



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

APARECIDA DONIZETTE MALVEZI

**EFEITO DO BLOQUEIO DE COX-1 E DE COX-2 SOBRE A  
INVASÃO DE CÉLULAS DO HOSPEDEIRO POR  
*Trypanosoma cruzi***

---

Londrina  
2014

APARECIDA DONIZETTE MALVEZI

**EFEITO DO BLOQUEIO DE COX-1 E DE COX-2 SOBRE A  
INVASÃO DE CÉLULAS DO HOSPEDEIRO POR  
*Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Phileo Pinge Filho

Londrina  
2014

**Catlogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M262e Malvezi, Aparecida Donizette.

Efeito do bloqueio de COX-1 e de COX-2 sobre a invasão de células do hospedeiro por *Trypanosoma cruzi* / Aparecida Donizetti Malvezi. – Londrina, 2014.

114 f. : il.

Orientador: Phileo Pingé Filho.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2014.

Inclui bibliografia.

1. *Trypanosoma cruzi* – Teses. 2. Prostaglandinas – Teses. 3. Macrófagos – Teses. 4. Miocárdio – Teses. 5. Patologia experimental – Teses. I. Pingé Filho, Phileo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616.937.3

APARECIDA DONIZETTE MALVEZI

**EFEITO DO BLOQUEIO DE COX-1 E DE COX-2 SOBRE A  
INVASÃO DE CÉLULAS DO HOSPEDEIRO POR *Trypanosoma*  
*Cruzi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Phileno Pinge Filho  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra Karina Alves de Toledo  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

---

Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron  
Universidade de São Paulo – USP

---

Prof. Dr. Fábio Henrique Kwasniewski  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Jr  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 17 de março de 2014.

Dedico este trabalho,  
Ao meu pai Avelino Malvezi, "*in memoriam*" meu maior incentivador.  
À minha mãe Anália Malvezi, que com toda simplicidade, sempre acreditou,  
apoiou, sonhou e sofreu comigo.  
À minha filha Fernanda Nayra, que compreendeu e aceitou a minha ausência e  
me ajudou a realizar este trabalho,  
Obrigada por tudo!

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela presença constante em minha vida, e que me deu Graça para realizar este trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina, ao Centro de Ciências Biológicas e ao Departamento de Ciências Patológicas e a todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Patológicas e em especial ao Prof. Dr Rubens Cecchini, muito obrigada.

Em especial ao Prof. Dr. Phileno Pinge Filho, pela orientação, estímulo, dedicação, paciência, carinho, amizade e auxílio na realização deste trabalho, meu respeito e admiração.

Às professoras do Departamento de Microbiologia Profa Dra Sueli Fumie Yamada Ogatta, Profa Dra Lucy Megume Yamauchi Lioni e Prof<sup>a</sup> Dra Claudia Bueno dos Reis Martinez pelos conhecimentos recebidos.

À Carolina Panis sua colaboração foi imprescindível para o término deste trabalho, muito obrigada.

Ao Prof Dr Waldiceu Verri Junior pela ajuda com reagentes, sem eles não seria possível o fechamento desta Tese, muito obrigada.

À Prof<sup>a</sup> Dra Marli Martins Pinge, sempre aconselhando, incentivando e apoiando. Meus sinceros agradecimentos.

Aos Professores Rodrigo Cabral Luiz, Fábio Henrique Kwasniewski, Wander Rogério Pavaneli, Ionice Felipe, Jair Tonon, Carlos Nozawa, muito valiosas foram as suas colaborações.

Aos meus amigos Vera Lúcia Hideko Tatakihara, Rosiane Valeriano da Silva, Nagela Ghabdan Zanluqui, Isabel Lovo Martins Buch Pereira, Rafael de Freitas, Sandra Lonien, Luana Aparecida Cosentini, Maria Raquel pela inestimável ajuda durante a realização deste trabalho.

Ao laboratório NIP V, em especial aos colegas Jucevânia Pereira dos Santos pela colaboração na cultura de células, ao Cezar Contreras e ao técnico Ediel Clementino da Costa pela disposição na esterilização dos materiais.

Aos técnicos de laboratório Jesus Antônio Vargas, Pedro Sebastião Dionízio, Irene Maria da Silva, Adernal dos Santos, Valdelice dos Santos, Iara Branco Ferreira, e Tatiana Monteiro Correia pela disponibilidade, colaboração e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Hematologia: Marta Pedro Moura, Elisabethi Cristina Bello Strass, Aurea Santos, Edimar Honorato, Fernando Godoy, Ivete de Oliveira, Luiz Corrente e Franciely A. Osete meu reconhecimento ao apoio e incentivos recebidos.

Aos Professores do Laboratório de Hematologia: José Wander Breganó, Aparecida de Lourdes Perim, Sandra Quintal Carvalho, Maria Emília de Fávero e Marla Amarantes, obrigada pelos incentivos.

Aos colegas de Curso pela amizade, troca de conhecimentos e apoio mútuo.

Aos animais, que com suas vidas, contribuíram para a realização deste trabalho.

Amém ! Louvor, e glória, e sabedoria, e ações de  
graças, e honra, e poder, e força ao nosso Deus para  
todo o sempre. Amém !  
Apocalipse 7: 12

MALVEZI, Aparecida Donizette. **Efeito do bloqueio de COX-1 e de COX-2 sobre a invasão de células do hospedeiro por *Trypanosoma cruzi***. 2014. 114f. Tese de doutorado (Pós graduação em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## RESUMO

*Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas (DC), afeta milhões de pessoas na América Latina. A invasão por *T. cruzi* e sua replicação intracelular são essenciais para o ciclo de vida do parasito e para o desenvolvimento da DC. Nós apresentamos evidências sugerindo o envolvimento da ciclooxigenase-1 e 2 (COX-1/COX-2) do hospedeiro durante a invasão por *T. cruzi*. A inibição farmacológica de COX-1 com aspirina (ASA) provocou marcante inibição da infecção quando macrófagos pré- tratados com ASA por 30 minutos a 37°C antes da inoculação com *T. cruzi*. Esta inibição foi associada com aumento da produção de TNF- $\alpha$ , óxido nítrico (NO) e IL1- $\beta$  por macrófagos. O tratamento de macrófagos com inibidores das óxido nítrico sintases (iNOs e cNOs) ou a adição de PGE2 restauraram a capacidade invasora de *T. cruzi* em macrófagos previamente tratados com ASA. Interessante, o efeito provocado pela ASA foi mediado por “Lipoxina iniciada por aspirina”. Em adição, o tratamento de células cardíacas de coração de ratos (mioblastos-H9C2) pré-tratadas com inibidores de COX-1 (aspirina) e COX-2 (celecoxibe) por 60 minutos a 37°C, também inibiu a infecção por *T. cruzi*. Esta inibição está associada com aumento da produção de NO e IL1-  $\beta$  e com redução da produção de TGF- $\beta$  pelos mioblasto. Nossos resultados indicam que PGE2, NO, lipoxinas e TGF- $\beta$  estão envolvidos na regulação da atividade anti-*T. cruzi* por macrófagos e mioblastos, fornecendo um melhor entendimento do papel das prostaglandinas na resposta inflamatória inata durante a infecção por *T. cruzi*. E abrem novas possibilidades para investigação de novas abordagens terapêuticas contra a doença de Chagas.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*. COX-1. COX-2. Macrófagos. Mioblasto.

MALVEZI, Aparecida Donizette. **Efeito do bloqueio de COX-1 e de COX-2 sobre a invasão de células do hospedeiro por *Trypanosoma cruzi***. 2014. 114p. Thesis (Doctorate in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## ABSTRAT

*Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease (DC) affects millions of people in Latin America. The invasion by *T.cruzi* and intracellular replication are essential to the life cycle of the parasite and the development of DC. Here, we present evidence suggesting the involvement of cyclooxygenase -1 and -2 (COX-1/COX-2) of the host during invasion by *T.cruzi*. Pharmacological inhibition of COX-1 with aspirin (ASA) caused inhibition of infection when macrophages were pretreated with ASA for 30 minutes at 37°C before inoculation with *T. cruzi*. This inhibition was associated with increased production of TNF- $\alpha$ , nitric oxide (NO) and IL1- $\beta$  by macrophages. Treatment of macrophages with inhibitors of nitric oxide synthase (cNOS and iNOS) or addition of PGE2 restored invasiveness of *T. cruzi* in macrophages pretreated with ASA. Interestingly, the effect caused by ASA were mediated “Lipoxin trigger by aspirin.” In addition, treatment of cardiac rat heart cells (myoblast-H9C2) with COX-1 (aspirin) and COX -2 inhibitors (celecoxib) for 60 minutes at 37°C also inhibited infection by *T. cruzi*. This inhibition is associated with increased production of NO and IL-1 $\beta$  and reduced production of TGF- $\beta$  by myoblasts. Our results indicate that PGE2, NO, TGF- $\beta$  and lipoxins are involved in regulating the activity anti-*T.cruzi* by macrophages and myoblasts, providing a better understanding of the role of prostaglandins in the innate inflammatory response during infection by *T. cruzi*, opening new possibilities for new therapeutic approaches against Chagas disease.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*. COX-1. COX-2. Macrophages. Myoblast

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema do ciclo biológico de *T. cruzi*. Diferenciação das formas tripomastigotas em amastigotas no ser humano e diferenciação da forma tripomastigotas, e epimastigotas no inseto barbeiro .....20
- Figura 2** - Síntese de Eicosanóides. Pela ação da fosfolipase A, o ácido araquidônico, constituinte normal dos fosfolípidios das membranas, é convertido em prostaglandinas (PG), tromboxanos A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e leucotrienos (LTs) .....24
- Figura 3** - Superfícies acessíveis da COX-1 e COX-2. Os domínios catalíticos das enzimas COX aparecem em vermelho, com os domínios de ligação à membrana em verde. Os sítios ativos de ambas as proteínas aparecem em branco .....27
- Figura 4** - Ligação do AINE (azul) no sítio ativo das enzimas COX-1 (A) e COX 2 (B).....32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AINEs	Anti-inflamatórios não esteróides
Arg-120	Arginina 120
AhR	Receptor Aril hidrocarboneto
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AP-1	Ativador da proteína 1
ASA	Ácido Acetil Salicílico
ATL	Lipoxina iniciada por aspirina
ATP	Adenosina trifosfato
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
( $\beta$ -MHC)	Miosina de cadeia pesada pesada beta
CB	Citocalasina B
CD	Citocalasina D
CD68 <sup>+</sup>	Grupo de diferenciação 68
CD11b	Grupo de diferenciação 11b
CMs	Cardio miócitos
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
DC	Doença de Chagas
DCH	Doença de Chagas Humana
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EBI	Inibidores da biossíntese do ergosterol
ECM	Matriz extracelular
eNOS	Óxido Nítrico sintase endotelial
ERK ½	Proteína quinase extracelular 1 e 2 regulada por sinal
FLAP	Proteína ativadora de 5-lipoxigenase
FPPS	Proteína farnesil pirofosfatase
GAG	Guanina Adenosina Guanina

GM-1	Microdomínios ricos em colesterol
GMPc	Guanilato monofosfato ciclase
GPI	Glico-fosfatidil inositol
GTPase	Guanina trifosfatase
HETE	Hidroxicicosatetraenóico
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPETE	Ácido hidroperoxicicosatetraenóico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL1-β	Interleucina 1 Beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina 12
Ile 523	Isoleucina 523
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRF-1	Fator regulador do interferon tipo 1
JAK-1	Janus Kinase 1
JAK-2	Janus Kinase 2
JNK	Jun N-terminal Kinase
LO	Lipoxigenase
LP	Lipoxina
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LTA <sub>4</sub>	Leucotrieno A <sub>4</sub>
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Leucotrieno C <sub>4</sub>

LX	Lipoxina
LXA <sub>4</sub>	Lipoxina A <sub>4</sub>
MIG	Monocinas induzidas por interferon gama
MIP-1 $\alpha$	Proteína inflamatória de macrófago 1 alfa
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófago 2
MMP-9	Matriz metalloproteinase 9
mTOR	Alvo da rapamicina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NDGA	Ácido nordihidroguairético
NF-IL-6	Fator nuclear da interleucina 6
NF $\kappa$ B	Fator nuclear kapa B
NK	Células "Natural Killer"
NO	Nitric Oxide - Óxido Nítrico
NO-AINEs	Antiinflamatórios não esteroides liberadores de óxido nítrico
NOS	Nitric Oxide Synthase - Óxido Nítrico Sintase
NOS-1	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS-2	Óxido nítrico sintase induzível
NOS-3	Óxido nítrico sintase endotelial
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs - Drogas antiinflamatórias não-esteróides
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PAMPs	Padrão de seqüências moleculares associadas ao patógeno
PG	Prostaglandins - Prostaglandina
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina da classe D <sub>2</sub>
PGE <sub>1</sub>	Prostaglandina da classe E <sub>1</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina da classe E <sub>2</sub>
PGF <sub>2</sub> $\alpha$	Prostaglandina da classe F <sub>2</sub> $\alpha$
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandina endoperóxido 2
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina hidroperóxido 2

PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina da classe I <sub>2</sub>
PH	Potencial de hidrogênio
PI <sub>3</sub> K	Fosfatidil inositol 3 quinase
PKC	Proteína quinase C
PLA1	Fosfolipase A1
PLA2	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
PPRs	Receptores de reconhecimento padrão
PTK	Proteína tirosina quinase
Raf-1	Proteína quinase Raf-1
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RNI	Espécies reativas derivadas do nitrogênio
Ser-530	Serina 530
SMC	Células musculares lisa
SOCS-2	Supressor de sinalização de citocina-2
STAT1 $\alpha$	Transdutores e ativadores de sinais de transcrição 1 alfa
SOD	Superóxido dismutase
TcFPPS	Proteína farnesil pirofosfatase sintase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TcOYE	(old yellow enzyme de <i>Trypanosoma cruzi</i> )
TCT	Tripomastigotas de cultura de tecido
TGF- $\beta$	Fator transformador do crescimento- $\beta$
Th1	Linfócito T auxiliar produtor de citocinas do padrão 1
Th2	Linfócito T auxiliar produtor de citocinas do padrão 2
TLR	Toll like receptor - Receptor de toll-like
TL-Rs	Receptores do tipo Toll
TM	Tripomastigota metacíclico
TIR-1	Receptor/ Toll de interleucina 1
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor - Fator de Necrose Tumoral alfa
TPA	Ativador do plasminogênio tecidual
TS	Trans-sialidase

TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
TyK <sub>2</sub>	Tirosina quinase 2
VP	Vacúolo parasitóforo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1	DOENÇA DE CHAGAS E <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	17
1.2	SÍNTESE DE EICOSANÓIDES .....	23
1.2.1	Metabolismo do Ácido Araquidônico .....	24
1.2.1.1	Características das ciclooxygenases .....	26
1.2.2	Propriedades das Prostaglandinas .....	28
1.2.2.1	Características da lipoxigenase .....	28
1.2.2.2	Via das Lipoxinas .....	29
1.2.3	Inibidores farmacológicos das Enzimas COX-1 e COX-2 .....	31
1.3	EICOSANÓIDES E DOENÇA DE CHAGAS.....	34
1.3.1	Regulação endógena de eicosanóides durante a doença de Chagas experimental .....	38
1.3.2	Metabolismo de lipídeos e eicosanóides por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	39
1.4	PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA DOENÇA DE CHAGAS.....	40
1.5	ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	45
1.5.1	Inibidores da Biossíntese de Esterol .....	45
1.5.2	INIBIDORES DE Cisteína Proteases.....	46
1.5.3	Inibidores do Metabolismo de Pirofosfatos.....	47
1.5.4	Inibidores de Purinas.....	48
1.5.5	Inibidores de Prostaglandinas .....	49
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	51
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	51
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	52
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	53
3.1	MECANISMO DE INVASÃO CELULAR PELO PROTOZOÁRIO <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	53
3.2	ARTIGO 1 .....	62
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 2</b> .....	71

4.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> E INFECÇÃO DE MIOBLASTO .....	71
4.2	PARTICIPAÇÃO DO TGF- $\beta$ NA CARDIOPATIA CHAGÁICA .....	73
4.3	ARTIGO 2 .....	76
5	<b>REFERENCIAS</b> .....	84

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 DOENÇA DE CHAGAS E *Trypanosoma cruzi*

As doenças tropicais negligenciadas afetam mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, principalmente populações de baixa renda que vivem em climas tropicais e subtropicais. Vários são os agentes etiológicos dessas doenças, como vírus, bactérias, protozoários e helmintos. A Doença de Chagas (DC) é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença tropical negligenciada (WHO, 2013).

A DC ou tripanosomíase americana é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* da Ordem Kinetoplastida Família Trypanosomatidea e constitui uma zoonose típica das regiões tropical e subtropical da América Latina, estendendo-se até a região sudeste dos Estados Unidos da América (DIAS, 2006).

O ciclo de vida do protozoário *T. cruzi* é complexo (Figura 1) e apresenta três formas evolutivas, denominadas de tripomastigotas como a forma infectante do parasito que estão livres no sangue, epimastigotas como forma de multiplicação no triatomíneo, e amastigotas que se multiplicam dentro das células hospedeiras de mamíferos (BURLEIGH, ANDREWS, 1995).

Durante ou após o repasto sanguíneo, tripomastigotas metacíclicos são eliminados nas fezes e urina do vetor (Figura 1), invadem o hospedeiro vertebrado pelo local da picada (GASCON et al, 2010). Ao penetrar no tecido, o parasito interage com as células da pele ou mucosas (COUTINHO et al., 1999). Após a invasão do parasito as formas tripomastigotas aderem-se às membranas de diferentes tipos de células do hospedeiro, inclusive macrófagos. Os parasitos penetram a partir do vacúolo parasitóforo em formação e à medida que o processo de internalização progride, lisossomos se fundem aos vacúolos. Conforme o pH diminui, ocorre a ativação de proteínas formadoras de poros que rompem as membranas lisossômicas, promovendo a degradação celular, porém a

forma tripomastigota não é afetada pela ação deste mecanismo (BURLEIGH, ANDREWS, 1995).

Os tripomastigotas liberados no citoplasma das células infectadas, diferenciam-se em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária. Dentro dos macrófagos, há formação de ninhos dos parasitos e após a diferenciação em tripomastigotas, estes provocam a ruptura da membrana do vacúolo, são liberados da célula hospedeira para o interstício (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012). As formas tripomastigotas podem atingir a corrente circulatória, podendo infectar células dos neurônios, células musculares e células epiteliais iniciando um novo ciclo celular, no hospedeiro mamífero. Alguns parasitos são destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro e outros podem ser ingeridos pelos triatomíneos, onde desenvolverão o seu ciclo extracelular (PEREIRA NEVES et al, 2011; SARMENTO, 2008).

Em termos de patogênese, considera-se *T. cruzi* como um dos parasitos que apresentam maior plasticidade, devido sua capacidade de infectar vários tipos celulares (PEREIRA et al.,, 2000). No inseto vetor, os tripomastigotas passam pelo estômago como formas arredondadas esferomastigotas e chegando ao intestino posterior dos triatomíneos, diferenciam-se nas formas epimastigotas em poucas horas após a ingestão e multiplicam-se por meio de divisão binária simples (Figura 1). Ao chegar na porção terminal do tubo digestivo, os epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicos, a forma infectante para os mamíferos (PEREIRA NEVES et al, 2011; REY, 2011).

Estima-se que cerca de 7 a 8 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, a maioria na América Latina onde a DC é endêmica, e que mais de 25 milhões vivam sob o risco de contrair a doença. Contudo, na última década a incidência da doença aumentou nos países não endêmicos, como Estados Unidos, Canadá, países da Europa e do Pacífico Ocidental. Isso se deve principalmente pela mobilidade entre a população da América Latina e o resto do mundo e, embora menos frequente, deve-se também por infecções através de transfusão sanguínea, transmissão vertical e doação de órgãos.

Dados estatísticos indicam que somente no ano de 2008 a Doença de Chagas matou mais de 10 mil pessoas, sendo nesse mesmo ano a soroprevalência da DC em crianças entre 0 e 5 anos foi da ordem de 1/100.000 (MASSAD, 2007; CDC, 2013; WHO, 2013).

O custo do tratamento da DC ainda é alto. Somente na Colômbia, o custo anual com os pacientes com a doença é em torno de 267 milhões de dólares. Já o custo anual com inseticidas para controle vetorial é de aproximadamente 5 milhões de dólares (WHO, 2013)

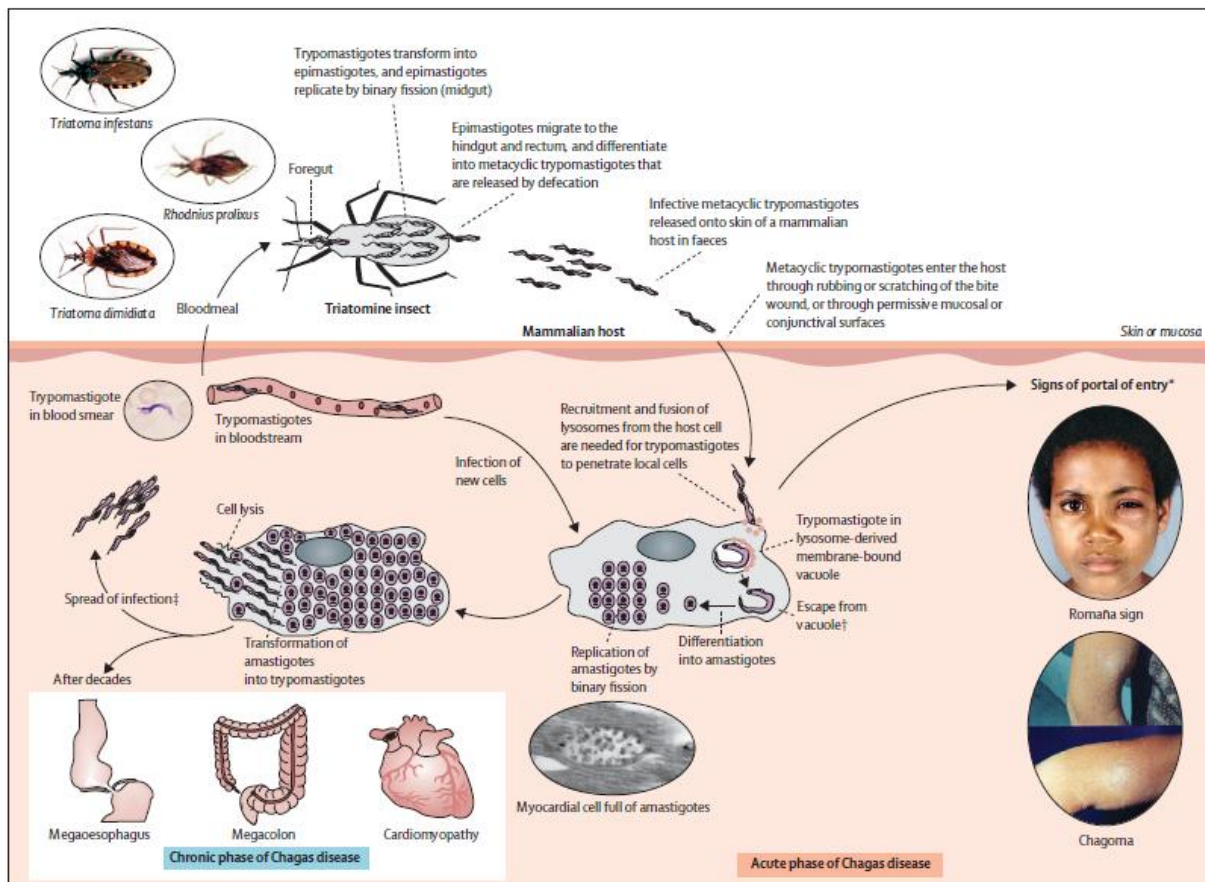
Entre os países do continente americano com maiores incidências da DC estão a Bolívia (6,8%), Argentina (4,1%), El Salvador (3,4%), Honduras (3,1%), Paraguai (2,5%). O Brasil com menor número de casos do continente, a partir de 2006 foi certificado como o país livre da transmissão da doença pelo principal vetor *Triatoma infestans* (RASSI Jr et al., 2012).

Registros oficiais de óbitos indicam que no Brasil ocorram aproximadamente seis mil mortes de pacientes chagásicos crônicos por ano (CHAPADEIRO et al., 1999) e redução de nove anos na expectativa de vida de portadores crônicos. (BLITZMAN et al., 2007).

A infecção caracteriza-se pela existência de uma fase aguda, na qual a parasitemia é comumente observada, seguida por uma fase crônica, onde a carga parasitária é controlada sem que haja completa eliminação dos parasitos.

A fase aguda da DC inicia-se após oito a dez dias após a infecção por *T. cruzi* ou até 20 a 40 dias depois da transfusão com sangue infectado, podendo ser sintomática ou assintomática (RASSI Jr et al., 2012). Esta fase caracteriza-se pela presença de tripomastigotas no sangue e pelos baixos títulos de anticorpos da classe IgG, mas podendo ser encontrados também anticorpos IgM (DOS SANTOS et al, 2012).

**Figura 1.** Esquema do ciclo biológico de *T. cruzi*. Diferenciação das formas tripomastigotas em amastigotas no ser humano e diferenciação da forma tripomastigotas, e epimastigotas no inseto barbeiro.



Fonte: Rassi-Jr et al., 2010.

Entre as manifestações clínicas da fase aguda que ocorre são o sinal de romanã ou chagoma de inoculação quando *T. cruzi* penetra na mucosa ocular ou na pele lesionada, respectivamente (MACHADO et al, 2012). Concomitantemente, os linfonodo-satélites são comprometidos, formando-se um complexo cutâneo de tecido gorduroso com a presença de parasitos intra e extracelular em abundância. Conforme *T. cruzi* invade determinadas células do corpo, o paciente chagásico pode apresentar febre entre 38 a 40° C, dores no corpo, cefaléias, edemas localizados e generalizados que podem aumentar de tamanho, poliadenia, astenia, quadros inflamatórios em diversos órgãos e leucocitose com linfocitose, podendo levar a leucopenia (REY, 2011). Nesta fase da doença, a morbidade é sempre maior em crianças com menos de 5 anos e

quando não há tratamento, com os sinais e sintomas de cardiopatia aguda, frequente linfadenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia e meningoencefalite (VAZ, 2007; WESTPHALEN, BISUGO, DE ARAÚJO, 2012). O diagnóstico laboratorial desta fase, pode ser feito a partir da detecção direta dos parasitos no sangue, xenodiagnóstico e hemocultura, além da sorologia para o anticorpo da classe IgM e IgG que podem atingir níveis elevados (MACHADO et al., 2012).

Na fase aguda da infecção uma intensa miocardite acompanhada de um intenso infiltrado inflamatório, frequentemente é encontrada (GODZEL et al., 2003; ROSSI et al., 1995).

Considerando que 5% dos pacientes com sintomas agudos morrem, pode ser estimada que a mortalidade está entre 1:2500 e 1:5000 (TEIXEIRA et al., 2006). Após a fase aguda, geralmente benigna e sub-clínica, segue-se uma fase clínica conhecida como “indeterminada” ou “inaparente”, na qual associam-se ausência de sintomatologia clínica com sorologia positiva.

A forma clínica indeterminada, apesar do seu bom prognóstico em médio prazo (5 a 10 anos), adquiriu uma impotência crescente, devido ao significado controverso de anormalidade de alguns testes e as lesões focais do miocárdio em muitos pacientes (PRATA et al., 2001).

Após vinte a trinta anos, cerca de 20% dos indivíduos infectados desenvolvem a fase crônica, sintomática, com diferentes formas clínicas: cardíaca, digestória ou neurológica (ARAÚJO-JORGE et al., 2000) essas formas contribuem para as altas taxas de morbidade e mortalidade por DC (DIAS et al., 1999; MAGUIRRE et al., 1987; WANDERLEY et al., 1994). Curiosamente, dois terços dos 18 milhões de pessoas que abrigam a infecção crônica por *T. cruzi* não apresentam qualquer manifestação clínica da doença.

A forma crônica cardíaca é evidenciada pela cardiomiopatia inflamatória de evolução fatal, acompanhada clinicamente por arritmias, fenômenos tromboembólicos, insuficiência cardíaca congestiva e cardiomegalia. Ocorrem lesões no sistema de condução cardíaco, alterações vasculares e lesão apical que contribuem para a destruição progressiva do miocárdio (ANDRADE et al., 2000). O prognóstico da cardiopatia chagásica crônica depende do grau de

comprometimento cardíaco, da cardiomegalia e do grau de insuficiência cardíaca, podendo ocorrer óbito por falência cardíaca ou morte súbita por bloqueio na condução do estímulo átrio-ventricular (BLITZMAN et al., 2007), além da redução da expectativa de vida para aproximadamente 60 anos de idade (MAGUIRRE et al., 1987).

A resposta imunológica gerada contra o parasito também provoca lesões teciduais, associadas ao processo auto-imune de destruição do tecido cardíaco ou a produção de mediadores inflamatórios contra o parasito e seus antígenos teciduais (GIRONES, FRESNO, 2003).

Cardiomiopatia chagásica é uma das formas mais comuns de doenças do coração no mundo, é uma das consequências da infecção com o parasito hemoflagelado *T. cruzi*. Em modelos de infecção experimental, camundongos infectados durante a fase aguda apresentaram grande infiltração de fagócitos CD68<sup>+</sup> e células TCD8<sup>+</sup> (DHIMAN et al., 2011). E também foi mostrado que os níveis de RNAm para TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  foram aumentados em mioblastos infectados por *T. cruzi* (BA et al., 2010).

Estes eventos podem estar associados com a presença persistente de infiltrado inflamatório (CARDONI et al., 1997), dano celular e tecidual induzidos por estresse oxidativo (ZACKES et al., 2005) e fibrose cardíaca (LEON et al., 2003). E ainda no estágio crônico da doença, a persistência do infiltrado inflamatório no coração estava associado com extensivo remodelamento cardíaco, evidenciado pelo aumento no tamanho dos mioblastos, aumento dos níveis de RNAm para marcadores de hipertrofia ( $\beta$ -MHC, ANP e BNP), extensiva deposição de componentes da matriz extracelular (colágeno e GAGs) e aumento da atividade da colagenase (MMP-9) (DHIMAN et al., 2011).

No acometimento crônico do trato digestório, ocorrem alterações como megaesôfago e constipação megacólon, decorrentes do comprometimento do sistema nervoso entérico, hipertrofia e inflamação de tecidos (ANDRADE et al., 2000).

## 1.2 SÍNTESE DE EICOSANÓIDES

Eicosanóides são uma família de mediadores lipídicos que participam de importantes atividades fisiológicas e patológicas incluindo tônus vascular, homeostase tecidual, inflamação e isquemia (HAEGGSTROM et al 2010). Em mamíferos, a via biossintética para esses mediadores biológicos estão bem descritas. O ácido araquidônico derivado dos fosfolipídios de membrana através da fosfolipase A2, na presença da prostaglandina (PG) sintase/ciclooxigenase (COX), é hidrolizado a PGH2 (ROUZER, MARNETT, 2008). PGH2 é o substrato central para síntese de outros eicosanóides que é mediado por sintases espécie-específica para gerar prostaglandinas (PGs) das séries leucotrienos (LTs), tromboxanos (TXs) e lipoxinas (LPs), os quais agem via uma série de receptores associados a proteína G (HAEGGSTROM et al., 2010; NEEDLEMAN et al., 1986; SANTOVITO et al., 2009; SMITH, 1997).

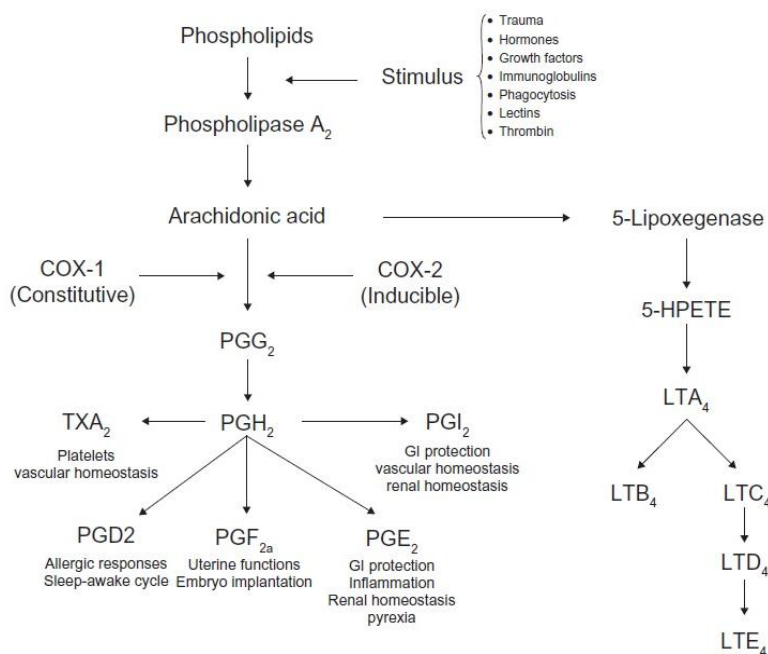
Enzimas da família das COXs são estruturalmente e enzimaticamente similares, mas apresentam diferentes papéis fisiológicos. COX-1 é constitutiva, enquanto a COX-2 é induzível em processos inflamatórios (HAEGGSTROM et al., 2010; ROUZER; MARNETT, 2008).

A enzima fosfolipase A1 que inicia a via metabólica do ácido araquidônico pela clivagem da cadeia Sn-1 acil, já foi descrita em *Trypanosoma brucei* (OPPERDOES; VAN ROY, 1982; SAGE et al., 1981). PGF<sub>2</sub>α sintase foi identificada em *Leishmania* e *T. cruzi* (Old Yellow Enzyme) e *T. brucei* (KABUTUTU et al., 2003; KUBATA et al., 2002). PGF<sub>2</sub>α é o eicosanóide predominante produzido por *Leishmania* e *T. brucei* juntamente com pequenas quantidades de PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> (KABUTUTU et al., 2003; KUBATA et al., 2000; OPPERDOES; VAN ROY, 1982). *T. cruzi* preferencialmente sintetiza TXA<sub>2</sub> (ASHTON et al., 2007). Eicosanóides liberados por *T. cruzi*, podem contribuir para diferenciação e fagocitose do parasito (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000) e sobrevivência do hospedeiro (STERIN-BORDA et al., 1996), agindo como imunomoduladores auxiliando na transição e manutenção da fase crônica da doença (KABUTUTU et al., 2003; KUBATA et al., 2000).

### 1.2.1 Metabolismo do Ácido Araquidônico

O ácido araquidônico é um ácido graxo poli-insaturado com 20 carbonos, derivado do ácido linoleico é o substrato para as duas vias enzimáticas: a das cicloxigenases (COX), que desencadeiam a síntese das prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs), e via das lipoxigenases (LOs) responsáveis pela síntese dos leucotrienos (LT) e lipoxinas (LXs), ácidos hidroieicosatetraenoico (HETE) e ácido hidroperoxieicotetraenoico (HPETE). (NARABA et al., 1998; TAKAHASHI et al. 2005), além disso, participa da via do citocromo P-450 monoxigenase, responsável pela produção de epóxidos e ácidos hidroieicosatetraenoico (Figura 2).

**Figura 2.** Síntese de Eicosanóides. Pela ação da fosfolipase A, o ácido araquidônico, constituinte normal dos fosfolípidios das membranas, é convertido em prostaglandinas (PG), tromboxanos A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e leucotrienos (LTs).



Fonte: SERHAN et al., 2008.

Prostaglandinas endoperóxido sintase H, conhecida como ciclooxigenases (COX), apresentam duas atividades catalíticas: 1) a ciclooxigenase, a qual oxida o ácido araquidônico em hidroperóxido-endoperóxido

PGG<sub>2</sub> e 2) peroxidase que subsequentemente reduz PGG<sub>2</sub> em hidroperóxido-endoperóxido PGH<sub>2</sub> e posteriormente esta PGH<sub>2</sub>, que é uma molécula instável, é transformada por diversas isomerases e sintases tecidos específicas em prostanóides, como as prostaglandinas (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub>α), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>).

Os prostanóides estão envolvidos em uma grande variedade de respostas fisiológicas e patofisiológicas (GRISWOLD et al., 1996). No sistema cardiovascular, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> são potentes vasodilatadores, enquanto TXA<sub>2</sub> mostra propriedade vasoconstritora. TXA<sub>2</sub> também tem grande atividade na indução de agregação plaquetária, enquanto PGI<sub>2</sub> tem atividade anticoagulante. Nas vias aéreas PGF<sub>2</sub>α e TXA<sub>2</sub> são broncoconstritores. No trato gastrointestinal PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> garantem a proteção da mucosa gástrica pela baixa secreção ácida, e também aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica e estimulam a formação de muco e secreção de bicarbonato. TXA<sub>2</sub> induz ao aumento da permeabilidade vascular levando ao edema. PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> estimulam o fluxo sanguíneo renal e diurese, PGF<sub>2</sub>α induz a contração da musculatura uterina (VANE et al., 1990).

Prostanóides também medeiam respostas a injúria tecidual ou inflamação. PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> são potentes vasodilatadores e agem em sinergia com outros autacóides (compostos envolvidos na inflamação) como histamina e bradicinina, e suas ações combinadas nos capilares contribuem para formação do rubor e aumentam o fluxo sanguíneo nas regiões da inflamação. Ainda aumentam a permeabilidade vascular levando ao edema tecidual e produzem hiperalgesia por sua ação sensitiva nos terminais das fibras sensoriais periféricas. PGE<sub>2</sub> age nos neurônios contribuindo para as respostas sistêmicas na inflamação como a febre, fadiga e hipersensibilidade a dor. (SAMAD et al., 2002).

Dois isoformas de ciclooxigenases estão melhor caracterizadas: a COX-1 é constitutivamente expressa em quase todos os tecidos, incluindo nas células amnióticas, no feto, epitélio do útero no início da gravidez (TRAUTMAN et al., 1996). Está envolvida na regulação de muitas funções fisiológicas, como agregação plaquetária e homeostase do trato gastrointestinal e dos rins. COX-2 é

constitutivamente expressa nos rins, cérebro, particularmente no hipocampo e neurônios glutamérgicos corticais, ovários, próstata e útero (CHOI et al., 2009; CROFFORD et al., 2000). Sua expressão é aumentada (induzida) durante condições inflamatórias por moléculas pró-inflamatórias como IL-1, TNF $\alpha$  e LPS (VANE et al., 1998; BLOBAUN; MARNETT, 2007). A COX-2 tem papel importante na geração da inflamação, uma vez que ela produz os mediadores prostanoídes pró-inflamatórios, como algumas prostaglandinas e leucotrienos.

#### 1.2.1.1 Características das ciclooxigenases

A estrutura primária da COX-1 e COX-2 de numerosas espécies são conhecidas. COX-1 e COX-2 de mamíferos contêm 576 e 587 aminoácidos respectivamente (SMITH, et al., 2000). Estas enzimas apresentam alto grau de identidade nas suas sequências (cerca de 60 a 65 %) na mesma espécie (GARAVITO et al., 1999) e (85 a 90%) entre isoformas individuais de diferentes espécies (SMITH et al., 1996; SPENCER et al., 1999).

As COXs são proteínas integrais de membrana contendo um grupamento heme. COX-1 está localizada na superfície do retículo endoplasmático e a COX-2 localiza-se principalmente no envelope nuclear. (MORITA et al., 1995). A estrutura tridimensional destas duas enzimas foi determinada por difração de raios-X. Ambas se apresentam como homodímeros, cada monômero consistindo por três unidades dobradas:

- 1) um domínio N-terminal ligado ao Fator de Crescimento Epidermal (EGF),

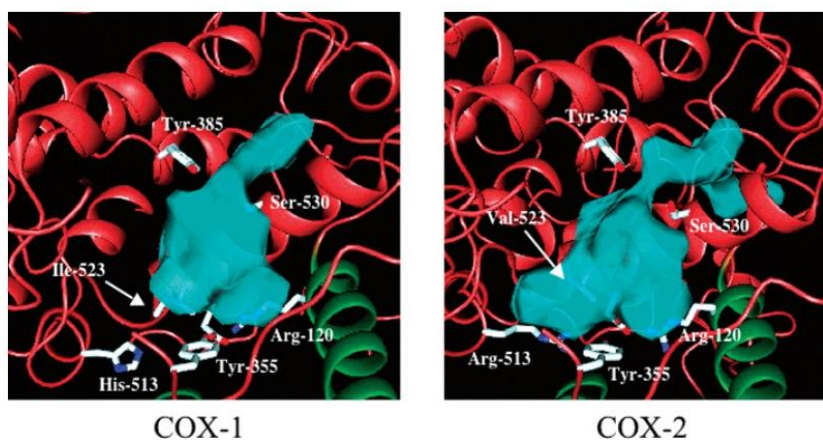
- 2) um domínio ligado a membrana alfa hélice, o qual ancora a proteína em uma pequena dobra da bicamada lipídica,

- 3) um grande domínio catalítico globular C-terminal com o sítio ativo da COX, os quais acomodam o substrato ou os inibidores e a peroxidase 1, que contém o cofator heme. Estes sítios são distintos, mas funcionalmente e estruturalmente interconectados. (SMITH et al., 2002) O sítio ativo da COX é similar em ambas as isoenzimas (LUONG et al., 1996), e consiste de um longo e

estreito canal hidrofóbico que se estende do domínio ligado a membrana até o core do sítio catalítico 1. (KURUMBAIL et al., 1996; PICOT et al., 1994).

O sítio de ligação do araquidonato está localizado no meio superior do canal, de Arg-120 para próximo da Tyr-385. A Ser-530 posicionada no meio do canal é o sítio de acetilação da Aspirina (LOLL et al., 1995). Apesar de suas similaridades, o sítio ativo da COX-2 é cerca de 20% maior que da COX-1 e tem uma discreta diferença na forma, as diferenças no tamanho e na forma são causados principalmente por variações na sequência de dois aminoácidos (GARAVITO et al., 2002). Ile-523 é substituído por uma valina na COX-2, estas diferenças abrem um pequeno bolso hidrofóbico ao lado do canal principal, aumentando o volume do sítio ativo da COX-2. Acesso a este lugar é estericamente inadequado na COX-1 pela cadeia lateral longa de Ile-523. (KURUMBAIL et al., 1996) (Figura 3).

**Figura 3.** Superfícies acessíveis da COX-1 e COX-2. Os domínios catalíticos das enzimas COX aparecem em vermelho, com os domínios de ligação à membrana em verde. Os sítios ativos de ambas as proteínas aparecem em branco.



**Fonte:** BLOBAUM; MARNETT, 2007.

### 1.2.2 Propriedades das Prostaglandinas

As prostaglandinas da série E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) têm múltiplos efeitos sobre o sistema imunológico, incluindo inibição da proliferação de células T murinas e de humanos (KUNKEL et al., 1986), inibição da atividade de células NK (HASLER et al., 1983), inibição da produção de IL-1, TNF- $\alpha$  (GOTO et al., 1983). Já foi mostrado que PGE<sub>2</sub> inibe o desenvolvimento da resposta Th1 e secreção de citocinas Th1 específicas (IFN- $\gamma$ , IL-2) (BETZ; FOX, 1991). PGE<sub>2</sub> também interfere nas interações *in vivo* entre monócitos e células T, gerando uma apresentação antigênica inadequada para células T e inibição da expressão de moléculas do MHC de classe II (STEPHAN et al., 1988). Em geral as prostaglandinas funcionam como agentes imunossupressores, então, a capacidade de um antígeno induzir a liberação de PGE<sub>2</sub> pelos macrófagos pode influenciar o desenvolvimento de uma resposta Th1 ou Th2 dominante e definir o estado de imunidade do hospedeiro (protetora ou não).

#### 1.2.2.1 Características da lipoxigenase

São quatro as enzimas lipoxigenases (LOs) 5-, 8-, 12- e 15-LO, que metabolizam o AA pela oxigenação de um simples carbono, resultando na formação de uma variedade de compostos com diversas atividades biológicas (SUMIDA et al., 1993). Em humanos, os produtos primários do metabolismo do AA pelo LO são: 5-, 12- e 15-HPETE que, pela ação de peroxidases formam os seus derivados hidróxi (HETE). A enzima 5- e 12-LO tem distribuição ubíqua, enquanto a 15-LO é confinada em eosinófilos (IVANOV et al., 2004). A 5-LO nos neutrófilos é translocada do citoplasma para a membrana da célula, na presença de aumento intracelular de Ca<sup>2+</sup> (BROK et al., 1995). 5-LO com a ajuda da proteína FLAP (proteína ativadora da 5-lipoxigenase) ativa a 5-LO e converte AA a 5-HPETE, que espontaneamente é reduzido a 5-HETE. 5-LO agora age sobre o 5-HETE para converter este em leucotrieno (LTA<sub>4</sub>) (CHIANG; SERHAN, 2006).

### 1.2.2.2 Via das Lipoxinas

As vias biossintéticas para a formação da lipoxina (LX<sub>4</sub>) são complexas envolvendo a ação de duas LOs independentes e pode ocorrer através de cascatas trans-celulares, particularmente aquelas que envolvem plaquetas e leucócitos (CHIAN; SERHAN, 2006). A atividade da 5-LO parece ter passos comuns na síntese da LXA<sub>4</sub> (SERHAN et al., 1984). LXA<sub>4</sub> é secretada por neutrófilos e inibe o efeito ativador do LTB<sub>4</sub> nas plaquetas (SERHAN et al., 1984); no entanto há vários efeitos antiinflamatórios e pró-resolvinas associados as LXA<sub>4</sub> sugerindo que elas agem como um “sinal de quebra” na inflamação (MADERNA; GODSON, 2009). Essas propriedades incluem limitar o tráfico de leucócitos e prevenir a ativação de células endoteliais no sítio da inflamação, e ainda estimula a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos e são mediadores potentes anti-fibrótico (ALIBERTI; BÁFICA, 2005; BAKER et al., 2009; MADERNA; GODSON, 2009; RYAN, GODSON, 2010).

Enquanto alguns mediadores lipídicos dirigem a inflamação aguda, outros mediadores endógenos fazem um contra-balanço desses eventos pró-inflamatórios. Em adição ao LTs, Lipoxinas (LXAs) apresentam papel pró-resolvinas em reações inflamatórias (MADERNA; GODSON, 2009; RYAN; GODSON, 2010; STABLE; GILROY, 2010).

O papel das LXs na inflamação do miocárdio e modulação da resposta imunológica durante a infecção por *T. cruzi* não está totalmente esclarecido. A ação das LXs na regulação da infecção com *Toxoplasma gondii*, permite extrapolar o papel potencial que estes eicosanoides tem, durante a infecção com *T. cruzi*. O modelo com *T. gondii*, mostrou que o desafio com este parasito provocou a liberação de LXA<sub>4</sub>, a qual modulou a ativação de células dendríticas *in vivo* e *in vitro* (ALIBERTI et al., 2002a). Infecção com *T. gondii* em camundongos nocautes para 5-LO (5-LO<sup>-/-</sup>), aumentou o dano tecidual e mortalidade dos animais e provocou aumento de IL-12 e IFN-γ, e este aumento foi prevenido pela administração de um análogo estável de LXA<sub>4</sub> (ALIBERTI et al., 2002b).

Machado e colaboradores (2006) mostraram que lipoxinas ativam dois receptores em células dendríticas: AhR (Receptor Aril hidrocarbono) e LXAR (receptor de lipoxina), esta ativação inicia a expressão do supressor de citocinas sinalizante 2 (SOCS-2). O receptor AhR medeia ações biológicas das LXA<sub>4</sub> durante a infecção com *T. gondii*. Este receptor é um fator de transcrição ativado que regula muitas das ações da LXA<sub>4</sub>. Também foi mostrado que durante a infecção com *T. cruzi*, SOCS-2 participa na modulação da inflamação durante a infecção (MUKHERJEE et al., 2011).

Microrganismos bem como opsoninas (IgG e componentes C3 do complemento) podem estimular a liberação de ácido araquidônico a partir de fosfolípidios de membranas e ser metabolizados até a formação de LTs (FERNANDEZ et al., 2003).

Durante a fase inflamatória aguda da infecção por *T. cruzi*, ocorre alta expressão de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores. As citocinas inflamatórias e mediadores lipídicos são essenciais para a sobrevivência do hospedeiro durante a infecção aguda (BORGES et al., 2009; HIDEKO TATAKIHARA et al., 2008). 5-LO tem recebido mais atenção nos casos envolvendo infecção por *T. cruzi* isto, devido ao seu envolvimento na síntese de LT, que são conhecidos por participar ativamente no controle de infecções por protozoários (HENDERSON; CHI, 1998; MACHADO et al., 2005); LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub> aumentam a associação e entrada de *T. cruzi* em monócitos pela estimulação da fagocitose (WIRTH, KIERSZENBAUN, 1985).

O ácido nordihidroguairético (NDGA) é um composto fenólico extraído de "Creosote bush" (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae) (DIAS, 1979) é um inibidor seletivo da lipoxigenase e, portanto impede a formação de LT. O NDGA age como antioxidante com importante atividade antiproliferativa sobre uma variedade de tumores. Em adição apresenta forte ação inibidora sobre a produção de TGF- $\beta$ , uma citocina multi-funcional que afeta vários eventos biológicos. Esta atividade ocorre através da inibição do deslocamento de Smad 2 (proteína chave da sinalização para produção de TGF- $\beta$  para o núcleo celular (DIAS, 2006).

### 1.2.3 Inibidores farmacológicos das Enzimas COX-1 e COX-2

Os inibidores das isoenzimas COXs (Figura 4) competem com o ácido araquidônico pelo sítio ativo da COX (SMITH et al., 1991 ) e podem ser divididos em duas classes:

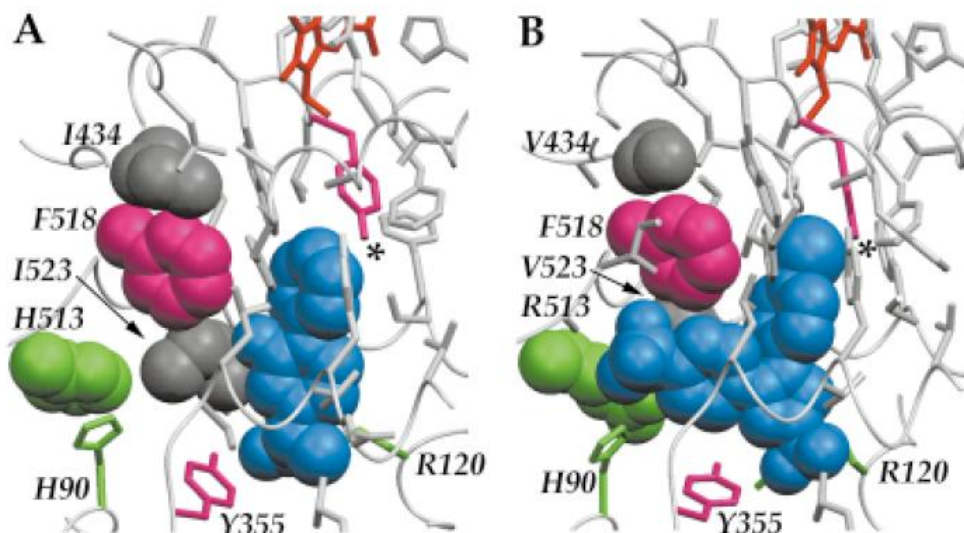
a) Clássicas “isoenzimas não específicas” AINES descobertos antes de 1995.

b) inibidores seletivos da COX-1. Descobertos em 1899 a Aspirina (ácido acetilsalicílico, ASA) que foi introduzida como o primeiro fármaco potente para o tratamento de doenças reumáticas e inflamatórias (SMITH et al., 2000; VANE et al., 1998).

Entre 1960 e 1980 foram desenvolvidos outros agentes antiinflamatórios tais como: ibuprofen, indometacina, diclofenaco e naprofen e todos estes agentes possuem função de carboxilato que se ligam no sítio de ligação do ácido araquidônico, formando um par de íons com a Arg-120 na parte inferior do sítio ativo da COX (DANNAHARDT; KIEFER, 2001). Estes fármacos apresentam as mesmas propriedades terapêuticas, e também são responsáveis por lesões no trato gastrointestinal e toxicidade renal que leva a ulcerações e sangramentos, podendo até levar a morte do paciente (FOSSLIEN et al., 1998; POUNTOS et al., 2011).

As atividades dos fármacos clássicos não são específicas para uma ou outra das isoformas de COX, e reduzem tanto a produção de PGs no sítio da injúria (via inibição da COX-2) quanto a formação fisiológica de PG no estômago e rins (via inibição da COX-1). Em vista dessas observações, foram desenvolvidos inibidores seletivos para COX-2, conservando seus efeitos analgésico e antiinflamatório, e diminuindo os efeitos adversos no trato gastrointestinal (CHARLIER, 2003; GOLDEMBERG et al., 1999; SMITH et al., 2000).

**Figura 4.** Ligação do AINE (azul) no sítio ativo das enzimas COX-1 (A) e COX 2 (B).



Fonte: Smith et al., 2000.

Nimesulida, Meloxicam e Etodalac foram a primeira geração destes compostos, que preferencialmente inibiam a forma induzível e apresentavam menos efeitos adversos. A principal característica destes compostos é a ausência de grupo carboxilato, presente nos AINEs clássicos, e geralmente a presença de Sulfeto ( $-SO_2-$ ) ou uma Sulfonamida ( $SO_2NH_2-$ ), os quais podem interagir com Arg 513 na dobra lateral hidrofílica no sítio ativo da COX-2 (VANE et al., 1998).

Dois compostos, celecoxibe e rofecoxibe foram lançados para o tratamento de processos inflamatórios (DANNAHARDT et al., 2000; HAEGGSTROM et al., 2010). Os coxibes também foram fármacos candidatos para o tratamento e prevenção de câncer de cólon via inibição da COX-2 (HAEGGTROM et al., 2010).

Estudos clínicos e experimentais mostraram que inibidores seletivos da COX-2 são agentes antiinflamatórios efetivos que apresentam baixo risco de toxicidade gastrointestinal (CANNON; BREEDVELDC, 2001). No entanto, vários estudos mostraram que estes inibidores poderiam conferir risco cardiovascular e, com isto, os tratamentos para câncer de cólon com rofecoxibe

foram suspensos (BRESALIER et al., 2005). A hipótese largamente aceita para este risco é que o coxibe bloqueia COX-2 dependente da síntese de PGI<sub>2</sub>, principalmente no endotélio, podendo aumentar uma resposta trombótica e acelerar o processo de aterogênese (FRIES et al., 2006).

RIMON e colaboradores em 2010 relataram que as COX-2 são inibidas preferencialmente por bloqueadores chamados coxibes, o grupo relatou que celecoxibe e outros coxibes também se ligam firmemente a subunidade da COX-1. Embora, o celecoxibe estando ligado a um monômero da COX-1 não afeta o processo catalítico normal da enzima em catalizar o ácido araquidônico pela segunda subunidade da mesma enzima e produzir prostaglandina normalmente. Coxibes, em concentrações que não inibem a atividade catalítica da COX-1, interferem com a habilidade dos AINEs, principalmente a Aspirina em inibir COX-1 *in vitro* (OUELLET et al., 2001; ROSENSTOKE et al., 1999). Isto sugere que inibidores da COX-2 são capazes de se ligarem a COX-1 e de algum modo, competir com a ação dos AINEs na COX-1, sem afetar a oxigenação do ácido araquidônico. (GLADDING et al., 2008; GROSSER et al., 2006; WILNER et al., 2002).

Após os conflitos gerados pelos inibidores da COX-2, foi necessário o desenvolvimento de novas gerações de inibidores, entre eles estão os AINEs liberadores de óxido nítrico (NO-AINEs), tendo como alvo a prostaglandina E sintase tipo 1 microsomal (mPGE-1) (SAMUELSSON et al., 2007; WALLACE; DEL SOLDATO, 2003). Esta enzima é uma proteína integral de membrana, a qual é induzida por citocinas pró-inflamatórias e mitógenos ligados a COX-2, e as suas ações conjuntas parecem ser responsáveis pela biossíntese de PGE<sub>2</sub> na inflamação (SAMUELSSON et al., 2007).

Os inibidores de prostaglandinas podem exibir três tipos diferentes de inibição: competitiva reversível, irreversível e não competitiva reversível (MITHELL et al., 1994; ROTH et al., 1975). Aspirina, por exemplo, acetila irreversivelmente a Ser 530 da COX-1 e COX-2 na região aminoterminal da enzima (ROTH et al., 1975; RIMON et al., 2010).

Aspirina usada em baixas doses, preferencialmente inibe COX-1 em plaquetas circulantes, atenuando a síntese de tromboxano e prevenindo a trombose, assim conferindo um papel cardioprotetivo (GROSSER et al., 2006). E ainda, na presença da Aspirina a COX-2 é acetilada e capaz de converter o ácido araquidônico em 15R-HETE, o qual é o substrato para a produção de 15-epi-LXA<sub>4</sub>, também chamada Lipoxina iniciada pela Aspirina (ATL), Lipoxinas e ATL possuem atividades anti-inflamatórias como pró-resolvinas (CLARIA et al., 1995; MOLINA-BERRÍOS et al., 2013; SERHAN et al., 2008).

Outro inibidor bastante utilizado, a indometacina, causa uma inibição da COX-1 e da COX-2, e esta inibição diminui com o passar do tempo (KURUMBAIL et al., 1996).

### 1.3 EICOSANOIDES E DOENÇA DE CHAGAS

Existem evidências de que a PGE<sub>2</sub> está aumentada em várias infecções parasitárias, tais como aquelas causadas por *Cryptosporidium parvum* (ARGENSIO, RHOADS, 1997), *Toxoplasma gondii* (YONG et al., 1994), *Leishmania donovani* (REINER; MALEMUD, 1985), *Leishmania major* (CILLARI et al., 1986) e *T. cruzi* (CARDONE; ATUNEZ, 2004; CELENTANO et al., 1995; PINGE-FILHO et al., 1999). PGs juntamente com o NO e TNF- $\alpha$  participam de um complexo circuito que controla a linfoproliferação e produção de citocinas durante a fase aguda da infecção com *T. cruzi* (PINGE-FILHO et al., 1999).

As PGs são imunomoduladores potentes e contribuem para a imunossupressão observada durante a infecção com *T. cruzi* (PINGE-FILHO et al., 1999). A descoberta de que tripanosomatídeos como *T. cruzi* produzem PGs (Revisado por KUBATA et al., 2007), indica que as PGs derivadas de *T. cruzi* exercem algum papel na patogenia da doença de Chagas. Em adição, o efeito supressor de PGE<sub>2</sub>/TGF- $\beta$  sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias (FADOK, 1998) poderia criar um ambiente favorável para o crescimento de *T. cruzi* dentro dos macrófagos. Entretanto, estudos que utilizaram diferentes AINEs para determinar o papel das PGs no controle da carga parasitária e resistência à

infecção com *T. cruzi* são discrepantes (CELENTANO et al., 1995; FREIRE-DE-LIMA, 2000; PINGE-FILHO et al., 1999; TATAKIHARA et al., 2007).

Na fase aguda da doença de Chagas, vários tipos de eicosanoides são produzidos, além de  $PGE_2$ . Plasma de animais que foram infectados, a partir do décimo dia pós-infecção, apresentaram aumento nos níveis de  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGI_2$ ,  $TXA_2$  e  $PGE_2$  (TANOWITZ et al., 1990; PINGE-FILHO et al., 1999; CARDONE; ANTUNES, 2004) quando comparado com camundongos não infectados. Machado e colaboradores, (2011) determinaram que as principais prostaglandinas presentes durante a infecção com *T. cruzi* são  $TXA_2$  e  $PGF_{2\alpha}$  (ASHTON et al., 2007), indicando que o hospedeiro é a fonte de elevados níveis de  $PGI_2$  e  $PGE_2$ .  $PGE_2$  é liberada a partir de macrófagos ativados e linfócitos TCD8+ (OLIVEIRA et al., 2010; STERIN-BORDA et al., 1996).

Pesquisadores tem sugerido que o papel primário das prostaglandinas está relacionado em modular a resposta imunológica do hospedeiro, aumentando a probabilidade de transição da fase aguda para a fase crônica (KRISTENSSON et al., 2010; PINGE-FILHO et al., 1999; STERIN-BORDA et al., 1996). Durante a fase aguda, foi mostrado que  $PGE_2$  modula a virulência de algumas cepas de *T. cruzi*. Cepa não letal (K98-2) induziu a produção de elevados níveis de  $PGE_2$  circulante, enquanto cepas letais (RA ou K98-2) não (CELENTANO et al., 1995). E a inibição da atividade da COX (liberação de  $PGE_2$ ) aumentou a mortalidade de camundongos infectados com a cepa K98-2, mas a infusão de  $PGE_2$  não atenuou a virulência da cepa RA. O efeito da  $PGE_2$  pode originar de fontes diferentes. Além disso,  $PGE_2$  é essencial para a supressão de  $TNF-\alpha$  e linfoproliferação pelo hospedeiro durante a infecção aguda em pacientes e camundongos (BORGES et al., 1998; DE BARROS-MAZON et al., 2004, PINGE-FILHO et al., 1999). E a inibição da síntese de  $PGE_2$  reduz o número de ninhos de parasitos, infiltrado inflamatório e fibrose cardíaca, durante a fase aguda da doença (ABDALLA et al., 2008).

Durante a fase inflamatória aguda da infecção com *T. cruzi*, ocorre a expressão de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores. As citocinas inflamatórias e mediadores lipídicos são essenciais para a sobrevivência do

hospedeiro durante a fase aguda da infecção (BORGES et al., 2009; HIDEKO TATAKIHARA et al., 2008).

Prostanoide liberado do parasito, primariamente  $TXA_2$ , parece ajudar na sobrevivência do hospedeiro durante a fase aguda da infecção e na transição para a fase crônica (ASHETON et al 2007). Plaquetas, produtoras de  $TXA_2$  exerce atividade tripanocida direta (MOMI et al., 2000) e, durante o curso da infecção aguda, ocorre trombocitopenia caracterizada pelo aumento da agregação plaquetária, o que limita a ação anti-parasítica destas células (TANOWITZ et al., 1990).  $TXA_2$  também apresenta propriedades imunossupressivas, gerando o mínimo de patologias em camundongos selvagens, mas camundongos nocautes para o receptor de  $TXA_2$  exibiram pronunciada inflamação no miocárdio com aumento da carga parasitária no tecido cardíaco (ASHETON et al., 2007).

Durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, macrófagos e células esplênicas de camundongos produzem altos níveis de  $PGE_2$  (BORGES et al., 1998).  $PGE_2$  e outros eicosanoides podem contribuir para o remodelamento cardíaco e outros déficits funcionais do coração após infecção com *T. cruzi*. Logo, a inibição da enzima cicloxigenase (COX) do hospedeiro emerge como um potencial alvo terapêutico (MOLINA-BERRIOS, et al., 2013).

Por outro lado, alguns mediadores lipídicos dirigem a inflamação aguda, enquanto outros mediadores endógenos fazem um balanceamento desses eventos pró-inflamatórios. Em adição, LTs, lipoxinas e 15-epi-LXA<sub>4</sub> apresentam papel como pró-resolvinas em reações inflamatórias. (MADERNA; GODSON, 2009; RYAN; GODSON, 2010; STABLE; GILROY, 2010). Sendo que a 15-epi-LXA<sub>4</sub> é capaz de inibir IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, NF $\kappa$ B, ERK1/2 e o ativador do p38 (WANG et al., 2011).

Recentemente tem sido mostrado o efeito da ASA em acetilar a COX-2 (MOLINA-BERRÍOS et al., 2013.). A inibição da COX-2 com ASA está associada com a síntese de outros produtos lipídicos derivados do AA sendo alguns com propriedades antiinflamatórias como a 15-epi-Lipoxina A<sub>4</sub> iniciada por ASA ou (ATLs) (MOLINA-BERRÍOS et al., 2013; SPITE et al., 2010). Os dados de Molina-Berríos e colaboradores (2013) mostraram que camundongos infectados

com *T. cruzi* e tratados com ASA nas doses de 25 ou 50mg/Kg/dia produziram 15-epi-LXA<sub>4</sub>, a qual produziu um efeito protetor aos camundongos infectados. De fato, estudos anteriores, indicam que os eicosanóides presentes na fase aguda da infecção agem como imunomoduladores, que auxiliam a transição da fase aguda para a fase crônica da doença (STERIN-BORDA et al., 1996).

Em contraste a fase aguda, enquanto os níveis plasmáticos de múltiplos prostanóides são elevados, somente os níveis de TXA<sub>2</sub> são aumentados na fase crônica (CARDONI, ANTUNES, 2004).

TXA<sub>2</sub> é o prostanóide detectado em maior quantidade no plasma, porém outros eicosanóides tem papel significativo na fase crônica da doença. Linfócitos T de pacientes chagásicos crônicos afetam a função cardíaca, e em modelos de ratos promoveram a remodelação tecidual (DE BRACCO et al., 1984). Produtos da LO (primariamente LTC<sub>4</sub>) liberados dos linfócitos tiveram efeitos positivos sobre a função cardíaca, enquanto produtos da COX (principalmente PGE<sub>2</sub>) exerceram ação inotrópica depressora.

Na doença crônica, TXA<sub>2</sub> promove dano tecidual especialmente no coração e também pode exacerbar a apoptose de mioblastos e aumentar a progressão da cardiomiopatia levando à falência cardíaca, sendo esta, a maior causa de morte em pacientes. Para suportar esta hipótese, camundongos com infecção crônica com *T. cruzi*, e tratados com ASA, apresentaram uma melhora na função cardíaca, na função plaquetária e tônus vascular. Desta forma, a secreção de TXA<sub>2</sub> na fase crônica, parece prevenir a iniciação de uma resposta imune adaptativa pelo hospedeiro (KABASHIMA et al., 2003) favorecendo a manutenção da fase crônica da doença. Assim sendo, a liberação de TXA<sub>2</sub> na fase crônica promove um melhor controle na proliferação dos parasitos. Foi sugerido que TXA<sub>2</sub> derivado de *T. cruzi* é um possível “quorum sensor” para o parasito (ASHETON et al., 2007). No entanto, a liberação de TXA<sub>2</sub> pelo parasito é insuficiente para suprimir a parasitemia periférica na doença crônica. Isto indica a necessidade da expressão de TXA<sub>2</sub> pelo hospedeiro, para controlar a severidade da doença na fase crônica (MACHADO et al., 2011).

### 1.3.1 Regulação endógena de eicosanoides durante a doença de Chagas experimental

Tem sido observado que a liberação de eicosanoides durante a infecção com *T. cruzi* regula a resposta do hospedeiro e controla a progressão da doença (ASHETON et al., 2007). O papel desses lipídios bioativos na doença de Chagas aguda e crônica ainda não está bem esclarecido. No entanto, estudos recentes tem mostrado que tripanossomas são capazes de realizar o metabolismo do ácido araquidônico. Portanto a interpretação da importância desses lipídios bioativos na patogênese da doença de Chagas é bastante complicado, no caso, o hospedeiro ou o parasito é a fonte primária de síntese desses lipídios bioativos (KABUTUTU et al., 2003; KUBATA et al., 2002). Apesar dessas incertezas, está claro que os eicosanoides apresentam papéis essenciais na patogênese da doença de Chagas experimental. Pois a deficiência de ácidos graxos (incluindo o AA) resultou na redução de 63% da parasitemia e aumentou mais que o dobro a taxa de sobrevivência durante a fase aguda da doença. (SANTOS et al., 1992).

A taxa de síntese dos eicosanoides é maior em camundongos resistentes que em suscetíveis ao parasito (CARDONI; ANTUNES, 2004). Eicosanoides liberados de *T. cruzi*, podem contribuir para a diferenciação e fagocitose do parasito (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000) e sobrevivência (STERIN-BORDA et al., 1996) pois agem como imunomoduladores para ajudar na transição e manutenção da fase crônica da doença. Para suportar este conceito, foi mostrado que células mieloides CD11b+ de animais infectados produziram prostaglandina que mediaram a perda de populações de células B imaturas por apoptose, com isto, estabelecendo a defesa do hospedeiro e favorecendo a fase crônica da doença (ZUNINGA et al, 2005).

### 1.3.2 Metabolismo de lipídios e eicosanoides por *Trypanosoma cruzi*

A organela cinetoplasto, presente nos tripanossomatídeos, apresenta via biossintética especializada e adaptável para o metabolismo de lipídios, que reflete o extremo ambiente que eles precisam suportar, durante seu ciclo de vida. A via biossintética dos protozoários sintetiza ácidos graxos usando sintases do tipo I ou tipo II (COX, 1982; LEE et al., 2006). Diferente das células dos mamíferos, *T. cruzi* e *T. brucei* utilizam elongases para a síntese de quase todos os ácidos graxos (LEE et al., 2006; LIVORE et al., 2007). Quatro novos genes para elongases foram identificados para *T. brucei* e cinco para *T. cruzi* (LEE et al., 2006; LIVORE et al., 2007).

Síntese de eicosanoides começa com a liberação do ácido araquidônico dos fosfolipídios de membrana por ação de fosfolipases que clivam a cadeia acil Sn-1. Atividades da PLA1 e PLA2 foram reportados para *T. cruzi* e *T. brucei* (BELAUNZARAN et al., 2007; CONELLY; KIERSZENBAUM, 1984; OPPERDOES; VAN ROY, 1982; SAGE et al., 1981; SHUAIBU et al., 2001). Em todos os casos, a atividade estava associada à membrana e dependente de liberação de  $Ca^{2+}$ . Conelli e Kierszenbaum (1984) mostraram que a presença da PLA2, causou alterações na membrana do parasito, aumentando significativamente a associação entre *T. cruzi* e macrófagos e células não fagocítica. No entanto, a atividade foi aumentada em tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. Em tripomastigotas metacíclicos ocorreu a liberação de PLA1 com aumento de secreção desta enzima (BELAUNZARAN et al., 2007).

$PGF_{2\alpha}$  é a espécie dominante de eicosanoides produzidos por *Leishmania* e *T. brucei*, seguido por pequenas quantidades de  $PGE_2$  e  $PGD_2$  (KABUTUTU et al., 2003; KUBATA et al., 2000; OPPERDOES; VAN ROY, 1982). Interessante, *T. cruzi* preferencialmente sintetiza  $TXA_2$  (ASHETON et al., 2007) com pequenas quantidades de  $PGF_{2\alpha}$  e baixo nível de  $PGD_2$ .  $PGF_{2\alpha}$  sintase (TcOYE) é similar a de leveduras (old yellow enzyme) e *T. brucei* (TbPGFS) (KABUTUTU et al., 2003; KUBATA et al., 2000, 2002). A atividade enzimática destas enzimas é resistente a agentes farmacológicos como (ASA e Indometacina) os quais inibem enzimas de

mamíferos, indicando que os sítios ativos são topograficamente e estruturalmente diferentes (KABUTUTU et al., 2003).

Ambas as enzimas, TcOYE e TbPGFS apresentam funções de resistência aos fármacos. Em *T. cruzi* TcOYE é essencial para resistência a agentes farmacológicos (KUBATA et al., 2002) e foi observado que a transcrição de TcOYE foi seis vezes maior em cepas de *T. cruzi* resistentes ao Benzonidazol quando comparado com a cepa sensível (MURTA et al., 2006). *T. cruzi* possui quatro cópias de TcOYE mostrando a importância desta enzima para o parasito. Embora a expressão de PGF<sub>2α</sub> sintase foi reportado por outros estudos (ANDRADE et al., 2008; DOST et al., 2004) os seus resultados não corroboraram a relação entre a expressão de PGF<sub>2α</sub> sintase e resistência aos fármacos. A razão para isto pode ser a presença adicional de NADPH oxireductase da família do citocromo P-450 em *T. cruzi* (PORTAL et al., 2008). É possível que a produção desses mediadores lipídicos por *T. cruzi*, seja exclusivamente para manipular a resposta do hospedeiro a infecção e garantir a sobrevivência e transmissão do parasito.

#### **1.4 PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA DOENÇA DE CHAGAS**

O NO tem sido objeto de diversas pesquisas desde a descoberta de seus efeitos biológicos (FURCHGOT; ZAWADSKI, 1980). É considerado um radical livre e atua como molécula mensageira em diversos processos fisiológicos, como regulação do tônus vascular e neurotransmissor, através do estímulo da síntese de GMP cíclico (BLOODSWORTH et al., 2000).

Quando o óxido nítrico (NO) entrou formalmente no cenário da imunologia, entre 1985 e 1990, o seu papel foi simplesmente definido como: NO é um produto de macrófagos ativados por citocinas e componentes de microrganismos ou ambos; é derivado do aminoácido L-arginina devido a atividade enzimática da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (NATHAN, 1992).

Tem sido reconhecido que NO apresenta vários papéis no sistema imunológico, bem como em outros órgãos. Além dos macrófagos, um grande

número de tipos celulares do sistema imunológico produz e responde ao NO, tais como: células dendríticas, células NK, mastócitos, monócitos, micróglia, células de Kupffer, eosinófilos e neutrófilos, além de outras células envolvidas em reações imunológicas como: células endoteliais, células epiteliais, condrócitos, hepatócitos, células mesangial e células de Schwan (BOGDAN, 2000; COLEMAN, 2001).

O NO é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxico devido a presença de um elétron extra que o torna um agente químico altamente reativo. Quando diluído, o NO tem uma meia vida de menos de 10 segundos devido a sua rápida oxidação a nitrito ( $\text{NO}^-_2$ ) e nitrato ( $\text{NO}^-_3$ ) (HEVEL et al., 1991; MAYER et al., 1991; MARLETTA et al., 1988; MULLIGAN; HEVEL; MARLETTA, 1991).

A produção de NO ocorre por meio da ação de um conjunto de enzimas, coletivamente denominadas de óxido nítrico sintase (NOS), que desaminam a L-arginina para liberar o NO, levando a co-produção de L-citrulina (BLOODSWORTH et al. 2000; MULLIGAN; HEVEL; MARLETTA, 1991). Inicialmente, a reação gera um composto intermediário, a  $\text{N}^G$ -hidroxil-L-arginina e ocorre na presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio (NADPH),  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{O}^{-2}$ .

A atividade do NO não é restrita ao sítio da sua produção, como é um gás, o radical NO é altamente difusível. Em contraste às citocinas, a interação do NO não é restrita a um simples receptor definido, NO pode reagir com outras moléculas inorgânicas tais como: oxigênio, superóxido ou metal de transição, estruturas no DNA (bases pirimidinas) grupos prostéticos como (heme) ou proteínas (levando a S-nitrosilação de grupos Tiois, nitração de resíduos de tirosinas (MARSHALL et al., 2000). Considerando que muitos dos alvos do NO são moléculas reguladoras, por exemplo fatores de transcrição e componentes de várias cascatas de sinalização, é evidente que o NO frequentemente exerce diversos efeitos fenotípicos e heterogêneos (BOGDAN, 2001).

Existem várias formas de NOS, podendo diferir quanto à disposição dos tecidos, peso molecular e propriedades físicas e funcionais. Há pelo menos três genes que sofrem “splicing” alternativos para a produção dessa

enzima (BREDT et al., 1991; LAMAS et al., 1992; LOWENSTEIN et al., 1993). As isoformas de NOS podem ser agrupadas em, óxido nítrico sintase induzível (iNOS), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A nNOS e eNOS são encontradas no sistema nervoso central e no endotélio vascular, respectivamente, e produzem constitutivamente baixas quantidades de NO (BLOODSWORTH et al., 2000; MONCADA et al., 1991; PALMER et al., 1998). As isoformas nNOS e eNOS são conhecidas coletivamente como constitutivas (cNOS), isto porque, diferente da iNOS elas são expressas constitutivamente nas células e são primariamente reguladas pelo fluxo de  $Ca^{2+}$  e subsequente ligantes de calmodulina (MACMICKING et al., 1997). Sua expressão não está restrita a neurônios ou células endoteliais, embora as três isoformas catalizam a mesma reação, a conversão da L-arginina e oxigênio molecular a  $N^G$ -hidroxi-L-arginina, e além disso, à citrulina e NO. Essas enzimas diferem com respeito a sua regulação, sua amplitude, sua duração de produção de NO e sua distribuição celular e tecidual (MACMICKING et al., 1997; STUEHR, 1999).

Ambas, iNOS ou eNOS tem sido encontradas em macrófagos, células dendríticas, células NK e em linhagens celulares, clones, hibridomas e células B e T de origem tumoral (TAYLOR-ROBINSON et al., 1994; THURING et al., 1995).

A expressão da iNOS é regulada por citocinas e determinada primariamente pela síntese do RNAm para iNOS e sua proteína (CARPENTER et al., 2001; MACMICKING et al., 1997; RODRIGUEZ-PASCUAL et al., 2000). Em contraste a nNOS e eNOS, que existem nas células como proteínas pré formadas, e sua atividade é mudada por elevação da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular ligado a calmodulina em resposta a neurotransmissores ou substâncias vasoativas (STUEHR, 1999). E todas as isoformas de NO sintase, neuronal (nNOS ou NOS1), induzível (iNOS ou NOS2) e endotelial (eNOS ou NOS3) operam no sistema imunológico (BOGDAN, 2000). Ativação do gene promotor de iNOS é um importante modo de regulação da iNOS por citocinas. Muitos são os fatores de transcrição participantes, entre eles o NF $\kappa$ B, AP-1, STAT1 $\alpha$  (sinal tradutor e

ativador da transcrição), IRF-1 (fator regulador do interferon), NF-IL-6 (fator nuclear da interleucina 6) (GANSTER et al., 2001; MACMICKING et al., 1997).

Dependendo da citocina, estímulo de microrganismos ou o tipo de células, diferentes vias de sinalização estão envolvidos que promovem (por exemplo Janus Kinase Jak1, Jak2 e Tyk2; proteína quinase Raf-1 Erk 1/2 e JNK, proteína quinase C, proteínas fosfatases 1 e 2<sup>a</sup>), ou inibem, (por exemplo fosfoinositol 3 quinase, proteína tirosina fosfatases) a expressão de iNOS (BOGDAN, 2000; CHAKRAVORTTY et al., 2001; CHAN et al., 2001; KRISTOF et al., 2001).

NO sozinho exerce efeitos bifásicos na transcrição da iNOS. Baixa concentração de NO, como ocorre no início da estimulação do macrófago por citocinas, ativa NFκB e aumenta a produção de iNOS. Alta concentração tem efeito oposto, o qual pode prevenir a super expressão de iNOS (CONNELLY et al., 2001; UMANSKY et al., 1998). Aumento da degradação da proteína iNOS é um dos vários mecanismos pelos quais o TGF-beta suprime a produção de NO em macrófagos (MACMICKING et al., 1997). Ambas, iNOS e nNOS são controladas por degradação de proteína envolvendo a via de proteassoma (FELLEY-BOSCO et al., 2000; MUSIAL; EISSA, 2001; NOGUSHI et al., 2000).

A iNOS catalisa a conversão de arginina em citrulina, liberando gás óxido nítrico (NO) difundível. Este pode combinar com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) gerado pela enzima fagócito-oxidase nos fagossomos ácidos, para produzir peróxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) altamente reativo, que pode matar diferentes tipos de microrganismos (DE GROOTE et al., 1999).

Em modelos experimentais para o estudo da DC, a inibição farmacológica da iNOS inibe a capacidade microbicida do macrófago e promove aumento da parasitemia (MARTINS et al., 1998; SILVA et al., 1995). Dentro do fagolisossomo de macrófagos ativados, *T. cruzi* é exposto a espécies reativas de oxigênio formadas pela NADPH oxidase, formando o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), e através de dismutação forma o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Além disso, a indução da óxido nítrico sintase (iNOS) por citocinas pró inflamatórias leva a produção de NO. Nem O<sub>2</sub><sup>-</sup> ou NO por si só são citotóxicos, mas muitas das suas

ações parasiticidas dependem de suas reações para formar o  $\text{ONOO}^-$ , um potente oxidante o qual é capaz de ocasionar nitração de proteínas do parasito, agindo como um mecanismo antiparasitário (ALVAREZ et al., 2004; NAVILIAT et al., 2005; TRUJILLO et al., 2013). E ainda, os macrófagos tem um importante papel contra a infecção por *T. cruzi*, via a produção de superóxido, NO e  $\text{ONOO}^-$ . Este último radical tem se mostrado altamente tóxico contra epimastigotas de *T. cruzi*, por uma via dependente do  $\text{Ca}^{2+}$ .

O  $\text{Ca}^{2+}$  está envolvido em muitas funções do parasito, sendo a sua concentração intracelular dirigida por vários sistemas de transporte, tanto em compartimentos mitocondrial e não mitocondrial. (ALVAREZ et al., 2004; THOMSOM et al., 1999). Foi relatado o efeito do  $\text{ONOO}^-$  no sistema de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{ONOO}^-$  em concentrações biologicamente relevantes, produzido dentro dos fagolisossomos (250-750 $\mu\text{M}$ ) inibiu a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  de maneira dose dependente, pois o radical diminuiu o potencial de membrana; além disso, decresceu a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  não mitocondrial, e concomitantemente inativou a atividade de ATPase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  do parasito. Logo, a quebra da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo  $\text{ONOO}^-$  pode contribuir para o efeito citotóxico do macrófago contra *T. cruzi* (THOMSOM et al., 1999).

A resistência à infecção por *T. cruzi* também está associada com a capacidade dos linfócitos produzirem  $\text{IFN-}\gamma$  e  $\text{TNF-}\alpha$  (MUÑOS FERNANDES et al., 1992). Estas citocinas induzem o macrófago a produzir NO, que na presença de  $\text{O}^{2-}$  gera o  $\text{ONOO}^-$  que se difunde rapidamente e exerce citotoxicidade contra o parasito controlando a multiplicação intracelular de *T. cruzi*, (ALVAREZ et al., 2011; VESPA, 1994; GAZZINELLI et al., 1992). Isso ocorre através da ativação das vias JAK/STAT e NF- $\kappa\text{B}$  (XIE et al., 1993). Entretanto, Cummings e Tarleton (2004) utilizando linhagens de camundongos deficientes para iNOS, mostraram que estes animais apresentaram sobrevida semelhantes aos animais selvagens. Resultados semelhantes foram observados quando camundongos foram desafiados com a cepa Sylvio (MARINHO et al., 2007). Desta forma, estes estudos colocam em dúvida o papel do NO durante a fase inicial da infecção por *T. cruzi*. Estes achados contraditórios podem ser explicados se considerarmos que

os estudos utilizaram diferentes cepas e linhagens de camundongos. Em adição ao questionamento sobre o papel do NO na infecção experimental, há indicação de que a participação do NO é estágio-dependente, ou seja, o NO participa no controle da infecção somente na fase aguda (SAEFTEL et al., 2001).

Há um número crescente de evidências indicando a participação de linfócitos e dos produtos dos macrófagos na indução de mielossupressão durante a infecção por *T. cruzi*. Essas alterações que ocorrem no sangue e na medula óssea de camundongos infectados por *T. cruzi* (fase aguda) (CARDOSO, BRENER, 1980; MARCONDES et al., 2000) podem ser consequências da supressão desencadeada por NO e por citocinas ou pelo próprio parasito (PINGE-FILHO et al., 1999).

Atividades supressoras na medula óssea tem sido atribuídas à ação de citocinas, como IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e MIP-1 $\alpha$  (BINDER et al., 1997; COOK, 1996; MOLDAWER et al., 1989). Dados obtidos em nosso laboratório mostraram que a anemia que se desenvolve em camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* é independente de NO (MALVEZI et al., 2004). Além disso, foi mostrado que o uso de inibidores de prostaglandinas ou o bloqueio da produção de TNF- $\alpha$  provocaram aumento dramático de reticulócitos em camundongos C57BL/6, esse aumento ocorre no momento de maior supressão (dia 14 de infecção) e foi revertido pelo bloqueio da produção de NO com aminoguanidina, bloqueador de iNOS (MALVEZI et al., 2004; HIDEKO TATAKIHARA et al., 2008).

## **1.5 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS**

### **1.5.1 Inibidores da Biossíntese de Esterol**

*Trypanosoma cruzi* requer esteróis para a viabilidade e proliferação celular em todos os estados do seu ciclo de vida, é extremamente suscetível a inibidores da biossíntese de ergosterol (EBI), os quais agem em diferentes níveis dessa via “*in vitro*” (URBINA et al., 2001, 2002). Estudos

realizados no Brasil tem mostrado que (EBIs) comercialmente disponíveis (Cetoconazol ou Itraconazol), são altamente eficazes no tratamento de fungos, os quais são inibidores do citocromo P-450 dependente de C14 $\alpha$  esterol demetilase. Estes inibidores não são suficientemente capazes de eliminarem *T cruzi*, de animais e humanos cronicamente infectados, ou parar a progressão da doença. (URBINA et al., 2001 e 2002). Em contraste, Apt e colaboradores no Chile tem mostrado que Itraconazol administrado 6 mg por Kg durante 120 dias, em pacientes com doença de Chagas crônico, marcadamente reduziu o número de testes positivos para Xenodiagnóstico. Foi capaz de regredir (50% dos casos), ou prevenir (97,8% dos casos) anormalidades eletrocardiográficas (APT et al., 1998; APT et al., 2003), embora todos os pacientes tratados mantiveram sorologia positiva para *T cruzi*, após nove anos de acompanhamento (CANÇADO, 1999; SOSA ESTANI et al., 1999).

Na década passada novos derivados do triazol, os quais também são inibidores do citocromo P-450 dependente do C14 $\alpha$  esterol demetilase, como o D0870 e o Posaconazol (SCH 56592), em fungos e protozoários, foram capazes de induzir a cura parasitológica da doença de Chagas crônica e aguda em modelos murinos (URBINA et al., 2001 e 2002). Estes são os primeiros compostos reportados que mostraram atividade curativa contra a doença de Chagas crônica e aguda. Estes compostos foram capazes de erradicar cepas de *T cruzi* resistentes a Nitrofuram e Nitroimidazol em camundongos infectados, porém, levando a imunossupressão do hospedeiro (URBINA et al., 2001 e 2002).

### 1.5.2 INIBIDORES DE Cisteína Protease

*Trypanosoma cruzi* contém uma catepsina ligada a uma cisteína protease chamada de cruzipaina ou gp51/57 a qual é responsável pela maior atividade proteolítica de todos os estágios de vida de *T cruzi*. (CAZZULO et al., 2002; CAFFREY et al 2000). Inibidores seletivos desta protease bloqueiam a proliferação de ambas as formas: epimastigota extracelular e amastigota intracelular *in vitro*, indicando que esta enzima realiza funções essenciais para o

crescimento e sobrevivência do parasito. (CAZZULO et al., 2002; CAFFREY et al., 2000). Ainda tem sido mostrado que a cruzipaina medeia a proteólise e metabolismo de pirofosfatos, e inibidores seletivos “*in vivo*” e “*in vitro*” tais como: peptidyl diazomethylketones; peptidyl fluoromethyl ketones, estes compostos são capazes de bloquear as etapas de diferenciação no ciclo de vida, e efetivamente matar o parasito (URBINA et al., 2003). N-methyl-piperazine-urea-F-hF-sulfone-phenyl também é um inibidor irreversível da cruzipaina com atividade tripanocida, prolongando a vida e a cura parasitológica em modelos murinos, na fase crônica e aguda da doença de Chagas (CAZZULO et al., 2002; ENGEL et al., 1998).

### 1.5.3 Inibidores do Metabolismo de Pirofosfatos

Tripanosomatídeos e parasitos apicomplexos, possuem organelas especializadas chamadas de acidocalciossomos que estão envolvidos nos estoques preventivos de polifosfatos, e também na adaptação desses microrganismos em ambiente de estresse (DOCAMPO; MORENO, 2003). A entrada e liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  da matriz acidocalciossomal é regulada por uma série de mecanismos, incluindo uma ATPase transportadora de  $\text{Ca}^{2+}$ , um permutador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , uma ATPase bombeadora de  $\text{H}^+$  e pirofosfatases (DOCAMPO, MORENO, 2003). A proteína farnesyl pirofosfatase sintase (FPPS) presente em mamíferos e também em *T. cruzi* (TcFPPS) é um alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos como os Bisfosfanatos, os quais são (análogos de pirofosfatos inorgânicos, inertes metabolicamente) e são usados para o tratamento de distúrbios de reabsorção de ossos (RODAN, MARTIM, 2000). Bisfosfanatos contendo nitrogênio tem sido ativo contra *T. cruzi* “*in vivo*” e “*in vitro*” sem aparente toxicidade às células do hospedeiro (URBINA et al., 1999). As mais potentes classes de Bisfosfanatos são os que contêm Nitrogênio como: Alendronate, Pamidionate, e Residronate, essas substâncias agem na inibição da enzima farnesyl pirofosfatase sintase resultando no déficit da prenilação da proteína, e em mamíferos este déficit resulta na apoptose de osteoclastos (DANESI et al., 1995; HUGHES et al., 1995). A atividade seletiva dos bisfosfanatos contendo nitrogênio

em *T. cruzi*, resultaria do seu acúmulo no parasita devido a presença do acidocalciossoma (DOCAMPO et al., 1999; URBINA et al., 1999). E este acúmulo de bisfosfanatos podem inibir enzimas envolvidas em reações orgânicas e inorgânicas de pirofosfatos (MONTALVETTI et al., 2001). Bisfosfanatos como o Pamidronate e Alendronate foram ativos contra a forma intracelular do parasito, já o Pamidronate administrado intravenosamente em camundongos na fase aguda da infecção com *T. cruzi* interrompeu o desenvolvimento da parasitemia durante o tratamento (URBINA et al., 1999) .

#### 1.5.4 Inibidores de Purinas

Parasitos tripanossomatídeos são absolutamente deficientes na síntese de novas purinas. Então retiram estes compostos essenciais de seus meios de crescimento. Uma enzima chave desta via é a hipoxantina-guanina-fosforribosil transferase (HGPRT) nestes organismos (STOPPANI et al., 1999).

O alopurinol [4-hidroxipirazol-(3,4 $\alpha$ ) pirimidina], tem sido usado por muitas décadas em humanos para o tratamento de gota (artrite), isto porque o alopurinol é transformado em vertebrados a oxipurinol, um potente inibidor da xantina oxidase.

Em tripanossomatídeos, os quais são deficientes em xantina oxidase, o alopurinol age como um análogo da purina e é incorporado, através do (HGPRT) no DNA do parasito, então interrompendo a síntese de RNA e proteínas. Alopurinol foi mostrado ser ativo em modelos murinos de doença de Chagas, mas com marcada diferenças na susceptibilidade ao fármaco entre diferentes cepas de *T. cruzi* (STOPPANI et al., 1999).

Tem sido relatado vários conflitos da eficácia terapêutica do alopurinol em humanos. Um relato no Brasil, apresentou ineficiência em pacientes com doença de Chagas (LAURIA-PIRES et al. 1988). Apt e colaboradores em 1998, mostraram que o alopurinol administrado 8,5 mg por dia, durante 60 dias, resultou na negatividade do teste de Xenodiagnóstico em alta porcentagem em pacientes crônicos no Chile. Também foi capaz de reverter em 49% dos casos, ou

prevenir em 75% dos casos, o desenvolvimento de anormalidades no eletrocardiograma (APT et al., 2003).

Várias outras vias bioquímicas têm sido identificadas como potentes alvos quimioterapêuticos em *T. cruzi*, incluindo as enzimas envolvidas na síntese e metabolismo redox da tripanotona [N1, N8-bis (Glutathionil)-espermidina]. Esta via bioquímica é exclusiva no protozoário Kinetoplastida, os quais substituem a glutatona em glutatona redutase, no sistema redox Tiol intracelulares destes microrganismos (KRAUTH-SIEGEL; SCHIMIDT et al., 2002).

Dihidrofolato redutase, é uma enzima que cataliza um passo crucial na via de síntese de nucleotídeos do DNA em tripanossomatídios (GILBERT, 2002). Sendo um potente alvo quimioterapêutico em *Leishmania* e *Trypanosomas*. Entretanto, alguns inibidores destas vias tem atividade seletiva anti-*T. cruzi* “*in vitro*”, porém, não apresentaram ainda atividade “*in vivo*”.

Há também outros compostos com atividade promissoras anti-*T. cruzi* que são os análogos de lisofosfolípidios que possuem atividade contra *Leishmania*, e tem também atividade *in vivo* contra *T. cruzi* em infecções experimentais (SARAIVA et al., 2002). Há também o Prenil e inibidores da N-myristoil transferase, as quais apresentam grande potencial tripanocida (GELB et al., 2003).

#### 1.5.5 Inibidores de Prostaglandinas

Asheton e colaboradores em 2007 mostraram que prostaglandinas derivadas do hospedeiro e derivadas do parasito, potencialmente contribuem para a patogênese da doença de Chagas. Devido a importância dos eicosanoides na infecção com *T. cruzi*, seria de relevância o uso de fármacos que fazem o bloqueio das enzimas ciclooxigenases (COXs), com a administração de agentes anti-inflamatórios não esteroidais (AINES).

Michelin e cols. em 2005 investigou o papel da prostaglandina produzida por COX-2 na imunossupressão observada durante a infecção com *T. cruzi*. Esplenócitos estimulados com Con-A e isolados de camundongos nos dias

5, 10 e 15 pós infecção, liberaram grandes quantidades de PGE<sub>2</sub>, o que foi inibida pelo tratamento do animal com salicilatos de sódio (inibidor preferencial de COX-2) ou meloxicam (inibidor seletivo de COX-2). Foi também observado que o tratamento com meloxicam na dose de 0,5 mg por kg ou etoricoxibe 0,6 mg por Qg, decresceu a síntese de PGE<sub>2</sub> em células esplênicas. Este decréscimo foi acompanhado pela redução do infiltrado inflamatório, redução dos ninhos de amastigotas, redução da fibrose cardíaca e com presença de poucas células positivas para COX-2. (ABDALIA et al., 2008). Entretanto a administração de AINES pode aumentar a mortalidade em pacientes (CELENTANO et al., 1995; STERIN-BORDA et al., 1996). Em infecções experimentais com *T. cruzi*, Hideco Tatakihara e colaboradores (2008), mostraram que o tratamento de camundongos C57BL/6 com aspirina e celecoxibe aumentou dramaticamente a carga parasitária nos dias 7 e 9 pós-infecção e não reverteu a anemia provocada pela infecção com *T. cruzi*. O tratamento com celecoxibe atenuou a trombocitopenia e a leucopenia em camundongos, e também aumentou a produção de óxido nítrico em macrófagos de camundongos C57BL/6.

López-Muñoz e colaboradores em 2010, mostraram que a inibição da síntese de prostaglandina com aspirina, pode aumentar a atividade anti-parasítica do macrófago e aumentar o efeito do nifurtimox e do benzonidazol. E ainda a aspirina decresceu a liberação de tripomastigotas no sobrenadante da cultura de células RAW.7 infectadas com *T. cruzi*.

Camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com ASA no início do curso da infecção, resultou no aumento da parasitemia e mortalidade. Já a administração de ASA durante a fase crônica não apresentou efeito na mortalidade ou parasitemia, porém apresentou melhora na fração de ejeção. ASA inibiu o aumento da liberação de PGF<sub>2</sub>α e TXA<sub>4</sub> em resposta a infecção com *T. cruzi* (MUKHERJEE et al., 2011). Portanto, o tratamento com ASA inibiu a produção de eicosanoides tanto no parasito como no hospedeiro (MUKHERJEE et al., 2011).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

É fato conhecido que macrófagos obtidos de animais sadios são frequentemente parasitados pelo protozoário *T. cruzi* no vertebrado e propiciam ao parasito um ciclo normal de evolução. Kierszenbaum e col. (1974), entretanto, inocularam formas sanguíneas de *T. cruzi* intraperitonealmente em camundongos e observaram que: quer nos macrófagos que eram retirados da cavidade peritoneal a intervalos regulares, quer naqueles retirados logo após a infecção e mantidos *in vitro*, havia uma crescente destruição de parasitos fagocitados. Esses dados são indicativos de que, mesmo em animais normais, não imunizados, os macrófagos estariam envolvidos na resistência. Dvorak e Schmunis (1972) foram ainda mais longe ao mostrar que tripomastigotas obtidos de cultura de tecido não se multiplicam nem sobrevivem em macrófagos peritoneais infectados *in vitro*. Esses achados contrastam com experiências de outros autores (HOFF, 1975 e NOGUEIRA; COHN, 1976) que, em condições semelhantes, cultivaram sem problemas o parasito em macrófagos normais *in-vitro*. Também entram em aparente desacordo com as observações clássicas da literatura, nas quais as células do sistema fagocitário mononuclear são consideradas como particularmente adequadas ao parasitismo por *T. cruzi*.

Desta forma, decidimos investigar os efeitos do bloqueio de COX-1 e de COX-2 sobre o processo de invasão e ativação de macrófagos e mioblastos infectados por *T. cruzi* (cepa Y), visando uma melhor compreensão da participação de eicosanoides no desenvolvimento da DC e que podem indicar novos caminhos para o surgimento de estratégias alternativas para o tratamento da DC humana.

## 2.2 OBJETIVOS E ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos, propomos:

- 1- Investigar os efeitos da inibição da COX-1 e COX-2 sobre a capacidade de invasão de *T. cruzi* em macrófagos e mioblastos, determinando o índice de internalização de formas tripomastigotas de cultura (TCT);
- 2- Avaliar os efeitos do bloqueio de COX-1 e COX-2 sobre a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$  e óxido nítrico por macrófagos infectados por *T. cruzi*;
- 3- Avaliar os efeitos do bloqueio de COX-1 e COX-2 sobre a produção de TGF- $\beta$ , IL-1- $\beta$  e óxido nítrico por mioblastos infectados por *T. cruzi*;
- 4- Avaliar os efeitos do bloqueio de COX-1 e de COX-2 sobre as vias principais de sinalização ativadas durante a internalização de *T. cruzi* tanto em macrófagos como em mioblastos.

### 3 CAPÍTULO 1

#### 3.1 MECANISMOS DE INVASÃO CELULAR PELO PROTOZOÁRIO *Trypanosoma cruzi*

O protozoário *T. cruzi* exibe diferentes formas durante seu ciclo de vida, encontradas em dois hospedeiros, um inseto vetor da ordem Hemiptera (Triatomíneo) e um hospedeiro vertebrado mamífero (CHAGAS 1909; KIRCHHOFF, 1996). As formas evolutivas de *T. cruzi* são reconhecidas por apresentarem forma esférica, piriforme ou alongada e pela posição relativa do núcleo e cinetoplasto e da posição do flagelo em relação à bolsa flagelar (BRENER, 1987; SOUZA, 2000). São elas epimastigota, tripomastigota, amastigota e esferomastigota, sendo essa última encontrada no estômago do inseto vetor e em determinadas situações experimentais *in vitro*.

*T. cruzi* constitui uma população heterogênea apresentando variabilidade genética e bioquímica que determina comportamentos diferentes para as diferentes cepas, o que dificulta a classificação taxonômica e a utilização de substâncias terapêuticas (BRENER, GAZINELLI, 1997). Os diferentes isolados de *T. cruzi* foram agrupados em duas linhagens filogenéticas principais, denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, utilizando marcadores bioquímicos e moleculares (ANONYMOUS, 1999). As cepas do grupo II de *T. cruzi* (CL e Y) infectam células humanas quatro vezes mais que as cepas do grupo I (Tulahuen, M226, Sylvio-X10, Dm30, Dm28 e Guafitas) que estão mais frequentemente associadas ao ciclo silvestre de transmissão (ANONYMOUS, 1999). A cepa Y tem preferência por macrófagos esplênicos, fígado e medula óssea, enquanto as outras infectam principalmente células musculares (MELO; BRENER, 1978) resultando em manifestações clínicas diferentes no curso da infecção. Nos mamíferos, o ciclo evolutivo de *T. cruzi* inicia-se com a penetração de tripomastigotas metacíclicos (TM) eliminados nas fezes e urina do inseto vetor, através da pele lesada ou mucosa (BRENER, 1987; TEIXEIRA, 1987). Evidências indicam que a entrada de *T. cruzi* na célula do hospedeiro pode ocorrer por pelo menos dois processos básicos: endocitose e fagocitose, na endocitose o parasita

é internalizado através de uma via clássica endocítica ou por um processo ativo, no qual o parasita é o agente da invasão. Em ambos os tipos de invasão o parasito induz a atividade de IP3-quinase (VIEIRA et al., 2002; WILKOWSKY et al., 2001). A forma tripomastigota circula na corrente sanguínea e invade as células hospedeiras e, inicialmente, aloja-se no interior de um vacúolo endocítico, o vacúolo parasitóforo (CARVALHO; DE SOUZA, 1989). Estudos morfológicos tem mostrado que quando tripomastigotas entram em contato com macrófagos, ocorre indução, com a formação de protusões na membrana plasmática, que difere da fagocitose que ocorre no caso de amastigotas não infectivas. Em contraste, quando tripomastigotas infectam células não fagocíticas, (epitelial ou células musculares) a superfície celular é minimamente modificada (ROMANO et al., 2012).

Durante a invasão das células não fagocíticas por *T. cruzi* dois eventos são ativados: a) molecular, com recrutamento da proteína autofagossomal (LC3), b) celular, indução de autofagia pela célula do hospedeiro. Foi mostrado que autofagossomos e proteína autofagossomal LC3 são recrutadas no sítio de entrada do parasito (ROMANO et al., 2009).

Após a invasão celular, o protozoário requer um ambiente ácido para que ocorra uma infecção produtiva. O pH baixo no interior dos lisossomos, facilita o escape do parasito do vacúolo parasitóforo para o citoplasma. (ANDRADE et al., 2005). A exposição das formas tripomastigotas a este ambiente ácido é necessária à secreção e atividade da proteína TcTox, atuante na formação de poros na membrana vacuolar. O meio ácido parece, também, ter papel importante no início da diferenciação de tripomastigotas em amastigotas, forma intracelular proliferativa. Esse processo se inicia no vacúolo e termina no citoplasma (BURLEIGH; WOOLSEY, 2002; KIRCHHOFF et al., 1996; TANOWITZ et al., 1992). Depois de escapar do vacúolo, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* se diferenciam em formas amastigotas. Estas por sua vez, permanecem livres no citoplasma da célula hospedeira em estado quiescente, que pode durar por algumas horas. Posteriormente, as formas amastigotas iniciam o processo de

replicação por fissão binária (revisado por SIBLEY et al., 2000). Em seguida, as formas amastigotas diferenciam-se, novamente, em tripomastigotas.

A intensa movimentação gerada pelos parasitas no interior da célula hospedeira promove sua ruptura e, conseqüentemente, a liberação dos tripomastigotas no meio extracelular tornando-os capazes de infectar novas células (BRENER, 1973; SOUZA, 2000). A ruptura da célula parasitada provoca uma reação inflamatória focal, caracterizada pela presença de neutrófilos polimorfonucleares, eosinófilos e células mononucleares, além de congestão e edema (ANDRADE, 2000; PRATA, 1994). Assim sendo, constata-se que a invasão da célula do hospedeiro é um evento crítico no estabelecimento da infecção por *T. cruzi* (revisado por YOSHIDA; CORTEZ, 2008).

As formas tripomastigotas são capazes de parasitar diferentes tipos celulares como fibras musculares cardíacas, esqueléticas e lisas, fibroblastos, macrófagos e células gliais (ANDRADE, 2000). Foi mostrado que *T. cruzi* também pode infectar células L929 sem núcleo, ou seja, a infecção ocorre na ausência de transcrição gênica cromossomal e/ou nucleolar e do processamento do RNA (COIMBRA et al., 2007).

*T. cruzi* pode utilizar diferentes mecanismos de invasão, relacionados com receptores e ligantes disponíveis tanto no parasita quanto na superfície de células-alvo específica. O processo de invasão inicia-se com a adesão do parasita à superfície celular, entretanto, o grau de adesão varia de acordo com a população do parasita, com a forma evolutiva e com a célula-alvo (ARAÚJO-JORGE et al., 1992). Diferentes tipos de carboidratos, presentes nas glicoproteínas e nos glicolipídeos da superfície do parasita e da célula hospedeira, parecem participar desse processo de adesão (CALVET et al., 2004; MEIRELLES et al., 1999). Glicoproteínas de superfície de *T. cruzi* são importantes para mobilização do  $Ca^{2+}$  intracelular, tanto do parasita quanto da célula hospedeira, sendo este fenômeno de grande importância para o processo de interiorização do parasita.

Na grande maioria dos estudos realizados na tentativa de elucidar os mecanismos de invasão das células utilizados pelo protozoário *T. cruzi*, foram

utilizadas formas tripomastigotas metacíclicas (TM) geradas em meio líquido ou a partir de tripomastigota de cultura de tecido (TCT) como sócias das formas encontradas no inseto vetor e no sangue, respectivamente. A análise dos dados da literatura permitem concluir que a sinalização celular é um requerimento essencial para a invasão celular pelo protozoário *T. cruzi*, durante a sua entrada na célula do hospedeiro. As formas TM e TCT utilizam diferentes tipos de moléculas que induzem a transdução de sinal e mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  evento que ocorre na célula do hospedeiro e do parasita (revisado por MAEDA et al., 2012; YOSHIDA 2006; YOSHIDA; CORTEZ, 2008).

De acordo com Schenkman e colaboradores (1991) a adesão dos TM à superfície celular, mediada por receptores, está restrita a certas regiões da membrana. Ruiz e colaboradores (1998) descrevem que a capacidade das formas tripomastigotas, de diferentes isolados de *T. cruzi*, de invadir as células hospedeiras é determinada pela expressão diferencial de glicoproteínas de superfície que exibem atividade sinalizadora de  $\text{Ca}^{2+}$  distinta. Três moléculas de superfície com atividade indutora de  $\text{Ca}^{2+}$  já foram identificadas, são elas: a gp82, gp30 e gp35/50. O papel dessas moléculas durante o processo de invasão celular foi deduzido por meio de experimentos no qual a internalização de TM foi inibida por meio da utilização de glicoproteínas recombinantes ou com o uso de anticorpos monoclonais (CORTEZ et al., 2003; RAMIREZ et al., 1993; RUIZ et al., 1993; YOSHIDA et al., 1998).

Em adição, a análise de moléculas de superfície dos parasitas possibilitou sua divisão em dois grupos distintos quanto à capacidade de invasão, *in vitro*, de células de mamíferos (YOSHIDA, 2006). As populações que apresentam maior capacidade infectante não possuem as glicoproteínas de superfície gp90 e gp35/50. Tripomastigotas dos isolados mais infectivas, como o clone CL Brener, a invasão é mediada por moléculas de superfície, a gp82, que ligam-se à superfície da célula hospedeira ativando o alvo da rapamicina (mTOR), fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e proteína quinase C (PKC) na célula do hospedeiro. Estes alvos estão associados com o rompimento do citoesqueleto de actina, em um mecanismo dependente da mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  dos seus estoques

intracelulares, provavelmente retículo endoplasmático (MAEDA et al., 2012; YOSHIDA et al., 2000). Após a disrupção do citoesqueleto de actina da célula do hospedeiro, segue-se a interação com *T. cruzi* e facilita a mobilização dos lisossomos para a periferia da célula, ocorrendo a fusão com a membrana plasmática e contribuindo para a biogênese do vacúolo parasitóforo (MARTINS et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 1996; TARDIEUX et al., 1992).

Por outro lado, em parasitos de menor capacidade infectante, como a cepa G, a ligação à superfície celular ocorre principalmente através de moléculas de gp35/50 que é pobremente indutor de sinalização de  $Ca^{2+}$  (YOSHIDA et al., 1989). Provavelmente estes isolados requerem para a invasão o recrutamento de F-actina e este evento pode estar associado com a ativação do adenilato ciclase que gera o AMPc (FERREIRA et al., 2006) e promove uma cascata de sinalização menos eficiente. Nesses isolados, a cascata de sinalização é independente de PTK e PLC. O  $Ca^{2+}$  necessário para invasão parece ser liberado para o citosol a partir de vacúolos contendo um sistema de troca iônica  $Ca^{2+}/H^+$ , também chamados acidocalciossomas (revisto por MAEDA et al., 2012; YOSHIDA, 2006).

O envolvimento das moléculas gp82, gp30 e gp35/50 na internalização de TM tem sido caracterizado em células de mamíferos que são fagócitos não profissionais. Experimentos com diferentes isolados de *T. cruzi* mostraram que a taxa de infecção de macrófagos por TM correlaciona com aquela encontrada em células HeLa.

Diversas moléculas de TCT, incluindo a trans-sialidase (TS) e a gp85 participam de maneira importante na invasão de células do hospedeiro (revisado por ALVES, COLLI, 2007). Segundo Andrews (1995) a elevação dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$ , na célula hospedeira, promove o recrutamento de lisossomos para o sítio de entrada do parasita seguido por sua fusão com a membrana e formação do vacúolo parasitóforo. Os lisossomos são deslocados por uma proteína motora associada aos microtúbulos, a cinesina (RODRIGUEZ et al., 1996; TARDIEUX et al., 1992). Além disso, o processo de invasão é facilitado pela ruptura de microfilamentos de actina (TARDIEUX et al., 1992). A elevação dos

níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  promove a fusão dos lisossomos com o plasmalema. Por outro lado, a invasão celular é inibida pela depleção do  $\text{Ca}^{2+}$  livre citosólico ou com pré-tratamento das células com bloqueadores de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  como a toxina pertussis, em contraste, a invasão é aumentada pela exposição da célula a Citocalasina D (TARDIEUX, 1992).

A proteína sinaptotagmina VII, membro da família sinaptotagmina, está presente na superfície dos lisossomos de diferentes tipos celulares e possui um domínio de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ , regulando esse processo (CALER et al., 2001; YOSHIDA, 2006). Outras moléculas de superfície do parasita também participam do processo de invasão celular. Oligopeptidase B (Opb), uma serina endopeptidase expressa pelas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, é capaz de ativar uma cascata de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de PLC e IP3 (BURLEIGH, ANDREWS, 1995; RODRÍGUEZ et al., 1996). A cruzipaina, uma cisteína proteinase expressa em todas as formas do ciclo de vida de *T. cruzi* (PAIVA et al., 1998), também ativa cascatas de sinalização mobilizadoras de  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando assim a eficácia do processo de invasão celular. Já a trans-sialidase (TS) transfere ácidos siálicos  $\alpha$  (2,3)-ligados de glicoproteínas e glicolipídios da superfície da célula-alvo para a superfície do parasita (SCHENKMAN; MORTARA, 1992). O processo de sinalização é importante para o início da adesão do parasita e formação de vacúolos parasitóforos (VP) eficientes. A presença do ácido siálico parece ser fundamental para correta justaposição das membranas do vacúolo nascente e dos tripomastigotas, promovendo a vedação do vacúolo e assim impedindo que *T. cruzi* escape durante o processo de internalização (HALL et al., 1992; LEY et al., 1990; LOPEZ et al., 2002). Mais recentemente, Rubin-de-Celis e colaboradores (2006) mostraram que o aumento na expressão de TS em TCT é responsável pela saída precoce dessas formas infectantes do VP para o citoplasma e subsequente diferenciação para formas amastigotas.

Da Silva e colaboradores (2013) mostraram que camundongos infectados com *T. cruzi*, rapidamente desenvolvem anemia e trombocitopenia. Estes efeitos são parcialmente promovidos pela trans-sialidase presente no

parasito, a qual é liberada no sangue e depleta o ácido sialico presente nas plaquetas, induzindo trombocitopenia durante a fase aguda da infecção.

O tratamento de formas amastigotas com forscolina um ativador da adenilato ciclase aumentou a infectividade tanto do isolado G como do isolado CL em células HeLa, e o tratamento dessas formas com genisteína reduziu a infecção cerca de 45% a invasão do isolado G mas não do isolado CL em células HeLa, indicando a participação diferencial da proteína tirosina quinase durante a invasão dos diferentes isolados de *T. cruzi* (FERNANDES et al., 2006).

Fosfatidilinositol 3 kinase (PI-3 Kinase) e Akt (serina/treonina kinase) também são importantes reguladores do processo de invasão de *T. cruzi* em células não fagocíticas profissionais (WILKOWSKY et al., 2001). As PI-3K regulam o processo de tráfico de membranas, fusão de endossomas e rearranjo do citoesqueleto (DOWNWARD, 2004). Esse processo de sinalização provavelmente modula a invasão mediada por lisossomas ou um outro associado a actina (PROCÓPIO et al., 1999). Além de participar no processo de invasão, a via sinalização PI-3K/Akt também estimula mecanismos pró-sobrevivência nas células parasitadas (CHUENKOVA et al., 2001). Em adição, em células de mamíferos há várias moléculas que seletivamente regulam a montagem do vacúolo endocítico, entre elas foi identificado a Dynamin a qual tem mostrado importante papel no processo de endocitose (SCHIMID et al. 1998). Dynamin é uma família de GTPases apresentando três isoformas: dynamin 1, dynamin 2 e dynamin 3 (PRAEFCKE et al., 2004). E o PI-3K é a proteína clássica que interage com dynamin (OTSUKA et al., 2008). Dynamin interage com a subunidade regulatória p85 do PI3K e esta interação estimula sua atividade de GTPase. Foi mostrado que células fagocíticas e não fagocíticas tratadas com Dynasore, inibidor de dynamin, preveniram drasticamente o processo de entrada de *T. cruzi* em células de mamíferos (BARRIAS et al., 2010).

Outra via de sinalização importante para invasão de *T. cruzi* é a que envolve o fator de crescimento transformador beta (TGF $\beta$ ). TGF $\beta$  é uma citocina que participa de inúmeros eventos celulares como a produção de matriz extracelular, regulação da miogênese, resposta imune, angiogênese e

embriogênese. Experimentos com células epiteliais de pulmão deficientes nos receptores para TGF $\beta$  mostraram que *T. cruzi* é incapaz de infectar essas células (MING et al. 1995). Foi mostrado que o bloqueio farmacológico de TGF- $\beta$  com o composto SB-431542 pode ser uma nova ferramenta no controle da infecção de mioblastos com *T. cruzi* (WAGHABI, et al., 2007).

Em adição, moléculas de superfície do parasita são reconhecidas por um tipo específico de receptor, os receptores do tipo Toll (TLRs) presentes nas células do hospedeiro. Os TLRs são receptores transmembrana do tipo 1 com domínio extracelular com repetições de leucina e uma cauda intracelular carboxi-terminal que contém uma região conservada denominada domínio de homologia Toll/receptor interleucina 1 (TIR). O domínio extracelular é responsável pelo reconhecimento do ligante e pelo processo de dimerização dos receptores, fundamental para sua ativação (WYLLIE et al., 2000). Até o momento 11 TLRs humanos e 13 TLRs murinos foram descobertos (AKIRA et al., 2006). Esses receptores atuam nas respostas imune inata e são parte de um grupo específico de receptores denominados receptores de reconhecimento de padrão (PPRs). Os PPRs reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Um PAMP é uma molécula altamente conservada que é expressa por uma classe de microrganismos e não é expressa pelas células hospedeiras (CAMPOS, GAZZINELLI, 2004; GAZZINELLI, DENKERS, 2006).

Uma nova estratégia de invasão celular por *T. cruzi* foi apresentada por Fernandes e colaboradores (2007). Esses autores mostram que microdomínios ricos em colesterol e GM1 presentes nas membranas celulares de células alvo específicas participam do processo de invasão de formas infectantes de *T. cruzi*.

Estudos *in vitro* da interação de *T. cruzi* com células do hospedeiro nem sempre envolvem células que são alvos da infecção *in vivo*. Células tumorais e linhagens celulares de diferentes origens, comumente utilizadas nesses estudos, não representam verdadeiramente a situação de interação do parasita com células do hospedeiro mamífero (BARBOSA, 1999). Um

dos pontos que ainda permanece em discussão, é o mecanismo de invasão por *T. cruzi* que ocorre em células fagocíticas e fagocíticas não profissionais.

Uma série de estudos tem mostrado que citocalasinas B (CB) e citocalasinas D (CD) bloqueiam a entrada de formas epimastigotas e tripomastigotas em macrófagos, células Vero, e fibroblastos (ALEXANDER, 1975; EBERT; BARBOSA, 1981; HENRÍQUEZ et al., 1981; MEIRELLES et al., 1982; ZENIAN, KIRSZENBAUM, 1983), enquanto outros mostraram que ocorre invasão de formas tripomastigotas em fibroblastos tratados com CB, células MDCK e células HeLa (SCHENKMAN et al., 1991, SCHENKMAN, MORTARA, 1992).

## Research Article

# Aspirin Modulates Innate Inflammatory Response and Inhibits the Entry of *Trypanosoma cruzi* in Mouse Peritoneal Macrophages

Aparecida Donizette Malvezi,<sup>1</sup> Rosiane Valeriano da Silva,<sup>1</sup> Carolina Panis,<sup>1</sup> Lucy Megumi Yamauchi,<sup>2</sup> Maria Isabel Lovo-Martins,<sup>1</sup> Nagela Ghabdan Zanluqui,<sup>1</sup> Vera Lúcia Hideko Tatakihara,<sup>1</sup> Luiz Vicente Rizzo,<sup>3</sup> Waldiceu A. Verri Jr.,<sup>4</sup> Marli Cardoso Martins-Pinge,<sup>5</sup> Sueli Fumie Yamada-Ogatta,<sup>2</sup> and Phileo Pingue-Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Imunopatologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86057-970 Londrina, PR, Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86057-970 Londrina, PR, Brazil

<sup>3</sup> Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, 056510-901 São Paulo, SP, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86057-970 Londrina, PR, Brazil

<sup>5</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86057-970 Londrina, PR, Brazil

Correspondence should be addressed to Phileo Pingue-Filho; pinguefilho@uel.br

Received 3 March 2014; Revised 13 May 2014; Accepted 20 May 2014; Published 19 June 2014

Academic Editor: Marcelo T. Bozza

Copyright © 2014 Aparecida Donizette Malvezi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The intracellular protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* causes Chagas disease, a serious disorder that affects millions of people in Latin America. Cell invasion by *T. cruzi* and its intracellular replication are essential to the parasite's life cycle and for the development of Chagas disease. Here, we present evidence suggesting the involvement of the host's cyclooxygenase (COX) enzyme during *T. cruzi* invasion. Pharmacological antagonist for COX-1, aspirin (ASA), caused marked inhibition of *T. cruzi* infection when peritoneal macrophages were pretreated with ASA for 30 min at 37°C before inoculation. This inhibition was associated with increased production of IL-1 $\beta$  and nitric oxide (NO<sup>\*</sup>) by macrophages. The treatment of macrophages with either NOS inhibitors or prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) restored the invasive action of *T. cruzi* in macrophages previously treated with ASA. Lipoxin ALX-receptor antagonist Boc2 reversed the inhibitory effect of ASA on trypomastigote invasion. Our results indicate that PGE<sub>2</sub>, NO<sup>\*</sup>, and lipoxins are involved in the regulation of anti-*T. cruzi* activity by macrophages, providing a better understanding of the role of prostaglandins in innate inflammatory response to *T. cruzi* infection as well as adding a new perspective to specific immune interventions.

## 1. Introduction

*Trypanosoma cruzi* is an intracellular protozoan parasite causing Chagas disease, which affects millions of people in Latin America. During the acute inflammatory phase of the *T. cruzi* infection, high-level expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) [1], proinflammatory cytokines

[2], and arachidonic acid- (AA-) derived lipids such as leukotrienes, lipoxins (LXs), H (P) ETEs, prostaglandins, and thromboxane is prevalent [3, 4]. In the early *T. cruzi* infection, nitric oxide (NO<sup>\*</sup>) and arachidonic acid metabolites could be attributed to resistance, but later on to tissue damage [4].

Prostaglandins (PGs) are oxygenated lipid mediators formed from the  $\omega$ 6 essential fatty acid, arachidonic acid

(AA). The committed step in PG biosynthesis is the conversion of AA to PG H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), catalyzed by either PG endoperoxide H synthase-1 or -2, commonly known as cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2), respectively [5, 6]. Both COX-1 and COX-2 are nonselectively inhibited by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as aspirin and ibuprofen, whereas COX-2 activity is selectively blocked by COX-2 inhibitors called coxibs (e.g., celecoxib) [7, 8]. The relevance of these enzymes and the bioactive lipids that they produce are not well understood in parasitic disease, although the role of eicosanoids in the pathogenesis of Chagas disease is becoming more defined [3]. Pharmacological antagonists of COX-1 (aspirin, ASA), COX-2 (celecoxib), or both (indomethacin) have been found to increase mortality and parasitemia (parasite load in peripheral blood and cardiac tissue) regardless of which mouse or *T. cruzi* strains were used [9–13]. Moreover, evidence suggests that administration of NSAIDs may enhance mortality in chagasic patients [12]. Conversely, others have found that inhibition of PG synthesis/release reduces parasitemia and extends survival of mice infected with *T. cruzi* [14–17]. This was often associated with a decrease in the levels of circulating inflammatory cytokines (such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-10) [16]. More recently, treatment with ASA during chronic infection was found to be beneficial with no increase in mortality and substantial improvement in cardiac function [13]. Additionally, the protective effect of ASA could be mediated by the synthesis of 15-epi-lipoxin A<sub>4</sub> (15-epi-LXA<sub>4</sub>) [18].

Given the increasing interest in the role of eicosanoids in *T. cruzi* infection, we decided to investigate the effect of prostaglandin synthesis inhibition with ASA on inflammatory response and macrophage invasion by *T. cruzi*.

## 2. Material and Methods

**2.1. Animals.** Six- to eight-week-old BALB/c female and male mice were supplied by the Multi-Institutional Center for Biological Investigation, State University of Campinas, Brazil. Mice were maintained under standard conditions in the animal house of the Department of Pathological Sciences, Center for Biological Sciences, State University of Londrina. Commercial rodent diet (Nuvilab-CR1, Quimtia-Nuvital, Colombo, Brazil) and sterilized water were available *ad libitum*.

All animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the Brazilian Code for the Use of Laboratory Animals. The protocols were approved by the Internal Scientific Commission and the Ethics in Animal Experimentation Committee of Londrina State University (Approval Number: CEEA 5492.2012.22).

**2.2. Parasites.** *T. cruzi* Y [19] was maintained by weekly intraperitoneal inoculation of Swiss mice with  $2 \times 10^5$  trypomastigotes. To conduct our experiments, blood from previously infected mice was obtained by cardiac puncture without anticoagulant. The blood was centrifuged at 1,500  $\times$ g

for 1 min and allowed to stand at 37°C for 60 min. The supernatant serum containing most of the *T. cruzi* was centrifuged at 1,200  $\times$ g for 15 min. The sediment was resuspended in 1 mL of RPMI 1640 medium (GIBCO, Gran Island, NY) containing 10% inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 units of penicillin, and 100  $\mu$ g streptomycin (GIBCO, Gran Island, NY).

Trypomastigotes were derived from the supernatant of *T. cruzi*-infected LLC-Mk2 culture cells (ATCC CCL-7; American Type Culture Collection, Rockville, MD) grown in RPMI 1640 medium containing 10% inactivated fetal bovine serum (FBS), 40  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> gentamicin, 100 units of penicillin, and 100  $\mu$ g streptomycin (GIBCO, Gran Island, NY). Subconfluent cultures of LLC-Mk2 were infected with  $5 \times 10^6$  trypomastigotes. Free parasites were removed after 24 h and cultures were maintained in 10% FBS-RPMI 1640. Five days postinfection, free trypomastigote forms could be found in the cell supernatants.

**2.3. Macrophage Culture.** Mice were inoculated intraperitoneally with 2 mL of 5% thioglycollate and, 4 days later, the elicited cells from the peritoneal exudates were harvested in cold PBS. Mouse peritoneum was washed with 5 mL ice-cold, serum-free RPMI. Peritoneal cells from 3–6 mice were pooled and left to adhere in complete medium (RPMI, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 40  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> gentamicin, and 10 mM HEPES) for 24 h in 24-well plates at  $2 \times 10^5$  cells/well. Each suspension of pooled peritoneal cells was plated in triplicate wells. Then, nonadherent cells were washed away and adherent cells received complete medium. The macrophages were plated onto 13 mm round glass coverslips and washed in warm phosphate-buffered saline (PBS) before the interaction assays. In addition,  $2.0 \times 10^5$  macrophages were plated onto 96-well dishes. One set of plates was used to quantify IL-1 $\beta$  and the other set for NO<sup>+</sup> detection.

**2.4. Treatment of Macrophages with Drugs and Macrophage Invasion Assay.** Before the experiments, peritoneal macrophages previously washed were incubated for 30 min at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in the presence of different concentrations of ASA (2.5 mM, 1.25 mM, and 0.625 mM) to test its effect on internalization of the parasite into the host cell. After incubation, the medium containing ASA was removed, and macrophages were allowed to interact with trypomastigote forms added in a ratio of 5 parasites per cell. The interaction was allowed to proceed for 2 h, at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The cells were then washed three times, fixed with Bouin's fixative, stained with Giemsa (Merck) stain, and observed with a light microscope at 1000 $\times$  magnification. Other treatments included incubation with aminoguanidine (1 mM) or L-NAME (1.0 mM) for 60 min at 37°C with or without ASA.

The internalization index was calculated by multiplying the percentage of infected cells by the mean number of parasites per infected cell [20]. All internalization indices were normalized. Experiments were performed in triplicate,

and six independent experiments were completed. All experiments included untreated, infected peritoneal macrophages as controls. The quantification was carried out using light microscopy where a total of 500 cells were randomly counted. The viability of the cells obtained from the cultures before and after incubation experiments was determined using MTT (Sigma-Aldrich) assay, showing the mitochondrial activity of living cells. The culture medium was aspirated, and MTT ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) was added to the cells prior to incubation at  $37^\circ\text{C}$  for 4 h. The supernatant was aspirated and dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich) was added to the wells. Insoluble crystals were dissolved by mixing and the plates were read using a BioRad multiplate reader (Hercules, CA), at a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 630 nm.

**2.5. Nitrite Measurements.** Production of nitric oxide ( $\text{NO}^*$ ) was determined by measuring the level of accumulated nitrite, a metabolite of  $\text{NO}^*$  in the culture supernatant using Griess reagent (Sigma-Aldrich). After 24 h of treatment with ASA ( $0.625 \text{ mM}$ ), the culture supernatants were collected and mixed with an equal volume of Griess reagent in 96-well culture plates and incubated at room temperature for 10 min. The absorbance was measured at 540 nm and nitrite concentrations were calculated by reference to a standard curve generated by known concentrations of sodium nitrite.

**2.6. Immunocytochemistry Labeling for iNOS.** Immunocytochemistry for iNOS was performed on coverslip-adherent cells using the labeled streptavidin biotin method with a LSAB KIT (DAKO Japan, Kyoto, Japan) without microwave accentuation. The coverslips were incubated with 10% Triton X-100 solution for 1 h, washed 3 times in PBS, and treated for 40 min at room temperature with 10% BSA. The coverslips were then incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with the primary antibody (anti-iNOS rabbit monoclonal antibody diluted 1:200, BD Biosciences, catalog number 610599), followed by secondary antibody treatment for 2 h at room temperature. Horseradish peroxidase activity was visualized by treatment with  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) for 5 min. At the last step, the sections were weakly counterstained with Harry's hematoxylin (Merck). For each case, negative controls were prepared by omitting the primary antibody. Intensity and localization of immune reaction against primary antibody used were examined on all coverslips using a photomicroscope (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). For the image analysis study, photomicroscopic color slides of representative areas (magnification, 40x) were digitally acquired. After conversion of the images into grey scale (Adobe Photoshop) iNOS-positive pixels and total pixels became thresholds and were processed by Image J program. Positive immunostained area was calculated as the proportion of positive pixels to total pixels (%).

**2.7. ELISA for IL-1 $\beta$ .** Culture supernatants from peritoneal macrophages in 96-well plates treated with ASA ( $0.625 \text{ mM}$ ) or untreated, either infected or not infected with *T. cruzi*, were incubated for 24 h. Levels of IL-1 $\beta$  in  $100 \mu\text{L}$  medium were measured by commercial ELISA kits (Ready-SET-Go!

eBioscience, San Diego, CA), according to the manufacturer's instructions.

**2.8. Statistical Analysis.** The statistical analysis was conducted using one way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. Values are presented as  $\pm$  standard error of mean. The results were considered significant when  $P < 0.05$ . Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5.0 computer software application (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### 3. Results

**3.1. Aspirin Inhibits *T. cruzi* Entry into Macrophages.** To determine whether COX-derived mediators are involved in *T. cruzi* entry into host cells, cells were treated with increasing amounts of ASA for 30 min and after treatment, the medium containing ASA was removed before macrophage invasion assay in order to guarantee that ASA affected only the host cell and not the parasites. After 2 h of incubation with parasites, which provides sufficient time for them to enter into macrophages, the free parasites were removed. Aspirin irreversibly inhibits COX-1 by acetylation of a single serine residue on the enzyme [21] and this inactivation persists, that is,  $\geq 24$  hours. In some cases, the medium with increasing ASA concentrations was added every 24 hours until the end of the *T. cruzi* infection period (7 days, Figure 4(d)). Figure 1(a) shows that ASA markedly inhibited the internalization of trypomastigote by macrophages at all concentrations tested ( $P < 0.0001$ ). Thus, PGE<sub>2</sub> synthesis inhibition using ASA improves macrophage response against *T. cruzi* infection. The cytotoxicity of ASA in macrophages was evaluated by MTT assay (Figure 1(a), insert). ASA did not induce cell death, as the concentrations of ASA used in all experiments reported were too low to cause cytotoxicity [22]. Light microscopy observations confirm *T. cruzi* inhibition invasion of ASA treated cells (Figure 1(c)).

**3.2. COX-2 Inhibition Together with Aspirin Restores the Infectivity of Trypomastigotes in Peritoneal Macrophages.** We examined the combined effect of celecoxib (COX-2 selective inhibitor) and ASA on the entry of *T. cruzi* into phagocytic cells. Peritoneal macrophages were incubated separately, with or without drugs (ASA and celecoxib) either alone or in combination. Figure 1(b) shows that the drugs in combination significantly ( $P < 0.01$ ) restored the invasive capacity of trypomastigotes. None of the drugs (ASA, celecoxib, or their combination) showed cytotoxicity against uninfected peritoneal macrophages (data not shown). These results indicate that the enzyme activities of COX-1 and COX-2 favor invasion, but simultaneous inhibition of both activities also favors parasite invasion, probably by allowing a new panorama of eicosanoids production.

**3.3. Aspirin Decreases Trypomastigotes Release to Culture Supernatants from *T. cruzi*-Infected Macrophages.** Four days postinfection, macrophages began releasing trypomastigotes into the supernatant (Figure 4(d)). Trypomastigotes release

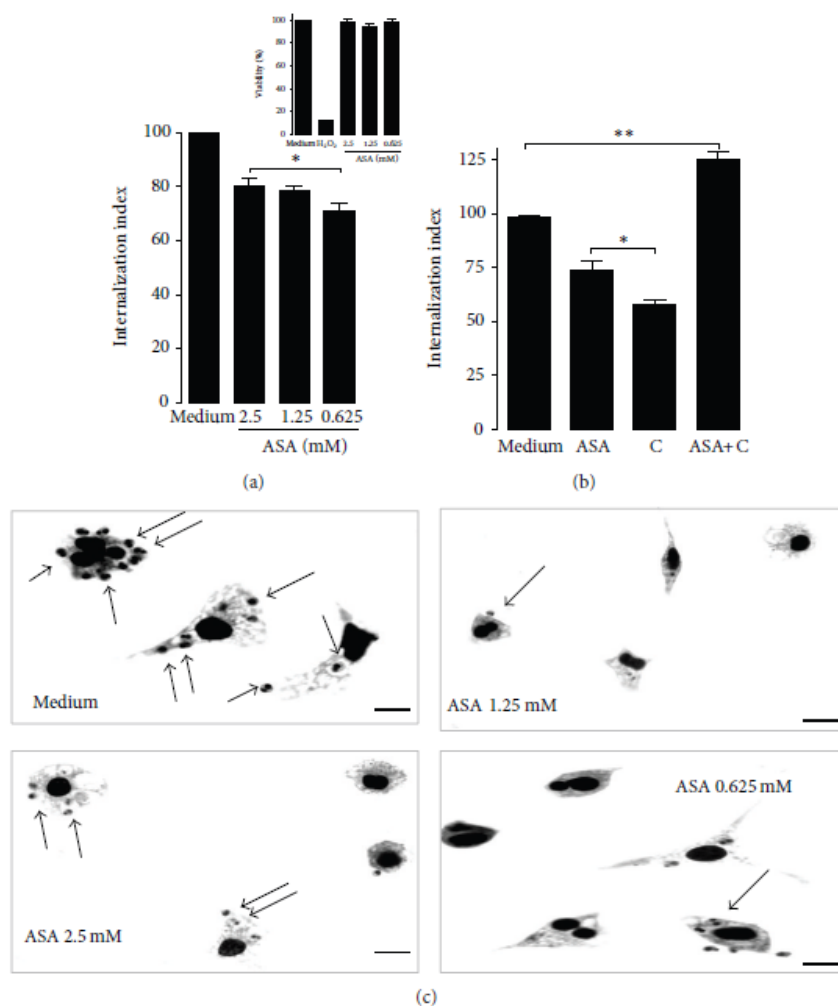


FIGURE 1: Aspirin (ASA) impairs *Trypanosoma cruzi* internalization by peritoneal macrophages. (a) Internalization index of the interaction process between macrophages treated for 30 minutes with increasing concentrations of ASA (0.625, 1.25, and 2.5 mM) and exposed to *T. cruzi* (Y strain). After treatment with ASA, peritoneal macrophages interacted with 5:1 trypomastigotes for 2 hours, after which they are washed, fixed with Bouin's fixative, and stained with Giemsa. Quantification was carried out under a light microscope where the number of intracellular parasites was counted in a total of at least 500 cells. MTT assay to measure cell viability in macrophages after treatment with ASA at 0.625 to 2.5 mM concentrations. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1000 μM) was used as negative control (insert). Values are the means ± standard error of mean of 10 experiments or two experiments (MTT assay). \**P* < 0.0001 for a comparison with infected cells cultured in medium alone. (b) The combined effect of celecoxib and aspirin on the entry of *T. cruzi* into phagocytic cells. Macrophages were treated for 30 minutes with celecoxib (0.625 mM) and ASA (0.625 mM) exposed to *T. cruzi* as describe above. Results are the mean ± standard error for triplicate determinations and are representative of three independent experiments. \**P* < 0.0001, \*\**P* < 0.001 for a comparison with infected cells cultured in medium alone. (c) Light microscopy observations confirm *T. cruzi* inhibition invasion of ASA treated cells. Observation after Giemsa staining by light microscopy of the interaction process between peritoneal macrophages treated (or not) with different concentration of ASA and exposed to trypomastigotes forms of *T. cruzi*. The black arrows indicate internalized parasites. Bars = 10 μm.

to culture supernatants from *T. cruzi*-infected macrophages was diminished by ASA (0.625 mM). This result is in agreement with previous reports, showing that aspirin and other COX inhibitors decrease *T. cruzi* infection *in vitro* [14–16, 23].

#### 3.4. Aspirin Inhibits *T. cruzi* Entry into Macrophages via ALX. Lipoxins (LXs) are endogenous lipid mediators with potent

anti-inflammatory and proresolving actions [24, 25]. Native LXs and their stable analogues exert their biological effects by binding to a G-protein-coupled receptor, denoted as ALX [26, 27]. The effect of ASA has been associated, in part, to a switch to the AA pathway linked to the acetylation of the COX-2 isoenzyme. This reaction enables COX-2 to synthesize LXs as 15-epi-LXs (15-epi-LXA4) [22]. To evaluate

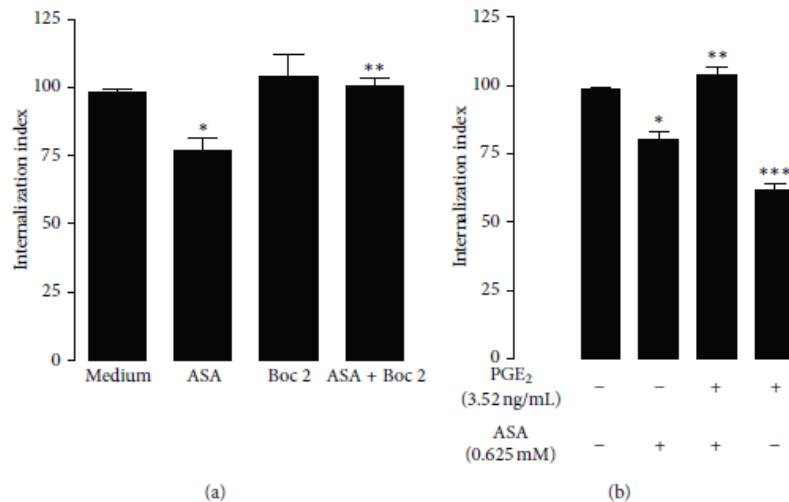


FIGURE 2: The effect of ASA on the entry of *T. cruzi* into macrophages was prevented by Boc-2. (a) Internalization index of the interaction process between macrophages treated for 30 minutes separately either with or without drugs (0.625  $\mu$ M ASA or 100  $\mu$ M Boc-2). Results are the mean  $\pm$  standard error for triplicate determinations and are representative of two independent experiments. \* $P < 0.01$ , for a comparison with infected cells cultured in medium alone. \*\* $P < 0.001$ , for a comparison with infected cell treated with ASA. (b) PGE<sub>2</sub> restores aspirin effect on *T. cruzi* entry into macrophages. Macrophages were treated for 30 minutes separately either with or without PGE<sub>2</sub> (35.2, 3.52, or 0.35 ng mL<sup>-1</sup>) alone or in combination (ASA 0.625 mM + PGE<sub>2</sub> 3.52 ng mL<sup>-1</sup>). Results are the mean  $\pm$  standard error and are representative of two independent experiments. \* $P < 0.001$  for a comparison with infected cells cultured in medium alone. \*\* $P < 0.05$  for comparison with infected cell treated with ASA or PGE<sub>2</sub> alone. \*\*\* $P < 0.05$  for a comparison with infected cells cultured in medium alone.

the effect of ASA-triggered LXs on the entry of *T. cruzi* into phagocytic cells, peritoneal macrophages were incubated separately either with or without drugs (ASA or Boc-2, a specific antagonist of the 15-epi-LXs) either alone or in combination. The inhibitory effect of ASA on the entry of *T. cruzi* into macrophages was prevented by Boc-2 demonstrating that the effect of ASA on the entry of *T. cruzi* into macrophages could be mediated by the synthesis of 15-epi-LXA4. Furthermore, Boc-2 did not have any effect on the entry of *T. cruzi* into macrophages when used alone (Figure 2(a)).

**3.5. PGE<sub>2</sub> Restores Aspirin Effect on *T. cruzi* Entry into Macrophages.** Figure 2(b) (insert) shows that treatment of macrophages with high concentrations of PGE<sub>2</sub> causes inhibition of *T. cruzi* entry into macrophages. When PGE<sub>2</sub> (3.52 ng mL<sup>-1</sup>) was added alone or in combination with ASA, the effect of ASA was inhibited, indicating that PGE<sub>2</sub> is involved in the internalization of *T. cruzi* trypomastigotes into peritoneal macrophages.

**3.6. Aspirin Modulates Innate Inflammatory Response of Macrophages Infected with *T. cruzi*.** The internalization of *T. cruzi* into macrophages stimulated the release of IL-1 $\beta$  while ASA increased IL-1 $\beta$  production by infected macrophages (Figure 3(a)). The effect of ASA on NO<sup>\*</sup> production was evaluated by detection of nitrite in *T. cruzi*-infected macrophage supernatants using Griess reaction (Figure 3(b)). NO<sup>\*</sup> production in macrophages was stimulated by *T. cruzi* and was also increased by prior treatment of macrophages with ASA.

In addition, we observed that ASA treatment stimulated iNOS expression in *T. cruzi*-infected macrophages (Figure 4(a)). To confirm that the effect of ASA on macrophage activity depends on NO<sup>\*</sup> levels, we assessed the entry of trypomastigotes into macrophages incubated with aminoguanidine (AG, iNOS inhibitor) or with L-NAME (c-NOS inhibitor). We found that both inhibitors reversed the effects of ASA (Figures 4(b) and 4(c)).

#### 4. Discussion

Previous studies have shown that the release of eicosanoids during infection with *T. cruzi* regulates host responses and controls disease progression [3, 10, 11, 13, 14, 28–31]. PGs, together with NO<sup>\*</sup> and TNF- $\alpha$ , participate in a complex circuit that controls lymphoproliferative and cytokine responses in *T. cruzi* infection [10]. However, the involvement of COX-mediated PG production in the entry of *T. cruzi* into macrophages is largely unexplored. The data shown herein demonstrates that the treatment of macrophages with ASA significantly inhibits internalization of *T. cruzi* trypomastigotes and strongly supports the idea that the COX pathway plays a fundamental role in the process of parasite invasion. In fact, PGE<sub>2</sub> production increases significantly in *T. cruzi*-infected macrophages as compared to uninfected macrophages [32] and synergistically enhances the activity of nifurtimox and benznidazole on infected RAW 264.7 cells [23].

Our results suggest that the actions of ASA depend on COX-2-derived biosynthesis of products. This is

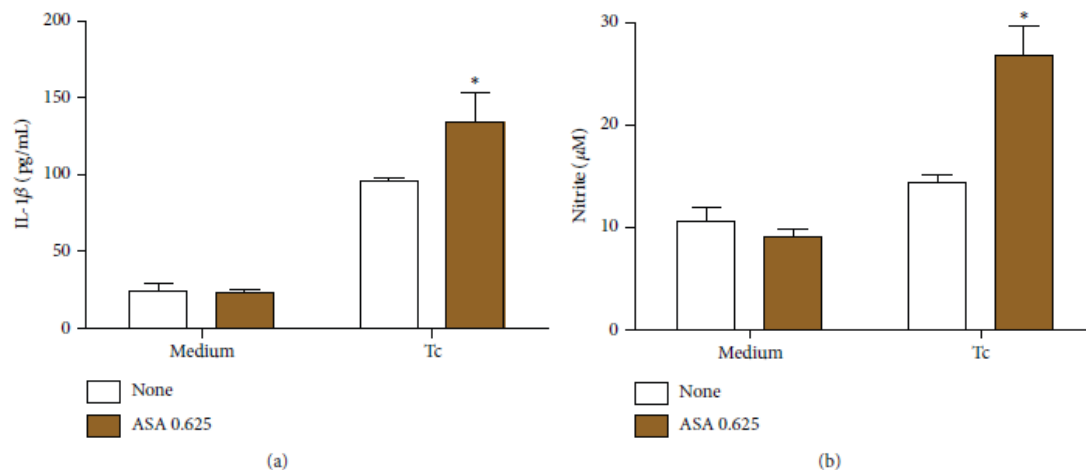


FIGURE 3: Effects of ASA upon IL-1 $\beta$  and nitrite production in *T. cruzi*-infected macrophages. Macrophages were treated for 30 minutes with ASA (0.625 mM) and exposed to *T. cruzi* (Y strain). After treatment with ASA, cells interacted with 5:1 trypomastigotes for 2 hours, after which they are cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> during 24 h. Afterwards, IL-1 $\beta$  (a) and nitrite (b) levels in supernatant were measured with a specific enzyme-linked immunosorbent assay and by Griess reaction, respectively. Results are the mean  $\pm$  standard error for duplicate determinations and are representative of four independent experiments. \*  $P < 0.05$  for a comparison with cell culture in medium alone.

demonstrated by the observation that celecoxib reversed the aspirin-induced inhibition of entry of *T. cruzi* into macrophages. The problem of NSAIDs coadministration is actively discussed in literature in the context of uncertainty of the resulting therapeutic and side effects arising from such combinations. The mechanism of such a suppression of aspirin inhibitory effect on COX-1 by other NSAIDs has been difficult to satisfactorily explain. This could be due to celecoxib binding strongly to a monomer of COX-1 without affecting AA oxygenation [7]. In fact, a related study has shown that celecoxib prevented ASA inhibition in a dog model of thrombosis [33]. However, the application of our approach to investigate the combined effect of aspirin and celecoxib on COX-1 during coadministration confirmed the ability of celecoxib to suppress the aspirin-mediated inhibition of COX-1 *in vitro* conditions [7].

In addition, the effects of ASA on *T. cruzi* infection have been associated in part, to a switch to the AA pathway linked to the acetylation of the COX-2 isoenzyme [18]. Such modification promotes the synthesis of the 15-R-HETE intermediate, which can be transformed by 5-lipoxygenase to 15-epi-LXA4, a lipid involved in the resolution of inflammation [34]. Accordingly, we assessed the effect of Boc-2 (a specific antagonist of the 15-epi-LXs) on low doses of ASA, indicating that 15-epi-LXA4 is probably involved in the inhibitory effect exerted by ASA on the internalization of *T. cruzi* by macrophages.

Interestingly, when macrophages were treated with PGE<sub>2</sub> concentration as high as 3.52 ng mL<sup>-1</sup>, we observed a reduction in the entry of parasites, but when we used low concentration of PGE<sub>2</sub> (0.35 ng mL<sup>-1</sup>), the entry of *T. cruzi* was similar to that observed in untreated macrophages.

In addition, we found reversal of ASA effect, even when PGE<sub>2</sub> concentration as low as 3.52 ng mL<sup>-1</sup> was used, indicating that PGE<sub>2</sub> has an important role in ASA effect. Inhibition of COX activity may increase NO<sup>\*</sup> levels, thus restoring the antiparasitic activity of macrophages [23]. Our results are in agreement with this hypothesis. To confirm that the effect of ASA on macrophage activity depends upon restoring NO<sup>\*</sup> levels, we assessed the invasive capacity of *T. cruzi* when cells were incubated with aminoguanidine (AG), an iNOS inhibitor. We found that 1.0 mM AG reverses ASA effect totally. In addition, we showed that iNOS expression in macrophages was increased with ASA treatment, suggesting that iNOS-dependent NO<sup>\*</sup> production is responsible for ASA effects. We did find reversal of ASA effect with L-NAME (1.0 mM), indicating the role of cNOS in ASA activity. This can be explained as high concentrations of L-NAME may interfere in the selectivity for cNOS and can inhibit other isoforms of NOS, such as nNOS and iNOS. So, NO<sup>\*</sup> deficiency induced by L-NAME could be explaining our results.

Additionally, polyamines seem to be crucial for trypomastigote internalization process in, at least, some cellular types and infection progression [35]. In *T. cruzi*-infected macrophages, COX is related to the increase of ornithine decarboxylase (ODC) activity [15], which might increase the polyamine content in macrophages. Since *T. cruzi* uses these polyamines to synthesize trypanothione (an enzyme that participates in the hydroperoxide detoxification of *T. cruzi*), the inhibition of COX by ASA probably resulted in a reduction in polyamine levels caused by inhibition of ODC, indirectly contributing to decrease trypanothione synthesis in *T. cruzi*, as suggested by López-Muñoz and collaborators [23].

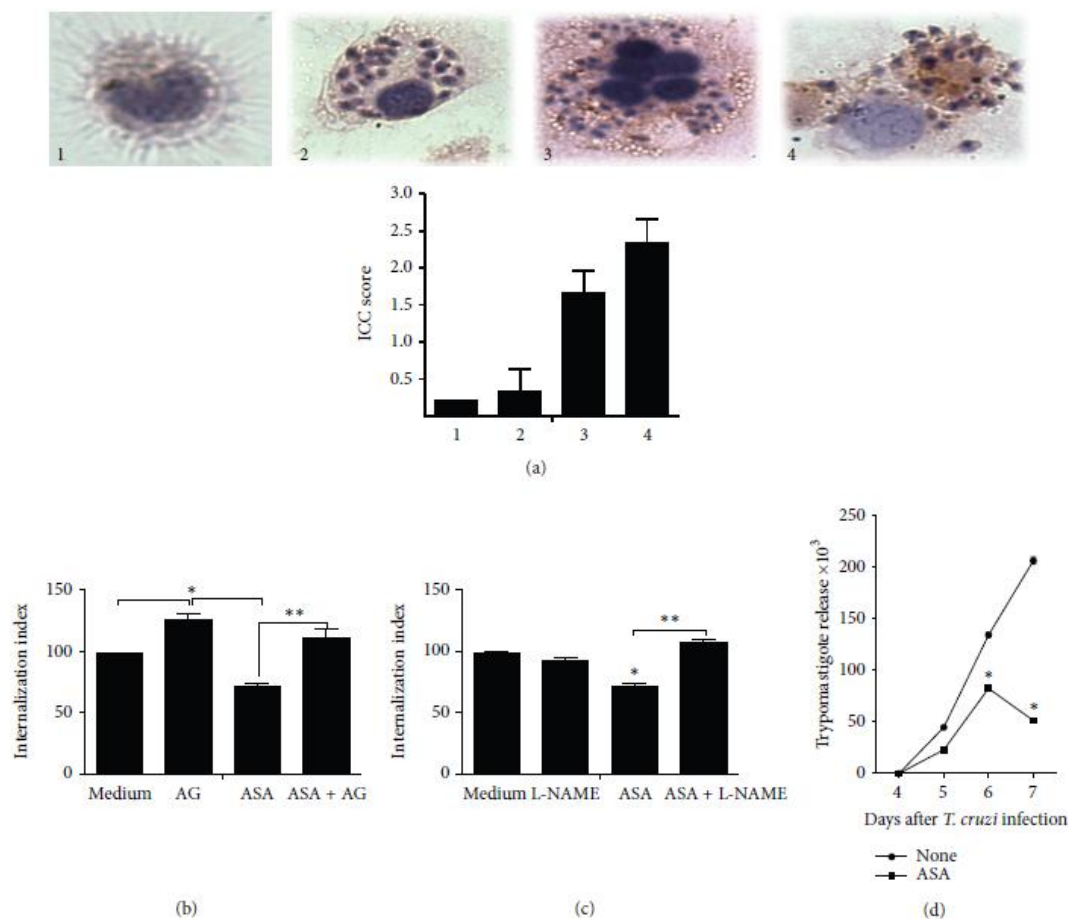


FIGURE 4: Effect of ASA on macrophage activity depends on NO<sup>•</sup> production. (a) Aspirin treatment stimulated iNOS expression in *T. cruzi*-infected macrophages. Immunocytochemistry for iNOS was performed on coverslip-adherent cells using the labeled streptavidin biotin method with a LSAB KIT (DAKO Japan, Kyoto, Japan) without microwave accentuation. (1) Intracellular iNOS protein cannot be detected by immunocytochemistry in uninfected (control) macrophages, (2) *T. cruzi*-infected cell, (3) ASA (0.625 mM) was an effective inducer of iNOS expression in peritoneal macrophages, and (4) the addition of PGE<sub>2</sub> (3.52 ng mL<sup>-1</sup>) to culture media increased iNOS mRNA expression in macrophages infected. Macrophages were treated for 30 minutes separately with 0.625  $\mu$ M ASA. After treatment, macrophages were washed and incubated with aminoguanidine (AG, 1.0 mM) (b) or L-NAME (c) at 1.0 mM for 1 h at 37°C. After treatment, macrophages were washed again and interacted with 5:1 trypomastigotes for 2 hours at 37°C, after which they are washed, fixed with Bouin's fixative, and stained with Giemsa. Quantification was carried out under a light microscope where the number of intracellular parasites was counted in a total of at least 500 cells. Results are the mean  $\pm$  standard error for triplicate determinations and are representative of two independent experiments. (d) Effect of aspirin upon trypomastigote release in aspirin-treated *T. cruzi*-infected macrophages. Cells were infected with *T. cruzi* trypomastigotes and treated daily with ASA at 0.625 mM; after 4 days of treatment, trypomastigotes release to supernatants was found and was measured until day 7 after infection. Results are the mean  $\pm$  standard error for triplicate determinations and are representative of two independent experiments. \* $P < 0.01$  for a comparison with infected cells cultured in medium alone. \*\* $P < 0.01$  for a comparison with infected cells cultured treated with ASA.

Finally, in *T. cruzi*-infected macrophages, COX inhibition by ASA was related to the increase of IL-1 $\beta$ , which also might explain the increase of antiparasitic activity of macrophages treated with ASA. In fact, IL-1 $\beta$  is critical for the restriction of *Leishmania amazonensis* infection [36] and it recently was demonstrated that macrophages treated with IL-1 $\beta$  released fewer trypomastigotes than untreated

macrophages and IL-1 $\beta$  triggered NO<sup>•</sup> release by *T. cruzi*-infected macrophages in a dose dependent manner [37].

## 5. Conclusion

In conclusion, this is the first report, to our knowledge, showing the *in vitro* effect of aspirin on *T. cruzi* entry into

peritoneal macrophages and the influence of COX pathway on innate inflammatory response to *T. cruzi* infection, adding a new perspective to immune interventions against Chagas disease.

### Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests.

### Authors' Contribution

P. Pinge-Filho, S. F. Yamada-Ogatta, M. C. Martins-Pinge, and L. V. Rizzo participated in research design. A. D. Malvezi, C. Panis, R. Valeriano da Silva, M. I. Lovo-Martins, N. G. Zanluchi, and V. L. H. Tatakijara conducted experiments. W. A. Verri Jr., and L. M. Yamauchi contributed to the new reagents or analytical tools. A. D. Malvezi, C. Panis, R. Valeriano da Silva, M. I. Lovo-Martins, and P. Pinge-Filho performed data analysis. A. D. Malvezi, C. Panis, and P. Pinge-Filho contributed to the writing of the paper.

### Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CNPq, 302097/2010-474792/2011-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Fundação Araucária (Convênio 419/2009). LVR, WAVJ, MCMP, and PPF received research fellowships from CNPq.

### References

- [1] M. E. Rottenberg, E. Castaños-Velez, R. de Mesquita, O. G. Laguardia, P. Biberfeld, and A. Örn, "Intracellular colocalization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction," *European Journal of Immunology*, vol. 26, no. 12, pp. 3203–3213, 1996.
- [2] J. A. Gomes, A. M. Molica, T. S. Keesen et al., "Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease," *Human Immunology*, vol. 75, no. 1, pp. 20–28, 2014.
- [3] F. S. Machado, S. Mukherjee, L. M. Weiss, H. B. Tanowitz, and A. W. Ashton, "Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection," *Advances in Parasitology*, vol. 76, pp. 1–31, 2011.
- [4] R. L. Cardoni and M. I. Antúnez, "Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections," *Mediators of Inflammation*, vol. 13, no. 4, pp. 235–240, 2004.
- [5] B. Rocca and G. A. FitzGerald, "Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response," *International Immunopharmacology*, vol. 2, no. 5, pp. 603–630, 2002.
- [6] J. Y. Park, M. H. Pillinger, and S. B. Abramson, "Prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis and secretion: the role of PGE<sub>2</sub> synthases," *Clinical Immunology*, vol. 119, no. 3, pp. 229–240, 2006.
- [7] G. Rimon, R. S. Sidhu, D. A. Lauver et al., "Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 1, pp. 28–33, 2010.
- [8] I. Pountos, T. Georgouli, H. Bird, and P. V. Giannoudis, "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prostaglandins, indications, and side effects," *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*, vol. 3, no. 1, pp. 19–27, 2011.
- [9] A. M. Celentano, G. Gorelik, M. E. Solana, L. Sterin-Borda, E. Borda, and S. M. González Cappa, "PGE<sub>2</sub> involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations," *Prostaglandins*, vol. 49, no. 3, pp. 141–153, 1995.
- [10] P. Pinge-Filho, C. E. Tadokoro, and I. D. A. Abrahamsohn, "Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection," *Cellular Immunology*, vol. 193, no. 1, pp. 90–98, 1999.
- [11] V. L. Hideko Tatakijara, R. Cecchini, C. L. Borges et al., "Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection," *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, vol. 52, no. 1, pp. 47–58, 2008.
- [12] L. Sterin-Borda, G. Gorelik, N. Goren, S. Gonzalez Cappa, A. M. Celentano, and E. Borda, "Lymphocyte muscarinic cholinergic activity and PGE<sub>2</sub> involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection," *Clinical Immunology and Immunopathology*, vol. 81, no. 2, pp. 122–128, 1996.
- [13] S. Mukherjee, F. S. Machado, H. Huang et al., "Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of chagas disease," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 2, Article ID e16959, 2011.
- [14] G. K. Abdalla, G. E. L. Faria, K. T. Silva, E. C. C. Castro, M. A. Reis, and M. A. Michelin, "*Trypanosoma cruzi*: the role of PGE<sub>2</sub> in immune response during the acute phase of experimental infection," *Experimental Parasitology*, vol. 118, no. 4, pp. 514–521, 2008.
- [15] C. G. Freire-de-Lima, D. O. Nascimento, M. B. P. Soares et al., "Erratum: uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages (Nature (2000) 403 (199-203))," *Nature*, vol. 404, no. 6780, p. 904, 2000.
- [16] M. A. Michelin, J. S. Silva, and F. Q. C. Cunha, "Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection," *Experimental Parasitology*, vol. 111, no. 2, pp. 71–79, 2005.
- [17] C. N. Paiva, R. H. Arras, L. P. Lessa et al., "Unraveling the lethal synergism between *Trypanosoma cruzi* infection and LPS: a role for increased macrophage reactivity," *European Journal of Immunology*, vol. 37, no. 5, pp. 1355–1364, 2007.
- [18] A. Molina-Berrios, C. Campos-Estrada, N. Henriquez et al., "Protective role of acetylsalicylic acid in experimental *Trypanosoma cruzi* infection: evidence of a 15-epi-lipoxin A4-mediated effect," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, no. 4, Article ID e2173, 2013.
- [19] L. H. P. Silva and V. Nussenzeig, "Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco," *Folia Clinica et Biologica*, vol. 20, pp. 191–203, 1953.
- [20] E. S. Barrias, L. C. Reignault, W. de Souza, and T. M. U. Carvalho, "Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 1, Article ID e7764, 2010.
- [21] W. L. Smith, "Nutritionally essential fatty acids and biologically indispensable cyclooxygenases," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 33, no. 1, pp. 27–37, 2008.

- [22] P. F. T. Cezar-De-Mello, A. M. Vieira, V. Nascimento-Silva, C. G. Villela, C. Barja-Fidalgo, and I. M. Fierro, "ATL-1, an analogue of aspirin-triggered lipoxin A<sub>4</sub>, is a potent inhibitor of several steps in angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor," *British Journal of Pharmacology*, vol. 153, no. 5, pp. 956–965, 2008.
- [23] R. López-Muñoz, M. Faúndez, and S. Klein, "Trypanosoma cruzi: in vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole," *Experimental Parasitology*, vol. 124, no. 2, pp. 167–171, 2010.
- [24] C. N. Serhan, N. Chiang, and T. E. van Dyke, "Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 5, pp. 349–361, 2008.
- [25] C. D. Russell and J. Schwarze, "The role of pro-resolution lipid mediators in infectious disease," *Immunology*, vol. 141, no. 2, pp. 166–173, 2014.
- [26] S. Fiore, G. Antico, M. Aloman, and S. Sodin-Semrl, "Lipoxin A<sub>4</sub> biology in the human synovium. Role of the ALX signaling pathways in modulation of inflammatory arthritis," *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 73, no. 3-4, pp. 189–196, 2005.
- [27] N. Chiang, C. N. Serhan, S.-E. Dahlén et al., "The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo," *Pharmacological Reviews*, vol. 58, no. 3, pp. 463–487, 2006.
- [28] J. Clària, M. H. Lee, and C. N. Serhan, "Aspirin-triggered lipoxins (15-epi-LX) are generated by the human lung adenocarcinoma cell line (A549)-neutrophil interactions and are potent inhibitors of cell proliferation," *Molecular Medicine*, vol. 2, no. 5, pp. 583–596, 1996.
- [29] A. W. Ashton, S. Mukherjee, F. N. U. Nagajyothi et al., "Thromboxane A<sub>2</sub> is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 4, pp. 929–940, 2007.
- [30] C. L. Borges, R. Cecchini, V. L. H. Tatakijara et al., "5-Lipoxygenase plays a role in the control of parasite burden and contributes to oxidative damage of erythrocytes in murine Chagas' disease," *Immunology Letters*, vol. 123, no. 1, pp. 38–45, 2009.
- [31] C. Panis, T. L. Mazzuco, C. Z. F. Costa et al., "Trypanosoma cruzi: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice," *Experimental Parasitology*, vol. 127, no. 1, pp. 58–65, 2011.
- [32] M. M. Borges, J. K. Kloetzel, H. F. Andrade Jr., C. E. Tadokoro, P. Pinge-Filho, and I. Abrahamsohn, "Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF- $\alpha$  production during *Trypanosoma cruzi* infection," *Immunology Letters*, vol. 63, no. 1, pp. 1–8, 1998.
- [33] J. K. Hennen, J. Huang, T. D. Barrett et al., "Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition on vascular responses and thrombosis in canine coronary arteries," *Circulation*, vol. 104, no. 7, pp. 820–825, 2001.
- [34] Y.-P. Wang, Y. Wu, L.-Y. Li et al., "Aspirin-triggered lipoxin A<sub>4</sub> attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses by inhibiting activation of NF- $\kappa$ B and MAPKs in BV-2 microglial cells," *Journal of Neuroinflammation*, vol. 8, article no. 95, 2011.
- [35] F. Kierszenbaum, J. J. Wirth, P. P. McCann, and A. Sjoerdsma, "Impairment of macrophage function by inhibitors of ornithine decarboxylase activity," *Infection and Immunity*, vol. 55, no. 10, pp. 2461–2464, 1987.
- [36] D. S. Lima-Junior, D. L. Costa, V. Carregaro et al., "Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania," *Nature Medicine*, vol. 19, no. 7, pp. 909–915, 2013.
- [37] G. K. Silva, R. S. Costa, T. N. Silveira, and B. C. Caetano, "Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1 $\beta$  response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection," *Journal of Immunology*, vol. 191, pp. 3373–3383, 2013.

## 4 CAPÍTULO 2

### 4.1 *Trypanosoma cruzi* E INFECÇÃO DE MIOBLASTOS

Tripomastigotas de *T. cruzi* ganham acesso aos mioblastos, primeiro invadindo o endotélio e áreas intersticiais da parede vascular e o miocárdio. O parasito provoca danos na matriz extracelular por meio de ações enzimáticas, contribuindo para uma resposta inflamatória. Quando o dano ao hospedeiro é causado por isquemia e necrose, a matriz é degradada e deslizada da parede ventricular, deixando-a delgada e com formação de aneurismas. Danos encontrados nesta área do coração juntamente com remodelamento da parede são frequentemente observados em doenças cardíacas provocadas por *T. cruzi*. Remodelamento refere-se a variações estruturais associadas com a inflamação, necrose, hipertrofia, dilatação ventricular e distúrbios funcionais (MACHADO et al., 2008).

O parasito induz resposta inflamatória no miocárdio como resultado de vários fatores, incluindo citocinas, quimiocinas, fibronectinas, cininas (MONTEIRO et al., 2007), endotelina (TANOWITZ et al., 2005), tromboxano (ASHETON et al., 2007) e o próprio parasito com seus antígenos. O parasito também pode contribuir para o recrutamento, migração e posição de células inflamatórias no tecido cardíaco, levando a persistência da miocardite em camundongos infectados (DOS SANTOS et al., 2001).

Machado e colaboradores (2000) mostraram que mioblastos constituem fonte potencial de citocinas, quimiocinas e óxido nítrico *in vivo*. Mioblastos infectados com *T. cruzi* expressam RNAm para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS e quimiocinas (MACHADO et al. 2000; VESPA et al., 1994). Vários estudos têm sugerido que a liberação de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por células do padrão Th1, resulta no desenvolvimento de miocardite associada a infecção e que a infecção com o parasito estimula mioblastos a produzirem citocinas e quimiocinas as quais amplificam a resposta inflamatória (MACHADO et al., 2008). Oncogenes

relacionados a quimiocinas, (MIP)-2 (proteína inflamatória de macrófagos), monocinas induzidas por IFN- $\gamma$  (MIG), RANTES, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  estimulam mioblastos, e estes estimulados produzem níveis críticos de NO que controlam a replicação do *T. cruzi*. E ainda, foi mostrado que a resistência a infecção está associada com a capacidade dos linfócitos produzirem IFN- $\gamma$ , os quais em resposta podem ativar macrófagos a produzirem NO, sendo esta a principal molécula efetora que controla a multiplicação intracelular de *T. cruzi* (GAZZINELLI et al., 1992; VESPA et al., 1994).

Além dos macrófagos, muitas outras células são hábeis a produzirem NO. Por exemplo, células miocárdicas murinas produzem NO *in vitro*, via indução da NOS por citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  (BALLIGAND et al., 1994). NO possui habilidade para mediar a atividade microbicida contra vários parasitos, incluindo *T. cruzi* (KINUGAWA et al., 1997; SILVA et al., 1995; VESPA et al., 1994), esta observação mostra que mioblastos produzem NO quando estimulados com TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (BALLIGAND et al., 1994; KINUGAWA et al., 1997) e estas citocinas foram detectadas no coração de ratos infectados com *T. cruzi* (CHANDRASEKAR et al., 1998). Kinugawa e colaboradores (1997) mostraram que a enzima NO sintase pode ser expressa em mioblastos. A regulação transcricional do gene para iNOS e a expressão de RNA mensageiro para iNOS foi observada, quando induzido por LPS. Os autores também mostraram que Forscolin, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  aumentam a expressão de iNOS. Mioblastos também expressam NOS-2 e NOS-3 quando induzidos por LPS e o aumento do NO produzido por mioblastos, modula negativamente a função do miocárdio. Foi também mostrado que LPS, IL-6 ou IFN- $\gamma$  podem aumentar a transcrição dos genes para iNOS e IRF-1 (receptor 1 para interferon) através da ativação da proteína STAT. STAT-1 é necessária para a indução de iNOS (KINUGAWA et al., 1997; MERAZ et al., 1996; SINGH et al., 1996). Citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  ativam NF $\kappa$ B e a ativação do NF $\kappa$ B tem papel crucial na indução da iNOS (KINUGAWA et al., 1997; LOWENSTEIN et al., 1993; SCHÜTZE et al., 1994; XIE et al., 1994).

## 4.2 PARTICIPAÇÃO DO TGF-B NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA

A família de proteínas do fator beta transformador do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) apresentam potentes propriedades imunorregulatórias, variando desde os efeitos no crescimento e diferenciação de células primitivas a funções diferenciadas de células efetoras do sistema imunológico. Embora muitos pesquisadores tem descrito a atividade supressora do TGF- $\beta$ , evidências suportam o conceito de que o TGF- $\beta$  pode ter ambas as ações, inibitórias e estimulatórias. TGF- $\beta$  tem efeito intracelular diferencial na modulação de receptores de superfície celular como fosforilação de tirosina, transcrição de genes para citocinas e pode mediar citotoxicidade celular (RUSCETTI et al., 1991)

A modulação das respostas imunológicas inflamatórias pelo TGF- $\beta$  incluem: inibição da proliferação de sub-classes de células T, efeito inibitório na proliferação e função dos linfócitos B, diminuição da regulação da atividade das células NK e respostas a células T, regulação da produção de citocinas e regulação de macrófagos (GOEY et al., 1989; WAHL, 1992).

TGF- $\beta$  é um fator de crescimento pleiotrópico que pode modular respostas inflamatórias em diversos tipos celulares, incluindo VSMCs (células vasculares do músculo liso). Os autores mostraram a habilidade do TGF- $\beta$  em inibir marcadores da ativação das VSMC, iNOS e IL-6 (FIENBERG et al., 2004).

TGF- $\beta$ 1 é uma citocina pró-fibrótica que estimula a produção de proteínas da matriz extracelular em diferentes órgãos. TGF- $\beta$  é expresso em altos níveis no coração durante a vida embrionária e adulta (THOMPSON et al., 1988, 1989). Entretanto a alta expressão de TGF- $\beta$  resulta em fibrose tecidual e disfunção do órgão e ainda está implicado no desenvolvimento de nefropatia diabética, colite ulcerativa, fibrose hepática e doenças congênitas (VALLANCE et al., 2005; WOLF et al., 2004). A fibrose que ocorre no coração pode ser parcialmente mediada pelo TGF- $\beta$ , um potente estimulador da produção de colágeno por fibroblastos cardíacos e tem sido implicado sozinho no remodelamento do miocárdio após infartos. Estudos indicam que a dilatação,

isquemia e cardiomiopatia hipertrófica estão todas associadas com o aumento dos níveis de TGF- $\beta$ 1 (KHAN; SHEPPARD, 2006).

TGF- $\beta$  também age de maneira autócrina para manter a taxa de batimentos de mioblastos de ratos neonatal, em cultura. Inteleucina 1- $\beta$  suprime a taxa de batidas dos mioblastos e o TGF- $\beta$  antagoniza este efeito. Foi mostrado também que TGF- $\beta$  e IL-1 $\beta$  apresentam efeitos antagônicos na secreção de NO por estes mioblastos (ROBERTS et al.,1992). Portanto, a secreção de NO, a atividade da NO sintase e a expressão da forma induzível da enzima, correlata inversalmente com o efeito do TGF- $\beta$  e IL-1 $\beta$  na taxa de batimentos dos mioblastos (NATHAN et al., 1992). Hausmann e colaboradores (1994) determinaram o efeito do TGF- $\beta$ 1 recombinante, na ativação de macrófagos por LPS. Macrófagos peritoneais de camundongos ou células da linhagem RAW 264.7 previamente tratadas com TGF- $\beta$ , perderam suas habilidades para produzirem TNF- $\alpha$  e NO em respostas a ativação com LPS.

O efeito do TGF- $\beta$  na indução do IFN- $\gamma$  em ativar macrófagos murinos infectados com *Toxoplasma gondii* foi estudado. A atividade toxoplasmatática induzida por IFN- $\gamma$  em macrófagos, foi inibida por TGF- $\beta$ , o que também foi observado para a produção de TNF- $\alpha$ , RNI e PGE<sub>2</sub>. Mas a PGE<sub>2</sub> não estava envolvida na inibição da ativação do macrófago por TGF- $\beta$ . Os resultados mostraram que a inibição da produção do TNF- $\alpha$  é o fator chave na supressão de macrófagos induzido por TGF- $\beta$  (LANGERMANS et al., 2001).

Sinalização para o NO também tem importante papel na regulação, desenvolvimento e função pulmonária. Expressão de guanilato ciclase solúvel (sgc), cGMP dependente da proteína quinase I (PKGI), ambos são mediadores críticos para sinalização de NO, e foi observado a redução da produção de NO em pulmão injuriado de recém nascido, provocado pelo TGF- $\beta$ , o qual reduziu a expressão de enzimas sinalizantes para o NO em isolados de miofibroblastos de SMC (células musculares lisa) (BACHILLER et al., 2010).

Vodovotz e colaboradores (1993) estudaram o mecanismo pelo qual o TGF- $\beta$ 1 suprime a produção de NO por macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$ . Tratamento dos macrófagos com TGF- $\beta$ 1 provocou decréscimo na concentração

de NO por três mecanismos: redução na estabilidade e tradução do RNAm para iNOS e aumento na degradação da proteína iNOS, levando a redução na concentração de iNOS no sobrenadante de cultura (PINSKI et al., 1995).

Desta forma, investigações que buscam esclarecer o papel que os eicosanoides exercem sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro, como a geração de citocinas, óxido nítrico e radicais livres na fase inicial da infecção por *T. cruzi* são essenciais para o melhor entendimento da patogênese da DC. Os resultados podem indicar caminhos para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento desta importante enfermidade negligenciada.

## Inhibition of Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 Impairs *Trypanosoma cruzi* Entry into Cardiac Cells and Promotes Differential Modulation of the Inflammatory Response

Aparecida D. Malvezi,<sup>a</sup> Carolina Panis,<sup>f</sup> Rosiane V. da Silva,<sup>a</sup> Rafael Carvalho de Freitas,<sup>a</sup> Maria I. Lovo-Martins,<sup>a</sup> Vera L. H. Tatakahara,<sup>a</sup> Nágela G. Zanluqui,<sup>a</sup> Edecio Cunha Neto,<sup>d</sup> Samuel Goldenberg,<sup>c</sup> Juliano Bordignon,<sup>c</sup> Sueli F. Yamada-Ogatta,<sup>d</sup> Marli C. Martins-Pinge,<sup>e</sup> Rubens Cecchini,<sup>f</sup> Phílino Pingé-Filho<sup>a</sup>

Laboratório de Imunopatologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil<sup>a</sup>; Laboratório de Imunologia, Instituto do Coração, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil<sup>b</sup>; Instituto Carlos Chagas/Fiocruz, Curitiba, Brazil<sup>c</sup>; Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil<sup>d</sup>; Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil<sup>e</sup>; Laboratório de Patofisiologia e Radicais Livres, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil<sup>f</sup>

The intracellular protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas disease, a serious disorder that affects millions of people in Latin America. Cell invasion by *T. cruzi* and its intracellular replication are essential to the parasite's life cycle and for the development of Chagas disease. Here, we present evidence suggesting the involvement of the host's cyclooxygenase (COX) enzymes during *T. cruzi* invasion. Pharmacological antagonists for COX-1 (aspirin) and COX-2 (celecoxib) caused marked inhibition of *T. cruzi* infection when rat cardiac cells were pretreated with these nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for 60 min at 37°C before inoculation. This inhibition was associated with an increase in the production of NO and interleukin-1 $\beta$  and decreased production of transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) by cells. Taken together, these results indicate that COX-1 more than COX-2 is involved in the regulation of anti-*T. cruzi* activity in cardiac cells, and they provide a better understanding of the influence of TGF- $\beta$ -interfering therapies on the innate inflammatory response to *T. cruzi* infection and may represent a very pertinent target for new therapeutic treatments of Chagas disease.

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi* infection, remains an important neglected tropical disease and has emerged as an important global public health problem because many *T. cruzi*-infected people from Latin America immigrate to countries where the disease is not endemic (1). An estimated 14,000 people die annually from this disease worldwide (2). Clinically, *T. cruzi* infection causes acute myocarditis followed by chronic cardiomyopathy and vasculopathy in humans and in experimental models.

Studies from diverse laboratories using different host cell types and *T. cruzi* strains have demonstrated that this parasite can invade almost all nucleated cells, both phagocytic and nonphagocytic (3). Although *T. cruzi* trypomastigotes are broadly dispersed among many different organs in the mammalian host, cardiac tissue is an important target for this parasite, and the *T. cruzi*-cardiomyocyte interaction has been the subject of intense investigation (4–7).

During the *T. cruzi*-cardiomyocyte interaction, the parasite gains control of overall host cell gene expression, including expression of 353 genes related to the immune response, inflammation, cytoskeleton organization, cell-cell and cell-matrix interactions, apoptosis, the cell cycle, and response to oxidative stress. This information provides insights into how the parasite survives, replicates, and persists in the infected host and ultimately the clinical outcome of the infection (5).

*T. cruzi* induces upregulation of nitric oxide (NO) production in cardiomyocytes along with an upregulation in the levels of interleukin-6 (IL-6), IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (8–13). The resulting acute myocarditis is characterized by an intense inflammatory response typified by upregulation of inflammatory mediators, such as cytokines, chemokines, inducible nitric oxide synthase (iNOS),

and endothelin (7), and also eicosanoids (10), which are essential elements to the defensive reaction in cardiac tissue (4), and it can also result in cardiac hypertrophy (8, 9).

Many of the changes that occur during acute and chronic Chagas disease can be explained by the effects of arachidonic acid (AA)-derived lipids, such as leukotrienes, lipoxins, hydroxyeicosatetraenoic and hydroperoxyeicosatetraenoic acids, prostaglandins (PGs), and thromboxane (10). A recent study demonstrated that cardiac calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> $\gamma$  (iPLA<sub>2</sub> $\gamma$ ) is responsible for AA and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) release in *T. cruzi* infection (11). PGs are oxygenated lipid mediators formed from the  $\omega$ 6 essential fatty acid AA. The committed step in PG biosynthesis is the conversion of AA to PGH<sub>2</sub>, which is catalyzed by either PG endoperoxide synthase-1 or -2, enzymes that are commonly known as cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2), respectively (14, 15). Both COX-1 and COX-2 are nonselectively inhibited by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as aspirin (ASA) and ibuprofen, whereas COX-2 activity is selectively blocked by COX-2 inhibitors called coxibs (e.g., celecoxib) (16). The relevance of these enzymes and the bioactive lipids that they produce are not well understood in parasitic diseases, although

Received 8 March 2014 Returned for modification 14 April 2014

Accepted 31 July 2014

Published ahead of print 4 August 2014

Address correspondence to Phílino Pingé-Filho, pingefilho@uel.br.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.02752-14

the role of eicosanoids in the pathogenesis of Chagas disease is becoming better defined (10).

Given the increasing interest in the role of eicosanoids in *T. cruzi* infection, we investigated the effect of prostaglandin synthesis inhibition with ASA and celecoxib on the inflammatory response and cardiac myoblast invasion by *T. cruzi*. Our results showed that the internalization of the parasite was reduced when H9C2 cells were treated with ASA or celecoxib. This reduction was associated with an increase in the production of NO and IL-1 $\beta$  and reduction of TGF- $\beta$  only by cells that were treated with ASA. Taken together, these results indicated that COX-1 is involved in the regulation of anti-*T. cruzi* activity by cardiac cells and that it participates in *T. cruzi* invasion of myoblasts. These results elucidate the influence of eicosanoids on the innate inflammatory response to *T. cruzi* infection as well as provide an alternate perspective of specific immune interventions.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals, drugs, and reagents.** Dimethyl sulfoxide (DMSO), ASA, and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich, Brazil Ltda. Penicillin, streptomycin sulfate, gentamicin, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Gibco (Grand Island, NY). Celecoxib was purchased from Pfizer Pharmaceuticals. Forskolin and wortmannin were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc.

**Cardiac myoblast cultures.** The rat cardiac myoblast H9C2 cell line (ATCC CRL-1446) was maintained in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate in a humidified incubator at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The cells were plated onto 13-mm round glass coverslips and washed in warm phosphate-buffered saline (PBS) before the interaction assays. Additionally, 2  $\times$  10<sup>5</sup> cells were plated onto 96-well dishes. One set of plates was used to quantify cytokines and the other set was for NO and iNOS detection.

**Parasites.** *Trypanosoma cruzi* (Y strain) (17) was maintained by weekly intraperitoneal inoculation of Swiss mice with 2  $\times$  10<sup>5</sup> trypomastigotes. To conduct our experiments, blood from previously infected mice was obtained by cardiac puncture with anticoagulant. The blood was centrifuged at 1,500  $\times$  g for 1 min and allowed to stand at 37°C for 60 min. The supernatant serum containing most of the *T. cruzi* trypomastigotes was centrifuged at 1,200  $\times$  g for 15 min. The sediment was resuspended in 1 ml of RPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island, NY) containing 10% inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco, Grand Island, NY).

Blood trypomastigotes from 5 mice previously infected with strain Y were used to infect LLC-Mk2 cells (ATCC CCL-7; American Type Culture Collection, Rockville, MD), and trypomastigotes derived from the supernatants of *T. cruzi*-infected LLC-Mk2 cell cultures were used for subsequent experiments. *T. cruzi*-infected LLC-Mk2 cell cultures were grown in RPMI 1640 medium containing 10% inactivated FBS, 40  $\mu$ g/ml gentamicin, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco, Grand Island, NY). Subconfluent cultures of LLC-Mk2 cells were infected with 5  $\times$  10<sup>6</sup> trypomastigotes. Free parasites were removed after 24 h, and cultures were maintained in 10% FBS-RPMI 1640. Five days postinfection, free trypomastigote forms could be found in the cell supernatants.

**Treatment of myoblasts with drugs, including NSAIDs.** Before the experiments, previously washed H9C2 cells were incubated for 1 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in the presence of different concentrations of ASA or celecoxib (2.5 mM, 1.25 mM, and 0.625 mM) to test the effects of the drugs on parasite internalization into the host cell. After incubation, the medium containing NSAIDs was removed and cells were allowed to interact with trypomastigote forms, added at a ratio of 5 parasites per cell. The interaction was allowed to proceed for 24 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The cells were then washed three times, fixed with Bouin's fixative, stained with Giemsa stain (Merck), and observed under a light

microscope at 1,000 $\times$  magnification. Other treatments included incubation with 10  $\mu$ M forskolin for 20 min at 37°C and 200 nM wortmannin for 30 min at 37°C in the presence or absence of celecoxib. The internalization index was calculated by multiplying the percentage of infected cells by the mean number of parasites per infected cell (18). All the internalization indices were normalized.

Experiments were performed in triplicate, and five independent experiments were completed. All the experiments included untreated, infected H9C2 cells as controls. Quantification was carried out via light microscopy, and a total of 500 cells were randomly counted.

**Cell viability assay.** Viability of the cells obtained from the cultures before and after incubation experiments was determined in an MTT assay to show the mitochondrial activity of living cells. Briefly, the H9C2 cells were plated at 2  $\times$  10<sup>5</sup> cells/well in a 96-well microplate for 24 h. After treatment, the cells were incubated with MTT (final concentration, 0.5 mg/ml) at 37°C for 4 h. The supernatant was aspirated, and DMSO was added to the wells. Insoluble crystals were dissolved by mixing, and the plates were read using a multiplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA) at a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 630 nm. The percentage of cell viability was calculated using the following formula, as previously described (19): percent cell viability = [(mean absorbance in test wells)/(mean absorbance in control wells)]  $\times$  100.

**Detection of NO levels by high-sensitivity chemiluminescence.** NO levels were evaluated by employing a highly sensitive, previously described chemiluminescence system (20) with some modifications. In this method, NO reacts with hydrogen peroxide, resulting in peroxynitrite. In the presence of luminol, peroxynitrite produces triplet oxygen, which decays to singlet oxygen and emits photons; the photons are detected by using a luminometer system coupled to software.

To measure the NO/peroxynitrite level, supernatants of the H9C2 cell cultures were removed from incubation and immediately diluted in fresh sterile Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer (2 mM; pH 8.5) that was previously degassed via N<sub>2</sub> bubbling for 20 min, to eliminate the presence of molecular oxygen and oxidation of NO to nitrite/nitrate. The final reaction volume was 1 ml, with a cell concentration of 2  $\times$  10<sup>5</sup> cells/ml.

The starting reagent was prepared by mixing equal volumes of luminol solution (4.39  $\mu$ M dissolved in 1 M KOH) diluted 1:10 in desferrioxamine (36.58  $\mu$ M), and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.44  $\mu$ M) was added to 3 parts of degassed Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer (2 mM; pH 8.5). This mixture was vortexed for 5 min before use. All the solutions were sterile, kept at 25°C in covered tubes, and protected from light. Finally, the samples were injected with 50  $\mu$ l of starting reagent, and the reaction was performed in a Glomax luminometer (Promega) with an automatic reagent injector, employing a kinetic protocol that allowed 10 readings per second.

The total curve profile, integrated area, and curve were analyzed to determine the peroxynitrite levels. A standard curve was obtained for nitrite reduction at an acidic pH to determine the NO/peroxynitrite concentration. NO is generated by nitrite (NO<sup>2-</sup>) reduction at acidic pH, as previously described (19). In this reaction, 1.8 ml of 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-0.1 M KI and 7.2 ml of 0.1 mM NaNO<sub>2</sub> were used. The reaction immediately generates a solution of 400 pM NO at room temperature. This solution was diluted to final concentrations of 100 fM, 200 fM, 300 fM, and 400 fM NO in 2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer, pH 8.5, that had been previously degassed using N<sub>2</sub>.

**Immunocytochemistry labeling for iNOS.** Immunocytochemistry for iNOS was performed on coverslip-adherent cells by using the labeled streptavidin biotin method and a LSAB kit (Dako Japan, Kyoto, Japan) without microwave accentuation. The coverslips were incubated with 10% Triton X-100 solution for 1 h, washed 3 times in PBS, and treated for 40 min at room temperature with 10% bovine serum albumin. The coverslips were then incubated overnight at 4°C with primary antibody (anti-iNOS rabbit monoclonal antibody diluted 1:200; catalog number 610599; BD Biosciences), followed by secondary antibody treatment for 2 h at room temperature. Horseradish peroxidase activity was visualized by treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) for 5 min. At the

last step, the sections were weakly counterstained with Harry's hematoxylin (Merck). Negative controls were prepared by omitting primary antibody. Intensity and localization of the immune reaction against primary antibody were examined on all coverslips with a photomicroscope (Olympus BX41; Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan).

For image analysis, photomicroscopic color slides of representative areas (magnification,  $\times 40$ ) were digitally acquired. After conversion of the images into gray scale (Adobe Photoshop), iNOS-positive pixels and total pixels thresholds were determined and data were processed using the ImageJ software. Positive immunostained areas were calculated as the proportion (percentage) of positive pixels to total pixels.

**ELISA for TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , and IL-1 $\beta$ .** Culture supernatants from H9C2 cells in 96-well plates were untreated or treated with ASA or celecoxib, either infected or not infected with *T. cruzi*, and incubated for 24 h. Levels of TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , and IL-1 $\beta$  in 100  $\mu$ l medium were measured by using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Ready-SET-Go!; eBioscience, San Diego, CA), according to the manufacturer's instructions.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was conducted via an analysis of variance with Bonferroni's multiple comparison test. Values are presented as means  $\pm$  standard errors of the means. The results were considered significant when  $P$  was  $< 0.05$ . Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism 5.0 computer software (GraphPad Software, San Diego, CA).

## RESULTS

**ASA and celecoxib inhibit *T. cruzi* entry into H9C2 cells.** To determine whether COX-derived mediators are involved in *T. cruzi* entry into host cells, H9C2 cells were infected with trypomastigotes in the presence of ASA or celecoxib at various concentrations. The cells were treated with increasing amounts of NSAIDs for 1 h. After treatment, the medium containing the inhibitors was removed before exposure to the parasites in order to guarantee that the inhibitors only affected the host cell and not the parasites. After 24 h of incubation with parasites, which provided sufficient time for them to enter into cells, the free parasites were removed and the cells were stained with Giemsa stain.

Both inhibitors reduced the internalization of trypomastigotes into H9C2 cells at 2.5 mM, 1.25 mM, and 0.625 mM (ASA) as well as 1.25 mM, 0.625 mM, and 0.312 mM (celecoxib) (Fig. 1a and b). Thus, PGE<sub>2</sub> synthesis inhibition by NSAIDs improves the myoblast response to *T. cruzi* infection. The cytotoxicity of inhibitors in the cells was evaluated in an MTT assay (Fig. 1c), and neither ASA nor celecoxib induced cell death. ASA irreversibly inhibited COX-1 by acetylation of a single serine residue on the enzyme, and this inactivation persisted for an extended period of time ( $\geq 24$  h). Therefore, to guarantee a prolonged effect of ASA on H9C2 cells in the cultures, we used the highest concentration, since it was not cytotoxic.

**Effect of adenylyl cyclase activation on H9C2 cell invasion by *T. cruzi*.** *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes trigger elevation in host cell cyclic AMP (cAMP) levels. Furthermore, parasite invasion is prevented by inhibition of host cell adenylyl cyclase and enhanced by stimulation of cAMP production (22). Here, we tested the effect of forskolin, an activator of adenylyl cyclase (23), on H9C2 cell invasion by *T. cruzi* after COX inhibition.

Cells were either untreated or treated with ASA (2.5 mM) or celecoxib (0.625 mM) for 1 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After washing in PBS, the cells were incubated with control (medium) or 10  $\mu$ M forskolin for 30 min at 37°C. An equivalent amount of the carrier (DMSO) was added to untreated cells. After

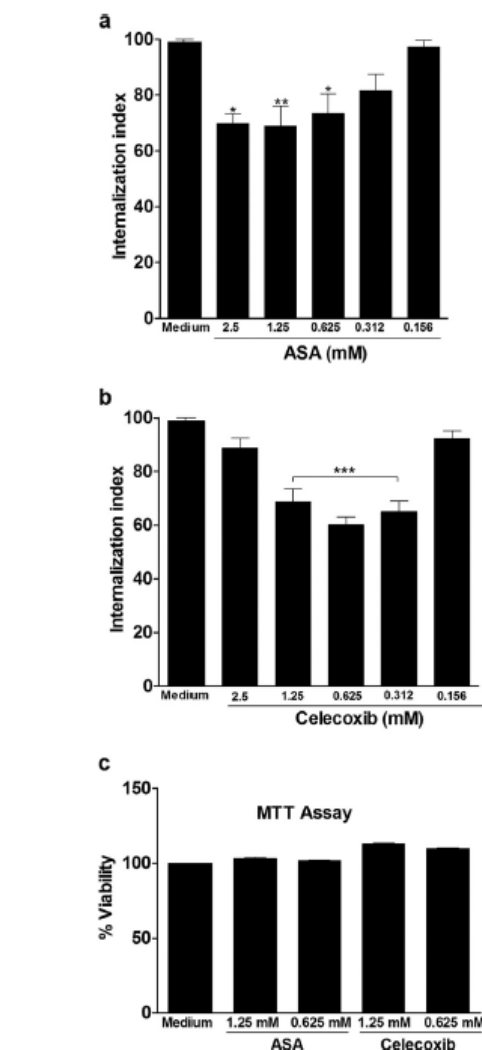


FIG 1 Aspirin and celecoxib inhibit *T. cruzi* entry into H9C2 cells. Internalization indices of the interaction process between macrophages treated for 1 h with increasing concentrations of ASA (a) or celecoxib (b) and exposed to *T. cruzi* (Y strain). After treatment with ASA or celecoxib, H9C2 cells interacted with a 5:1 parasite:cell ratio of trypomastigotes for 24 h, after which they were washed, fixed with Bouin's fixative, and stained with Giemsa stain. Quantification was carried out under a light microscope, where the number of intracellular parasites was counted in a total of at least 500 cells. (c) The effects of ASA and celecoxib on cell viability. An MTT assay was conducted to measure cell viability in H9C2 cells after treatment with inhibitors at concentrations from 0.625 to 2.5 mM. Values are means  $\pm$  standard errors of means of 10 experiments or two experiments (c). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (compared to infected cells cultured in medium alone).

washing in PBS, control and forskolin-treated cells were incubated for 24 h with parasites at a cell ratio of 5:1.

The activation of adenylyl cyclase with forskolin did not affect H9C2 cell invasion by trypomastigote in the Y strain ( $P > 0.05$ ) (Fig. 2) but reversed the effects of ASA and celecoxib (Fig. 2a and b).

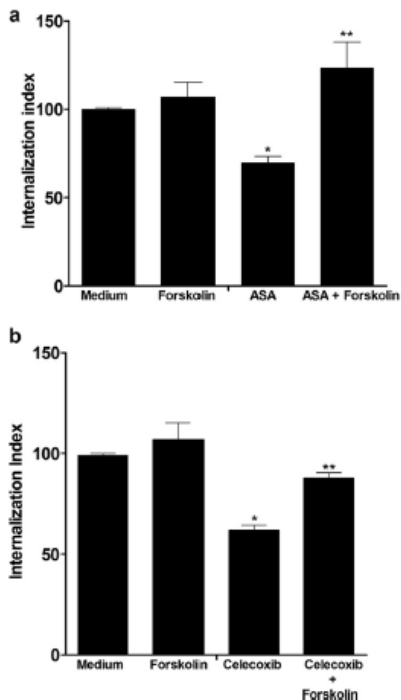


FIG 2 Activation of adenylyl cyclase with forskolin reverted the ASA and celecoxib effects on *T. cruzi*-infected H9C2 cells. Internalization indices were calculated for the interaction process between H9C2 cells treated for 1 h with ASA (2.5 mM) (a) or celecoxib (0.625 mM) (b) and exposed to *T. cruzi* (Y strain). Cells were pretreated or not with ASA (2.5 mM) or celecoxib (0.625 mM) for 1 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After washing in PBS, the cells were incubated with control (medium) or 10 μM forskolin for 30 min at 37°C. An equivalent amount of the carrier (DMSO) was added to untreated cells. After washing in PBS, control and forskolin-treated cells were incubated for 24 h with parasites at a parasite:cell ratio of 5:1. Values are the means ± standard errors of the means of three experiments. \*,  $P < 0.001$  (compared to infected cells cultured in medium alone); \*\*,  $P < 0.05$  (compared to cells cultured in ASA or celecoxib).

H9C2 cell PI3K activity is required for invasion by *T. cruzi*. The involvement of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) in *T. cruzi* host cell invasion has been examined using specific inhibitors, such as wortmannin (24). To investigate the role of PI3K in cells treated with NSAIDs, we administered wortmannin (200 nM) to cells for 30 min after NSAID treatment. An equivalent amount of the carrier (DMSO) was added to untreated cells.

The treatment of H9C2 cells with wortmannin significantly impaired *T. cruzi* invasion, independent of pretreatment with both NSAIDs (Fig. 3a and b). These data indicate that PI3 activity is involved in the entry into the cardiac cells used in this study, and this observation is consistent with previously published research demonstrating that both inhibitors cause downregulation in the PI3K/Akt pathway (25, 26).

NSAIDs modulate the innate inflammatory response of H9C2 cells infected with *T. cruzi*. We examined the effects on NO production and cytokines of various treatments that alter intracellular signal transducing pathways. Internalization of *T. cruzi* into H9C2 cells did not stimulate the release of TNF-α (Fig. 4a) or

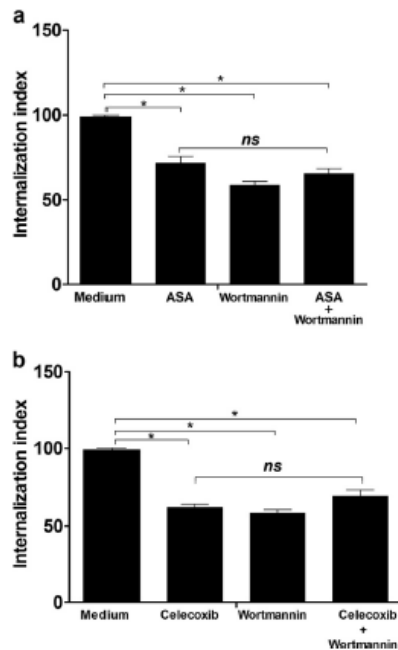


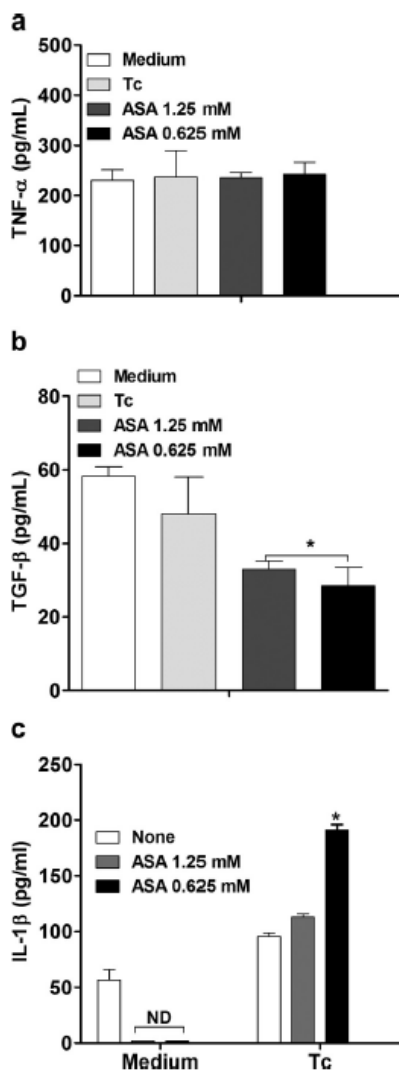
FIG 3 Treatment of H9C2 cells with wortmannin significantly diminished the infectivity of parasites independently of pretreatment with ASA or celecoxib. Internalization indices were calculated for the interaction process between H9C2 cells pretreated for 1 h with ASA (2.5 mM) (a) or celecoxib (0.625 mM) (b) and exposed to *T. cruzi* (Y strain). Cells were treated or not with ASA or celecoxib for 1 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After washing in PBS, the cells were incubated with medium (control) or wortmannin (200 nM) for 30 min at 37°C. An equivalent amount of the carrier (DMSO) was added to untreated cells. After washing in PBS, control and wortmannin-treated cells were incubated for 24 h with a parasite:cell ratio of 5:1. Values are the means ± standard errors of the means of three experiments. \*,  $P < 0.001$  (compared to infected cells cultured in medium alone); ns, not significant.

TGF-β (Fig. 4b), but it increased IL-1β production (Fig. 4c). Treatment with ASA (Fig. 4a) or celecoxib (Fig. 5a) did not affect TNF-α production by cardiac cells but increased IL-1β production (Fig. 4c and 5c), whereas ASA (Fig. 4b), but not celecoxib, inhibited TGF-β production by the cells (Fig. 5b).

The effect of both inhibitors on NO production was evaluated by detection of NO in *T. cruzi*-infected H9C2 supernatants using high-sensitivity chemiluminescence. Interestingly, NO production in cardiac cells was diminished by *T. cruzi* and increased by prior treatment of cells with ASA (0.625 mM) and celecoxib (1.25 mM) (Fig. 6). The increase in NO production induced by ASA was concentration dependent. Additionally, we observed that ASA and celecoxib treatment stimulated iNOS expression in *T. cruzi*-infected H9C2 cells (Fig. 7). Interestingly, when cells were incubated with ASA in combination with forskolin, we observed a large number of internalized trypomastigotes (Fig. 2a), which was associated with increased TGF-β production by cells (Fig. 8).

## DISCUSSION

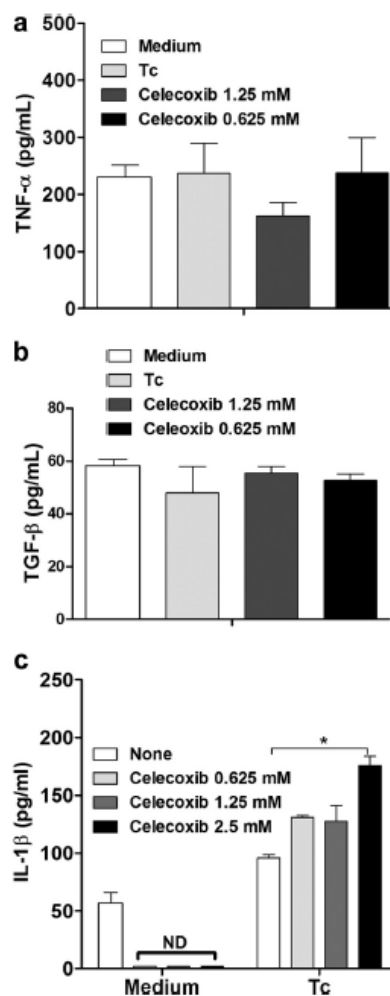
Previous studies have shown that the release of eicosanoids during infection with *T. cruzi* regulates host responses and controls disease progression (10, 27–31). PGs, together with NO and TNF-α,



**FIG 4** Effects of aspirin on TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , and IL-1  $\beta$  production in *T. cruzi*-infected H9C2 cells. Cells were treated for 1 h with ASA (0.625 and 1.25 mM) and exposed to *T. cruzi* (Y strain). After treatment, the cells interacted with a 5:1 trypomastigote:cell ratio for 24 h, after which they were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> during 24 h. TNF- $\alpha$  (a), TGF- $\beta$  (b), and IL-1 $\beta$  (c) levels in supernatants were measured with a specific enzyme-linked immunosorbent assay. Results are the means  $\pm$  standard errors of the means for duplicate determinations and are representative of two independent experiments. \*,  $P < 0.05$  (compared to cell culture in medium alone); ND, not detected.

participate in a complex circuit that controls lymphoproliferative and cytokine responses in *T. cruzi* infection (28). However, the involvement of COX-mediated PG production in the entry of *T. cruzi* into cardiac cells is largely unexplored.

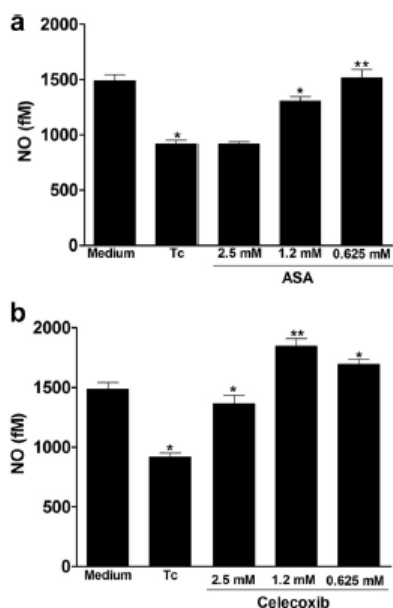
The data shown herein demonstrate that treatment of rat cardiac cells with NSAIDs such as aspirin and celecoxib significantly inhibits internalization of *T. cruzi* trypomastigotes and strongly support the idea that the COX pathway plays a fundamental role



**FIG 5** Effects of celecoxib on TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , and IL-1 $\beta$  production in *T. cruzi*-infected H9C2 cells. Cells were treated for 1 h with celecoxib (0.625 and 1.25 mM) and exposed to *T. cruzi* (Y strain). After treatment, the cells interacted with a 5:1 trypomastigote:cell ratio for 24 h, after which they were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> during 24 h. TNF- $\alpha$  (a), TGF- $\beta$  (b), and IL-1 $\beta$  (c) levels in supernatants were measured with a specific enzyme-linked immunosorbent assay. Results are the means  $\pm$  standard errors of the means for duplicate determinations and are representative of two independent experiments. \*,  $P < 0.05$  (compared to cell culture in medium alone); ND, not detected.

in the process of parasite invasion. In fact, PGE<sub>2</sub> production significantly increases in *T. cruzi*-infected macrophages compared with uninfected macrophages (35), and PGE<sub>2</sub> synthesis inhibition by using aspirin synergistically enhances the activity of nifurtimox and benznidazole in infected RAW 264.7 cells (36).

The effects of aspirin on *T. cruzi* infection have been associated in part, with a switch to the AA pathway that is linked to acetylation of the COX-2 isoenzyme (37). This acetylation enables COX-2 to synthesize other lipid products derived from AA, some of them with anti-inflammatory properties, such as 15-epi-LXA<sub>4</sub>,



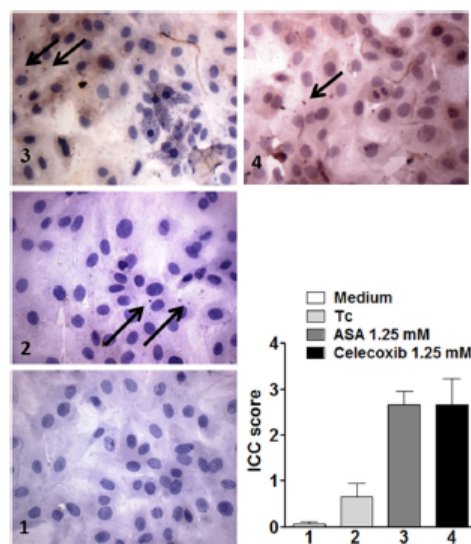
**FIG 6** Effects of aspirin upon NO production in *T. cruzi*-infected H9C2 cells. Cells were treated for 1 h with ASA (0.625, 1.25, and 2.5 mM) (a) or celecoxib (0.625, 1.25 and 2.5 mM) (b) and exposed to *T. cruzi* (Y strain). After treatment with NSAIDs, cells interacted with a 5:1 trypomastigote:cell ratio for 24 h, after which they were washed and cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> during 24 h. NO levels in supernatants were measured by high-sensitivity chemiluminescence. Results are the means ± standard errors of the means for duplicate determinations and are representative of two independent experiments. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  (compared to the untreated infected cell culture [Tc]).

known as an “aspirin-triggered lipoxin.” High levels of 15-epi-LXA<sub>4</sub> were observed in *T. cruzi*-infected mice treated with the low doses of ASA, while high ASA doses decreased 15-epi-LXA<sub>4</sub> levels (37). Importantly, 15-epi-LXA<sub>4</sub> prevented parasitemia, mortality, and cardiac changes *in vivo* and restored the protective role in the treatment group that received a high dose of ASA (37). Additionally, polyamines seem to be crucial for the trypomastigote internalization process in at least some cellular types and in infection progression (38).

COX is related to an increase of ornithine decarboxylase (ODC) activity in *T. cruzi*-infected macrophages (33), which might increase the polyamine content in macrophages. Since *T. cruzi* uses these polyamines to synthesize trypanothione (an enzyme that participates in the hydroperoxide detoxification of *T. cruzi*), the inhibition of COX by ASA probably results in a reduction in polyamine levels caused by inhibition of ODC, indirectly contributing to decreased trypanothione synthesis in *T. cruzi*, as suggested by López-Muñoz and collaborators (36).

Trypomastigotes (the infective stages of *T. cruzi*) trigger elevations in host cell cAMP levels. This is a significant finding, because trypomastigotes are the *T. cruzi* life cycle stages that are capable of invading host cells through a Ca<sup>2+</sup>-dependent lysosome recruitment process, which involves parasite-mediated signaling (22). Elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels has also been demonstrated in *T. cruzi*-infected cardiac cells (4).

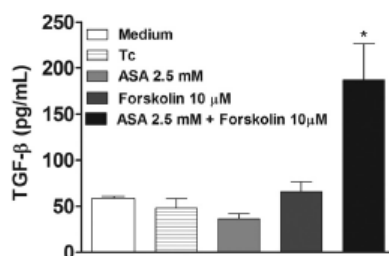
Our results showed that treatment of H9C2 cells with the ad-



**FIG 7** Effects of aspirin and celecoxib on iNOS expression in *T. cruzi*-infected H9C2 cells. Immunocytochemistry for iNOS was performed on coverslip-adherent cells by the labeled streptavidin biotin method with a LSAB kit (Dako Japan, Kyoto, Japan) without microwave accentuation. (1) Intracellular iNOS protein was detected by immunocytochemistry in uninfected (control) H9C2 cells. (2) *T. cruzi* provoked a discrete increase of iNOS expression. (3 and 4) ASA (3) and celecoxib (4) were effective inducers of iNOS expression in *T. cruzi*-infected H9C2 cells.

enyl cyclase activator forskolin (23) did not alter the infectivity of trypomastigotes (Y strain). The treatment of H9C2 cells with celecoxib (an inhibitor of COX-2) or ASA in combination with forskolin restored the infectivity of trypomastigotes in cardiac cells. This could have been due to the effects of NSAIDs through the inhibition of cAMP, as previously described (39).

The PI3K inhibitor wortmannin caused marked inhibition of *T. cruzi* infection when H9C2 cells were treated before inoculation. This inhibition was independent of pretreatment with aspirin or celecoxib. These findings suggest a role for host PI3K activ-



**FIG 8** Aspirin in combination with 10 μM forskolin increased TGF-β production by *T. cruzi*-infected H9C2 cells. Cells were treated for 1 h with ASA (2.5 mM). After treatment, cells were washed and incubated with 10 μM forskolin for 20 min. After treatment, cells were washed again and allowed to interact with a 5:1 trypomastigote:cell ratio for 24 h at 37°C. TGF-β levels in supernatants were measured with a specific enzyme-linked immunosorbent assay. Results are means ± standard errors of the means for duplicate determinations and are representative of two independent experiments. \*,  $P < 0.05$  (compared to infected cells in cell culture medium, ASA, or forskolin alone).

ities during the *T. cruzi* infection process into cardiac cells. Therefore, our findings are consistent with the hypothesis that PI3K inhibition results in an increase in COX-2 production (40). Further work will be required to test our hypothesis and to determine whether wortmannin promotes increases of PGs in *T. cruzi*-infected H9C2 cells.

Inhibition of COX activity may increase NO levels, thus restoring the antiparasitic activity of macrophages (38). Our results are consistent with this hypothesis. Additionally, we showed that iNOS expression in H9C2 cells increased with ASA or celecoxib treatment, which is also in agreement with our hypothesis.

Moreover, there is no evidence to support the hypothesis that low TGF- $\beta$  production by H9C2 cells reduces *T. cruzi* infection. We attempted to determine whether TGF- $\beta$  is involved in the effect of ASA or celecoxib on *T. cruzi*-infected cells. We did not find any effect of celecoxib on TGF- $\beta$  production by H9C2 cells, but when we used ASA, we observed a decrease in TGF- $\beta$  released by cells, indicating the role of TGF- $\beta$  in ASA activity. In fact, TGF- $\beta$  is required for the invasion of host cells by the parasite (41). *T. cruzi* infection induces the production of NO, which could contribute to parasite killing by host cells. TGF- $\beta$  is a potent suppressor of NO production (42), and its inhibition caused decreased *T. cruzi* invasion in cardiomyocytes (43).

Finally, in *T. cruzi*-infected H9C2 cells, COX inhibition by ASA or celecoxib was related to the increase of IL-1 $\beta$  but not of TNF- $\alpha$ , which might explain in part the increase of antiparasitic activity of cardiac cells treated with NSAIDs. In fact, IL-1 $\beta$  is critical for the restriction of *Leishmania amazonensis* infection (44), and recently it was demonstrated that *T. cruzi*-infected macrophages treated with IL-1 $\beta$  released fewer trypomastigotes than untreated macrophages and that IL-1 $\beta$  triggered NO release by infected macrophages in a dose-dependent manner (45).

In conclusion, this is the first report, to our knowledge, showing the *in vitro* effect of NSAIDs (aspirin and celecoxib) on *T. cruzi* entry into rat cardiac cells, providing a better understanding of the influence of TGF- $\beta$ -interfering therapies on the innate inflammatory response to *T. cruzi* infection and may represent a very pertinent target for new therapeutic treatments of Chagas disease.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil (CNPq; 302097/2010-474792/2011-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and by the Fundação Araucária (Convênio 419/2009).

We declare no conflict of interests.

P. Pinge-Filho, S. F. Yamada-Ogatta, M. C. Martins-Pinge, and A. D. Malvezi participated in research design. A. D. Malvezi, C. Panis, R. Valeriano da Silva, M. I. Lovo-Martins, N. G. Zanluqui, V. L. Tatakahara, and R. C. de Freitas conducted experiments. E. C. Neto, R. Cecchini, J. Bordignon, and S. Goldenberg contributed to the new reagents or analytical tools. A. D. Malvezi, C. Panis, R. Valeriano da Silva, M. I. Lovo-Martins, and P. Pinge-Filho performed the data analysis. A. D. Malvezi, J. Bordignon, M. C. Martins-Pinge, and P. Pinge-Filho contributed to the writing of the paper.

#### REFERENCES

- Pérez-Molina JA, Norman F, López-Vélez R. 2012. Chagas disease in non-endemic countries: epidemiology, clinical presentation and treatment. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 14:263–274. <http://dx.doi.org/10.1007/s11908-012-0259-3>.
- Schmunis GA, Yadon ZE. 2010. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 115:14–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>.
- Romano PS, Cueto JA, Casassa AF, Vanrell MC, Gottlieb RA, Colombo MI. 2012. Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. *IUBMB Life* 64:387–396. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.1019>.
- Calvet CM, Melo TG, Garzoni LR, Oliveira FOR, Jr, Silva Neto DT, Nazareth MNSL, Pereira MCS. 2012. Current understanding of the *Trypanosoma cruzi* cardiomyocyte interaction. *Front. Immunol.* 3:327.
- Manque PA, Probst C, Pereira MCS, Rampazzo RCP, Ozaki LS, Pavoni DP, Silva Neto DT, Carvalho MR, Xu P, Serrano MG, Alves JMP, Nazareth MNSL, Meirelles L, Goldenberg S, Krieger MA, Buck GA. 2011. *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. *Infect. Immun.* 79:1855–1862. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00643-10>.
- Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, Weiss LM, Nagajyothi F, Tanowitz HB, Garg NJ. 2012. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin. Immunopathol.* 34:753–770. <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-012-0351-7>.
- Corral RS, Guerrero NA, Cuervo H, Gironès N, Fresno M. 2013. *Trypanosoma cruzi* infection and endothelin-1 cooperatively activate pathogenic inflammatory pathways in cardiomyocytes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2034. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002034>.
- Petersen CA, Burleigh BA. 2003. Role for interleukin-1 beta in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Infect. Immun.* 71:4441–4447. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.8.4441-4447.2003>.
- Petersen CA, Krumholz KA, Burleigh BA. 2005. Toll-like receptor 2 regulates interleukin-1 $\beta$ -dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 73:6974–6980. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.10.6974-6980.2005>.
- Machado FS, Mukherjee S, Weiss LM, Tanowitz HB, Ashton AW. 2011. Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection. *Adv. Parasitol.* 76:1–31. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385895-5.00001-3>.
- Sharma J, Eickhoff CS, Hoft DF, Ford DA, Gross RW, McHowat J. 2013. The absence of myocardial calcium-independent phospholipase A $_2$  results in impaired prostaglandin E $_2$  production and decreased survival in mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 81:2278–2287. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00497-12>.
- Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS. 2000. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation* 102:3003–3008. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.102.24.3003>.
- Machado FS, Souto JT, Rossi MA, Esper L, Tanowitz HB, Aliberti J, Silva J. 2008. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. *Microbes Infect.* 10:1558–1566. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2008.09.009>.
- Rocca B, FitzGerald GA. 2002. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int. Immunopharmacol.* 2:603–630. [http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00204-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00204-1).
- Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. 2006. Prostaglandin E $_2$  synthesis and secretion: the role of PGE $_2$  synthases. *Clin. Immunol.* 119:229–240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2006.01.016>.
- Rimon G, Sidhu RS, Lauver DA, Lee JY, Sharma NP, Yuan C, Frieler RA, Triebel RC, Lucchesi BR, Smith WL. 2010. Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase -1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:28–33. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0909765106>.
- Silva LHP, Nussenzweig V. 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* 20:191–203.
- Barrias ES, Reignault LC, De Souza W, Carvalho TM. 2010. Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages. *PLoS One* 5:e7764. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007764>.
- Ren G, Qiao HX, Yang J, Zhou CX. 2010. Protective effects of steroids from *Allium chinense* against H $_2$ O $_2$ -induced oxidative stress in rat cardiac H9C2 cells. *Phytother. Res.* 24:404–409. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2964>.
- Kikuchi K, Nagano T, Hayakawa H, Hirata Y, Hirobe M. 1993. Real time measurement of nitric oxide produced *ex vivo* by luminol-H $_2$ O $_2$  chemiluminescence method. *J. Biol. Chem.* 268:23106–23110.
- Pfeiffer S, Gorren ACF, Schmidt K, Werner ER, Hansert B, Bohle DS, Mayer B. 1997. Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution: reac-

- tion with nitric oxide and pH-dependent decoupling to nitrite and oxygen in a 2:1 stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 272:3465–3470. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.6.3465>.
22. Rodriguez A, Martinez I, Chung A, Berlot CH, Andrews NW. 1999. cAMP regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 274:16754–16759. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.24.16754>.
  23. Seamon KB, Daly JW. 1981. Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. *Cyclic Nucleotide Res.* 7:201–224.
  24. Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl P, Isola ELD. 2001. *Trypanosoma cruzi*: phosphatidylinositol 3-Kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp. Cell Res.* 264:211–218. <http://dx.doi.org/10.1006/excr.2000.5123>.
  25. Liu B, Shi ZL, Feng J, Tao HM. 2008. Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in human osteosarcoma cell line MG-63 via down-regulation of PI3K/Akt. *Cell Biol. Int.* 32:494–501. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.10.008>.
  26. Uddin S, Ahmed M, Hussain A, Assad L, Dayel F, Bavi P, Al-Kuraya KS, Munkarah A. 2010. Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits PI3K/AKT kinase activity in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Cancer* 126:382–394. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24757>.
  27. Celentano AM, Gorelik G, Solana ME, Sterin-Borda L, Borda E, González Cappa SM. 1995. PGE<sub>2</sub> involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Prostaglandins* 49:141–153.
  28. Pinge-Filho P, Tadokoro CE, Abrahamsohn IA. 1999. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell. Immunol.* 193:90–98. <http://dx.doi.org/10.1006/cimm.1999.1463>.
  29. Hideko Tatakahara VL, Cecchini R, Borges CL, Malvezi AD, Graça-de-Souza VK, Yamada-Ogata SF, Rizzo LV, Pinge-Filho P. 2008. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52:47–58. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00340.x>.
  30. Sterin-Borda L, Gorelik G, Goren N, Cappa SG, Celentano AM, Borda E. 1996. Lymphocyte muscarinic cholinergic activity and PGE<sub>2</sub> involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 81:122–128. <http://dx.doi.org/10.1006/clin.1996.0167>.
  31. Mukherjee S, Machado FS, Huang H, Oz HS, Jelicks LA, Prado CM, Koba W, Fine EJ, Zhao D, Factor SM, Collado E, Weiss LM, Tanowitz HB, Ashto AW. 2011. Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease. *PLoS One* 6:e16959. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016959>.
  32. Abdalla GK, Faria GE, Silva KT, Castro ECC, Reis MA, Michelin MA. 2008. *Trypanosoma cruzi*: the role of PGE<sub>2</sub> in immune response during the acute phase of experimental infection. *Exp. Parasitol.* 118:514–521. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2007.11.003>.
  33. Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MBP, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, Dos Reis GA, Lopes MF. 2000. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403:199–203. <http://dx.doi.org/10.1038/35003208>.
  34. Michelin MA, Silva JS, Cunha FQ. 2005. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp. Parasitol.* 111:71–79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2005.05.001>.
  35. Borges MM, Kloetzel JK, Andrade HF, Jr, Tadokoro CE, Pinge-Filho P, Abrahamsohn IA. 1998. Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF- $\alpha$  production during *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol. Lett.* 63:1–8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2478\(98\)00034-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2478(98)00034-0).
  36. López-Muñoz R, Faúndez M, Klein S, Escanilla S, Torres G, Lee-Liu D, Ferreira J, Kemmerling U, Orellana M, Morello A, Ferreira A, Maya JD. 2010. *Trypanosoma cruzi*: in vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. *Exp. Parasitol.* 124:167–171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.09.005>.
  37. Molina-Berrios A, Campos-Estrada C, Henriquez N, Faúndez M, Torres G, Castillo C, Escanilla S, Kemmerling U, Morello A, López-Muñoz RA, Maya JD. 2013. Protective role of acetylsalicylic acid in experimental *Trypanosoma cruzi* infection: evidence of a 15-epi-lipoxin A-mediated effect. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2173. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002173>.
  38. Kierszenbaum F, Wirth JJ, McCann PP, Sjoerdsma A. 1987. Impairment of macrophage function by inhibitors of ornithine decarboxylase activity. *Infect. Immun.* 55:2461–2464.
  39. Moon HG, Kim YS, Choi JP, Choi DS, Yoon CM, Jeon SG, Gho YS, Kim YK. 2010. Aspirin attenuates the anti-inflammatory effects of theophylline via inhibition of cAMP production in mice with non-eosinophilic asthma. *Exp. Mol. Med.* 42:47–60. <http://dx.doi.org/10.3858/emmm.2010.42.1.005>.
  40. Monick MM, Robeff PK, Butler NS, Flaherty DM, Carter AB, Peterson MW, Hunninghake GW. 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase activity negatively regulates stability of cyclooxygenase 2 mRNA. *J. Biol. Chem.* 277:32992–3000. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M203218200>.
  41. Araújo-Jorge TC, Waghbi MC, Soeiro Mde N, Keramidas M, Bailly S, Feige JJ. 2008. Pivotal role for TGF- $\beta$  in infectious heart disease: the case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardiopathy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19:405–413. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.08.002>.
  42. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. 1992. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur. J. Immunol.* 22:2501–2506. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830221006>.
  43. Waghbi MC, Keramidas M, Calvet CM, Meuser M, de Nazaré Soeiro CM, Mendonça-Lima L, Araújo-Jorge TC, Feige JJ, Bailly S. 2007. SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:2905–2910. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00022-07>.
  44. Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva ALN, Mineo TWP, Gutierrez FRS, Bellio M, Bortoluci K, Flavell RA, Bozza MT, Silva JS, Zamboni D. 2013. Inflammation-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat. Med.* 19:909–915. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3221>.
  45. Silva GK, Costa RS, Silveira TN, Caetano BC, Horta CV, Gutierrez FPS, PMda Matta Andrade WA, Niz M, Gazzinelli RT, Zamboni DS, Silva JS. 2013. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1 $\beta$  response and host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 191:3373–3383. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1203293>.

## 5 REFERENCIAS

ABDALLA, G. K.; FARIA, G. E.; CASTRO, K. T.; REIS, M. A.; MICHELIN, M. A. *Trypanosomacruzi*: role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. **Exp. Parasitol.** 118: 514-521, 2008.

AKIRA, S; UEMATSU S.; TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, 124:783-801, 2006.

ALEXANDER J. Effect of the antiphagocytic agent cytochalasin B on macrophages invasion by *Leishmania Mexicana* promastigota and *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **J. Protozool.** 22: 237-240, 1975.

ALIBERTI, J.; BAFICA, A. Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.** 73(3-4):283-8, 2005.

ALIBERTI, J.; HIENY, S.; REIS, E.; SOUSA, C.; SERHAN, C. N.; SHER, A. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. **Nat Immunol.** 3(1):76-82, 2002a.

ALIBERTI, J.; SERHAN, C.; SHER, A. Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. **J Exp Med.** 196(9):1253-62, 2002b.

ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; PIACENZA, L.; RADI, R. Intraflagosomal peroxynitrite as a macrophage derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol.Chem.** 286 (8): 6627-40, 2011.

ALVAREZ, M. N.; PIACENZA, L.; IRIGOIN, F.; PELUFFO, G.; RADI, R. Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. **Arch. Biochem. Biophys.** 432 (2): 222-232, 2004.

ALVES, M. J.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. **JUBMB Life** 59: 274-279, 2007.

ANDRADE H. M.; MURTA S. M.; CHAPEAUROUGE A.; PERALES J.; NIRDÉ P.; ROMANHA A. J. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. **J Proteome** 7(6):2357-67. 2008.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. V. The *Trypanosoma cruzi*-host cell interplay location, invasion, retention. **Nat. Rev. Microbiol.** 3 (10): 819-823, 2005.

ANDRADE, S.G. Patologia experimental da doença de Chagas. In: Brener, Z.; Andrade Z.A.; Barral-Netto, M. (Eds.), ***Trypanosoma cruzi* doença de Chagas**. Guanabara Koogan R.J., 177-200, 2000.

ANDREWS, N.W. Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Trends Cell Biol.** 5: 133-137, 1995.

ANONYMOUS. Recommendation from a satellite meeting. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 94: 429-432, 1999.

APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PÉREZ, C.; MIRANDA, C.; SÁNCHEZ, G.; ZULANTAY, I.; CORTÉS, P.; RODRIGUEZ, J.; JURI, D. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. **Am J Trop Med Hyg.** 59(1):133-8, 1998.

APT, W.; ARRIBADA, A.; ZULANTAY, I.; SANCHEZ, G.; VARGAS, S. L.; RODRIGUEZ, J. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. **Ann Trop Med Parasitol.** 97(1):23-9, 2003.

ARAÚJO-JORGE, T. C. Modelo animais para o estudo in vivo da Doença de Chagas e de seus aspectos histopatológicos (o camundongo) In: **Doença de Chagas: manual para experimentação animal**, Tânia C. Araujo-Jorge e Solange de Castro (Org). Rio de Janeiro: Fiocruz-Inst. Oswaldo Cruz, 2000.

ARAÚJO-JORGE, T.C.; BARBOSA, H.S.; MEIRELES, M.N. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15- year study. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz;** 87 Suppl5:43-56, 1992.

ARGENZIO, R. A.; RHOADS, J. M. Reactive oxygen metabolites in piglet cryptosporidiosis. **Pediatr Res.** 41(4 Pt 1):521-6, 1997.

ASHETON, A. W.; MURKERJEE, S.; NAGAJYOTHI, F. N.; HUANG, H.; BRAUSTEIN, V. L.; DERSRUISSEAU, M. S. Tromboxane A<sub>2</sub> is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.** 204: 929-940, 2007.

BA, X.; GUPTA S.; DAVIDSON, M.; GARG, N. J. *Trypanosoma cruzi* induces the reactive oxygen species-PARP-1-RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. **J Biol Chem.** 9;285(15). 2010.

BACHILLER, P. R.; NAKANISH, H.; ROBERTS, J. D. JR. Transforming growth factor  $\beta$  modulates the expression of nitric oxide signaling enzymes in the injured

developing lung and in vascular smooth muscle cells. **Ame.J. of Phys Lung C and Mol. Physio.** 298: 324-334, 2010.

BAKER N., O'MEARA S. J.; SCANNELLI M.; MADERNA P.; GODSON C. Lipoxin A4: anti-inflammatory and anti-angiogenic impact on endothelial cells. **J Immunol.** 15;182(6):3819-26. 2009.

BALLIGAND, J.; UNGUREANU, L. D.; SIMMONS, W. W. Citocine inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes: characterization and regulation of iNOS expression and dection of iNOS activity in single cardiac myocytes *in vitro*. **J. Biol. Chem.** 269: 27580-27588, 1994.

BARBOSA H. S. Why studies on invasion of host cell by *Trypanosoma cruzi* using established cell lines or primary cell cultures give conflicting results? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.94 p.153-154, 1999.

BARRIAS, E. S.; REIGNALT, L. C.; DE SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U. Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages. **Plos one** 5 (1): 1-11 2010.

BELAUNZARÁN, M. L.; WAINSELBAUM, M. J.; LAMMEL, E. M.; GIMENEZ, G.; ALOISE, M. M.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; ISOLA, E. L. Phospholipase A1 from *Trypanosoma cruzi* infective stages generates lipid messengers that activate host cell protein kinase c. **Parasitology.** 134(Pt 4):491-502, 2007.

BETZ, M.; FOX, S. B. Prostaglandins E<sub>2</sub> inibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. **J. Immunol.** 146: 108-113, 1991.

BINDER, D.; FEHR, J.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R. M. Virus-induced transient bone marrow aplasia: major role of interferon  $\alpha/\beta$  during acute infection with the noncytopathic lymphocytic choriomeningitis virus. **J. Exp. Med.** 185: 517-530. 1997.

BLITZMAN, M. Enfermedad de Chagas-Mazza- ler congress Virtual de cardiologia. Disponível em: <http://www.fac.org.ar>. 2007. Acesso em 05 de março de 2014.

BLOBAUM, A. L.; MARNETT, L. J. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. **J Med Chem.** 50(7):1425-41, 2007.

BLOODSWORT, A.; O'DONNELL, V. B. ; FREEMAN, B. A. Nitric oxide regulation of free radical ad enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. **Arterioscl. Tromb. Vasc. Biol.** 20 (7): 1707-1715, 2000.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response, **Nature Immunol.** 2: 907-916, 2001.

BOGDAN, C. The function of nitric oxide in the immune system In handbook of **Experimental Pharmacology . Vol. Nitric Oxide** 443 -492, 2000.

BORGES, C. L.; CECCHINI,R.; TATAKIHARA, V. L. H.;MALVEZI, A. D.; YAMADA-OGATTA, S.F.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO 5-Lipoxygenase plays a role in the control of parasite burden and contributes to oxidative damage of erythrocytes in murine Chagas' disease. **Immunol. Letters** 123: 38-45, 2009.

BORGES. M. M.; KLOETZEL,, J. K.; ANDRADE, H. F.; TADOKORO, C. E.; PINGE-FILHO, P.; ABRAHAMSON, I. Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF- $\alpha$  production during *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol.Lett.** 63: 1-8, 1998.

BREDT, D. S.; GLATT, C. E.; HWANG, P. M.; FOTUHI, M.; DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. **Neuron.** 7: 615-624, 1991.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Microbiol.** 27: 347-382, 1973.

BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease.**Osw Cruz Mem Inst**, v.82, p.205-213, 1987.

BRENER, Z.;GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. In **Arch. Allergy.Immunol.** 114: 103-110, 1997.

BRESALIER, R. S.; FRIEDEWALD, V. E. JR.; RAKEL, R. E.; ROBERTS, W. C.; WILLIAMS, G. W. The Editor's roundtable: cyclooxygenase-2 inhibitors and cardiovascular risk.**Am J Cardiol.** 1;96(11):1589-604, 2005.

BROK, R. G.; DEKKER, N.; GERRITS, N. VERHEIJ, H. M.; TOMMASSEN, J.A conserved histidine residue of *Escherichia coli* outer-membrane phospholipase A is important for activity. **Eur J Biochem.** 234(3):934-8, 1995.

BURLEIGH B.; ANDREWS N.W. A 120-k-Da alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi*s involved in the generation of a novel Ca<sup>2+</sup>-signaling factor for mammalian cells. **J BiolChem.** 270: 5172-5180, 1995.

BURLEIGH, B.A.; WOOLSEY, A.M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion.**Cel Microbiol.** 4(11):701-711, 2002.

CAFFREY, C. R.; SCORY, S.; STEVERDING, D. Cysteine proteinases of trypanosome parasites: novel targets for chemotherapy. **Curr Drug Targets.** 1(2):155-62, 2000.

CALER, E.V.; CHAKRABARTI, S.; FOWLER, K.T.; RAO, S.; ANDREWS, N.W. The exocytosis-regulatory protein sinaptotagmin VII mediates cell invasion by *Trypanosomacruzi*. **J ExpMed.** 193: 1097-1104, 2001.

CALVET, C.M.; MEUSER, M.; ALMEIDA, D.; MEIRELLES, M.N.L.; PEREIRA, M.C.S. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. **Exp. Parasitol.** 107: 20-30, 2004.

CAMPOS M.A.; GAZZINELLI R.T. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. **Med Inflamm.** 13(3): 139-143, 2004.

CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 94 Suppl 1:331-5, 1999.

CANNON, G. W.; BREEDVELD, F. C. Efficacy of cyclooxygenase-2-specific inhibitors. **Am J Med.** 19;110 Suppl 3A:6S-12S, 2001.

CARDONI R. L.; ANTUNEZ, M. I. Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Mediators of inflammation** 13(4): 235-240, 2004.

CARDONI, R. L.; ANTUNEZ, M. I.; MORALES, C., NANTES, I. R. Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with *trypanosome cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg** 56: 329-334, 1997.

CARDOSO, J. E.; BRENER, Z. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 75: 97-104, 1980.

CARPENTER, L.; CORDERY, D., BIDEN, T. J.; Protein kinase Cd activation by interleukin1- $\beta$  stabilizes inducible nitric oxide synthase mRNA in pancreatic  $\beta$ -cells. **J.Biol. Chem.** 276: 5368- 5374, 2001.

CARVALHO T.M.; DE SOUZA W. Early events related with the behavior of *Trypanosomacruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. **Cells truct funct.** 45(6): 498-502, 1989.

CAZZULO J. J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. **Curr Top Med Chem.** 2(11):1261-71. 2002.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **American Trypanosomiasis: Epidemiology & Risk Factors.**2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html>> Acesso em 04 dez. 2013.

CELENTANO, A. M.; GORELINK G.; SOLANA, M. E.; STERIN-BORDA, L.; BORDA, E GONZÁLEZ CAPPA, S. M. PGE<sub>2</sub> involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. **Prostaglandins** 49: 141-153, 1995.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana, Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanuncruzi* n. gen., s. sp. Agente etiológico de uma nova entidade morbid do homem. **Mem.Inst. Osw. Cruz.** 1: 159-218, 1909.

CHAKRAVORTTY, D.; KATO,Y.; SUGIYAMA, T.; KOID, N. MU, M.M.; YOSHIDA, T.; TOKOCHI, T. The inhibitory action of sodium arsenit on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophage cells: a role of Raf-1 in lipopolysaccharide signaling. **J. Immunol.** 166: 2011-2017, 2001.

CHAN, E. D.:MORRIS,K. R.; BELISLE, J. T.; HILL, P.; REMIGIO, L.K.; BRENNAN, P. J.; RICHES, D.W. Induction of inducible nitric oxide synthase- NO by lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis is mediated by the MEK1-ERK, MKK7-JNK and NF-κB signaling pathway. **Infec. Immun.** 69: 2001-2010, 2001.

CHANDRASEKAR, B.; MELBY, P. C.; TROYER, D. A.; COLSTON, J. T.; FREEMAN, G. L. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute chagasic cardiomyopathy. **An. J. Pathol.** 152 (4): 925-934, 1998.

CHAPADEIRO, E. Clinical evolution and morbid-mortality in Chagas disease.**Mem.Inst.Oswaldo Cruz.** 94 (1): 309-310, 1999.

CHARLIER, C.; MICHAUX, C.Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs.**Eur J Med Chem.** 38(7-8):645-59, 2003.

CHIANG, N.; SERHAN, C. N. New mechanism for an old drug: aspirin triggers anti-inflammatory lipid mediators with gender implications. **Compr Ther.** 32(3):150-7, 2006.

CHOI, S. H.; AID, S.; BOSETTI, F. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and-2 in neuroinflammation: implicatios for translational research. **TrendsFarmacolSci** 30 (4): 174-181, 2009.

CHUENKOVA M. V.; FURNARI F. B.; CAVENEE W. K.; PEREIRA M. A. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: a potent and specific survival factor for human Schwann cells by means of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. **Proc Natl AcadSci USA**, v.98: 9936-9941, 2001.

CILLARI, E.; LIEW, F. Y.; LELCHUK, R. Suppression of interleukin-2 production by macrophages in genetically susceptible mice infected with *Leishmania major*. **Infect.Immun.** 54: 386-394, 1986.

CLÀRIA, J.; SERHAN, C. N. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 10;92(21):9475-9, 1995.

COIMBRA V.C.;YAMAMOTO D.; KHUSAL K.G.; ATAYDE V.D.; FERNANDES M.C.; MORTARA R. A.;YOSHIDA N.; ALVES M.J.; RABINOVITCH M. Eucleated L929 cells support invasion, differentiation, and multiplication of *Trypanosoma cruzi* parasites .**Infect Immun.** 75(8):3700-6. 2007.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation.**Int Immunopharmacol.** 1(8):1397-406, 2001.

CONNELLY, L.; PALACIOS-CALLENDER, M.; AMEIXA, C.; MONCADA, S.; HOBBS, A. Biphasic regulation of NF- $\kappa$ B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of Nitric oxide. **J. Immunol.** 166: 3873-3881, 2001.

CONNELLY, M. C.; KIERSZENBAUM, F. Modulation of macrophage interaction with *Trypanosoma cruzi* by phospholipase A2-sensitive components of the membrane **Biochem. Biophys Res Commun** 121: 931-939, 1984.

COOK, D. N. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis.**J.Leuko. Biol.** 59 (1): 61-66, 1996.

CORTEZ M.; NAIRA ; FERREIRA D.; LUQUETTI A. O.; RASSI A., ATAYDE V.D.; YOSHIDA N.;Infections by *Trypanosoma cruzi*metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule gp30. **Infect Immun**, v.71 p. 6184-6191, 2003.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review.**RevSocBrasMed Trop.**45(3):286-96, 2012.

COUTINHO, M.; FREIRE, O. JR.; DIAS, J. C.The noble enigma: Chagas' nominations for the Nobel prize. **MemInstOswaldo Cruz.** 1999.

COX, F. E. *Trypanosoma cruzi*: signals for transformation. **Nature**. 300(5894):685, 1982.

CROFFORD, L. J.; LIPSK, P. E.; BROOKS, P.; ABRAMSON, S. B.; SIMON, L.S.; VAN-DE-PUTE, L.B. Basis biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors **Arthritis Rheum**, 43 (1): 4-13, 2000.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infections in mice. **Infect. Immun.** 72: 4081-4089, 2004.

DA SILVA, R. V.; MALVEZI, A. D.; AUGUSTO, L. S.; KIAN, D.; TATAKIHARA, V. L. H.; YAMAGUSHI L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V.; SCHENKMAN, S.; PINGE-FILHO, P. Oral exposure to *Phytomonas serpens* attenuates thrombocytopenia and leukopenia during acute infection with *Trypanosoma cruzi*. **PLOS one** 2,8 (7): e68299, 2013.

DANESI R.; FIGG W. D.; REED E.; MYERS C. E. Paclitaxel (taxol) inhibits protein isoprenylation and induces apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. **Mol Pharmacol.** 47(6):1106-11. 1995.

DANNHARDT G.; KIEFER W.; KRÄMER G.; MAEHRLEIN S.; NOWE U.; FIEBICH B. The pyrrole moiety as a template for COX-1/COX-2 inhibitors. **Eur. J. Med Chem.** 35(5):499-510. 2000.

DANNHARDT, G.; KIEFER, W. Cyclooxygenase inhibitors--current status and future prospects. **Eur J Med Chem.** 36(2):109-26, 2001.

DE BARROS-MAZON, S.; GUARIENTO, M. E.; DA SILVA, C. A.; COFFMAN, R. L.; ABRAHAMSOHN, I. A.; Differential regulation of lymphoproliferative response a *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. **Cell Immunol.** 111 (1): 137-145, 2004.

DE BRACCO, M. M.; STERI-BORDA, L.; FINK, S.; FINIASZ, M.; BORDA, E. Stimulatory effect of lymphocytes from Chagas' patients on spontaneously beating rat atria. **Clin. Exp. Immunol.** 55: 405-412, 1984.

DE GROOTE, M. A., FANG F. C. Antimicrobial properties of nitric oxide. In **nitric oxide and infections** (ed. Fang F. C.) 231-261, 1999.

DHIMAN, M.; GARG, N. J. NADPH oxidase inhibition ameliorates *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis during Chagas disease. **J. of Pathol.** 225 (4): 583-596, 2011.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro, 22(10), 2006

DIAS, J. C. P. Mecanismos de transmissão. In: Brener, Z. & Andrade, Z. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, cap. 4, p. 152-174, 1979.

DIAS, J. C. P.; SHOFIELD, C. J. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (1): 103-121, 1999.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Acidocalcisome: A novel Ca<sup>2+</sup> storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. **Parasitol Today**. 15(11):443-8, 1999.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Current chemotherapy of human African trypanosomiasis. **Parasitol Res.** 90 Supp 1:S10-3, 2003.

DOS SANTOS, P. V.; ROFFÊ, E.; SANTIAGO, H. C.; TORRES, R. A.; MARINO, A. P.; PAIVA, C. N.; SILVA, A. A.; GAZZINELLI, R. T.; LANNES-VIEIRA, J. Prevalence of CD8(+) alpha, beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited, myocarditis is associated with acquisition of CD62L (Low) LFA-1(High) VLA (High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemottractant molecules. **Microbes Infect.** 3 (12): 971-984, 2001.

DOS SANTOS, S. L.; FREITAS, L. M.; LOBO, F. P.; RODRIGUES-LUIZ, G. F.; MENDES, T. A.; OLIVEIRA, A. C.; ANDRADE, L. O.; CHIARI, E.; GAZZINELLI, R. T.; TEIXEIRA, S. M.; FUJIWARA, R. T., BARTHOLOMEU, D. C. The MASP family of *Trypanosoma cruzi*: changes in gene expression and antigenic profile during the acute phase of experimental infection. **PLoS Negl Trop Dis.** 6(8):e1779. 2012.

DOST, C. K.; SARAIVA, J.; MONESI, N.; ZENTGRAF, U.; ENGELS, W.; ALBUQUERQUE, S. Six *Trypanosoma cruzi* strains characterized by specific gene expression patterns. **Parasitol Res.** 94(2):134-40, 2004.

DOWNWARD, P. PI 3-kinase, Akt and cell survival. **Semin Cell Dev. Biol.** 15: 177-182, 2004.

DVORAK, J.A. & SHMUNIS, G.A. *Trypanosoma cruzi*: interaction with mouse peritoneal macrophages, **Exper. Parasit.** 32: 289-300, 1972.

EBERT, F.; BARBOSA, H.S. The influence of cytochalasin B on the interaction of *T. cruzi* and mouse peritoneal macrophages. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 23: 61-67, 1981.

ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; HSIEH, I.; MCKERROW, J. H. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Med.** 188(4):725-34, 1998.

FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; KONOWAL, A.; FREED, P. W.; WESTCOTT, J. Y.; HENSON, P. M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J Clin Invest.** 101(4):890-8, 1998.

FELLEY-BOSCO, E.; BENDER, F. C.; COURJAULT-GAUTIER, F.; BRON, C., QUEST, A. F. G.; Caveolin -1 downregulates inducible nitric oxide synthase via the proteasome pathway in human colon carcinoma cells. **Proc. Natl. Sci.** 97: 14334-14339, 2000.

FERNANDES A.B; NEIRA I.; FERREIRA A.T.; MORTARA R.A. Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. **Parasitol Res.** 100 (1):59-68. 2006.

FERNANDES M.C.; CORTEZ M.; YONEYAMA K.A.G.; STRAUS A.H.; YOSHIDA N.; MORTARA R. A. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion. **Int. J. Parasitol.** 37 (13): 1431-1441, 2007.

FERNÁNDEZ, N.; RENEDO, M.; ALONSO, S.; CRESPO, M. S. Release of arachidonic acid by stimulation of opsonic receptors in human monocytes: the FcγR and the complement receptor 3 pathways. **J Biol Chem.** 278(52):52179-87, 2003.

FERREIRA, D.; CORTEZ, M.; ATAYDE, V. D.; YOSHIDA, N. Actin cytoskeleton-dependent and independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* mediated by distinct parasite surface molecules. **Infec. Immune.** 74: 5522-5528, 2006.

FIENBERG, M.W.; SHIMIZU, K.; LEBEDEVA, M.; HASPEL, R.; TAKAYAMA, K.; CHEN, Z.; FREDERIC, J. P.; WANG, X. F.; SIMON, D. I.; LIBBY, P.; MITCHELL, R. N.; JAIN, M. R. Essential role for Smad-3 in regulating MCP-1 expression and vascular inflammation. **Cir. Res.** 94: 601-608, 2004.

FOSSLIEN, E. Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the gastrointestinal system. **Ann Clin Lab Sci.** 28(2):67-81, 1998.

FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NASCIMENTO, D. O.; SOARES, M. B. P.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-Neto H. C.; MELLO, F. G.; DOS REIS, G. A.; LOPES, M. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, 403: 199-203, 2000.

FRIES, S.; GROSSER, T.; PRICE, T. S.; LAWSON, J.; KAPOOR, S.; DEMARCO, S.; PLETCHER, M. T.; WILTSHIRE, T.; FITZGERALD, G. A. Marked interindividual variability in the response to selective inhibitors of cyclooxygenase-2. **Gastroenterology**. 130(1):55-64, 2006.

FURCHGOT, R. F.; ZAWADSKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 288 (5789): 373-376, 1980.

GANSTER, R. W.; TAYLOR, B. S.; SHAO, L.; GELLER, D. A. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 98(15):8638-43, 2001.

GARAVITO, R. M.; DEWITT, D. L. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. **Biochim Biophys Acta**. 23;1441(2-3):278-87, 1999.

GARAVITO, R. M.; MALKOWSKI, M. G.; DEWITT, D. L. The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**. 68-69:129-52, 2002.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop**. 115(1-2):22-7, 2010.

GAZZINELLI R.T.; DENKERS E.Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nat Rev Immunol**. Dec;6(12):895-906, 2006.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; JAMES, S. L.; SHER, A. IL-10 inhibits parasites killing and nitrogen oxide production by IFN- $\gamma$  activated macrophages. **J Immunol**. 148: 1792-1796, 1992.

GELB, M. H.; VAN VOORHIS, W. C.; BUCKNER, F. S.; YOKOYAMA, K.; EASTMAN, R.; CARPENTER, E. P.; PANETHYMITAKI, C.; BROWN, K. A.; SMITH, D. F. Protein farnesyl and N-myristoyl transferases: piggy-back medicinal chemistry targets for the development of antitrypanosomatid and antimalarial therapeutics. **Mol Biochem Parasitol**. 126(2):155-63, 2003.

GILBERT, I. H. Inhibitors of dihydrofolate reductase in Leishmania and trypanosomes. **Biochim Biophys Acta**. 1587(2-3):249-57, 2002.

GIRONES, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence or both? **Trend Parasitol**. 19 (1): 19-22, 2003.

GLADDING, P. A.; WEBSTER, M. W.; FARRELL, H. B.; ZENG, I. S.; PARK, R.; RUIJNE, N. The antiplatelet effect of six non-steroidal anti-inflammatory drugs and their pharmacodynamic interaction with aspirin in healthy volunteers. **Am J Cardiol.** 101(7):1060-3, 2008.

GODZEL, L. M.; LEON, J. S.; ENGMAN, D. M. Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonistic in experimental myocarditis. **Curr.Pharmal.Des.** 9: 723-735, 2003.

GOEY, H.; KELLER, J. R.; BACK, T.; LONGO, D. L.; RUSCETTI, F. W.; WILTHROUT, R. H. Inhibition of early murine hemopoietic progenitor cell proliferation after in vivo locoregional administration of transforming growth factor  $\beta$ -1. **J.immunol.** 143 (3): 877-880, 1989.

GOLDENBERG, M. M. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clin Ther.** 21(9):1497-513, 1999.

GOTO T.; HERBERMAN, R. B.; MALUISH, A.; STRONG, D. M. Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E-induced suppression of human natural killer cell activity. **J. Immunol.** 130: 1350, 1983.

GRISWOLD, D. E.; ADAMS, J. L. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2) rationale for selective inhibition and progress to date. **Med. Res. Rev.** 16 (2): 181-206. 1996.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **J Clin Invest.** 116(1):4-15, 2006.

HAEGGSTROM, J. Z.; RINALDO-MATTHIS, A.; WHEELLOCK, C. E.; WETTERHOLM, A. Advances in eicosanoid research, novel therapeutic implications. **Biochim.Biophys. Res.Comm.** 396: 135-139, 2010.

HALL B.F., WEBSTER P., MA A.K., JOINER K.A., ANDREWS N.W. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. **J Exp Med.** 176: 313-325, 1992.

HASLER, F.; BLUESTEIN, H. G.; ZVAIFLER, N. J.; EPSTEIN, L. B. Analysis of the defects responsible for the impaired regulation of EBV-induced B cell proliferation by rheumatoid arthritis lymphocytes. II Role of monocytes and the increase sensitivity of rheumatoid arthritis lymphocytes to prostaglandin E. **J. Immunol.**, 131: 768, 1983.

HAUSMANN, S.H.; HAO S. Y.; PACE, J. L.; PARMELY, M. J. Transforming growth factor  $\beta$ -1 and gamma interferon provide opposing signals to lipopolysaccharide activated mouse macrophages. **Infect. Immunit.** 62 (9): 3625-3632, 1994.

HENDERSON, W. R. Jr.; CHI, E. Y. The importance of leukotrienes in mast cell-mediated *Toxoplasma gondii* cytotoxicity. **J. Infect Dis.** 177: 1437-1443, 1998.

HENRIQUEZ, D.; PIRAS, R.; PIRAS, M. M. The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Mol Biochem Parasitol** v.2 p. 359-366, 1981.

HEVEL, J. M.; WHITE K. A.; MARLETTA, M. A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase identification as a flavoprotein. **J. Biol. Chem.** 266 (34): 22789-91, 1991.

HIDEKO TATAKIHARA, V. L.; CECCHINI, R.; BORGES, C. L.; MALVEZI, A. D.; GRAÇA-DE SOUZA, V. K.; YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 52(1):47-58, 2008.

HOFF, R. Killing in vitro of *Trypanosoma cruzi* by macrophages from mice immunized with T. cruzi or BCG, and absence of cross-immunity on challenge in vivo. **J. exper. Med.**, 142: 299-311, 1975.

HUGHES D. E.; WRIGHT K. R.; UY H. L.; SASAKI A.; YONEDA T.; ROODMAN G. D.; MUNDY G. R.; BOYCE B. F. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. **J Bone Miner Res.** 10(10):1478-87. 1995.

IVANOV, I.; ROMANOV, S.; OZDOBA, C.; HOLZHÜTTER, H. G.; MYAGKOVA, G.; KUHN, H. Enantioselective substrate specificity of 15-lipoxygenase 1. **Biochemistry.** 43(50):15720-8, 2004.

KABASHIMA, K.; MMURATA, T.; TANAKA, H.; MATSUOKA, T.; SAKATA, D.; YOSHIDA; N. Thromboxane A<sub>2</sub> modulates interaction of dendritic cells and T cells and regulates acquired immunity. **Nat. immunol.** 4: 694-701, 2003.

KABUTUTU, Z.; MARTIN, S. K.; NOZAKI, T.; KAWAZU, S.; OKADA, T.; MUNDAY, C. J.; DUSZENKO, M.; LAZARUS, M.; THUITA, L. W.; URADE, Y.; KUBATA, B. K. Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H<sub>2</sub> reductase in Leishmania. **Int J Parasitol.** 33(2):221-8, 2003.

KHAN, R.; SHEPPARD, R. Fibrosis in heart disease understanding the role of transforming growth factor  $-\beta 1$  in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. **Immunology**. 118 (1): 10-24, 2006.

KIERSZENBAUM, F.; KNECHT, R.; BUDZKO, D.B.; PIZZIMENTI, M. C. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** 112: 1839-44, 1974.

KIERSZENBAUM, F.; LIMA, M. F.; WIRTH, J. J. Effects of antiserum to *Trypanosoma cruzi* on the uptake and rate of killing of vector-borne, metacyclic forms of the parasite by macrophages. **Int J Parasitol.** 15(4):409-13, 1985.

KINUGAWA, K.; KOHMOTO, O.; YAO, A.; SERIZAWA, T.; TAKAHASHI, T. Cardiac inducible nitric oxide synthase negatively modulates myocardial function in cultured rat myocytes. **Am. J. Physiol.** 272: H35-H47, 1997.

KIRCHHOFF, L. V. American trypanosomiasis (Chagas' disease). **Gastroenterol. Clin. North Am.** 25: 517-533, 1996.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; SCHMIDT, H. Trypanothione and trypanredoxin in ribonucleotide reduction. **Methods Enzymol.** 347:259-66, 2002.

KRISTENSSON, K.; NYGARD, M.; BERTINI, G.; BENTIVOGLIO, M. African trypanosome infections of the nervous system: parasite entry and effects on sleep and synaptic functions. **Prog. Neurobiol.** 91 (2): 152-171, 2010.

KRISTOF, A. S.; MARCKS-KONCZALIK, J., MORS, J. Mitogen-activated protein kinases mediate activator protein-1-dependent human inducible nitric oxide synthase activation. **J. Biol. Chem.** 276: 8445-8452, 2001.

KUBATA, B. K.; DUSZENKO, M.; MARTIN, K. S.; URADE, Y. Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites. **Trends Parasitol** v.23 p.325-331, 2007.

KUBATA, B. K.; DUSZENKO, M.; KABUTUTU, Z.; RAWER, M.; SZALLIES, A.; FUJIMORI, K.; INUI, T.; NOZAKI, T.; YAMASHITA, K.; HORII, T.; URADE, Y.; HAYAISHI, O. Identification of a novel prostaglandin f(2 $\alpha$ ) synthase in *Trypanosoma brucei*. **J Exp Med.** 6;192(9):1327-38, 2000.

KUBATA, B. K.; KABUTUTU, Z.; NOZAKI, T.; MUNDAY, C. J.; FUKUZUMI, S.; OHKUBO, K.; LAZARUS, M.; MARUYAMA, T.; MARTIN, S. K.; DUSZENKO, M.; URADE, Y. A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. **J Exp Med.** 196(9):1241-51, 2002.

KUNKEL, S. L.; WIGGINS, R. C.; CHENSUE, S. W.; LARRICK, J. Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E<sub>2</sub>. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 137: 404, 1986.

KURUMBAIL, R. G.; STEVENS, A. M.; GIERSE, J. K.; MCDONALD, J. J.; STEGEMAN, R. A.; PAK, J. Y.; GILDEHAUS, D.; MIYASHIRO, J. M.; PENNING, T. D.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P. C.; STALLINGS, W. C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. **Nature**. 19-26;384(6610):644-8, 1996.

LAMAS, S.; MARSDEN, P. A.; LI, G. K.; TEMPST, P.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isiform. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89 (14): 6348-6352, 1992.

LANGERSMANS, J. A.; NIBBERING, P. H. VAN-VUREN-VAN-DER-HULST, M.E.; VAN FURTH, R. **Parasite Immunol.**23 (4) 169-175, 2001.

LAURIA-PIRES, L.; DE CASTRO, C. N.; EMANUEL, A.; PRATA, A. Ineffectiveness of allopurinol in patients in the acute phase of Chagas disease. **Rev Soc Bras Med Trop.** 21(2):79, 1988.

LEE, S. H.; STEPHENS, J. L.; PAUL, K. S.; ENGLUND, P. T. Fatty acid synthesis by elongases in trypanosomes. **Cell.** 25;126(4):691-9, 2006.

LEON, J. S.; WANG, K.; ENGMAN, D. M. Myosin autoimmunity is not essential for cardiac inflammation in acute Chagas' disease. **J. Immunol.** 17 (8): 4271-4277, 2003.

LEY V., ROBBINS E.S., NUSSENZWEIG V., ANDREWS N.W. The exit of *Trypanosomacruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **J Exp Med.** 171: 401-413, 1990.

LIVORE, V. I.; TRIPODI, K. E.; UTTARO, A. D. Elongation of polyunsaturated fatty acids in trypanosomatids. **FEBS J.** 274(1):264-74, 2007.

LOLL, P. J.; PICOT, D.; GARAVITO, R. M. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H<sub>2</sub> synthase. **Nat Struct Biol.** 2(8):637-43, 1995.

LOPEZ M., HUYNH C., ANDRADE L.O., PYPART M., ANDREWS N.W. Role of sialic acid in the formation of tight lysosome-derived vacuoles during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Mol Biochem Parasitol.** 119: 141- 145, 2002.

LÓPEZ-MUÑOZ, R.; FAÚNDEZ, M.; KLEIN, S.; ESCANILLA, S.; TORRES, G.; LEE-LIU, D.; FERREIRA, J.; KEMMERLING, U.; ORELLANA, M.; MORELLO, A.; FERREIRA, A.; MAYA, J. D. *Trypanosoma cruzi*: In vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. **Exp Parasitol.** 124(2):167-71, 2010.

LOWENSTEIN, C. J.; ALLEY, E. W.; RAVAL, P.; SNOWMAN, A. M.; SNIDER, S. H.; RUSSEL, S. W.; MURPHY, W. J. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon  $\gamma$  and lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci.USA.** 90: 9730-9734, 1993.

LUONG, C.; MILLER, A.; BARNETT, J.; CHOW, J.; RAMESHA, C.; BROWNER, M. F. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. **Nat Struct Biol.** 3(11):927-33, 1996.

MACHADO F. S.; MUKHERJEE S.; WEISS L. M.; TANOWITZ H. B.; ASHTON AW. Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection. **Adv Parasitol.** 76:1-31. 2011.

MACHADO, E.R.; UETA, M. T.; LOURENÇO. E.V.; ANIBAL, F. F.; SORGI, C. A.; SOARES, E. G. Leucotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. **J Immunol.** 175: 3892-3899, 2005.

MACHADO, F. S.; MUKHERJII, S.; WEIS, L. M.; TANOWITZ, H. B.; ASHON, A. W. Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection. **Adv. Parasitol.** 76: 1-31, 2011.

MACHADO, F. S.; SOUTO, J. T.; ROSSI, M. A.; ESPER, L.; TANOWITZ, H. B.; ALIBERTI, J. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosomacruzi* infected cardiac myocytes. **Microb. Infect.** 10: 1558-1566, 2008.

MACHADO, F. S.; ALIBERTI, J. Impact of lipoxin-mediated regulation on immune response to infectious disease. **Immunol Res.** 35(3):209-18, 2006.

MACHADO, F. S.; DUTRA, W. O.; ESPER, L.; GOLLOB, K. J.; TEIXEIRA, M. M.; FACTOR, S. M.; WEISS, L. M.; NAGAJYOTHI, F.; TANOWITZ, H. B.; GARG, N. J. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Semin Immunopathol.** 34(6):753-70, 2012.

MACHADO, F.S.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C. S.; MESTRINER, F. L. A. C. ; CUNHA, F.Q.; SILVA, J. S. *Trypanosoma cruzi* infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation.** 102: 3003-3008, 2000.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN C. Nitric oxide and macrophage function **Ann.Rev. Immunol.** 15: 323-350, 1997.

MADERNA, P.; GODSON, C. Lipoxins: resolutionary road. **Br. J. Pharmacol.**158: 947-959, 2009.

MAEDA, F. Y.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Front. In immunol.** 3: 1-7, 2012.

MAGUIRRE, J. H.; HOFF, R. Cardiac morbidity and mortality due to Chagas disease: prospective eletrocardiographic study of a Braziliancommunity .**Circulation.** 75 (6): 1140-1145, 1987.

MALVEZI, A. D.; CECCHINI, R.; SOUZA, F.; TADOKORO C. E.; RIZZO, L. V.; PINGE-FILHO, P. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- $\alpha$  in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Immunol. And MedicalMicrobiol.** 41: 69-77, 2004.

MARCONDES , M. C. G.; BORELLI, P.; YOSHIDA, N.; RUSSO, M. Acute *Trypanosoma cruzi* infections is associated with anemia, thrombocytopenia, leucopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. **Microbs infect.** 2: 347-352, 2000.

MARINHO, C. R.; NUNEZ-APAZA, L. N.; MARTINS-SANTOS, R.; BASTOS, K. R.; BOMBEIRO, A. L.; BUCCI, D. Z.; SARDINHA, L. R.; LIMA, M. R. ALVAREZ, J. M. IFN- $\gamma$ , but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the in vivo control of low-virulence SylvioX10/4 *Trypanosoma cruzi* parasites. **Scand. J. Immunol.** 66: 297-308, 2007.

MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C. D.; WISHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry.** 27: 8706-8711, 1988.

MARSHALL, H. E.; MERCHANT, K.; STAMLER, J. S. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. **FASEB J.** 14: 1889-1900, 2000.

MARTINS, G. A.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C. SILVA, J. S. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Immunol. Lett** 63 (2): 113-120, 1998.

MARTINS, R. M.; ALVES, R. M.; MACEDO, S.; YISHIDA, N. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Tripanosomacruzimetacyclic* forms. **Cell.Microbiol.** 13: 943-954, 2011.

MASSAD, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. **Epidemiol Infect.**136(9):1153-64, 2007.

MAYER, B.; JOHN, N.; HEINZEL, B.; WERNER, E. R.; WACHTER, H.; SCHULTZ, G.; BÖHME, E. brain nitric oxide synthase is a biopterin and flavin-containing mult functional oxidoreductase. **FEBS Lett**, 19; 288 (1-2): 187-191, 1991.

MEIRELLES, M.N.L.; PEREIRA, M.C.S.; SINGER, R.H.; SOEIRO, M.N.C.; GARZONI, L.R.; SILVA, D.T.; BARBOSA, H.S.; ARAUJO-JORGE, T.C.; MASUDA, M.O.; CAPELLA, M.A.M.; LOPES, A.G.; VERMELHO, A.B. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte: new contributions regarding a better understanding of this interaction. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94, Suppl.1:149-152, 1999.

MEIRELLES, M.N.L.; ARAUJO-JORGE T.C.; MIRANDA C.F., DE SOUZA W.; BARBOSA H.S. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages in vitro: dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B. **Z Parasitenkd** 68:7-14, 1982.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J.Parasitol.** 64: 475-482, 1978.

MERAZ, M. A.; WHITE, J. M.; SHEEHAN, K. C.; BACH, E. A.; RODIG, S. J.; DIGHE, A. S.; KAPLAN, D. H.; RILEY, J. K.; GREENLUND, A. C.; CAMPBELL, D.; CARVER-MOORE, K.; DUBOIS, R. N.; CLACK, R.; AGUET, M.; SCHEREIBER, R. D. Targeted disruption of the Stat 1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. **Cell**. 84: 431-442, 1996.

MICHELIN, M. A.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp parasitol.** 111(2) 71-79, 2005.

MING M.; EWEN ME.; PEREIRA M.E.A. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF $\beta$  signaling pathway. **Cell**. 82:287-296, 1995.

MITHELL, J. A.; AKARASEREENONT, P.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R. J.; VANE J. R. Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Pharmacology**. 90: 11693-11697, 1994.

MOLDAWER, L. L.; MARANO, M.; WEI, H.; FONG, Y.; LILEM, M. L.; KUO, G.; MANOGUE, K. R.; VLASSARA, H.; COHEN, H.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor alfa alters red blood cell kinetics and induces anemia in vivo. **FASEB J.** 3: 1637-1643, 1989.

MOLINA-BERRÍOS, A.; CAMPOS-ESTRADA, C.; HENRIQUEZ, N. FAÚNDEZ, M.; TORRES, G.; CASTILLO, C.; ESCANILLA, S.; KEMMERLING, U.; MORELO, A.; LOPEZ-MUÑOS, R. A.; MAYA J.D. Protective role of AcetilsalicylicAcide in

experimental *Trypanosomacruzi* infection: evidence of a 15-epi-lipoxin A4 mediated effect. **Plos Negl. Trop. Dis.** 7 (4) e2173, 2013.

MOMI, S.; PERITO, S.; MEZZASOMA, A. M.; BISTONI, F.; GRESELE, P. Involvement of platelets in experimental mouse trypanosomiasis: evidence of mouse platelet cytotoxicity against *Trypanosoma equiperdum*. **Exp Parasitol.** 95(2):136-43, 2000.

MONCADA, S.; HIGGES, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **Eur. J. Clin. Invest.** 21 (4): 361- 74, 1991.

MONTALVETTI A.; BAILEY B. N.; MARTIN M. B.; SEVERIN G. W.; OLDFIELD E.; DOCAMPO R. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. **J Biol Chem.** 7;276(36):33930-7. 2001.

MONTEIRO, A. C.; SHMITZ, V.; MORROT, A.; ARRUDA, L. B.; NAGAJYOTHI, F.; GRANATO, A.; PESQUERO, J. B.; MÜLLER-ESTERL,; TANOWITZ, H. B.; SCHARFSTEIN, J. Bradykinin receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically release *Trypanosoma cruzi* are critical for the development of protective tpe-1 responses. **Plos Pathogens.** 2007.

MORITA, I.; SCHINDLER, M.; REGIER, M. K.; OTTO, J. C.; HORI, T.; DEWITT, D. L.; SMITH, W. L. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. **J Biol Chem.** 270(18):10902-8, 1995.

MUKHERJEE S.; MACHADO F. S.; HUANG H.; OZ H. S.; JELICKS L. A.; PRADO C. M.; KOBAYASHI W.; FINE E. J.; ZHAO D.; FACTOR S. M.; COLLADO J. E.; WEISS L. M.; TANOWITZ H. B.; ASHTON A. W.; Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease. **PLoS One.** 15;6(2). 2011.

MULLIGAN, M. S.; HEVEL, J. M.; MARLETTA, M. A.; WARD, P. A. tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 88: 6338-6342, 1991.

MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.; FERNÁNDEZ, M. A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur J Immunol.** 22(2):301-7, 1992.

MURTA, S. M.; KRIEGER, M. A.; MONTENEGRO, L. R.; CAMPOS, F. F.; PROBST, C. M.; AVILA, A. R.; MUTO, N. H.; DE OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; NIRDÉ, P.; BRUNA-ROMERO, O.; GOLDENBERG, S.; ROMANHA, A. J. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H

flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benzimidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol.** 146(2):151-62, 2006.

MUSIAL, A., EISSA, N. T. Inducible nitric oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. **J. Biol. Chem.** 276: 24268-24273, 2001.

NARABA, H.; MURAKAMI, M.; MATSUMOTO, H.; SHIMBARA S.; UENO, A.; KUDO I.; OH-ISHI S. Segregated coupling of phospholipases A2, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. **J Immunol.**, 160 (6): 2974-2982, 1998.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.** 6: 3051-3064, 1992.

NAVILIAT, M.; GUALCO, G.; CAYOTA, A.; RADL, R. Protein 3-nitrotyrosine formation during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Bras. J. Med. Biol. Res.** 38 (12): 1825-34, 2005.

NEEDLEMAN, P.; TURK, J.; JAKSCHIK, B. A.; MORRISON, A. R.; LEFKOWITH, J. B. Arachidonic acid metabolism. **Ann. Rev. Biochem.** 55: 69-102, 1986.

NOGUCHI S.; JIANMONGKOL S.; BENDER A. T.; KAMADA Y.; DEMADY D. R.; OSAWA Y. Guanabenz-mediated inactivation and enhanced proteolytic degradation of neuronal nitric-oxide synthase. **J Biol Chem.** 275(4):2376-80. 2000.

NOGUEIRA N.; COHN Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **J. Exp Med** 143:1402-1420, 1976.

OLIVEIRA, L. G.; KUEHN, C.C.; SANTOS, C. D.; TOLDO, M. P.; DO PRADO, J. C.; Enhanced protection by melatonin and meloxicam combination in experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** 32: 245-251, 2010.

OPPERDOES, F. R.; VAN ROY, J. The phospholipases of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and cultured procyclics. **Mol Biochem Parasitol.** 5(5):309-19, 1982.

OTSUKA, A.; ABE, T.; WATANABE, M.; YAGISAWA, H.; TAKEI, K. Dynamin 2 is required for actin assembly in phagocytosis in sertoli cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 378 (3) 478-482, 2008.

OUELLET, M.; RIENDEAU, D.; PERCIVAL, M. D. A high level of cyclooxygenase-2 inhibitor selectivity is associated with a reduced interference of platelet

cyclooxygenase-1 inactivation by aspirin. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 98(25):14583-8. 2001.

PAIVA C.N.; SOUTO-PADRON T.; COSTA D.A.; GATTASS C.R.; High expression of a functional cruzipain by a non-infective and non-pathogenic *Trypanosoma cruzi* clone. **Parasitology** v.117 p.483-490, 1998.

PALMER, L. A.; SEMENZA, G. L.; STOLER, M. H.; JOHNS, R. A. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. **Am J Physiol.** 274(2 Pt 1):L212-9, 1998.

PEREIRA NEVES, D.; DE MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; ALMEIDA VITOR, R. W. **Parasitologia Humana.** 12<sup>o</sup> Edição. São Paulo, SP. Editora Atheneu, p.24-30, p.89-114, 2011.

PEREIRA, M. C.; SINGER, R. H.; DE MEIRELLES, M. N. *Trypanosoma cruzi* infection affects actin mRNA regulation in heart muscle cells. **J Eukaryot Microbiol.** 47(3):271-9, 2000.

PETERS-GOLDEN, M.; CANETTI, C.; MANCUSO, P.; COFFEY, M. J. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. **J Immunol.** 15;174(2):589-94, 2005.

PICOT, D.; LOLL, P. J.; GARAVITO, R. M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. **Nature.** 20;367(6460):243-9, 1994.

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell Immunol.** 10;193(1):90-8, 1999.

PINSKI, D. J.; CAI, B.; YANG X.; RODRIGUEZ, C.; SCIACCA, R. R.; CANON, P. J. The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor  $\beta$ . **J Clin. Investig.** 95: 2 677-685, 1995.

PORTAL, P.; FERNÁNDEZ VILLAMIL, S.; ALONSO, G. D.; DE VAS, M. G.; FLAWIÁ, M. M.; TORRES, H. N.; PAVETO, C. Multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from *Trypanosoma cruzi* suggested role on drug resistance. **Mol Biochem Parasitol.** 160(1):42-51, 2008.

POUNTOS, I.; GRORGOULI, T.; BIRD, H.; GIANNOUDIS, P. V. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prostaglandins, indications, and side effects. **Inter J of Inter, Cyt and Mediat Res.** 3: 19-27, 2011.

PRAEFCKE, G. J.; MCMAHON, H. T. The dynamin superfamily: universal membrane tabulation and fission molecules? **Nat. Rev. mol. Cell Biol.** 2: 133-147, 2004.

PRATA, A. Chagas` Disease. **Infect. Dis. Clin. North America**, 8:61-75, 1994.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspect of Chagas disease. **Lancet. Infect. Dis.** 1 (2): 92-100, 2001.

PROCOPIO D.O., BARROS H.C., MORTARA R.A. actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *trypanosoma cruzi*. **Eur J. Cell Biol.** 1999; 78: 911-924, 1999.

RAMIREZ, M.I.; RUIZ R.C.; ARAYA J.E; FRANCO DA SILVEIRA J.; YOSHIDA N. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Inflmmun** 61: 3636-3641, 1993.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease) **Infect Dis Clin N Am.** 26:275–291. 2012.

REINER, N. E.; MALEMUD, C. J. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with leishmaniadonovani: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxigenase pathways. **J. Immunol.** 134: 556-563, 1985.

REY, L. GOMES, L. **Bases da Parasitologia Médica.** 3º Edição, São Paulo, SP. Editora Guanabara Koogan, p.67-76, p.55-63, 2011.

RIMON, G.; SIDHU, R. S.; LAUVER, D. A.; LEE, J. Y.; SHARMA, N. P.; YUAN, C.; FRIELER, R. A.; TRIEVEL, R. C.; LUCCHESI, B. R.; SMITH, W. L. Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 5;107(1):28-33, 2010.

ROBERTS, A. B.; VODOVOTZ, Y.; ROCHE, N. S.; SPORN, M. B.; NATHAN, C. E. Role of nitric oxide in antagonistic effects of transforming growth factor-beta and interleukin-1 beta on the beatig rate of cultured cardiac myocytes. **Mol. Endocrinol.** 6 (11): 1921-1930, 1992.

RODAN, G. A.; MARTIN, T. J. Therapeutic approaches to bone diseases. **Science.** 289(5484):1508-14, 2000.

RODRÍGUEZ, A.; SAMOFF, E.; RIOULT, M.G.; CHUNG, A.; ANDREWS, N.W. Host cell invasion by Trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. **J.Cell.Biol.**, 134(2):349-362, 1996.

RODRIGUEZ-PASCUAL, F. Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric oxide synthase gene .Involvement of the RNA-binding protein HuR.**J. Biol. Chem.** 275: 26040-26049. 2000.

ROMANO, P. S.; ARBOIT, M.; VÁZQUEZ, C. COLOMBO, M. I. The autophagic pathway is a key component in the lisosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the cell. **Autophagy** 5: 6-18. 2009.

ROMANO, P. S.; CUESTO, J. A.; CASASSA, A. F.; VANRELL, M. C.; GOTTLIEB, R. A.; COLOMBO, M. I. Moleculr and cellular mechanism involved in the *cruzi*/host cell interplay. **IUBMB Life**, 64 (5): 387-396. 2012.

ROSENSTOCK, M.; DANON, A.; RIMON, G. PGHS-2 inhibitors, NS-398 and DuP-697, attenuate the inhibition of PGHS-1 by aspirin and indomethacin without altering its activity. **Biochim Biophys Acta.** 25;1440(1):127-37, 1999.

ROSSI, M. A.; BESTETTI, R. B. The challenge of Chaga' cardiomyopathy: the pathologic roles of autonomic abnormalities autoimmune mechanism and microvascular changes, and therapeutic implications. **Cardiology.**86: 1-7, 1995.

ROTH, G. J.; STANFORD, N.; MAJERUS, P. W. Acetylation of prostaglandin synthetase by aspirin.**Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 72: 3073-3076, 1975.

ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Non-redundant functions of cyclooxygenases: oxygenation of endocannabinoids. **J Biol Chem.**283(13):8065-9, 2008.

RUBIN-DE-CELIS S.S.C.; UEMURA H.; YOSHIDA, N. SCHENKMAN S. Expression of trypomastigotettrans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole **Cell Microbiol.** 8 (12): 1888–1898, 2006.

RUIZ, R. C.; RIGONI V. L.; GONZALEZ J.; YOSHIDA N. The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclicrypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. **V** 15; p. 121-125, 1993.

RUIZ, R.C.; FAVORETO JUNIOR; DORTA, M.L.; OSHIRO, M.E.M.; FERREIRA, A.T.; MANQUE, P.M.; YOSHIDA, N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signalling activity. **Biochem. J.**, 330:505-511, 1998.

RUSCETTI, F. W.; JACOBSEN, S. E.; BIRCHENAL, R. M.; BROXMEYER, H. E.; ENGELMANN, G. L.; DUBOIS, C.; KELLER, J. R.; Role of transforming growth factor- $\beta$ 1 in regulation of hematopoiesis. **An. NY Acad. Sci.** 628: 31-43, 1991.

RYAN, A.; GODSON, C. Lipoxins: regulators of resolution. **Curr. Opin. Pharmacol.** 10: 166-172, 2010.

SAEFTEL, M.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infections. **Infect. Immun.** 69: 2252-2259, 2001.

SAGE, L.; HAMBREY, P. N.; WERCHOLA, G. M.; MELLORS, A.; TIZARD, I. R. Lysophospholipase 1 in *Trypanosoma brucei*. **Tropenmed Parasitol.** 32(4):215-20, 1981.

SAMAD, T. A.; SAPIRSTEIN, A.; WOOLF, C. J. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. **Trends Mol Med.** 8(8):390-6, 2002.

SAMUELSSON, B.; MORGENSTERN, R.; JAKOBSSON, P. J. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. **Pharmacol Rev.** 59(3):207-24, 2007.

SANTOS C. F.; SILVA M. E.; SILVA M. E.; SILVA M. E.; NICOLI J. R.; CROCCO-AFONSO L. C.; SANTOS J. E.; BAMBIRRA E. A.; VIEIRA E. C. Effect of an essential fatty acid deficient diet on experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in germfree and conventional mice. **Braz J Med Biol Res.** 25(8):795-803. 1992.

SANTOVITO, D.; MEZZETTI, A.; CIPOLLONE, F. Cyclooxygenase and prostaglandin synthases: roles in plaque stability and instability in humans. **Curr Opin Lipidol.** 20(5):402-8, 2009.

SARAIVA, V. B.; GIBALDI, D.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; BOZZA, M. T.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; HEISE, N. Proinflammatory and cytotoxic effects of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother.** 46(11):3472-7, 2002.

SARMENTO, R. R. **Interação do *Trypanosoma cruzi* com células da resposta imune inata.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Uberaba – Minas Gerais, 2008.

SCHENKMAN S.; DIAS C.; NUSSENZWEIG V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptor at restricted cell surface domains. **Exp. Parasitolog.** 72: 76-86, 1991.

SCHENKMAN S.; MORTARA R.A. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **J Cell Sci**: 101: 895-905, 1992.

SCHMID, S. L.; MCNIVEN, M. A.; DE CAMILLI P. Dynamin and its partners: a progress report. **Curr.Opin. Cell Biol.** 10 (4): 504-512, 1998.

SCHÜTZE, S.; MACHLEIDT, T.; KRÖNE, M. The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin -1 signal transduction. **J. Leukoc. Biol.** 56: 533-541, 1994.

SERHAN, C. N.; YACOUBIAN, S.; YANG, R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. **Annu Rev Pathol.** 3:279-312. 2008.

SERHAN, C. N.; LUNDBERG, U.; WEISSMANN, G.; SAMUELSSON, B. Formation of leukotrienes and hydroxy acids by human neutrophils and platelets exposed to monosodium urate. **Prostaglandins.** 27(4):563-81, 1984.

SHUAIBU, M. N.; KANBARA, H.; YANAGI, T.; AMEH, D. A.; BONIRE, J. J.; NOK, A. J. Phospholipase A2 from *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei brucei*: inhibition by organotin. **J Enzyme Inhib.** 16(5):433-41, 2001.

SIBLEY, L.D. & ANDREWS, N.W. Cell invasion by un-palatable parasites. **Traffic**, 1:100-106, 2000.

SILVA, J. S.; VESPA, G. N. R.; CARDOSO, M. A. G. Tumour necrosis factor  $\alpha$  mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon activated macrophages. **Infec. Immun.** 63: 4862-4867, 1995.

SINGH, K.; BALLIGAND, J. L.; FISCHER, T. A.; SMITH, T. W.; KELLY, R. A. Regulation of cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells: role extracellular signal-regulated kinases (ERK1/ERK2) and STAT1 $\alpha$ . **J. Biol. Chem.** 271: 1-7, 1996.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; ARAKAWA, T.; SPENCER, A. G.; THRURESSON, E. D.; SONG, I. Independent prostanoïd biosynthetic system associated with prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. **Tromb.Haemost.** 78: 627-630, 1997.

SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M.; DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **J Biol Chem.** 271(52):33157-60, 1996.

SMITH, W. L.; MARNETT, L. J.; DEWITT, D. L. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. **Pharmacol Ther.** 49(3):153-79, 1991.

SMITH, W. L.; SONG, I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** 68-69:115-28, 2002.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annu Rev Biochem.** 69:145-82, 2000.

SOSA ESTANI, S.; SEGURA, E. L. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the undetermined phase. Experience and current guidelines of treatment in Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 94 Suppl 1:363-5, 1999.

SOUZA, W.; CARREIRO, I. P.; MIRANDA, K.; SILVA, N. L. Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*. **An. Acad. Cienc.** 72 (3): 421-432, 2000.

SPENCER, A. G.; THURESSON, E.; OTTO, J. C.; SONG, I.; SMITH, T.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M.; SMITH, W. L. The membrane binding domains of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2. Peptide mapping and mutational analysis. **J Biol Chem.** 274(46):32936-42, 1999.

SPITE, M.; SERHAN, C. N. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. **Circ. Res.** 107: 1170-1184, 2010.

STABLE, M. J.; GILROY, D. W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. **Prog. Lipid Res.** 50: 35-51, 2010.

STEPHAN, R. N.; CONRAD, P. J.; SAIZAWA, M.; DEAN, R. E.; CHAUDRY, I. H. Prostaglandins E<sub>2</sub> depresses antigen-presenting cell function of peritoneal macrophages. **J. Surg. Res.**, 44: 733-739, 1988.

STERIN-BORDA, L.; GORELIK, G.; GOREM, N.; CAPPAS, S. G.; CELENTANO, A. M.; BORDA, E. Lymphocyte masticaric cholinergic activity and PGE<sub>2</sub> involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Clin. Immunol. Immunopathol.** 81: 122-128, 1996.

STOPPANI, A. O. The chemotherapy of Chagas disease. **Medicina (B Aires).** 59 Suppl 2:147-65, 1999.

STUEHR, D. Mammalian nitric oxide synthases. **Biochim. Biophys. Acta** 1411: 217-230, 1999.

SUMIDA, C.; GRABER, R.; NUNEZ, E. Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. **Prostaglandins LeukotEssent Fatty Acids**. 48(1):117-22, 1993.

TAKAHASHI Y.; ZHU H.; YOSHIMOTO T.; Essential roles of lipoxygenases in LDL oxidation and development of atherosclerosis. **Antioxid Redox Signal**, v. 7 p.425-431, 2005.

TANOWITZ, H. B.; BURN, E. R.; SINHA, A. K.; KAHN, N. N.; MORRIS, S. A.; FACTOR, S. M. Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas's disease a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 43: 274-281, 1990.

TANOWITZ, H. B.; HUANG, H.; JELIKES, L. A.; CHANDRA, M.; LOREDO, M. L.; WEISS, L.M. Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease. **Infect. Immun.** 73: 2496-2503, 2005.

TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. Chagas` disease. **Clin.Microbiol.Rev.** 5:400-419; 1992.

TARDIEUX, I.; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J.; BORON, W.; LUNN, J.A.; HEUSER, J.E.; ANDREWS, N.W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, 71(7):1117-1130, 1992.

TATAKIHARA, V. L. H., BORGES, C. L., MALVEZI, A. D. GRAÇA-DE-SOUZA, V. K., YAMADA-OGATTA, S. F.; RIZZO, L. V. CECCHINI, R.; PINGE-FILHO P. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Imm.Microb.** 2007.

TAYLOR-ROBINSON, A. W.; SEVERN, A.; XU, D.; MCSORLEY, S. J.; GARSIDE, P. PADRON, J.; PHILLIPS, R. S. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and type 2 cells. **Eur. J. Immunol.** 24: 980-984, 1994.

TEIXEIRA, A.R.L. The Stercorarian trypanosomes. In: Soulsby, E. J. L. Immune response in parasitic infections: immunology, immunopathology, and immunoprophylaxis. Boca Raton: **CRC Press, Inc.**, p. 25-118, 1987.

TEIXEIRA, A.R.L.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C.; Chagas disease. **Postgrad.Med. J.** 82 (974): 788-797, 2006.

THOMPSON, N. L.; FLANDERS, K. C.; SMITH, J. M.; ELLINGSWORTH, L.R. ROBERTS, A.B. ; SPORN, M. S. Expression of transforming growth factor  $\beta$ -1 in

specific cells and tissues of adult and neonatal mice. **J. Cell Biol.** 108: 661-669, 1989.

THOMPSON, N. L.; BASOBENY, F.; SPEIR, E. H.; CASSCELLS, W.; FERRANS, V. J.; FLANDERS, K. C.; KONDAIAH, P.; GEISER, A. G.; SPORN, M. B. Transforming growth factor  $\beta$ -1 in acute myocardial infarctation in rats. **Growth Factor** (1) 91-99, 1988.

THOMSON, L.; GADELHA, F. R.; PELUFFO, G.; VERCESI, A. E.; RADU, R. Peroxynitrite affects  $Ca^{2+}$  transport in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol.** 98(1):81-91, 1999.

THÜRING, H.; STENGER, S.; GMEHLING, D.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Lack of inducible nitric oxide synthase activity in T cell clones and T lymphocytes from naive and *Leishmania major*-infected mice. **Eur J Immunol.** 25(12):3229-34, 1995.

TRAUTMAN, M. S.; EDWIN, S. S.; COLLMER, D.; DUDLEY, D. J.; SIMMONS, D.; MITCHELL, M.D. Prostaglandin H synthase-2 in human gestational tissues regulation in amnion. **Placenta** 17 (4): 239-245, 1996.

TRUJILLO, N.; ALVAREZ, M. N.; PIACENZA, L.; HUGO, M.; PELUFFO, G.; RADU, R. Peroxynitrite as a cytotoxic effector against *Trypanosoma cruzi*: oxidative killing and antioxidant resistance mechanism. **Trypan. Diseases: Molecular Routes to Drug Discovery** 2013.

UMANSKY, V.; HEHNER, S. P.; DUMONT, A.; HOFMANN, T. G.; SCHIRRMACHER, V.; DRÖGE, W.; SCHMITZ, M. L. Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF- $\kappa$ B implies a physiological self-amplifying mechanism. **Eur J Immunol.** 28(8):2276-82, 1998.

URBINA, J. A. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. **Curr Opin Infect Dis.** 14(6):733-41, 2001.

URBINA, J. A.; CONCEPCION, J. L.; RANGEL, S.; VISBAL, G.; LIRA, R. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. **Mol Biochem Parasitol.** 125(1-2):35-45, 2002.

URBINA, J. A.; MORENO, B.; VIERKOTTER, S.; OLDFIELD, E.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; BAILEY, B. N.; YAN, W.; SCOTT, D. A.; MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth in vitro and in vivo is blocked by pyrophosphate analogs. **J Biol Chem.** 274(47):33609-15, 1999.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; LIRA, R.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **Int J Antimicrob Agents**. 21(1):39-48, 2003.

VALLANCE, B. A.; GUNAVAN, M. I.; HEWLETT, B. TGF- $\beta$ 1 gene transfer to the mouse colon leads to intestinal fibrosis. **An. J. Physiol. Gastro Lives Physiol**. 2005.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 38:97-120, 1998.

VANE, J. R.; FLOWER, R. J.; BOTTING, R. M. History of aspirin and its mechanism of action. **Stroke**. 21(12 Suppl):IV12-23, 1990.

VAZ, V. C.; D'ANDREA, P. S.; JANSEN, A. M. Effects of habitat fragmentation on wild mammal infection by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**. 134(Pt 12):1785-93, 2007.

VESPA, G. N. R.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. **Infec. Immunol**. 62: 5177-5182. 1994.

VIEIRA M.; DUTRA J.M.F.; CARVALHO T.M.U.; CUNHA-E-SILVA N.L.; SOUTO-PADRÓN T.; SOUZA W. Cellular signaling during the macrophages invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Histochem. Cell Biol** 118: 491-499, 2002.

VODOVOTZ, Y.; BOGDAN, C.; PAIK, J.; XIE Q. W.; NATHAN, C. Mechanism of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor  $\beta$ . **J. Exp. Med**. 178: 605-613, 1993.

WAGHABI M. C.; KERAMIDAS M.; CALVET C. M.; MEUSER M.; SOEIRO, M.C.N.; MENDONÇA-LIMA L.; ARAÚJO-JORGE T.C.; FEIGE J.Q.; BAILLY S. SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. **Antimicrob Agents Chemother**. 51(8):2905-10, 2007.

WAHL, S. M. Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in inflammation a cause and a cure. **J. Clin. Immunol**. 12 (2): 61-74, 1992.

WALLACE, J. L.; DEL SOLDATO, P. The therapeutic potential of NO-NSAIDs. **Fundam Clin Pharmacol**. 17(1):11-20, 2003.

WANDERLEY, D. M. V.; LITVOC, J. Doença de Chagas como causa básica de óbito na região sudeste do Brasil: presença de causas contributárias. **Rev. Saúde Pub.** 28: 69-75 1994.

WANG, Y. P.; WU, Y.; LI, L.Y.; ZHENG, Y.; LIU, R. G.; ZHOU, J.P.; YUAN, S. Y.; SHANG, Y.; YAO, S.L. Aspirin-triggered lipoxin A<sub>4</sub> attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses by inhibiting activation of NF-κB and MAPKs in BV-2 microglial cells. **J. of Neuroinflamm.** 8 (95): 1-12, 2011.

WESTPHALEN, E. V. N.; BISUGO, M. C.; DE ARAÚJO, M. F. L. Epidemiological and historical aspects of Chagas disease control in the American continent. **BEPA.**9(105):17-34. 2012.

WHO, World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> Acesso em 04 dez. 2013.

WILKOWSKY S. E., BARBIERI M.A., STAHL P., ISOLA E.L.D. *Trypanosoma cruzi* phosphatidyl inositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. **Exp Cell Res.** 264: 211-218, 2001.

WILNER, K. D.; RUSHING, M.; WALDEN, C.; ADLER, R.; ESKRA, J.; NOVECK, R.; VARGAS, R. Celecoxib does not affect the antiplatelet activity of aspirin in healthy volunteers. **J Clin Pharmacol.** 42(9):1027-30, 2002.

WIRTH, J. J.; KIERSZEMBAUM, F. Efectes of leucotriene C<sub>4</sub> on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. **J.Immunol.** 134: 1989-1993, 1985.

WOLF, G. New insights into the pathophysiologi of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. **Eur.J. Clin. Invest.** 34:785-796, 2004.

WYLLIE D. H., KISS-TOTH E., VISINTIN A., SMITH S. C., BOUSSOUF S., SEGAL D. M., DUFF .W., DOWER, S. K. Evidence for an accessory protein function for Toll like receptor 1 in anti bacterial responses. **J Immunol.** 165: 7125-7132, 2000.

XIE, Q. W.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-κB/Rel in induction of nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, 269:4701- 4708, 1994.

XIE, Q. W.; WHISNANT, R.; NATHAN, C. Promoter of the gene encoding calcium independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.** 177 (6): 1779-1784, 1993.

YONG C. E.; CHI, E. Y.; HENDERSON JR. W. R. Toxoplasma gondii alters eicosanoid release by human mononuclear phagocytes: role of leukotrienes in interferon gamma-induced antitoxoplasma activity. **J. Exp. Med.** 180: 1637-1648, 1994.

YOSHIDA , N.; SATO, T.; KOBAYASHI K.; OKADA, Y. High extracellular  $Ca^{2+}$  an  $Ca^{2+}$ -sensing receptor agonistic activate nonselective cation conductance in freshly isolated rat osteoclasts. **Bone** 22 (5): 495-501, 1998.

YOSHIDA, N.; CORTEZ, M. *Trypanosoma cruzi* parasite and host cell signaling during the invasion process. **Subcell. Biochem.** 47: 82-91 2008.

YOSHIDA, N.; FAVORETO S. JR.; FERREIRA A.T.; MANQUE P.M. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. **Braz J Med Biol Res** v.33 p. 269-278, 2000.

YOSHIDA, N.; MORTARA, R. A.; ARAGUTH, M. F.; GONZALEZ, J. C.; RUSSO, M. Metacyclic of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35 and 50 Kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infec. Immun.** 57: 1663-1667, 1989.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **An Acad Bras Cienc.** 78(1): 87-111, 2006.

ZACKS, M. A.; WEN, J. J.; VYATKINA, G.; BHATIA, V.; GARG, N. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. **An Acad Bras Cienc.** 77(4):695-715, 2005.

ZENIAN A.; KIERSZENBAUM F. *Trypanosoma cruzi*: differences in cell surface interaction of circulating (trypomastigote) and culture (epimastigote) forms with macrophages. **J. Parasitol** 69: 660-665, 1983.

ZUNIGA E.; ACOSTA-RODRIGUEZ E.; MERINO M. C.; MONTES C.; GRUPPI A. Depletion of immature B cells during *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of myeloid cells and the cyclooxygenase pathway. **Eur J Immunol.** 35(6):1849-58. 2005.