS U, GALLA HJ, KALSCHEUER R, STÖVEKEN T, VON LANDENBERG P, STEINBÜCHEL A. Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up. **Mol Microbiol;** 55, 750–63. 2005

WANDERLEY JL, MOREIRA ME, BENJAMIN A, BONOMO AC, BARCINSKI MA. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. **J Immunol.** 176, 1834-9. 2006