



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

HELENA TIEMI SUZUKAWA

TRYPANOSOMA CRUZI:

EFEITO DA ASPIRINA SOBRE A ATIVAÇÃO E INVASÃO DE
MACRÓFAGOS DERIVADOS DE THP-1, UMA LINHAGEM DE
MONÓCITOS HUMANOS

HELENA TIEMI SUZUKAWA

TRYPANOSOMA CRUZI:

EFEITO DA ASPIRINA SOBRE A ATIVAÇÃO E INVASÃO DE
MACRÓFAGOS DERIVADOS DE THP-1, UMA LINHAGEM DE
MONÓCITOS HUMANOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção de título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Phileno Pinge Filho
Co-orientador: Dr. Juliano Bordignon

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

- H474 Suzukawa, Helena Tiemi.
Trypanosoma cruzi: Efeito da Aspirina sobre a ativação e invasão de macrófagos derivados de THP-1, uma linhagem de monócitos humanos. / Helena Tiemi Suzukawa. - Londrina, 2019.
70 f. : il.
- Orientador: Phileo Pinge Filho.
Coorientador: Juliano Bordignon.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2019.
Inclui bibliografia.
1. Doença de Chagas - Tese. 2. Inibição farmacológica da COX-1 pelo tratamento com aspirina - Tese. 3. Células de linhagem humana THP-1 - Tese. 4. Macrófagos - Tese. I. Pinge Filho, Phileo. II. Bordignon, Juliano. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.
- CDU 616

HELENA TIEMI SUZUKAWA

TRYPANOSOMA CRUZI:

EFEITO DA ASPIRINA SOBRE A ATIVAÇÃO E INVASÃO DE
MACRÓFAGOS DERIVADOS DE THP-1, UMA LINHAGEM DE
MONÓCITOS HUMANOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção de título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dra Sueli Fumie Yamada-Ogatta
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 09 de maio de 2019.

Se a princípio a ideia não é absurda,
então não há esperança para ela.

Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sua constante presença em minha vida.

À Universidade Estadual de Londrina e seus funcionários, que de alguma forma foram facilitadores para que este trabalho acontecesse.

Ao Departamento de Ciências Patológicas e seus professores, em especial ao Professor Dr. Phileno Pinge Filho, o “pai científico”, pela sua orientação, amizade e incentivo!

Ao Instituto Carlos Chagas, direcionado na pessoa do Dr. Juliano Bordignon, pela co-orientação neste projeto.

Ao Professor Dr. Fábio Henrique Kwasniewski, que concedeu uma das minhas mais famosas alcunhas e pelo incentivo.

Às Prof^{as} do Departamento de Microbiologia, Professora Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta e Professora Dra. Lucy Yamauchi Lioni, por incentivarem e permitirem o uso de equipamentos que foram importantes para este estudo .

Aos técnicos Zui, Pedrinho, “seu” Adernaldo e Theodoro.

À família do laboratório: “Cidocs” Aparecida Malvezi, Maria Isabel Lovo Martins Busch Pereira, Nágela Ghabdan Zanluqui, Vera Tatakihara, Rosiane Valeriano, Sandra Lonien, Bruno Lucchetti, “Ritão” Rito Pereira, Gabriella Ferreira, Raquel Nakama, “Fabinho” Fábio Bonifácio, Bruna Terceiro e Patrícia Moraes. Pela amizade e ajuda em todos os momentos!

Aos amigos que conheci durante o mestrado: Virgínia Concato, Renan Cajuca, Laís Machado, Bruna Bortoleti, Manoela Gonçalves, dentre tantos outros que sempre me incentivaram e acreditaram em mim. Obrigada pelo apoio e pelas risadas juntos!

À minha família que soube compreender minha ausência quando se fez necessário.

À todas as pessoas que contribuíram com este trabalho direta ou indiretamente.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e Fundação Araucária.

SUZUKAWA, Helena Tiemi. **Trypanosoma cruzi**: Efeito da Aspirina sobre a ativação e invasão de macrófagos derivados de THP-1, uma linhagem de monócitos humanos. 2019. 69 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A Doença de Chagas (DC) é uma doença tropical negligenciada que acomete 8 milhões pessoas no mundo, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi). Macrófagos são fagócitos que atuam como importantes agentes no controle da carga parasitária na fase aguda e no desenvolvimento da fase crônica. A atividade funcional de macrófagos durante a infecção chagásica tem sido correlacionada com a elevação da produção de diversos mediadores inflamatórios, como os eicosanóides. Desta forma é do nosso interesse compreender os efeitos do bloqueio da cicloxigenase (COX) sobre a ativação e infecção de macrófagos humanos por T. cruzi. Macrófagos derivados de células THP-1 (THP-1/MØ) foram obtidos por meio da estimulação com 5 ng/mL de PMA durante 48h, seguido de 48h de repouso. A identidade fenotípica das células foi confirmada por citometria de fluxo. A infecção por T. cruzi aumentou a porcentagem de células duplo positivas para CD11b+ /CD206+ o que pode estar relacionado com a indução de células de caráter pouco inflamatório. Além disso, THP-1/MØ infectados com T. cruzi apresentaram diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) 24 e 48 horas pós infecção. A inibição farmacológica da COX com aspirina (ASA) diminuiu a invasão e a liberação de formas tripomastigotas de T. cruzi. O uso de BOC-2 como bloqueador de receptores para lipoxina em células tratadas com ASA e infectadas reverteu o efeito observado. Neste sentido, investigamos o papel da 15-epi-Lipoxina A4 (15-epi-LXA4, uma lipoxina gerada pelo uso da ASA) na invasão, saída de T. cruzi e produção de EROs. O tratamento com 100 nM de 15-epi-LXA4 aumentou a quantidade de células CD11b+ /CD206+ , sugerindo que o tratamento seja capaz de induzir um padrão de resposta pouco inflamatório. Em adição, houve diminuição de CD11b+ /HLA-DR+ em células tratadas com 15-epi-LXA4 e infectadas, indicando que o tratamento aliado a infecção é capaz de modular negativamente a apresentação de antígenos. O tratamento com 15-epi-LXA4 não teve efeito em diminuir a invasão e liberação de T. cruzi. Entretanto a concentração de 3,12 nM de 15-epi-LXA4 aumentou a produção de EROs em células tratadas e infectadas 24 horas pós infecção. Nossos resultados sugerem pela primeira vez que a enzima COX participa do processo de infecção por T. cruzi em macrófagos humanos.

Palavras-chave: Aspirina. Macrófagos. 15-epi-Lipoxina A4. EROs. Doença de Chagas.

SUZUKAWA, Helena Tiemi. **Trypanosoma cruzi**: Effect of Aspirin on an Activation and Invasion of THP-1 Derived Macrophages, a Human Monocyte Lineage. 2019. 69 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is a neglected tropical disease that affects 8 million people worldwide caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Macrophages are phagocytes that act as important agents in controlling the parasite load in the acute phase and in the development of CD's chronic phase. The functional activity of macrophages during chagasic infection is correlated with the production of various inflammatory mediators, like eicosanoids. Therefore, our interest is to understand the effects of cyclooxygenase enzyme (COX) inhibition on activation and infection of human macrophages by *T. cruzi*. Macrophages derived from THP-1 cells (THP1/MØ) were obtained by stimulation with 5 ng/mL of PMA during 48 hours, followed by 48 hours resting. The phenotypic identity of THP-1/MØ was confirmed by flow cytometry. The *T. cruzi* infection increased the percentage of CD14⁺ /CD206⁺ cells, that can be related to the induction of cells with low inflammatory character. In addition, THP-1/MØ infected with *T. cruzi* showed a decrease in the production of reactive oxygen species (ROS) 24 and 48 hours post infection. Pharmacological inhibition of COX with aspirin (ASA) decreased invasion and release of trypomastigote forms of *T. cruzi*. Using BOC-2 as a lipoxin receptor blocker in ASA treated and infected cells, reversed ASA effect. Therefore we investigated the role of 15-epi-Lipoxin A4 (15-epi-LXA4, a lipoxin produced by ASA treatment) in invasion, release of *T. cruzi* and production of EROs. Treatment with 100 nM 15-epi-LXA4 increased CD11b⁺ /CD206⁺ cells, suggesting that the treatment would be able to induce a poorly inflammatory response pattern. Moreover, there was a decrease in CD11b⁺ /HLA-DR⁺ in cells treated with 15-epi-LXA4 and infected, indicating that treatment allied to infection are able to negatively modulate the presentation of antigens. Treatment with 15-epi-LXA4 had no effect on decreasing the invasion and release of *T. cruzi*. However, the concentration of 3.12 nM of 15-epi-LXA4 increased ROS production in treated and infected cells 24 hours post infection. Our results suggest for the first time that the COX enzyme participates in the process of *T. cruzi* infection in human macrophages.

Key words: Macrophages. 15-epi-Lipoxin A4. Aspirin. Chagas Disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Transmissão e ciclo de vida do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
Figura 2	– Principais características da Doença de Chagas na fase aguda e Crônica.....	16
Figura 3	– Metabolismo do ácido araquidônico	24
Figura 4	– Morfologia de células THP-1 antes e depois da estimulação com PMA	34
Figura 5	– Estratégia de gate e de controle de marcação para imunofenotipagem de macrófagos derivados de células THP-1 (THP-1/MØ).....	35
Figura 6	– Controle da técnica, comparação da detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em THP1/MØ.....	38
Figura 7	– Delineamento experimental	39
Figura 8	– Caracterização de macrófagos obtidos através do estímulo com 5ng/mL de PMA	40
Figura 9	– Marcação de moléculas de superfície em THP1/MØ	42
Figura 10	– Ensaio de viabilidade celular por MTT do tratamento com ASA em THP1/MØ	43
Figura 11	– Efeito do tratamento com ASA na Invasão de THP1/MØ.....	44
Figura 12	– Efeito do tratamento de ASA na liberação de formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma Cruzi</i>	46
Figura 13	– Dosagem de espécies reativas de oxigênio (EROs) em THP-1/MØ tratados com ASA.....	47
Figura 14	– Marcação de moléculas de superfície em THP-1/MØ tratados com 15- epi-Lipoxina A4.....	49
Figura 15	– Ensaio de viabilidade celular por MTT de THP-1/MØ tratados com 15- epi-Lipoxina A4.....	51
Figura 16	– Efeito do tratamento com 15-epi-Lipoxina A4 na invasão de THP1/MØ	52
Figura 17	– Efeito do tratamento com 15-epi-Lipoxina A4 na liberação de formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
Figura 18	– Dosagem de espécies reativas de oxigênio (EROs) em THP-1/MØ tratados com 15-epi-Lipoxina A4.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

13-PGR	13-Prostaglandina Redutase
15-epi-LXA4	15-epi-Lipoxina A4
15-PGDH	15-Hidroxi-Prostaglandina Desidrogenase
5-LO	5-Lipoxigenase
12-LO	12- Lipoxigenase
15-LO	15-Lipoxigenase
5-(R)HETE	5-(R)-Ácido hidroxi-eicosatetraenóico
AA	Ácido Araquidônico
AINEs	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
AKT	Serina/Treonina Quinase
AMPc	AMP cíclico
AP-1	Proteína Ativadora 1
ASA	Ácido acetilsalicílico/Aspirina
ATL	Aspirin Triggered Lipoxin
BOC-2	Dicarbonato de di-terc-butila
CCL2	Quimiocina de Família CC Ligante 2
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
cPLA2	Fosfolipase A2 Citoplasmática
DC	Doença de Chagas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTU	Discret Type of Units
ERNs	Espécies Reativas do Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
FRP2/ALX	Receptor N-formil Peptídeo 2/Lipoxina A4
GPI	Glicosilfosfatidil inositol
HETE	Ácido Hidroxi-eicosatetraenóico
HPETE	Ácido Hidroxiperaxitetranol
IFN- γ	Interferon γ
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-10	Interleucina 10

IL-12	Interleucina 12
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IP3	Fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDLr	Lipoproteína de Baixa Densidade da Célula Hospedeira
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrienos
LTA4	Leucotrieno A4
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LX	Lipoxina
LXA4	Lipoxina A4
LXB4	Lipoxina B4
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDSC	Myeloid-Derived Supressor Cell
MHC-II	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
Nrf2	Nuclear Factor Like-2
OPB	Oligopeptidase B
PAMPs	Padrões Moleculares Associado ao Patógeno
PBS	Phospate Buffered Saline
PG	Prostaglandina
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2α	Prostaglandina F2α
PGG2	Prostaglandina G2
PGH2	Prostaglandina H2
PGI2	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Kinase

PLA2	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-acetate
PRRs	Receptores de Reconhecimento Padrão
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2
PTK	Proteína Tirosina Quinase
SBF	Soro Fetal Bovino
TGF- β	Fator Transformador do Crescimento β
THP-1/M \emptyset	Macrófagos derivados de células de linhagem THP-1
TLR	Receptores Semelhantes a Toll
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TX	Tromboxano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	DOENÇA DE CHAGAS	13
1.2	INTERAÇÃO ENTRE PARASITO E HOSPEDEIRO	17
1.3	RESPOSTA IMUNOLÓGICA ANTI-PARASITÁRIA	20
1.4	EICOSANOIDES	23
1.4.1	Via das Cicloxigenases e Prostaglandinas	24
1.4.2	Via das Lipoxigenases e Lipoxinas: Importantes Mediadores Pró-Resolução	27
1.5	ASPIRINA E DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL	29
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVOS GERAIS	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	CULTURA DE CÉLULAS THP-1 E DIFERENCIAÇÃO	34
4.3	ANÁLISE DA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE CÉLULAS THP-1 (THP-1/MØ)	36
4.4	TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE THP-1 (THP-1/MØ)	37
4.5	ENSAIO DE INVASÃO CELULAR	37
4.6	ENSAIO DE SAÍDA DE TRYPANOSOMA CRUZI	38
4.7	DOSAGEM DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)	38
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4.9	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Confirmação Fenotípica das Células Obtidas e Fenotipagem	40
5.2	Ensaio de Viabilidade Celular do Tratamento com Aspirina	43
5.4	Ensaio de Saída de Trypanosoma CRUZI	45
5.5	Ensaio de Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)	47

5.6	Fenotipagem de THP-1/MØ Tratadas com 15-EPI-LIPOXINA A4 e Infectadas Por Trypanosoma CRUZI	48
5.7	Ensaio de Viabilidade Celular de THP-1/MØ Tratados com 15-EPI-LIPOXINAA4.....	50
5.8	Ensaio de Invasão Celular de THP-1/MØ Tratados com 15-EPI-LXA4	51
5.9	Ensaio de Saída de Trypanosoma CRUZI	53
5.10	Ensaio de Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)	54
6	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXOS	70
	ANEXO 1	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS:

A Doença de Chagas (DC) ou Tripanossomíase Americana é uma doença zoonótica que acomete seres humanos nos países da América Latina (WHO, 2019). Esta doença foi descoberta e descrita pelo médico infectologista Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909). Nesta época, a malária era uma das doenças que mais acometiam brasileiros e uma das principais causas de mortes no país. Um ano antes da primeira publicação sobre uma nova tripanossomíase humana, Carlos Chagas foi enviado para trabalhar em uma campanha anti-malária na construção de uma ferrovia em Minas Gerais. Durante sua estada, observou a presença de um inseto hematófago de hábito noturno, comumente encontrado em casas de sapé, onde os moradores da região relataram ser picados na face. Ao fazer a dissecação do inseto, encontrou abundantes formas tripomastigotas em seu trato digestório, as quais enviou para serem analisadas por seu mentor, o médico sanitarista Oswaldo Cruz. Desde então, Carlos Chagas, em conjunto com sua equipe, descreveu a doença, a forma de contágio e o agente etiológico da Doença de Chagas: o protozoário *Trypanosoma cruzi*, que leva o nome de seu mentor em sua homenagem (STEVERDING, 2014).

Passados 110 anos do primeiro relato da DC confirmada, estima-se que haja 8 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, estando a maioria na América Latina e aproximadamente 25 milhões de pessoas em risco de adquirir a doença (WHO, 2019).

A DC é considerada uma doença tropical negligenciada e atualmente existem apenas dois medicamentos disponíveis para seu tratamento: Benzonidazol (Roche) e Nifurtimox (Bayer) (WHO, 2019). O Benzonidazol (derivado nitroimidazólico) é o medicamento de primeira linha de tratamento e mais eficaz que o Nifurtimox (derivado de nitrofurano) (BERN et al., 2007).

Apesar de serem os dois únicos medicamentos existentes para tratamento da DC, asseguram cura de 60% à 85% dos casos quando o tratamento é iniciado na fase aguda, e até 60% quando o tratamento é iniciado na fase crônica (COURA; CASTRO, 2002; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Porém, ambos os

medicamentos possuem efeitos colaterais, tais como náusea, insônia, perda de peso, dermatites e em casos mais raros, aplasia medular e graves distúrbios no sistema digestório, que cessam ao descontinuar o tratamento (BERN, 2015).

O protozoário hemoflagelado *T. cruzi*, pertencente à ordem *Kinetoplastida*, família Trypanosomatidae (RASSI; RASSI; REZENDE, 2012), teve desenvolvimento da transmissão doméstica facilitada por ações antrópicas como a agricultura e pecuária (PATZ et al., 2000). O processo de urbanização, construções de estradas, linhas férreas, desmatamento e conseqüentemente perda de biodiversidade, resulta em distúrbios ecológicos, colocando o ser humano como um novo alvo para o inseto vetor. (PATZ et al., 2000; CONFALONIERI; MARGONARI; QUINTÃO, 2014).

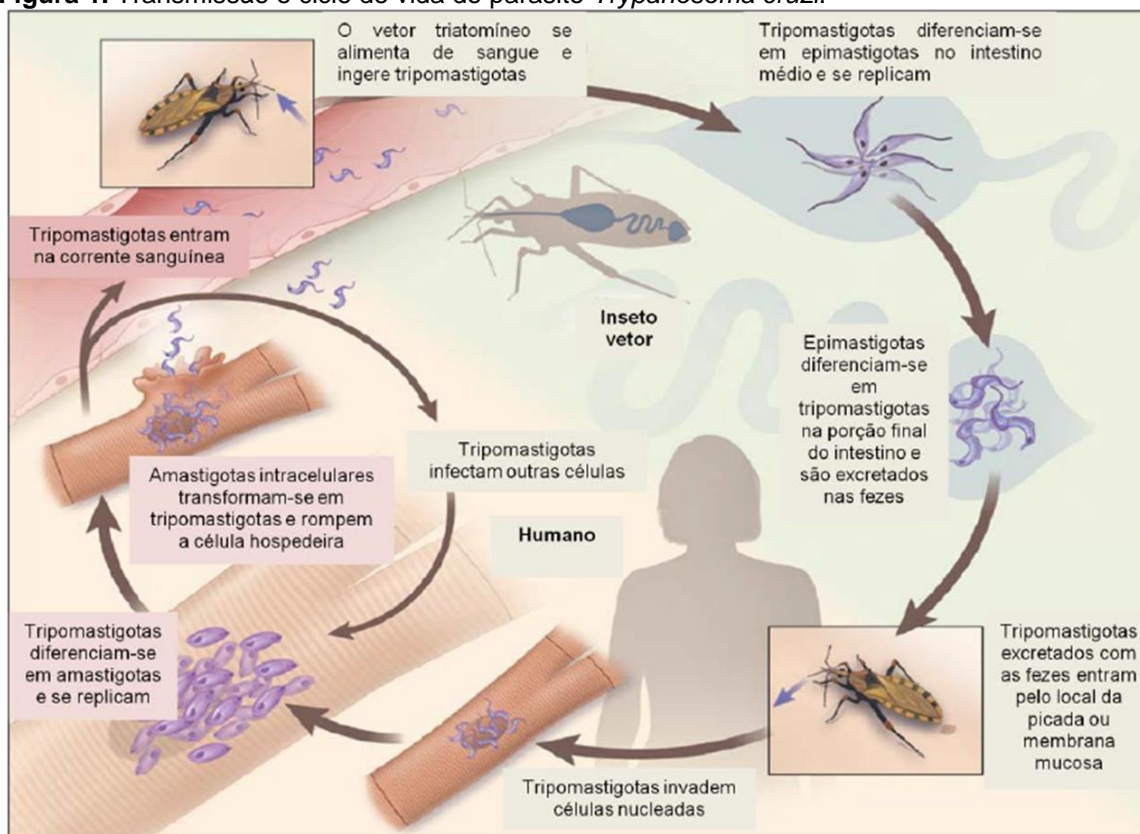
Os insetos triatomíneos, vetores da DC popularmente conhecidos como “barbeiro”, são hemípteros, pertencentes à família Reduviidae e subfamília Triatominae, sendo os principais transmissores do parasito no Brasil as espécies *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*, este último particularmente capaz de se adaptar facilmente a novas condições e habitat (RASSI; RASSI; REZENDE, 2012; CONFALONIERI; MARGONARI; QUINTÃO, 2014; STEVERDING, 2014).

O protozoário *T. cruzi* possui ciclo de vida heteroxênico, com diversas formas evolutivas que ocorrem entre o inseto triatomíneo hematófago e o hospedeiro mamífero (CHAGAS, 1909; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010.; RASSI; RASSI; REZENDE, 2012). O ciclo se inicia com a ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas de um hospedeiro mamífero pelo inseto triatomíneo. Estas formas se diferenciam em formas epimastigotas, que se replicam por fissão binária no início do sistema digestório do inseto triatomíneo. Por fim, as formas epimastigotas migram para porções distais do sistema digestório e devido ao estresse nutricional, diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; BARRIAS; CARVALHO; SOUZA, 2013) (Figura 1).

Tripomastigotas metacíclicos são as formas infectantes presentes no hospedeiro invertebrado. Durante o repasto sanguíneo do inseto triatomíneo são liberadas fezes e urina contaminadas com estas formas, que ao entrar em contato com a lesão ocasionada pela probóscide do inseto, mucosas ou lesões preexistentes, são capazes de infectar as células do hospedeiro mamífero. Ao penetrar no hospedeiro mamífero, as formas tripomastigotas metacíclicas podem

infectar todo tipo de célula nucleada. Após a invasão celular, tripomastigotas metacíclicos se diferenciam em amastigotas, que são as formas de replicação intracelular do parasito no hospedeiro mamífero. Após sofrerem diversas fissões binárias, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que rompem a célula podendo infectar novas células ou cair na corrente sanguínea reiniciando o ciclo (MONTEÓN et al., 1996; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018), conforme Figura 1.

Figura 1. Transmissão e ciclo de vida do parasito *Trypanosoma cruzi*.

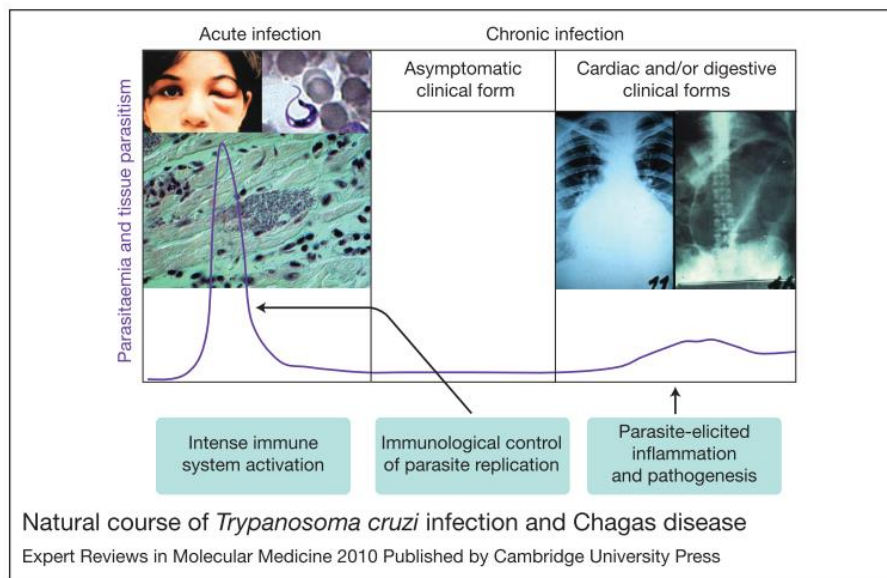


FONTE: Adaptado de BERN, C. Chagas' Disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.

A DC pode se apresentar em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda ocorre de 8 à 10 dias após o contato com o parasito, sendo encontrados os sinais de porta de entrada no hospedeiro mamífero, como presença de leucócitos, edema, hiperplasia de linfonodos proximais, febre e dor (RASSI; RASSI; REZENDE, 2012; JUNQUEIRA et al., 2019); além disso, há presença de formas tripomastigotas no sangue do hospedeiro, cuja carga parasitária é controlada após intensa ativação do sistema imunológico (Figura 2). A fase crônica é caracterizada pela ausência de parasitos na corrente sanguínea, onde o paciente pode permanecer assintomático,

ingressando na fase indeterminada ou desenvolver as megassíndromes da DC como o megacólon, megaesôfago ou a cardiomiopatia chagásica (Figura 2).

Figura 2. Principais características da Doença de Chagas na fase aguda e crônica.



Fonte: JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 12, p. 1–23, 2019.

Por ser um parasito de replicação clonal, entre cepas de *T. cruzi* não há alta variabilidade genética (TIBAYERENC; AYALA, 1991) Apesar disso, diferentes isolados de cepas de *T. cruzi* podem apresentar variações na virulência, patogênese e gravidade da doença, bem como na resposta à terapia. Além disso, estes protozoários podem apresentar distribuição geográfica e especificidade entre hospedeiros triatomíneos e mamíferos distintos (ZINGALES et al., 2012). Assim, diferentes cepas de *T. cruzi* são agrupadas em DTUs (do inglês *discret type of units*), que nada mais são que clados geralmente separados por marcadores genéticos particulares entre grupos chamados de “tags” (TIBAYRENC; AYALA, 1998). Atualmente são aceitos 6 DTUs: TcI – TcVI (ZINGALES et al., 2009) e mais recentemente foi descoberto e caracterizado pelo grupo de Marcili et al., (2019), um novo grupo de tripanossomatídeos que infecta morcegos da região amazônica e que possui similaridade genética com as DTUs TcI e II, porém com características particulares que o exclui de ambos os grupos, compondo uma nova DTU: Tcbat.

Dentre as cepas relacionadas com a infecção em humanos podemos destacar as cepas Colombiana e Sylvio X10C11, que pertencem ao DTU TcI; a cepa

Y, pertencente ao DTU TcII; e a cepa Tulahuen, pertencente ao DTU TcVI. Entre as cepas envolvidas com o ciclo silvestre do parasito pertencem ao DTU TcI as cepas Dm28c, G e YuYu; e ao DTU TcVI a cepa CL, assim como seu clone CL Brener (ZINGALES et al., 2009).

Apesar do desenvolvimento de uma resposta imunológica robusta durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, o organismo não é capaz de fazer o “*clearance*” de todos os parasitos, principalmente no tecido cardíaco, podendo ser detectado por técnicas de biologia molecular (ZHANG; TARLETON, 1999; TARLETON; ZHANG, 1999). Além disso, há um consenso sobre a persistência do parasito *in vivo* por décadas e isso está relacionado, dentre outros fatores, com a capacidade de *T. cruzi* infectar um grande número de tipos celulares diferentes no hospedeiro mamífero (BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

Assim sendo, constata-se que a invasão da célula do hospedeiro é um evento crítico no estabelecimento da infecção por *T. cruzi* (YOSHIDA, 2006). Portanto, será discutido com maiores detalhes a seguir o processo de adesão, reconhecimento e invasão do parasito na célula hospedeira.

1.2 INTERAÇÃO ENTRE PARASITO E HOSPEDEIRO:

Os primeiros passos da interação entre *T. cruzi* e a célula hospedeira são divididos em 3 estágios: reconhecimento e adesão entre a célula hospedeira e parasito, sinalização e invasão (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010).

Como mencionado anteriormente, *T. cruzi* é capaz de infectar células nucleadas do hospedeiro mamífero. Desta forma, durante a fase aguda da DC, as formas tripomastigotas são promíscuas e podem infectar vários tecidos e órgãos, como músculo esquelético, coração, bexiga, nervos periféricos, fígado, baço, glândulas adrenais, cérebro, tecido adiposo além de células do próprio sistema imunológico (BUCKNER; WILSON; VOORHIS, 1999; YOSHIDA, 2006).

T. cruzi pode utilizar diferentes mecanismos de invasão, sendo o processo inicial a adesão do parasito à superfície celular. Entretanto, o grau de adesão varia de acordo com a cepa do parasito, com a forma evolutiva e com a célula-alvo (ARAÚJO-JORGE; BARBOSA; MEIRELLES, 1992).

A adesão e invasão do parasito na célula hospedeira envolvem processos complexos mediados pela elevação de Ca^{2+} intracelular e participação de lisossomo, tanto na célula hospedeira, quanto no parasito (YOSHIDA, 2006; MAEDA; CORTEZ; YOSHIDA, 2012).

De fato, o aumento do Ca^{2+} intracelular é crucial para o estabelecimento da infecção, pois está relacionado com eventos importantes como a adesão, invasão e formação do vacúolo parasitóforo. Neste sentido, o bloqueio de vias relacionadas com a liberação e aumento do Ca^{2+} citosólico, prejudica o processo de invasão (DOCAMPO, ROBERTO.; MORENO, SILVIA N.J.; VERCESI, 1993; TARDIEUX et al., 1992.; MARTINS et al., 2011).

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 parasito seguido por sua fusão com a membrana e formação do vacúolo parasitóforo. 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 Ca^{2+} , regulando esse processo (CALER et al., 2001; YOSHIDA, 2006). Os lisossomos são deslocados por uma proteína motora associada aos microtúbulos, a cinesina. Além disso, o processo de invasão é facilitado pela ruptura de microfilamentos de actina (TARDIEUX et al., 1992).

As formas infectantes do parasito apresentam diferentes conjuntos de moléculas de superfície que interagem com os componentes celulares e teciduais do hospedeiro, sendo destaque diferentes glicoproteínas, que estão relacionadas principalmente com a adesão na célula hospedeira (FERGUSON, 1997; NAKAYASU et al., 2009; SOUZA, 2002).

Membros da família da glicoproteína Tc85 são amplamente expressas na superfície de formas infectantes do parasito, e foram as primeiras a serem sugeridas como envolvidas na adesão celular. Trabalhos pioneiros de Alves e colaboradores (1986) e Giordano e colaboradores (1999) utilizando anticorpos monoclonais que reconheciam a proteína de membrana Tc85 impediram a interação com as moléculas do hospedeiro, inibindo o reconhecimento e bloqueando a ligação de Tc85 com a laminina do hospedeiro.

Em adição, a análise de moléculas de superfície dos parasitos possibilitou sua divisão em dois grupos distintos quanto à capacidade de invasão, *in vitro*, de células de mamíferos (YOSHIDA, 2006). Cepas que não possuem as

glicoproteínas de superfície gp90 e gp35/50 apresentam maior capacidade infectante. Isolados mais infectivos, como o clone CL Brener, ligam-se à superfície da célula hospedeira através de gp82 e induzem a ativação de PTK (proteína tirosina quinase). Essa sinalização envolve a ativação de fosfolipase C (PLC), liberação de IP₃ (fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato) e conseqüentemente mobilização de Ca²⁺ no citosol (YOSHIDA, 2000).

Por outro lado, em isolados de menor capacidade infectante, como a cepa G, a ligação à superfície celular ocorre principalmente através de gp35/50, que promove uma cascata de sinalização menos eficiente. Nesses isolados, a cascata de sinalização é independente de PTK e PLC, e provavelmente dependente de AMPc (AMP cíclico). O Ca²⁺ necessário para invasão parece ser liberado para o citosol a partir de vacúolos contendo um sistema de troca iônica Ca²⁺/H⁺, também chamados acidocalciossomas (YOSHIDA, 2006).

Além disso, diversas moléculas expressas por formas tripomastigotas, incluindo a trans-sialidase, oligopeptidase e cruzipaina participam de maneira importante na invasão de células do hospedeiro (BURLEIGH; ANDREWS, 1995.; PAIVA et al., 1998; RODRÍGUEZ et al., 1995).

A oligopeptidase B (OPB), é uma serina endopeptidase expressa pelas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, é capaz de ativar uma cascata de sinalização de Ca²⁺ dependente de PLC e IP₃ (BURLEIGH; ANDREWS, 1995; RODRÍGUEZ et al., 1995). Em adição, a cruzipaina, uma cisteína proteinase expressa em todas as formas do ciclo de vida de *T. cruzi*, também ativa cascatas de sinalização mobilizadoras de Ca²⁺, aumentando assim a eficácia do processo de invasão celular. Entretanto sua alta expressão não está relacionada com o aumento da virulência do parasito (PAIVA et al., 1998).

Já a transialidase transfere ácidos siálicos (2,3)-ligados de glicoproteínas e glicolipídios da superfície da célula-alvo para a superfície do parasito (SCHENKMAN; MORTARA, 1992). Sendo o processo de sinalização essencial para adesão e formação de vacúolos parasitóforos eficientes, a presença do ácido siálico é fundamental para correta justaposição das membranas do vacúolo nascente e dos tripomastigotas, promovendo a vedação do vacúolo e impedindo que *T. cruzi* escape durante o processo de internalização (LOPEZ et al., 2002).

Fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) e Akt (serina/treonina quinase) também são importantes reguladores do processo de invasão do *T. cruzi* em células

não fagocíticas (WILKOWSKY et al., 2001). As PI3K regulam o processo de tráfico de membranas, fusão de endossomas e rearranjo do citoesqueleto, promovendo a invasão e a maturação lisossomal (WOOLSEY et al., 2003). Além de participar no processo de invasão, a via sinalização PI3K/Akt também estimula mecanismos pró-sobrevivência nas células parasitadas (CHUENKOVA et al., 2001).

Outra via de sinalização importante para invasão de *T. cruzi* envolve o fator de crescimento tumoral beta (TGF- β). Durante a infecção, o parasito têm capacidade de modular a produção de TGF- β , molécula relacionada com a regulação da resposta inflamatória e supressão de moléculas tripanocidas como o óxido nítrico (NO).

O TGF- β é uma citocina que participa de inúmeros eventos celulares como a produção de matriz extracelular, regulação da miogênese, resposta imune, angiogênese e embriogênese (ROBERTS et al., 1985).

Experimentos com células epiteliais de pulmão deficientes nos receptores para TGF- β , demonstraram que *T. cruzi* é incapaz de infectar essas células (MING; EWEN; PEREIRA, 1995). Em adição, estudos envolvendo cardiomiócitos demonstraram que o tratamento com ácido acetilsalicílico (ASA), reduziu a liberação de TGF- β , resultando em uma diminuição na internalização e multiplicação de parasitos nestas células (MALVEZI et al., 2014a).

Além disso, também foi demonstrado que *T. cruzi* explora receptores para lipoproteína de baixa densidade da célula hospedeira (LDLr) para a sua internalização e posterior fusão do vacúolo parasitário com o compartimento lisossômico da célula hospedeira (NAGAJYOTHI et al., 2011).

Desta forma, o parasito pode acionar diferentes vias de adesão e sinalização na célula hospedeira, facilitando sucesso da infecção e estabelecimento da DC.

1.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA ANTI-PARASITÁRIA:

Na fase aguda da DC, uma resposta imunológica robusta é necessária e determinante para conter a replicação do parasito. Sendo assim, diversos estudos sobre a infecção experimental por *T. cruzi* têm mostrado que há uma intensa resposta inflamatória na fase aguda da DC. Esta resposta inflamatória é caracterizada pela intensa ativação e infiltração de células fagocíticas, que possuem

habilidade de processar e apresentar antígenos, sintetizar citocinas pró-inflamatórias, auxiliando no controle da multiplicação do parasito e sua eliminação na fase aguda e crônica da doença.

O reconhecimento dos patógenos pelas células de defesa do sistema imune inato se dá através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Um PAMP é uma molécula altamente conservada que é expressa por microrganismos e não é expressa pelas células hospedeiras (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). As vias de transdução de sinal desencadeadas pelos PRRs culminam na expressão de genes e síntese de diversas moléculas tais como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão celular e imunorreceptores, que orquestram a resposta imunológica inata a diversas infecções e ao mesmo tempo, atuam como importante ponte para a montagem da resposta imune adaptativa (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

Na célula hospedeira, o reconhecimento dos parasitos envolve principalmente os receptores do tipo Toll (TLR) (HARRIS et al., 2006). Os TLRs tem tido destaque em diversos estudos sobre a DC experimental, estando relacionados com o primeiro disparo de reconhecimento de diversos patógenos. Além disso, desempenham papel crucial no recrutamento de fagócitos para o sítio inflamatório, reconhecimento, fagocitose e produção de citocinas relacionadas com o controle dos patógenos reconhecidos (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; MOGENSEN, 2009).

Dentre os eventos que ocorrem na fase aguda, estão a grande produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de componentes da imunidade inata tais como células *natural killer* (NK) (HATCHER et al., 1981) e macrófagos (ORTIZ-ORTIZ et al., 1976), a ativação de NFκB (Fator nuclear kappa B), fosforilação de MAPKs (*Mitogen-activated protein kinase*) e a indução da transcrição de genes que codificam moléculas pró-inflamatórias, características da ativação celular por *T. cruzi* (HALL et al., 2000; HUANG et al., 2003).

Desta forma, o sistema imune inato desempenha um importante papel na fase aguda da DC. Células como NK, células dendríticas e macrófagos são elementos chave para o controle inicial da replicação do parasito e sua eliminação na fase aguda e crônica da doença (HUANG et al., 1999; MACHADO et al., 2008, 2012). De maneira particular, os macrófagos ativados são capazes de processar e

apresentar antígenos, produzir citocinas, e fornecer sinais de coestimulação; demonstrando seu papel crucial na iniciação da resposta imune (MELO, MACHADO 2001; SOUZA et al., 2004).

Logo nas primeiras horas de infecção os parasitos invadem os macrófagos, induzindo uma resposta inata do organismo que desencadeia nas células NK a produção de interferon gama (IFN- γ), ativando macrófagos que iniciam a produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores com atividade tripanocida (CARDILLO et al., 2002). Esta produção inicial de IFN- γ é de extrema importância, pois está relacionada com o desenvolvimento de uma resposta imunológica eficiente contra o *T. cruzi* (CARDILLO et al., 1996).

Moléculas presentes na superfície do parasito como mucinas e proteínas GPI (glicofosfatidil inositol), que estão ligadas com o ancoramento do mesmo na célula hospedeira, estimulam a síntese de IL-12 e TNF- α em macrófagos (COELHO et al., 2012). Proteínas GPI induzem recrutamento leucocitário via TLR2 e dependente de CCL2 (CAMARGO et al., 1997).

Os macrófagos produzem também grandes quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), que são importantes no “clearance” parasitário (CARDONI; ROTTENBERG; SEGURA, 1990).

Além da participação de TLR2, os TLR4 e TLR9 também reconhecem proteínas de membrana e DNA do parasito respectivamente, atuando na ativação celular e levando a regulação da infecção (KAYAMA; TAKEDA, 2010). Outros TLR também podem estar envolvidos no reconhecimento do parasito e de seus componentes celulares, como TLR3 e 11 (YAROVINSKY et al., 2005; KAYAMA; TAKEDA, 2010).

Muitos tipos de células e moléculas já foram descritas por apresentarem atividades regulatórias ou supressoras durante a infecção por *T. cruzi*, como o NO (ABRAHAMSOHN, 1998), a PGE₂ (PINGE-FILHO; TADOKORO; ABRAHAMSOHN, 1999), TXA₄ (ASHTON et al., 2007) a PGF_{2 α} (KUBATA et al., 2002) e células mielóides supressoras (MDSCs do inglês *myeloid-derived suppressor cells*) foram dadas como responsáveis pelo controle ou supressão da resposta imunológica que ocorre durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* (AROCENA et al., 2014; CUERVO et al., 2011).

Assim sendo, diversos tipos de células da imunidade inata e adquirida atuam no controle da infecção por *T. cruzi*. A redução e controle da carga

parasitária na fase aguda depende da ação de citocinas pró-inflamatórias sobre os macrófagos, resultando em fagocitose e morte eficiente dos parasitos (ABRAHAMSOHN, 1998).

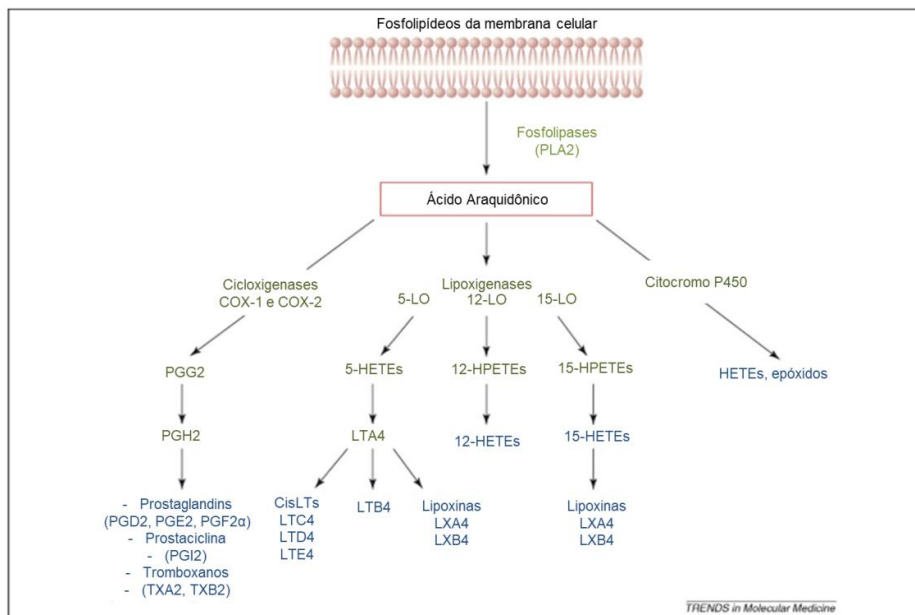
1.4 EICOSANOIDES

Eicosanoides são mediadores lipídicos compostos por 20 carbonos, resultantes do metabolismo do ácido araquidônico (AA), compondo uma classe de moléculas importantes no curso da resposta imunológica (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014).

Com o papel de regular a inflamação, estão as prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas (HARRIS et al., 2002), que atuam coordenando a produção de citocinas, produção e liberação de anticorpos, proliferação e migração celular e apresentação de antígenos (GUALDE; HARIZI, 2008). A produção de diferentes eicosanóides está relacionada com etapas específicas da resposta imunológica, participando tanto de suas fases iniciais como no combate ao agente agressor, até as fases de resolução e reparo da injúria (ESSER-VON BIEREN, 2019), sendo o desbalanço de sua síntese e degradação, uma das principais causas das inflamações crônicas (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014).

A biossíntese dos eicosanóides pelo metabolismo do AA depende da disponibilidade de AA livre no citosol. Quando os tecidos são expostos a diversos estímulos, sejam eles fisiológicos ou patológicos, como fatores de crescimento, hormônios ou citocinas, o AA presente na membrana plasmática é excisado pela ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂). Uma vez livre, o AA pode se tornar substrato em 3 vias diferentes da produção de eicosanóides: P-450 epoxigenase, cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX). A via das COX resulta em prostaglandina G₂ (PGG₂) e prostaglandina H₂ (PGH₂), as quais são convertidas em diferentes classes de prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs) por enzimas isomerases; a via das LOX resulta na síntese de leucotrienos (LT) e lipoxinas (LX); e a via da P-450 epoxigenase, gera epóxidos (Figura 3) (GUALDE; HARIZI, 2008).

Figura 3. Metabolismo do ácido araquidônico



Fonte: Adaptado de GUALDE, N.; HARIZI, H. Arachidonic-acid-derived eicosanoids : roles in biology and immunopathology. **Cell Press**, v. 14, n. 10, p. 461–469, 2008.

1.4.1 VIA DAS CICLOXIGENASES E PROSTAGLANDINAS

Dois tipos de COX estão melhor caracterizadas, a COX-1, presente em quase todos os tecidos; e a COX-2 induzida localmente por citocinas produzidas por leucócitos em resposta a danos ou invasão microbiana.

Ambas as enzimas produzem um intermediário lipídico que é a PGG₂, que é convertido à PGH₂ por uma enzima peroxidase, sendo substrato para a geração de diferentes classes de prostaglandina: PGI₂, PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} (SMITH; MURPHY, 2002). Particularmente a PGE₂ é relativamente estável *in vitro*, porém fisiologicamente possui um rápido “turnover” e é rapidamente eliminada dos tecidos e circulação, o que está relacionado com o controle das suas atividades imunomoduladoras. Nos tecidos, a degradação da PGE₂ é controlada pela enzima 15-hidroxi-prostaglandina-desidrogenase (15-PGDH), 13-prostaglandina redutase (13-PGR) (TAI et al., 2002).

Apesar do uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) datarem muitos anos, a descoberta das enzimas envolvidas em sua ação anti-inflamatória, mecanismos e seus produtos são recentes (MARNETT et al., 1999). As PGs foram descobertas em 1930 no sêmen humano (VON EULER, 1936), mas somente em 1967 foi descrito um possível mecanismo de biossíntese (HAMBERG; SAMUELSSON, 1967), sendo confirmado em estudos posteriores.

Em 1971, utilizando homogenato de baço de cobaias, Vane (1971) descreveu o efeito da aspirina na redução da produção de prostaglandinas, explicando seu efeito terapêutico anti-inflamatório. Dois anos depois, este mecanismo foi confirmado com o isolamento da enzima COX-1 (NUGTEREN; HAZELHOF, 1973), e em 1994 foi observada a estrutura protéica da COX-1 (PICOT; LOLL; GARAVITO, 1994). Neste intervalo, foi identificada a COX-2 (FU et al., 1990), o gene que a codifica e, logo depois, como atuam os AINEs, no bloqueio do funcionamento de ambas as enzimas (MARNETT et al., 1999).

Desde a descoberta das duas isoformas de COX, muitos estudos foram conduzidos para esclarecer o mecanismo e sua função fisiológica. Por conta de sua presença na maior parte dos tecidos e células do organismo mamífero, COX-1 é considerada uma enzima constitutiva importante, auxiliando em diversos processos fisiológicos. Devido essas características esta enzima recebeu a denominação de proteína “*house keeping*”, pois sua estrutura é extremamente conservada entre espécies de vertebrados e desempenha diversas funções em diferentes células e tecidos do organismo.

Por outro lado, a COX-2 é encontrada nos tecidos em baixas concentrações. No entanto, em tecidos específicos, como no cérebro, rins, sistema reprodutivo e nas células do sistema imunológico, sua expressão é rapidamente induzida por estímulos inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α), lipopolissacarídeo (LPS), mitógenos (como ésteres de forbol), oncogenes, fatores de crescimento, hormônios e estresse celular, resultando na síntese de PGs (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2012). Na presença destes estímulos, há indução da expressão de COX-2 e conseqüente aumento da concentração desta enzima nos tecidos (CHANDRASEKHARAN; SIMMONS, 2004).

Dentre as principais prostaglandinas produzidas, estão as da série E (PGE₂ e PGE₁), desempenhando importantes funções regulatórias relacionadas com o controle da pressão arterial, integridade gastrointestinal e fertilidade (KUNKEL et al., 1986; MEDEIROS et al., 2012; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2012).

Os macrófagos são capazes de produzir grandes quantidades de PGE₂ em resposta a estímulos pró-inflamatórios como IL-1 e LPS. Além disso, a própria PGE₂ produzida pela célula é capaz de atuar de forma autócrina a estimular a expressão da COX-2 (HINZ; BRUNE; PAHL, 2000; SCHOTT et al., 1982; IKEGAMI et al., 2001; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2012). Em adição, a PGE₂

também está relacionada com a promoção de eventos pró-inflamatórios, como a vasodilatação e recrutamento celular (PHIPPS; STEIN; ROPER, 1991; FUNK, 2001).

Entretanto, a PGE₂ possui um viés anti-inflamatório, direcionando eventos de imunossupressão pela indução da secreção de IL-10, suprimindo a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias e limitando a inflamação (HILKENS et al., 1996). Dentre esses eventos, estão a inibição da proliferação de células T murinas e de humanos (KUNKEL et al., 1986; STAFFORD; MARNETT, 2008), inibição da atividade de células NK (HASLER et al., 1983) e produção de IL-1 e TNF.

Da mesma forma, a PGE₂ inibe o desenvolvimento da resposta Th1 e secreção de citocinas Th1 específicas (IFN- γ , IL-2) (BETZ; FOX, 1991), interferindo nas interações *in vivo* entre monócitos e células T, por inibição da expressão de moléculas do MHC de classe II, gerando uma apresentação antigênica inadequada (STEPHAN et al., 1988).

A sinalização autócrina mediada por PGE₂ nos macrófagos diminui a produção da TNF- α e aumenta a produção de IL-10, levando a uma redução na resposta inflamatória (STAFFORD; MARNETT, 2008; STRASSMANN et al., 1994) e ativando alternativamente estas células, resultando em macrófagos de fenótipo M2 (MACKENZIE et al., 2013), com fagocitose e potencial microbicida limitados (SEREZANI et al., 2007). A diminuição na fagocitose de microrganismos pela PGE₂ pode estar relacionada com o bloqueio de receptores *scavenger* e de receptores TLR dependentes de TNF- α (HUBBARD et al., 2014), favorecendo o crescimento e proliferação de microrganismos intracelulares.

A evidência original que a PGE₂ está envolvida com o balanço entre as respostas Th1 e Th2 veio de estudos *in vitro* que mostraram a habilidade da PGE₂ de inibir a produção de citocinas do padrão Th1 como o IFN- γ , IL-1, IL-12, mas não do padrão Th2 como a IL-4 e a IL-5 em células T CD4 em humanos (BETZ; FOX, 1991; SNIJDEWINT et al., 1993). Além disso, foi mostrado por Meja e colaboradores (1997), que em células dendríticas derivadas de medula óssea, há diminuição na produção de TNF- α e IL-12 mediada principalmente por receptores EP2 e EP4.

Em geral as PGs funcionam como agentes imunossupressores, então a capacidade de um antígeno induzir a liberação de PGE₂ pelos macrófagos pode influenciar o desenvolvimento de uma resposta Th1 ou Th2 dominante e definir o estado de imunidade do hospedeiro (protetora ou não). Existem evidências de que

a PGE₂ está aumentada em várias infecções parasitárias, tais como *Cryptosporidium parvum* (ARGENZIO; RHOADS, 1997), *Toxoplasma gondii* (YONG; CHI; HENDERSON JR, 1994), *Leishmania donovan* (REINER; MALEMUD, 1985), *Leishmania major* (CILLARI; LIEW; LELCHUK, 1986) e *T. cruzi* (CARDONI; ANTÚNEZ, 2004; CELENTANO et al., 1995; PINGE-FILHO; TADOKORO; ABRAHAMSOHN, 1999). PGs juntamente com o NO e TNF- α 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).

Sendo imunomoduladores potentes, contribuindo para a imunossupressão observada durante a infecção com *T. cruzi* (PINGE-FILHO et al., 1999), o próprio parasito é capaz de modular a produção de PGE₂ do hospedeiro ao seu favor através da regulação da atividade da COX-2 e da conversão de compostos tripanocidas em prostanoídes, como o TXA₄ (revisado por KUBATA et al., 2007). Resultado disso é o controle da própria proliferação, aumentando a permanência no hospedeiro (ASHTON et al., 2007; MORAES; DINIZ; BAHIA, 2015). Em adição, o efeito supressor de PGE₂/TGF- β sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias (FADOK et al., 1998) cria um ambiente favorável para a proliferação de *T. cruzi* dentro dos macrófagos.

1.4.2 VIA DAS LIPOXIGENASES E LIPOXINAS: IMPORTANTES MEDIADORES PRÓ-RESOLUÇÃO

Também exercendo papel importante na resposta imunológica, as enzimas LOX são mais numerosas e convertem AA em ácido hidroxiperoxitetraenoico (HPETE) e ácido hidroxieicosatetraenoico (HETE). Em seguida, HPETE sofrem processo de desidratação e são convertidos em leucotrieno A₄ (LTA₄), um metabólito intermediário importante na biossíntese dos demais mediadores pró-inflamatórios. O LTA₄ sofre transformação em um ou mais dos três destinos possíveis, dependendo do contexto celular: hidrólise pela LTA₄ hidrolase, formando LTB₄; conjugação com glutatona, formando LTC₄; ou metabolismo transcelular para gerar outros mediadores lipídicos bioativos, como as lipoxinas (GRONERT et al., 1999; LINDGREN; EDENIUS, 1993).

Diversos mediadores são produzidos durante o processo da inflamação, sejam eles produtos da via das COX ou das LOX. Entretanto, a própria resposta inflamatória requer mecanismos de reparo para que o tecido recupere sua

função e homeostase. Neste sentido, são de grande importância os mediadores lipídicos pró-resolução como as lipoxinas (LX), que estão envolvidas na regulação da resposta inflamatória e no reparo tecidual.

Durante a geração de mediadores lipídicos pró-inflamatórios como os leucotrienos, pela via da 5-LO, há estímulo para a produção de metabólitos originados das enzimas 12/15-LO, como as LXA4 e LXB4 (lipoxina B4). As LX são o produto final da oxigenação do AA pela enzima 15-LO (15-Lipoxigenase), que resulta em 15S-ácido hidroxipentaenóico (15S-H(p)ETE), que sofre ação subsequente da 5-LO e finalmente uma reação de hidrólise leva à formação da molécula final: LXA4 e LXB4 (SERHAN, 2005).

De forma alternativa, o uso de ASA possui capacidade de acetilar a COX-2, desviando sua função de peroxidase do AA e conversão do mesmo para PGH₂, dando origem ao 5(R)-ácido hidroxi-eicosatetraenóico (5-(R)HETE). Este último, se tornando substrato para a enzima 5-LO, o 5-(R)HETE é convertido em 15-epi-lipoxina A4 (15-epi-LXA4) (SERHAN, 2005).

Por ser resultado da acetilação da COX-2 pela aspirina, 15-epi-LXA4 e 15-epi-LXB4 são chamadas de lipoxinas desencadeadas pela aspirina (ATL, do inglês *aspirin triggered lipoxin*), as quais compartilham potente atividade anti-inflamatória com as LX em doenças como asma (BONNANS; CHANEZ; CHAVIS, 2004), artrite reumatoide (CONTE et al., 2010), doenças cardiovasculares e metabólicas (BÖRGESON, 2016), doenças gastrointestinais (WIEDENMANN et al., 2007), doença periodontal (BALTA; LOOS; NICU, 2017), entre outras, onde a resposta inflamatória exacerbada participa de forma importante na patogênese destas doenças. Além disso em monócitos e macrófagos, LXA4 induz a síntese de IL-10, polarizando a célula para um padrão de resposta alternativo ou pró-resolução (SOUZA et al., 2007; MADERNA et al., 2010).

Estudos conduzidos por Molina-Bérrios e colaboradores (2013) e Moraes e colaboradores (2015), mostraram que há aumento na expressão da COX-2 durante a infecção na fase aguda por *T. cruzi*, bem como a capacidade do parasito modular a atividade da COX-2 nas primeiras horas de infecção na célula hospedeira. Além disso, também foi relatado aumento de receptores de PGE₂ (EP2) no tecido cardíaco (GUERRERO et al., 2015).

Como registrado anteriormente, diversos estudos demonstram a importante participação dos prostanoides durante a infecção por *T. cruzi*. Com o

objetivo de compreender a interferência destes mediadores lipídicos no curso da DC na fase aguda, diversos ensaios utilizando bloqueadores de COX foram utilizados como uma estratégia de controle do parasito. Dentro deste contexto, abordaremos o tratamento da aspirina na DC experimental e a participação da lipoxina como mediador induzido pelo bloqueio da COX-2 pela aspirina.

1.5 ASPIRINA E DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

O Ácido Acetilsalicílico (ASA), comercialmente chamado de Aspirina, compõe os chamados AINEs e, atualmente é um dos fármacos mais utilizados no mundo. Seus efeitos anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos o tornam um medicamento amplamente utilizado para tratamento de doenças inflamatórias e na prevenção de doenças cardiovasculares (JACK, 1997; DESBOROUGH; KEELING, 2017).

Por conta do bloqueio das enzimas COX e a consequente diminuição na produção e disponibilidade de PGE₂, que como já discutido anteriormente, está relacionada com eventos de imunossupressão, diversos estudos foram realizados com o objetivo de investigar a COX-1 e/ou COX-2 sobre o curso de doenças infecciosas, tais com a DC.

Dentro deste contexto, vários trabalhos correlacionam o bloqueio da COX com efeitos benéficos, tais como os demonstrados por Guerrero e colaboradores (2015). Estes autores observaram que camundongos “*knockout*” para o gene *ptgs2* (do inglês, *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*, o qual codifica a COX-2) apresentam redução do infiltrado inflamatório e de fibrose no tecido cardíaco quando comparados com animais controle. Além disso, Guerrero e colaboradores também mostraram que a expressão de COX-2 bem como de PGE₂ em camundongos controles é aumentada durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, sugerindo que a COX-2 tem importante participação no desenvolvimento da miocardite chagásica.

Malvezi e colaboradores (2014a), demonstraram que o bloqueio da COX -1 e COX-2 em linhagem de cardiomiócitos H9C2, prejudicou a entrada de *T. cruzi* e induziu aumento na produção de NO. Em adição, foi observado que o bloqueio de COX-1 pela ASA foi capaz de diminuir a invasão em macrófagos intraperitoneais, porém o tratamento simultâneo com celecoxibe (inibidor seletivo de

COX-2), reverteu a diminuição da entrada de *T. cruzi* nestas células (MALVEZI et al., 2014b), sugerindo que a atividade da COX-2 é necessária para se observar o efeito benéfico do tratamento com a aspirina.

A ASA possui capacidade de acetilar a COX-1 de forma irreversível, impedindo sua atividade enzimática e também a COX-2, porém de forma que a enzima não perca totalmente sua atividade de peroxidação, convertendo AA em 5-RHETE que dá origem a produção de 15-epi-lipoxina A4. Utilizando bloqueadores de FRP2/ALX (receptor N-formil peptídeo 2, um dos receptores citoplasmáticos ao qual as LX se ligam), em macrófagos murinos tratados com aspirina, Malvezi e colaboradores (2014b) observaram reversão da diminuição da entrada do parasito nestas células, sugerindo que existe participação importante da 15-epi-lipoxina A4 no efeito observado pelo tratamento com ASA.

Estudos *in vivo* que utilizaram diferentes AINEs, como o ácido acetilsalicílico (ASA), para determinar o papel das PGs no controle da carga parasitária e resistência à infecção com *T. cruzi* têm-se moestrado discrepantes (CELENTANO et al., 1995; FREIRE-DE-LIMA et al., 2000; PINGE-FILHO et al., 1999; TATAKIHARA et al., 2008). Enquanto o tratamento com ASA aumenta a parasitemia e mortalidade em camundongos que apresentam perfil de resistência para *T. cruzi* (MICHELIN; SILVA; CUNHA, 2005; TATAKIHARA et al., 2008; MUKHERJEE et al., 2011), outros estudos mostram que em camundongos susceptíveis, o tratamento com ASA foi benéfico (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000; MOLINA-BERRÍOS et al., 2013).

Além disso, foi observado que o efeito do tratamento com ASA é dose-dependente. Em estudos *in vivo*, o tratamento com altas doses de ASA não possuem efeitos benéficos, entretanto, quando administrada em baixas doses, é capaz de diminuir infiltrado inflamatório no tecido cardíaco, diminuir a parasitemia e aumentar a sobrevivência de animais tratados e infectados com *T. cruzi*; possível resultado da produção de 15-epi-lipoxina A4 induzida pelo tratamento da ASA. (MOLINA-BERRÍOS et al., 2013).

Em adição, Chiang e colaboradores (2004) demonstraram que o tratamento com baixas doses de ASA diárias aumentaram a concentração de 15-epi-lipoxina A4 no plasma de humanos quando comparados com o grupo controle e tratamento com doses maiores não apresentou diferença na produção do mesmo

mediador. Este dado mostra que a produção de 15-epi-lipoxina A4 é inversamente proporcional à concentração ministrada de ASA.

Diversos estudos observaram o efeito do bloqueio da COX-1 por meio do tratamento com ASA *in vivo* e *in vitro* no modelo murino da infecção por *T. cruzi*. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos do bloqueio farmacológico da COX-1 com o uso da ASA em células humanas infectadas por *T. cruzi*.

2 JUSTIFICATIVA

A atividade funcional de fagócitos durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* tem sido correlacionada com a elevação da produção de diversos mediadores inflamatórios, como os eicosanóides.

Desta forma é do nosso interesse compreender os efeitos do bloqueio farmacológico da cicloxigenase-1 (COX-1) através do tratamento com ácido acetilsalicílico (ASA) sobre a ativação e infecção de macrófagos humanos por *Trypanosoma cruzi*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito do bloqueio COX-1 induzido pelo tratamento com ácido acetilsalicílico (ASA) sobre a atividade funcional de macrófagos humanos infectados por *Trypanosoma cruzi* (cepa Y).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Diferenciar células THP-1 (ATCC TIB-202 - monócitos humanos) em macrófagos utilizando “Phorbol 12-myristate 13-acetate” (PMA).
- b. Caracterizar o fenótipo dos macrófagos obtidos da diferenciação de células THP-1 (THP-1/MØ) por citometria de fluxo;
- c. Investigar o efeito do tratamento de THP-1/MØ com aspirina (ASA), BOC-2 e 15-epi-lipoxina A4 sobre a viabilidade celular e a capacidade de invasão do protozoário *Trypanosoma cruzi*;
- d. Avaliar a liberação de formas tripomastigotas em THP-1/MØ tratados com ASA, BOC-2 e 15-epi-Lipoxina A4 e infectados por *Trypanosoma cruzi*;
- e. Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em cultura de THP-1/MØ, tratados com Asa, BOC-2 e 15-epi-lipoxina A4.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTURA DE CÉLULAS THP-1 E DIFERENCIAÇÃO

A linhagem de células de monócitos humanos THP-1 (ATCC TIB-202) foi mantida em meio RPMI-1640 contendo 2% de penicilina-estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB) à 37°C, 5% CO₂. A morfologia da célula é apresentada na Figura 4. Células THP-1 se mantêm em suspensão; após ativação celular induzido por mitógenos ou agentes inflamatórios, as células se tornam aderentes.

A diferenciação em THP-1/MØ foi realizada segundo protocolo adaptado por Lund e colaboradores (2016). Foram plaqueadas 1×10^5 células THP-1 em placas de cultivo celular de 6 poços, e mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 2% de penicilina-estreptomicina com adição de 5 ng/ml de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich) por 48h. Após o tempo de incubação com PMA, os poços foram lavados 2 vezes com PBS à 37° para remoção do estímulo, e então as células foram deixadas em repouso por mais 48h em RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB sem adição de PMA. Após as 48h de repouso, os THP-1/MØ foram desaderidos com Trypsina (Gibco, 0,25%) e prontos para uso em experimento (Figura 4).

A confirmação fenotípica das células obtidas foi realizada utilizando-se ensaio de citometria de fluxo (BD Accuri C6), com os marcadores celulares CD11b, CD14, HLA-DR, CD206, CD86, CD80 e os controles isotípicos (BD Bioscience) (Figura 5).

Figura 4. Células THP-1 em cultivo. Sem o estímulo de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) as células mantêm formato esférico em suspensão. Após o estímulo com PMA na concentração de 5ng/ml, as células THP-1 começam o processo de adesão. 24h pós estímulo com PMA, 48h pós estímulo com PMA, THP-1/MØ 48h após o período de repouso. Linha tracejada vermelha indica remoção do PMA com PBS. Imagens representativas sem escala.

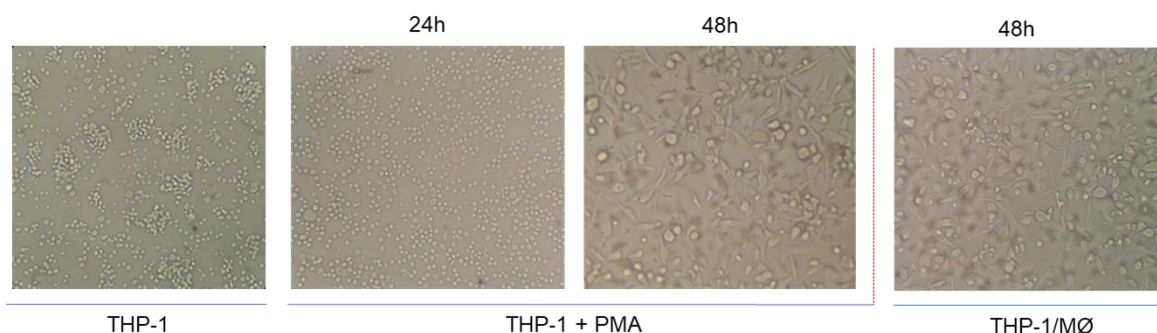
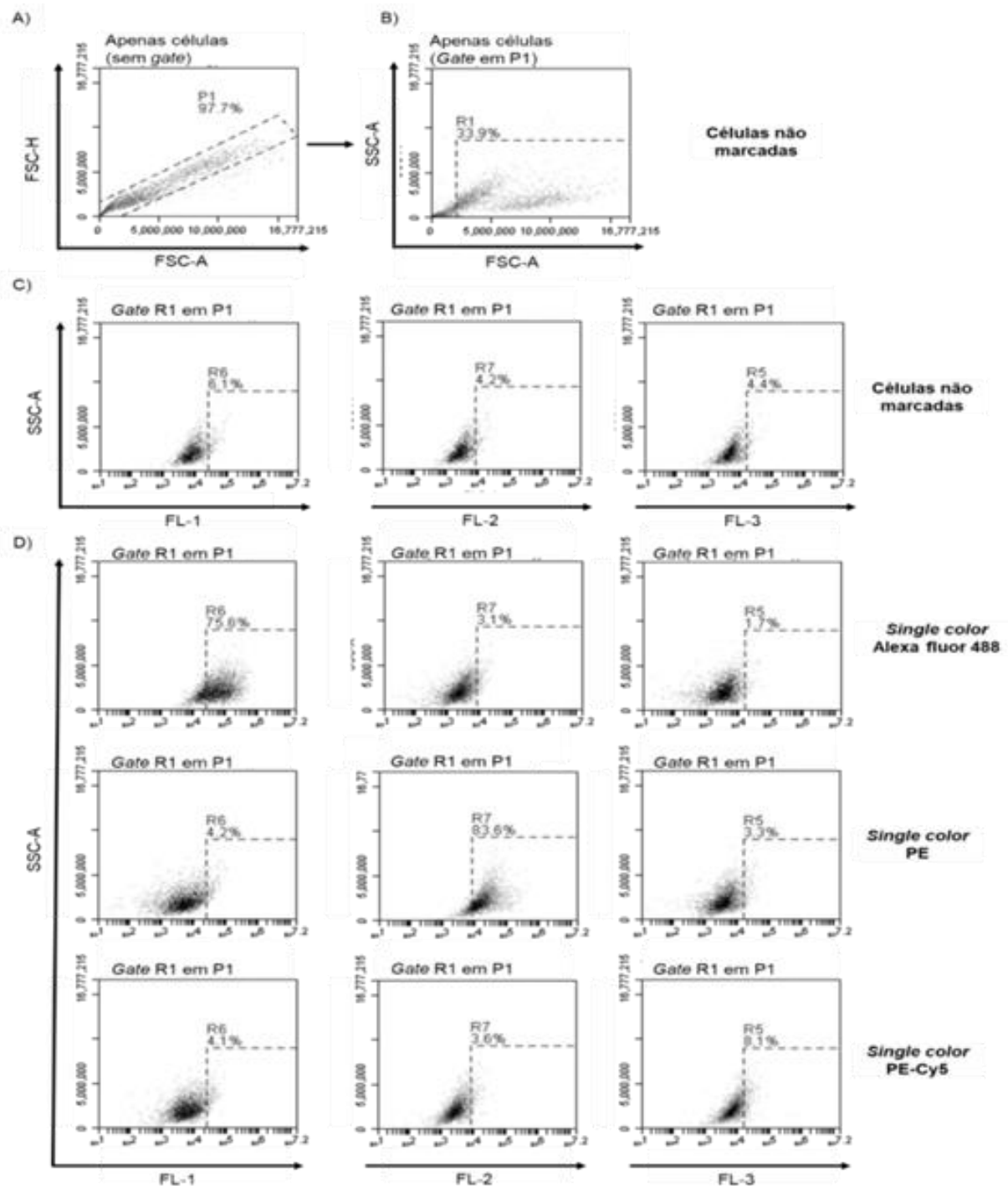


Figura 5. Estratégia de *gate* e de controle de marcação para imunofenotipagem de macrófagos derivados de células THP-1 (THP-1/MØ). THP-1/MØ foram submetidos a marcação de moléculas superfície, seguido da análise por citometria de fluxo para determinação da população, *gate* e compensação do equipamento. (A) Gráfico de tamanho-altura (FSC-H) por tamanho-área (FSC-A) para seleção de células não-agrupadas no *gate* P1. (B) Gráfico de granulosidade (SSC) por tamanho (FSC) no *gate* P1 e seleção da população de interesse (*gate* R1). (C) Marcação de *gate* negativo em células não marcadas (*gate* R2) em gráfico granulosidade (SSC) por fluorescência nos canais FL1, FL2 ou FL3. (D) Controles positivos para marcação única (*single color*) de Alexa Fluor-FL-1, PE-FL-2 e PE-Cy5-FL-3. Realizou-se a leitura de 10 mil eventos em citômetro de fluxo Accuri C6 e análise utilizando o Software C6 BD Accuri.



4.2 OBTENÇÃO DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE CULTURA DE *Trypanosoma cruzi*

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram mantidas *in vivo* através de infecção realizada a cada 10 dias com inoculação de 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas em PBS, por via intraperitoneal em camundongos Swiss. Para a manutenção *in vitro* da cepa Y foram utilizadas células LLC-MK2 (ATCC; American Type Culture Collection, Rockville, MD) infectadas. Células LLC-MK2 foram cultivadas em meio RPMI-1640 completo, contendo 5% de SBF (soro fetal bovino), mantidas a 37°C em estufa com pressão de 5% de CO₂.

Para replicação *in vitro* e consequente liberação de formas tripomastigotas, formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* foram obtidas a partir da coleta de sangue de camundongos Swiss infectados e utilizadas para infectar monocamadas de células LLC-MK2 em garrafa de cultivo de 25 cm². Após 4 horas de interação as células foram lavadas com PBS a 37°C para remoção dos parasitos não internalizados. Decorridos cerca de 10 dias após a infecção das células, as formas tripomastigotas presentes em grande quantidade no sobrenadante do cultivo celular foram utilizadas para infecção de novas culturas de células LLC-MK2, em garrafas de cultivo celular de 75 cm². Para utilização das formas tripomastigotas, o meio de cultura de células LLC-MK2 foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos para retirada dos restos celulares, seguida de nova centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos para recolhimento das formas tripomastigotas de cultura.

4.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE CÉLULAS THP-1 (THP-1/MØ)

Para mensurar a viabilidade celular dos macrófagos diferenciados após o tratamento com os fármacos (ácido acetilsalicílico e 15-epi-lipoxina A4) em todas as concentrações utilizadas experimentalmente foram utilizadas a análise de viabilidade celular pela redução do MTT (Sigma-Aldrich); teste colorimétrico que mensura a atividade de desidrogenases mitocondriais das células vivas. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e adicionado reagente de MTT (0,5 mg/mL) em cada poço e incubado à 37°C por 4 horas. Passado o período de incubação, o sobrenadante foi retirado e então adicionado dimetilsulfóxido (DMSO)

(Sigma-Aldrich). As placas foram lidas em leitor de microplacas (Synergy HT, Biotek) no comprimento de onda de 570nm.

4.4 TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE THP-1 (THP-1/MØ)

Macrófagos diferenciados foram tratados com ácido acetilsalicílico (inibidor preferencial de COX-1, nas concentrações de 0,312 mM, 0,625 mM, 1,25 mM), por 1 hora ou 15-epi-Lipoxina A4 (nas concentrações 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM) por 1 hora. Tratamentos prévios com BOC-2 (bloqueador de FRP1/2), foram feitos por 1 hora na concentração de 100 mM. Tratamentos com PGE₂ purificada após o bloqueio da COX-1 com aspirina ou tratamento com 15-epi-lipoxina A4 foram feitos utilizando a concentração de 1 µM durante 30 minutos. Após o tempo de incubação com os fármacos, todos os poços foram lavados com PBS à 37°C duas vezes, com objetivo de remover os tratamentos utilizados (ácido acetilsalicílico, 15-epi-Lipoxina A4, BOC-2 e PGE₂). Após o tratamento, foi feita a infecção com formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* conforme ensaios à seguir.

4.5 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR

O ensaio de invasão celular foi realizado como descrito por Yoshida e colaboradores (1989). THP-1/MØ foram submetidos ao tratamento com aspirina e 15-epi-lipoxina A4 nas concentrações já discriminadas e infectados com 5:1 parasitos por célula, obedecendo o tempo de infecção de 18 horas a 37°C e 5% CO₂. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS para remoção dos parasitos não internalizados, fixadas com metanol por 5 minutos e coradas com Giemsa. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro e o índice de infecção foi determinado por contagem do número de parasitos intracelulares em um total de 200 células, seguindo a fórmula: (número de células infectadas/número total de células) x (número total de amastigotas/número de células infectadas). A contagem foi realizada em microscópio óptico (Olympus CH30) em um aumento de 1000x

4.6 ENSAIO DE SAÍDA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

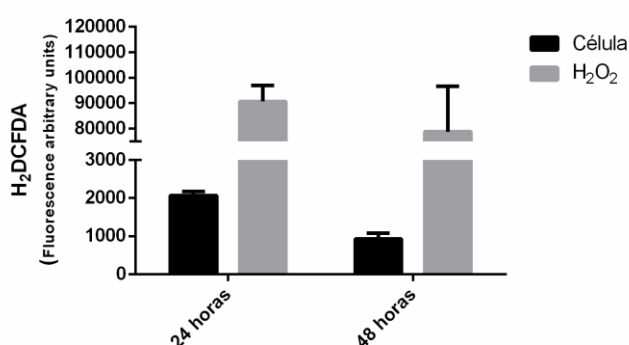
Para avaliar a liberação de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, 1×10^5 THP-1/MØ foram tratados com ASA e 15-epi-lipoxina A4 nas concentrações discriminadas e infectados com 1:10 parasito por célula durante 18 horas em estufa de CO₂ à 37°C e 5% de CO₂. Após o tempo de incubação com o parasito, os poços foram lavados 3 vezes para retirada dos parasitos não internalizados. Durante todos os dias após a infecção, foi feita a troca do meio de cultura e reestabelecido os tratamentos iniciais. Após o 3º dia de infecção iniciou-se a contagem das formas tripomastigotas liberadas pelas células todos os dias até o 7º dia pós infecção. Para isso, o meio de cultura foi retirado, centrifugado durante 5 minutos à 4000 rpm e ressuspendido em 30 µL. A contagem dos parasitos liberados no sobrenadante de cultura foi realizada por contagem em câmara de Neubauer no aumento de 400x em microscópio óptico (Olympus CH30).

4.7 DOSAGEM DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

Para avaliar a geração de EROs em THP-1/MØ e submetidos aos tratamentos com aspirina e 15-epi-lipoxina A4, foi utilizada a sonda permanente 2'7'diclorohidrofluoreceína (H₂DCFDA) (Sigma Aldrich) na concentração de 10 µM por poço com volume final de 200 µL. Para o controle positivo, realizado para controle de técnica, foi utilizado peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 30 minutos (Figura 6).

As EROs foram mensuradas pelo aumento da fluorescência causada pela conversão do fluoróforo não fluorescente para o altamente fluorescente 2'7 diclorofluoreceína, com comprimento de onda de excitação de 488 nm e emissão 530 nm. Após incubação de 30 minutos, foi realizada leitura em 488 nm em leitora de microplacas Victor X3 (PerkinElmer).

Figura 6: Controle da técnica. Comparação da detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em THP-1/MØ sem tratamento (controle negativo, indicando nível basal de EROs) e em THP1-/MØ submetidos à H₂O₂ na concentração de 1/200 (controle positivo).

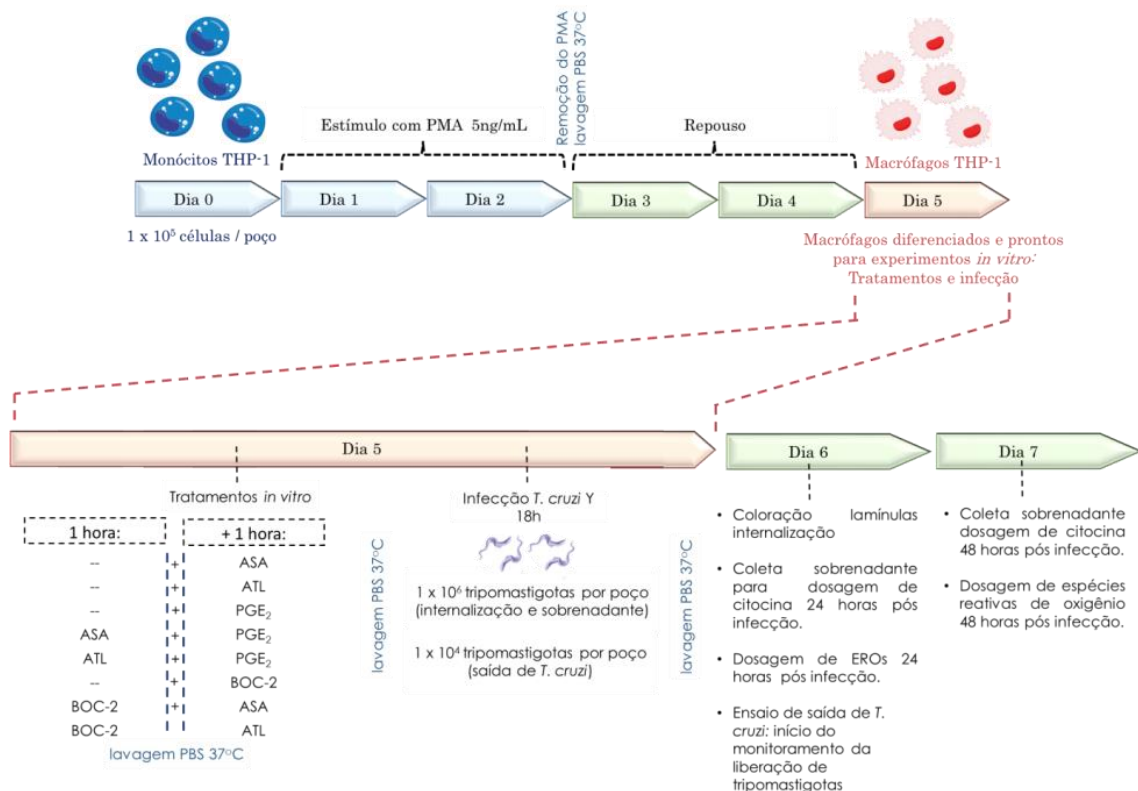


4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico “INSTAT” (GraphPad, San Diego, CA). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças entre os grupos controles e experimentais foram analisadas pela análise de variância ANOVA seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey-Kramer, considerando $p \leq 0,05$ ou test *t*-Student não pareado.

4.9 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 7. Delineamento experimental. (A) Monócitos THP-1 cultivados em meio RPMI-1640 10% foram semeados em placas de cultivo celular na densidade 1×10^5 células por poço e estimulados com PMA (5 ng/ml) por 2 dias. O PMA foi removido e as células foram mantidas por mais 2 dias em meio de cultura RPMI-1640 10%. Após o repouso, no quinto dia, as células estavam diferenciadas em macrófagos (THP-1/MØ) e prontas para a fenotipagem em citometria de fluxo e para experimentos *in vitro*. (B) THP-1/MØ foram tratados com ácido acetilsalicílico (ASA) ou 15-epi-lipoxina A4 (15-epi-LXA4) por 1h, BOC-2 por 1h + ASA ou 15-epi-LXA4 por 1h ou Prostaglandina E₂ (PGE₂) por 30 após o tratamento com ASA ou 15-epi-LXA4. Após a lavagem com PBS as células foram infectadas com tripomastigotas de *T. cruzi* Y por 18h. No dia seguinte, os tripomastigotas não internalizados foram removidos por lavagens dos poços com PBS. Nos ensaios de internalização de parasitos as células foram coradas com Giemsa; nos ensaios de quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) dosagem de citocinas as células foram incubadas por tempo adicional; e nos ensaios de liberação de tripomastigotas os parasitos presentes no sobrenadante foram monitorados diariamente.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

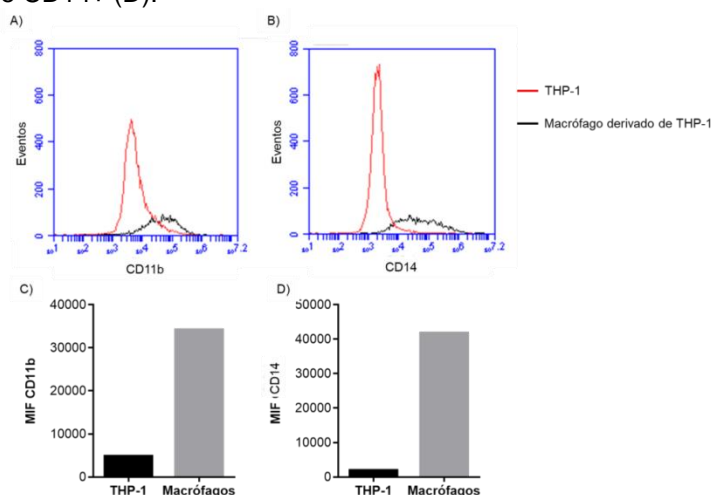
5.1 CONFIRMAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS OBTIDAS E FENOTIPAGEM

Para caracterizar as células obtidas através do estímulo com PMA, as células foram submetidas à marcação utilizando os marcadores CD11b e CD14 (BD Bioscience) e aquisição dos dados em citômetro de fluxo (Accuri C6).

Ambos os marcadores CD11c e CD14 são proteínas de membrana presentes em macrófagos humanos. CD11b é uma proteína de membrana presente em todas as células de origem mielóide e está relacionada com a adesão e migração celular (ARNAOUT, 1990). CD14 é uma proteína de membrana relacionada com o reconhecimento de LPS (lipopolissacarídeo) e um importante marcador de maturação celular (KIELIAN; BLECHA, 1995).

Segundo Chen et al., (2012), o estímulo com PMA em células THP-1, aumenta a quantidade de CD14 e CD11b. Este efeito também foi observado nas nossas células pós-diferenciação (Figura 8).

Figura 8. Caracterização de THP-1/MØ (macrófagos) obtidos através do estímulo com 5ng/mL de PMA. Células THP-1 foram submetidas ao estímulo com 5 ng/mL de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) durante 48 horas, seguidos de 48 horas de repouso em meio RPMI 10% fresco. Após o período de diferenciação, as células foram desaderidas e submetidas a marcação com os marcadores CD11b e CD14 (BD Bioscience). Os gráficos representam a quantidade de células que apresentam CD11b (A) ou CD14 (B), comparando células THP-1 (linha vermelha) e THP-1/MØ após o estímulo com PMA (linha preta). Mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de células THP-1 e de THP-1/MØ em células CD11b+ (C) e CD14+ (D).



A partir da obtenção da identidade fenotípica dos macrófagos diferenciados de células THP-1 (THP-1/MØ), foi realizada a caracterização das células utilizadas em nossos experimentos.

Durante as fases iniciais da infecção por *T. cruzi*, o parasito induz uma intensa resposta inflamatória, estando envolvidas diversas citocinas pró-inflamatórias no controle parasitário (BASSO, 2013). Esta fase inicial estimula macrófagos a serem ativados de forma clássica (padrão M1). Estas células apresentam importante atividade tripanocida, atuando no controle do parasito na fase aguda da infecção (ZANLUQUI; WOWK; PINGE-FILHO, 2015).

Macrófagos polarizados para uma resposta M2 estão relacionados com funções imunorregulatórias como aumento da atividade fagocítica, remodelamento da matriz extracelular, angiogênese e cicatrização (MARTINEZ et al., 2008). Por outro lado, macrófagos que possuem perfil M1 exibem altos níveis de MHC-II e moléculas coestimulatórias tais como CD80 e CD40 (BOEHM et al., 1997), por outro lado, macrófagos ativados alternativamente (perfil M2) possuem uma menor expressão de CD14, MHC-II e presença de receptores de manose, tais como CD163 e CD206 (MANTOVANI et al., 2002).

Desta forma, avaliamos de forma qualitativa e quantitativa os marcadores de ativação celular CD14, CD40, CD86, HLA-DR, CD16 e CD206 em THP-1/MØ positivas para CD11b, tratadas com ASA e submetidas ou não à infecção.

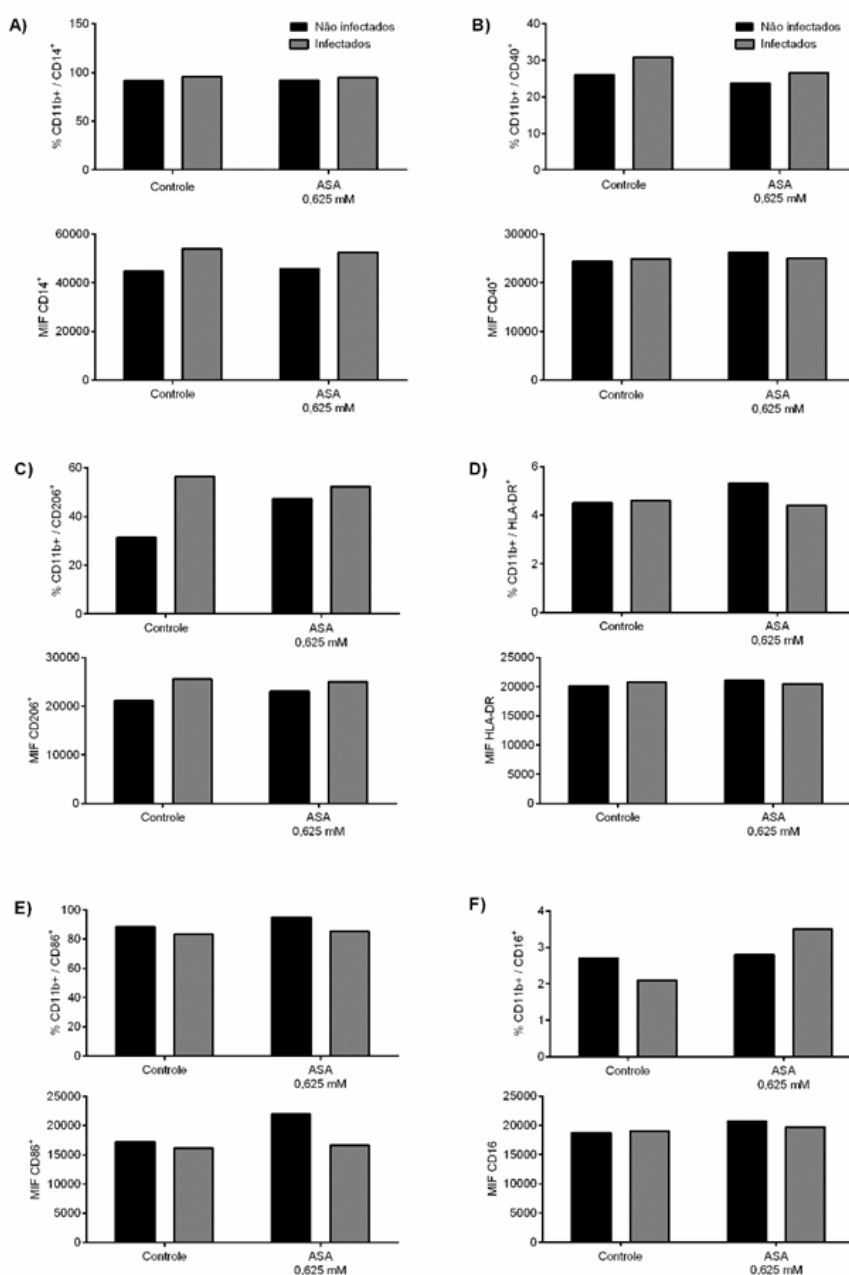
Analizando a porcentagem de células duplo positivas para os marcadores CD11b⁺/CD14⁺ (Figura 9A), CD11b⁺/CD40⁺ (Figura 9B), CD11b⁺/HLA-DR⁺ (Figura 9D), não foi observado aumento na presença e na expressão (quantificado pelo MIF, mediana da intensidade de fluorescência) destes marcadores na superfície de células tratadas com 0,625 mM de aspirina e/ou infectadas por *T. cruzi* quando comparado com os respectivos controles.

Entretanto, foi observado aumento na porcentagem de células positivas para o marcador CD206 em células infectadas (Figura 9C) quando comparadas com células não infectadas. Este aumento não foi observado em células tratadas com ASA e/ou infectadas. Apesar da infecção por si só ter aumentado o número de células duplo positivas para CD11b⁺/CD206⁺, este aumento não foi acompanhado da elevação da expressão (MIF) de CD206 nas células infectadas.

Apesar de ser uma proteína de membrana relacionada com a identidade fenotípica de macrófagos M2, CD206 pode estar presente em macrófagos infectados por *T. cruzi*, desta forma, relacionado com o controle da resposta

inflamatória na fase aguda e desenvolvimento da fase crônica (ZANLUQUI; WOWK; PINGE-FILHO, 2015).

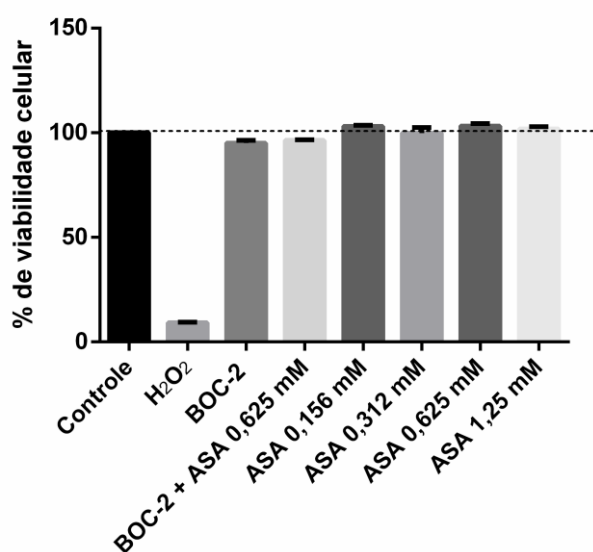
Figura 9: Marcação de moléculas de superfície em THP-1/MØ. THP-1/MØ obtidos a partir da diferenciação de células THP-1 foram tratados *in vitro* com ácido acetilsalicílico 0,625 mM (ASA 0,625 mM) por 1h. Em seguida as células foram infectadas com tripomastigotas de *T. cruzi* Y por 18h. Grupos não infectados foram mantidos em meio de cultura RPMI-1640. Após a remoção dos parasitos não internalizados os macrófagos foram desadheridos da placa de cultivo celular e submetidos a marcação de moléculas superfície e análise por citometria de fluxo. Foram analisadas moléculas de superfície de ativação celular em THP-1/MØ CD11b+, confirmando a identificação fenotípica dessas células como macrófagos. Gráficos de porcentagem (%) indicam células positivas para a molécula analisada e gráficos de Mediana de Intensidade de Fluorescência (MIF) indicam a quantidade que a molécula analisada encontra-se expressa na superfície de THP-1/MØ. (A) THP-1/MØ CD11b+/CD14+; (B) THP-1/MØ CD11b+/CD40+; (C) THP-1/MØ CD11b+/CD206+; (D) THP-1/MØ CD11b+/HLA-DR; (E) THP-1/MØ CD11b+/CD86+; (F) THP-1/MØ CD11b+/CD16+. Realizou-se a leitura de 3 mil eventos em citômetro de fluxo Accuri C6 e análise no Software C6 BD Accuri.



5.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DO TRATAMENTO COM ASPIRINA

A avaliação da citotoxicidade em relação à concentração do fármaco utilizado, foi realizado através da redução do MTT em cultura celular. Para todas as concentrações utilizadas de ASA, não houve diferença estatística na viabilidade celular das células tratadas quando comparado ao grupo controle (Figura 10).

Figura 10. Ensaio de viabilidade celular por MTT (Sigma Aldrich) de células THP-1/MØ. Tratamentos com aspirina (ASA); BOC-2 na concentração de 100 µM; meio de cultura (controle positivo, representando 100% de viabilidade celular) e H₂O₂ como controle negativo. Tratamentos foram realizados por 1 hora em estufa de CO₂ 5% à 37° C. A viabilidade das células foi determinada pela medida da atividade metabólica utilizando-se o método de redução do MTT.



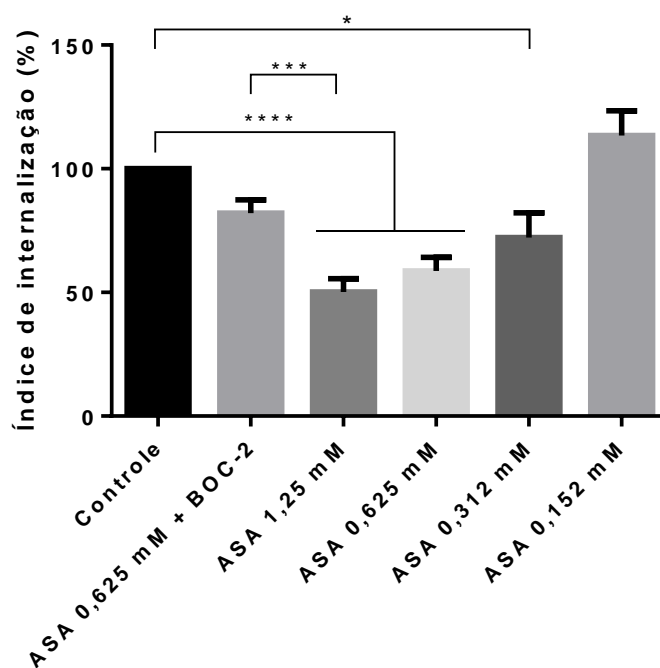
5.3 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR DE THP-1/MØ TRATADOS COM ASPIRINA

O tratamento de THP-1/MØ com ASA, inibidor preferencial de COX-1 reduziu o índice de internalização de *T. cruzi* em cerca de 50% nas concentrações de 1,25 mM e 0,625 mM, e cerca de 30% na concentração de 0,312 mM (Figura 11). A redução no índice de internalização de *T. cruzi in vitro* também foi verificada Carvalho de Freitas e colaboradores (2017) e Malvezi e colaboradores (2014b), em monócitos humanos *in vitro* e macrófagos murinos, respectivamente, após o tratamento com ASA.

Já foi observado por Moraes e colaboradores (2015), que em células H9c2 (cardiomiócitos de rato) o parasito foi capaz de modular a expressão de COX-2, controlando a produção de PGE₂ nas primeiras 48 horas pós-infecção. Este controle

pode estar relacionado com o estabelecimento de condições que contribuam para a sobrevivência e replicação de *T. cruzi*, que são importantes no estabelecimento da infecção nas primeiras horas entre parasito-célula (MORAES; DINIZ; BAHIA, 2015). Além disso, outros estudos mostraram que a atividade da COX-2 e a síntese de PGE₂ têm destaque no desenvolvimento da doença em modelo murino e em células humanas (GUERRERO et al., 2015; LONIEN et al., 2017).

Figura 11. Efeito do tratamento com Aspirina (ASA) em THP-1/MØ. Células foram tratadas previamente com Asa por 1 hora e infectados com 5:1 *Trypanosoma cruzi* por célula durante 18 horas. O número de células infectadas foi mensurado através de contagem em microscópio óptico na objetiva de 100x. Resultados expressos são a porcentagem de células infectadas em 200 células contadas; seguindo a fórmula (número de células infectadas/número total de células) x (número total de amastigotas/número de células infectadas). **** (p≤0,0001), *** (p≤0,001), * (p≤0,05).



Em adição, diversos mediadores lipídicos são produzidos durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* e o próprio parasito se utiliza de prostanoídeos tais como TXA₄, PGF₂α, PGE₂, a fim de modular o micro ambiente a seu favor (ASHTON et al., 2007; KUBATA et al., 2002; PINGE-FILHO; TADOKORO; ABRAHAMSOHN, 1999).

Neste contexto, a acetilação de COX-1 pela aspirina inibe irreversivelmente sua ação sob o ácido araquidônico, impedindo a formação de mediadores lipídicos tais como a PGE₂ (SHIMOKAWA; SMITH, 1992).

Adicionalmente, a acetilação de COX-2 pela aspirina altera seu sítio de peroxidação e promove a produção de 15(R)-HETE, que está relacionado com a produção de lipoxinas induzidas pelo uso da aspirina (ATL, do inglês “*aspirin triggered lipoxins*”) (SERHAN, 1997; SERHAN, 2005).

Desta forma, produtos da enzima COX parecem ter influência na invasão de *T. cruzi*, pois o bloqueio de COX com ASA está relacionado com a diminuição da invasão celular.

Nossos resultados mostram que o bloqueio do receptor FPR1 e 2 (receptores de lipoxina) com o uso de BOC-2, restaurou os níveis de invasão parasitária para próximo do controle, indicando que possa haver participação de ATL no fenômeno observado.

Sendo assim, a possível diminuição da produção de prostanóides como a PGE₂, somada à produção de ATL em THP-1/MØ tratados com ASA, pode estar relacionado com o evento de diminuição na invasão celular observado em nossos experimentos.

5.4 ENSAIO DE SAÍDA DE *Trypanosoma cruzi*

O ensaio de saída de *T. cruzi*, visa avaliar o potencial microbicida das células submetidas aos tratamentos à posterior infecção. Após o 3º dia de infecção foi observado o início da liberação de formas tripomastigotas de *T. cruzi* no sobrenadante das culturas, tendo início as contagens (dado não mostrado).

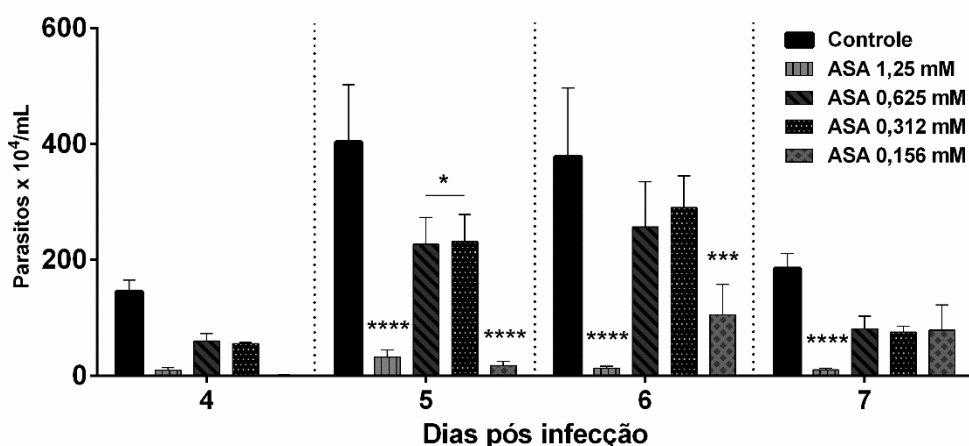
Os resultados obtidos mostram que o tratamento diário de ASA foi eficaz na diminuição da liberação de formas tripomastigotas. O tratamento com ASA nas concentrações 1,25 mM no 5º dia, 6º dia, 7º dia pós infecção diminuiu significativamente a liberação de formas tripomastigotas comparado ao controle ($p < 0,0001$); aspirina 0,625 mM e 0,132 mM no 5º dia pós infecção também foram capazes de diminuir a liberação de formas tripomastigotas ($p < 0,001$); por fim, o tratamento com 0,156 mM de aspirina no 5º dia pós infecção ($p \leq 0,0001$), 6º dia pós infecção ($p \leq 0,001$) e 7º dia pós infecção ($p \leq 0,0001$) também mostrou potencial em diminuir a liberação de *T. cruzi* (Figura 12).

Nossos resultados vão de encontro com dados mostrados por (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2010) e (MALVEZI et al., 2014b), nos quais o tratamento

com ASA foi eficaz em diminuir o número de parasitos liberados em macrófagos murinos tratados e infectados com *T. cruzi*.

Muitos estudos sugerem o envolvimento das prostaglandinas nas fases iniciais da infecção por *T. cruzi* como responsáveis por desencadear eventos de imunossupressão e controle dos parasitos, garantindo ingresso da fase aguda para a crônica (STERIN-BORDA et al., 1996; PINGE-FILHO; TADOKORO; ABRAHAMSOHN, 1999).

Figura 12. Efeito do tratamento com aspirina (ASA) na liberação de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* de THP-1/MØ infectados. Representação em gráfico de barras por dia de contagem dos parasitos liberados de THP-1/MØ submetidos ao tratamento prévio com ASA nas concentrações de 0,156 mM, 0,312 mM, 0,625 mM e 1,25 mM. Grupo controle foi mantido apenas com meio RPMI-1640.. A contagem dos parasitos foi realizada diariamente até o 7º dia pós infecção. **** ($p \leq 0,0001$), *** ($p \leq 0,001$), ** ($p \leq 0,01$), * ($p \leq 0,05$).



Além disso, a PGE_2 secretada por macrófagos pode atuar de maneira autócrina, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como o $TNF-\alpha$ e aumento de IL-10 (SHINOMIYA et al., 2000). Altas concentrações de $TNF-\alpha$ são produzidas na fase aguda da DC em fagócitos como os macrófagos deflagrados principalmente por estímulos gerados por $INF-\gamma$. (COSTA et al., 2006).

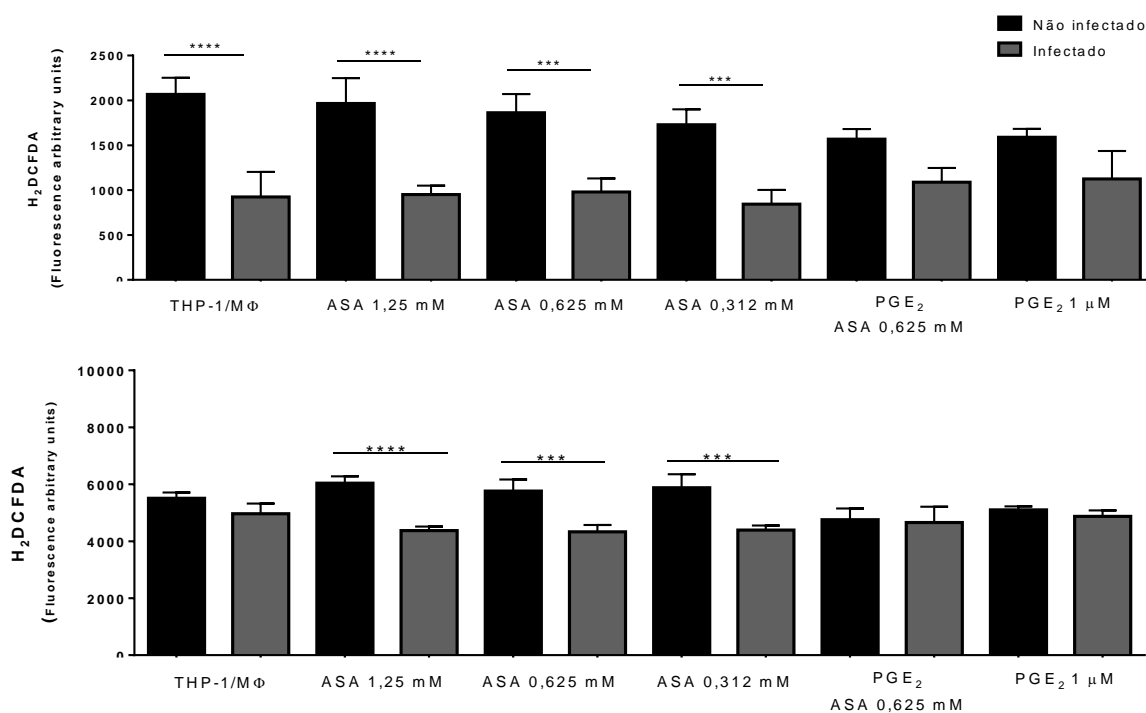
Estando o aumento de $TNF-\alpha$ relacionado com a ativação da produção de mediadores tripanocidas em células fagocíticas como os macrófagos, seu "turn-over" desencadeado pela PGE_2 pode estar relacionado com a diminuição do potencial microbicida destas células. Em concordância com os resultados obtidos sobre o efeito da ASA na invasão de THP1-/MØ por *T. cruzi*, a possível diminuição da produção de PGE_2 via bloqueio de COX-1 com aspirina em nosso modelo experimental, pode ser uma das formas de atuação da diminuição da invasão e liberação de *T. cruzi*.

5.5 ENSAIO DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

O controle da infecção é dependente da ativação dos macrófagos levando a morte do parasito. Portanto, a produção de moléculas microbicidas, tais como as EROs são importantes para o controle dos parasitos intracelulares (ABRAHAMSOHN, 1998; BASSO, 2013).

A produção de EROs total foi mensurada através do uso da sonda H_2DCFDA (Sigma Aldrich). O tratamento com ASA não alterou os níveis de EROs produzidos quando comparados com o grupo controle. Entretanto, a infecção por si só diminuiu a produção de EROs comparando os grupos infectado e não infectado (Figura 13).

Figura 13. Dosagem de espécies reativas de oxigênio (EROs) de células tratadas com Aspirina (ASA) 0,625 mM e PGE_2 1 μM ou PGE_2 1 μM e infectadas com 5:1 formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* durante 18 horas. Dosagem feita com 24 horas pós infecção (A) e 48 horas pós infecção (B). **** ($p < 0,0001$), *** ($p \leq 0,001$).



Durante a infecção por *T. cruzi*, os macrófagos produzem grandes quantidades de EROs em um processo chamado “burst” respiratório. Vários trabalhos têm demonstrado que a produção de EROs em macrófagos possui um viés contraditório: ao mesmo tempo em que o estresse oxidativo é necessário para o controle parasitário (ALVAREZ et al., 2011), o parasito também se utiliza da

maquinaria oxidativa para persistência e replicação intracelular (ANDREWS, 2012; FINZI et al., 2003).

Em adição, o parasito possui mecanismos de evadir e neutralizar potenciais espécies microbicidas através de enzimas antioxidantes como as peroxirredoxinas (peroxidases) (PIACENZA et al., 2008; KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008). Enzimas tais como a triparedoxina peroxidase (TcCPX) e a triparedoxina mitocondrial (TcMPX) possuem capacidade de neutralizar moléculas tais como peroxinitrito, EROs e hidroperóxidos de cadeia curta. (PIACENZA et al., 2008).

A menor produção de EROs em células infectadas pode estar relacionada com a atividade de mecanismos detoxificadores de EROs produzidos pelas células fagocíticas.

5.6 FENOTIPAGEM DE THP-1/MØ TRATADAS COM 15-EPI-LIPOXINA A4 E INFECTADAS POR TRYPANOSOMA CRUZI

Dados os efeitos observados em células tratadas com diferentes concentrações de ASA nos ensaios de invasão celular e liberação de formas tripomastigotas de *T. cruzi* e, reversão do padrão de diminuição da invasão celular em células submetidas ao bloqueio dos receptores FRP1 e 2 por meio de BOC-2, resolvemos investigar o papel da 15-epi-Lipoxina A4 (15-epi-LXA4) nos eventos observados.

THP-1/MØ foram obtidos da mesma forma e submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de 15-epi-LXA4 e/ou infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

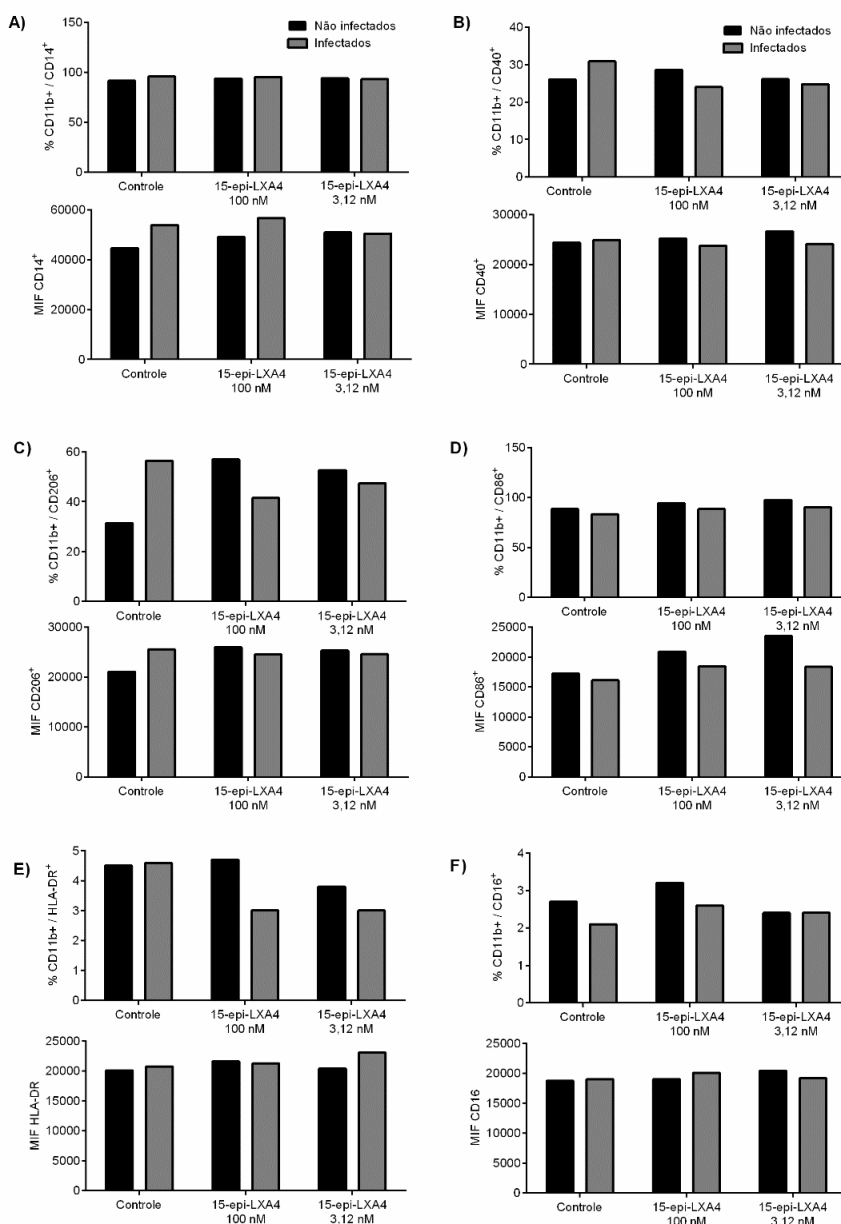
Com o objetivo de caracterizar fenotipicamente THP-1/MØ tratados e infectados, avaliamos os marcadores de ativação celular CD14, CD40, CD86, HLA-DR, CD16 e CD206 em THP-1/MØ positivas para CD11b.

Analisando a porcentagem de células duplo positivas para os marcadores CD11b⁺/CD14⁺ (Figura 14A), CD11b⁺/CD40⁺ (Figura 14B), CD11b⁺/CD86⁺ (Figura 14D) e CD11b⁺/CD16⁺ (Figura 14F), não houve alteração entre tratamento com 15-epi-LXA4 nas concentrações de 100 nM e 3,12 nM, de grupos infectados ou não quando comparados com o controle.

Apesar de células duplo positivas para CD11b⁺/CD86⁺ (Figura 14D) não apresentarem diferença na porcentagem de células que possuem a dupla

marcação, o tratamento com 3,12 nM de 15-epi-LXA4 aumentou a expressão (MIF) quando comparado com as células tratadas e infectadas.

Figura 14: Marcação de moléculas de superfície em THP-1/MØ. THP-1/MØ foram tratados *in vitro* com 15-epi-Lipoxina A4 (15-epi-LXA4) por 1h. Em seguida as células foram infectadas com tripomastigotas de *T. cruzi* Y por 18h. Grupos não infectados foram mantidos em meio de cultura RPMI-1640. Após a remoção dos parasitos não internalizados, THP-1/MØ foram desaderidos da placa de cultivo celular e submetidos a marcação de moléculas superfície e análise por citometria de fluxo. Foram analisadas moléculas de superfície de ativação celular em THP-1/MØ CD11b+, confirmando a identificação fenotípica dessas células como macrófagos. Gráficos de porcentagem (%) indicam células positivas para a molécula analisada e gráficos de Mediana de Intensidade de Fluorescência (MIF) indicam a quantidade que a molécula analisada encontra-se expressa na superfície do macrófago. (A) THP-1/MØ CD11b+/CD14+; (B) THP-1/MØ CD11b+/CD40+; (C) THP-1/MØ CD11b+/CD206+; (D) THP-1/MØ CD11b+/HLA-DR; (E) THP-1/MØ CD11b+/CD86+; (F) THP-1/MØ CD11b+/CD16+. Realizou-se a leitura de 3 mil eventos em citômetro de fluxo Accuri C6 e análise no Software C6 BD Accuri.



Avaliando dupla positividade para CD11b⁺/CD206⁺, assim como THP-1/MØ apenas a infectado sem tratamento algum, apresentou aumento da porcentagem de células duplo positivas, o tratamento com 15-epi-LXA4 nas concentrações 100 nM e 3,12 nM por si só também induziram o aumento de células CD206⁺ quando comparado com o controle sem tratamento (Figura 14C).

Em uma relação inversa, a infecção de células tratadas com 100 nM de 15-epi-LXA4 diminuiu o número de células positivas para CD11b⁺/CD206⁺ quando comparado com a célula apenas tratada. Apesar de haver alterações quanto a porcentagem de células duplo positivas para ambos os marcadores, a expressão (MFI) de CD206⁺ não apresentou diferença entre grupos (Figura 14C).

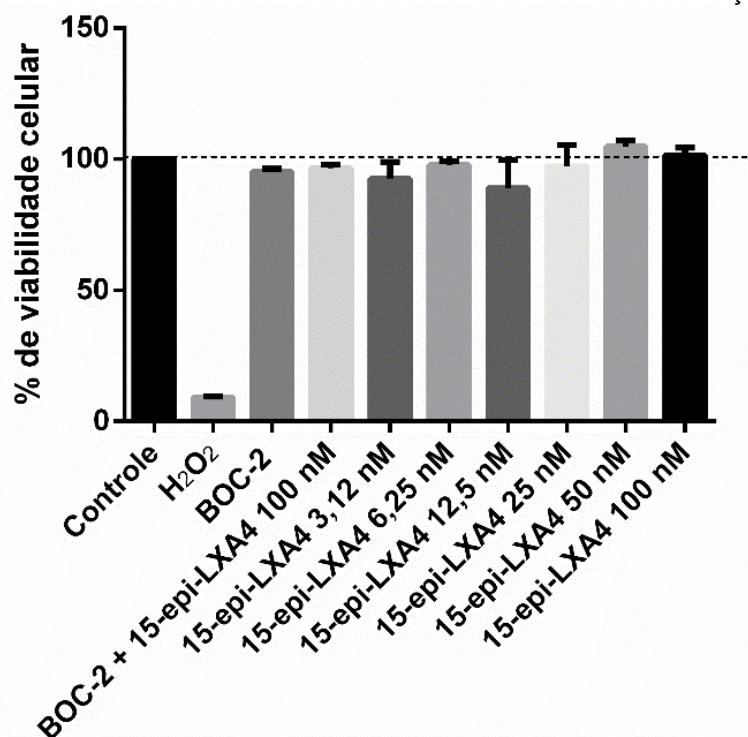
Com relação ao HLA-DR (Figura 13E), ambos os tratamentos com 15-epi-LXA4 após serem submetidos à infecção, apresentaram redução na porcentagem de células duplo positivas para CD11b⁺/HLA-DR quando comparado com o controle apenas infectado. Observando o MIF, não houve alterações na expressão de HLA-DR.

Já foi mostrado que a infecção com diferentes cepas de *T. cruzi* possuem a capacidade de diminuir a apresentação de antígenos em células apresentadoras de antígeno, por meio da redução da expressão de HLA-DR e moléculas coestimulatórias como CD40 (SOTO et al., 2003; OVERTVELT et al., 1999) em um mecanismo de evasão do sistema imunológico.

5.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DE THP-1/MØ TRATADOS COM 15-EPI-LIPOXINAA4

A avaliação da citotoxicidade de 15-epi-LXA4 em THP-1/MØ foi realizado através do método de MTT. Para testar a diferença entre concentrações, foi utilizadas diluições partindo da concentração máxima de 100 nM. Para todas as concentrações utilizadas de 15-epi-LXA4, não houve diferença estatística na viabilidade celular das células tratadas quando comparado ao grupo controle (Figura 15).

Figura 15. Ensaio de viabilidade celular de THP-1/MØ tratados com 15-epi-Lipoxina A4 (15-epi-LXA4) e BOC-2. Tratamentos com 15-epi-LXA4; BOC-2 na concentração de 100 µM; meio de cultura (controle positivo, representando 100% de viabilidade celular) e H₂O₂ como controle negativo. Tratamentos foram realizados por 1 hora em estufa de CO₂ 5% à 37° C. A viabilidade das células foi determinada pela medida da atividade metabólica utilizando-se o método de redução do MTT.



5.8 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR DE THP-1/MØ TRATADOS COM 15-EPI-LXA4

Como já demonstrado em nossos ensaios, o tratamento de THP-1/MØ com ASA teve capacidade de diminuir a entrada de *T. cruzi* em células infectadas. Com a reversão deste efeito pelo bloqueio de receptores de lipoxina (FRP1 e 2) gerado pelo tratamento com BOC-2, decidimos investigar o papel de uma das lipoxinas deflagradas pelo uso da aspirina (ATL) no processo de invasão por *T. cruzi*. Para o uso em nossos experimentos foi utilizada a ATL 15-epi-Lipoxina A4 (15-epi-LXA4).

Os efeitos da ASA na invasão por *T. cruzi* têm sido associados em parte com a produção de lipoxina deflagrada pelo uso da ATL (MOLINA-BERRÍOS et al., 2013). Molina-Berríos e colaboradores (2013), apresentaram que em camundongos tratados com baixas doses de aspirina possuem ATL detectável em concentrações significativas no plasma sanguíneo e que ambos os fatores (inibição de PGE₂ e produção de ATL), poderiam estar relacionados com a diminuição da mortalidade e de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de animais infectados.

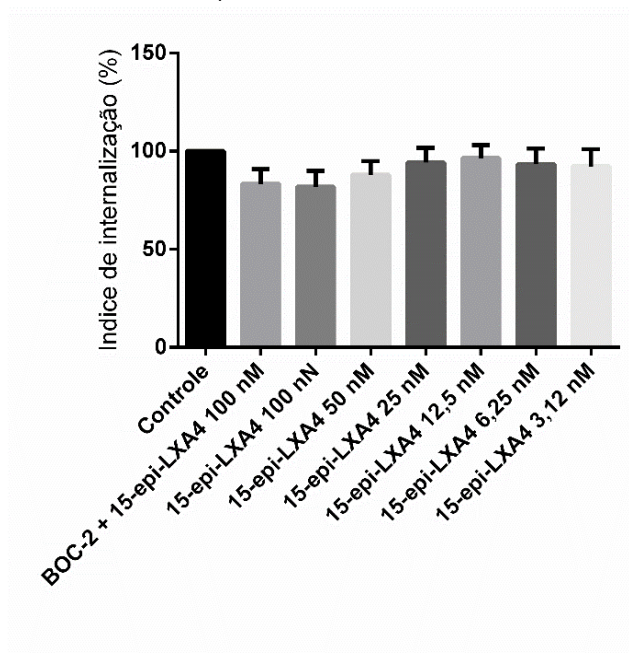
Em resposta a estímulos infecciosos ou inflamatórios, um dos mediadores liberados para regular a resposta imunológica são as lipoxinas, que representam moléculas pró-resolução, abundantemente secretada por neutrófilos e macrófagos (FIERRO; SERHAN, 2001).

Entretanto, o tratamento com diferentes doses de ATL (100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM e 3,12 nM) não apresentaram diferenças estatísticas avaliando a invasão celular quando comparados ao grupo controle (Figura 16).

Estudos anteriores mostraram que as lipoxinas estimulam a fagocitose em macrófagos *in vivo* e *in vitro* através de mecanismos envolvendo proteína quinase C (PKC) e fosfoinositol 3 quinase (PI-3 quinase) (GODSON et al., 2000). Além disso, induzem a polarização celular e a formação de filamentos de actina, auxiliando no processo de fagocitose (MADERNA et al., 2002).

Em células fagocíticas profissionais como os macrófagos, a invasão de formas tripomastigotas de *T. cruzi* é dependente da ativação de proteína tirosina quinase, seguida do recrutamento de PI-3 quinase e de filamentos de actina (VIEIRA; DE CARVALHO; DE SOUZA, 1994), desta forma o tratamento com 15-epi-LXA4 poderia estar aumentando a invasão parasitária em THP-1/MØ.

Figura 16. Efeito do tratamento com 15-epi-LXA4 em THP-1/MØ. Células foram tratadas previamente com ASA por 1 hora e infectados com 5:1 *Trypanosoma cruzi* por célula durante 18 horas. O número de células infectadas foi mensurado através de contagem em microscópio óptico na objetiva de 100x. Resultados expressos são a porcentagem de células infectadas em 200 células contadas; seguindo a fórmula (número de células infectadas/número total de células) x (número total de amastigotas/número de células infectadas)



Em adição, foi observado que o tratamento com LXA4 induz mobilização de Ca^{2+} intracelular (ROMANO; MADDOX; SERHAN, 1996). O aumento do Ca^{2+} intracelular é crucial para o estabelecimento da infecção, pois está relacionado com eventos importantes como a adesão, invasão e formação do vacúolo parasitóforo. O bloqueio de vias relacionadas com a liberação e aumento do Ca^{2+} citosólico, prejudica o processo de invasão e está relacionada com a diminuição da entrada de *T. cruzi* na célula hospedeira (DOCAMPO, ROBERTO; MORENO, SILVIA N.J.; VERCESI, 1993.; TARDIEUX et al., 1992.; MARTINS et al., 2011).

5.9 ENSAIO DE SAÍDA DE *Trypanosoma cruzi*

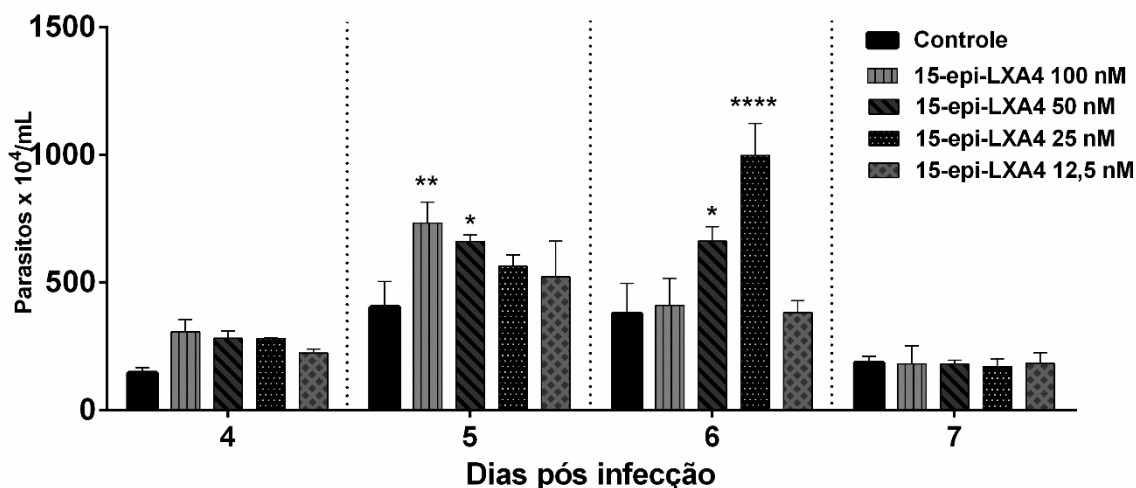
Com o intuito de avaliar o potencial microbicida de THP-1/MØ submetidos aos tratamentos à posterior infecção foi realizado o ensaio de saída de *T. cruzi*. Após o 3º dia de infecção foi observado o início da liberação de formas tripomastigotas de *T. cruzi* no sobrenadante das culturas, tendo início as contagens (dado não mostrado) todos os dias, até o 7º dia pós infecção.

Como já demonstrado em estudos anteriores, o tratamento com a aspirina possui capacidade de diminuir a liberação de formas tripomastigotas (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2010; MALVEZI et al., 2014b).

Por outro lado, o tratamento apenas com 15-epi-LXA4 não foi capaz de diminuir a liberação das formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Figura 17). Potencializando a saída de *T. cruzi* no 5º dia em THP-1/MØ tratados com 100 nM e 50 nM de 15-epi-LXA4 e no 6º dia pós infecção em THP-1/MØ tratados com 50 nM e 25 nM.

Este efeito pode estar relacionado com a indução de uma resposta pró-resolutiva pelo tratamento com 15-epi-Lipoxina A4 (ROMANO et al., 2015). O estímulo com lipoxina gera sinalização e ativação de proteína SOCS (do inglês “*suppressor of cytokine signaling*”), reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como $\text{IFN-}\gamma$ (MACHADO et al., 2006).

Figura 17. Efeito do tratamento com 15-epi-LXA4 na liberação de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* em THP-1/MØ infectados. Representação em gráfico de barras por dia de contagem dos parasitos liberados de THP-1/MØ submetidos ao tratamento prévio com 15-epi-LXA4 nas concentrações de 12,5 mM, 25 mM, 50 mM e 100 mM. Grupo controle foi mantido apenas com meio RPMI-1640. A contagem dos parasitos foi realizada diariamente até o 7º dia pós infecção. A contagem dos parasitos foi realizada diariamente até o 7º dia pós infecção. **** ($p \leq 0,0001$), ** ($p \leq 0,01$), * ($p \leq 0,05$).



Em adição, lipoxinas inibem a formação de ERNs (espécies reativas do nitrogênio) como ONOO^- e diminuição do $\text{NF}\kappa\text{B}$ (fator nuclear κB) e de proteína ativadora-1 (AP-1) no núcleo, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias importantes para deflagrar uma resposta pró-inflamatória eficiente (JÓZSEF et al., 2002) direcionando a resposta celular para um padrão resolutivo.

A resposta celular de padrão Th1 resulta em morte eficiente de formas amastigotas intracelulares, em contrapartida, citocinas do padrão Th2 como $\text{TGF-}\beta$ e IL-10 inibem a ação tripanocida de macrófagos ativados (ABRAHAMSOHN, 1998).

Sendo assim, o aumento da liberação de formas tripomastigotas em THP-1/MØ tratadas pode estar relacionado com seus efeitos anti-inflamatórios, polarizando a célula para um padrão de resposta resolutivo.

5.10 ENSAIO DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

Com o objetivo de verificar a produção de moléculas microbicidas em THP-1/MØ tratados com 15-epi-LXA4 foi realizado a dosagem de espécies reativas de oxigênio.

Assim como o tratamento com ASA, o tratamento com 15-epi-LXA4 não alterou os níveis de EROs produzidos quando comparados com o grupo controle.

Avaliando a produção de EROs 24 horas pós infecção, o tratamento com 15-epi-LXA4 na concentração de 3,12 nM induziu aumento na produção de EROs em células infectadas (Figura 18A), entretanto, avaliando o mesmo grupo 48 horas pós infecção, apenas o tratamento apresentou aumento na produção de EROs, ficando os grupos infectados em níveis similares ao controle independente da dosagem de 15-epi-LXA4 ministrada (Figura 18B).

Assim como discutido anteriormente, os mecanismos antioxidantes que o parasito possui, somado ao tratamento com lipoxinas, resulta na inibição da produção de ERNs e de uma resposta inflamatória intensa, já que a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-8 e TNF- α se tornam reduzidas (ARIEL et al., 2003; JÓZSEF et al., 2002).

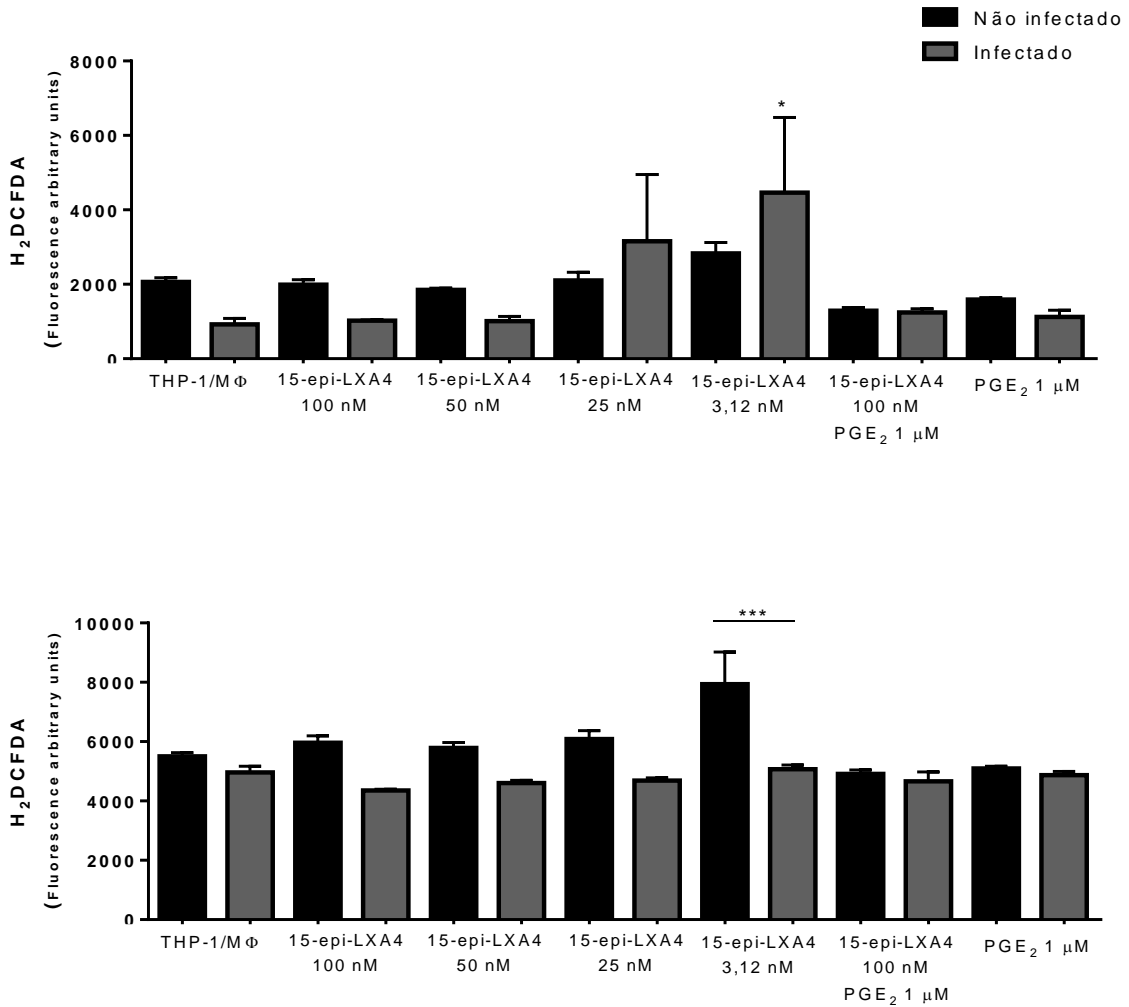
A transcrição de genes que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias também pode ser regulada pela 15-epi-LXA4. Foi demonstrado que o gene EGR1 (do inglês “early growth response gene 1”), está relacionado com a produção de IL-2 e TNF- α e é inibido pela lipoxina através da ativação do repressor NAB1 (do inglês “*NGFI binding protein 1*”) em neutrófilos humanos (QIU et al., 2001).

Somado a estes efeitos, já foi demonstrado que LXs exercem importante papel regulando processos inflamatórios através da ativação de Nrf2 (do inglês “*nuclear factor like-2*”), que está relacionado com a expressão e regulação de genes responsáveis pela produção de enzimas antioxidantes (WU et al., 2015; ZONGDUO et al., 2016)

Além disso, as LX são potentes anti-inflamatórios, e podem causar efeitos biológicos em concentrações muito baixas, além de possuírem capacidade de promover a infiltração de células fagocíticas para o sítio inflamatório de maneira não flogística, induzindo a restauração tecidual e retorno da homeostase sem produção de EROs (JÓZSEF et al., 2002).

Em conjunto com o resultado de saída de *T. cruzi*, a reduzida produção de EROs observada em nossos ensaios pode estar relacionada com o aumento da liberação de formas tripomastiotas de *T. cruzi* em THP-1/MO tratados com 15-epi-LXA4.

Figura 18. Dosagem de espécies reativas de oxigênio (EROs) de THP-1/MØ tratados com 15-epi-LXA4. THP-1/MØ foram submetidos ao tratamento com 15-epi-LXA4 nas concentrações de 3,12 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 15-epi-LXA4 na concentração 100 mM mais PGE₂ à 1 μM ou PGE₂ à 1 μM e infectadas com 5:1 formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* durante 18 horas. Dosagem feita com 24 horas pós infecção (A) e 48 horas pós infecção (B). **** (p<0,0001), *** (p≤0,001).



6 CONCLUSÃO

O bloqueio farmacológico da COX-1 pelo uso da aspirina (ASA) em nosso modelo experimental, diminuiu a invasão e a liberação de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Com o intuito de avaliar o potencial das lipoxinas induzidas pelo tratamento com a ASA (ATL) como indutora deste fenômeno, macrófagos diferenciados de células THP-1 (THP-1/MØ) foram tratados com 15-epi-lipoxina A4 (15-epi-LXA4). Entretanto, o tratamento isolado com 15-epi-LXA4 não induziu o mesmo resultado do tratamento com ASA.

Nossos resultados indicam que o bloqueio da COX-1 através do uso da ASA, concomitante com a produção de 15-epi-LXA4, possam atuar em conjunto, regulando a diminuição da invasão e proliferação parasitária em THP-1/MØ e tratados com ASA.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSOHN, I. A. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 117–121, 1998.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.
- ALVAREZ, M. N. et al. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 8, p. 6627–6640, 25 fev. 2011.
- ALVES, M. J. M. et al. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 21, p. 75–82, 1986.
- ANDREWS, N. W. Oxidative stress and intracellular infections: more iron to the fire. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 7, p. 6–8, 2012.
- ARAÚJO-JORGE, T. C.; BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after 15-years study. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 43–56, 1992.
- ARGENZIO, R. A.; RHOADS, J. M. Reactive Oxygen Metabolites in Piglet Cryptosporidiosis. **Pediatric Research**, v. 41, p. 521, 1 abr. 1997.
- ARIEL, A. et al. Aspirin-Triggered Lipoxin A4 and B4 Analogs Block Extracellular Signal-Regulated Kinase-Dependent TNF- α Secretion from Human T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 12, p. 6266 LP – 6272, 15 jun. 2003.
- ARNAOUT, A. M. Structure and Function of the Leukocyte Adhesion Molecules CD11/CD18. **The Journal of The American Society of Hematology**, v. 75, n. 5, p. 1037–1050, 1990.
- AROCENA, A. R. et al. Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 1, p. 184–194, 2014.
- ASHTON, A. W. et al. Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 4, p. 929–940, 16 abr. 2007.
- BALTA, M. G.; LOOS, B. G.; NICU, E. A. Emerging Concepts in the Resolution of Periodontal Inflammation: A Role for Resolvin E1. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1682, 14 dez. 2017.
- BARRIAS, E. S.; CARVALHO, T. M. U.; SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi* : entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. **Frontiers in**

Immunology, v. 4, n. 186, p. 1–10, 2013.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World journal of experimental medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 20 fev. 2013.

BERN, C. et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States A Systematic Review. **JAMA**, v. 298, n. 18, p. 2171–2181, 14 nov. 2007.

BERN, C. Chagas' Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.

BETZ, M.; FOX, B. S. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. **The Journal of Immunology**, v. 146, p. 108–113, 1991.

BOEHM, U. et al. Cellular responses to Interferon- γ . **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 749–795, 1997.

BONNANS, C.; CHANEZ, P.; CHAVIS, C. Lipoxins in asthma: potential therapeutic mediators on bronchial inflammation? **Allergy**, v. 59, n. 10, p. 1027–1041, 2004.

BÖRGESON, E. The role of lipoxins in cardiometabolic physiology and disease. **Cardiovascular Endocrinology & Metabolism**, p. 4–13, 2016.

BUCKNER, F. S.; WILSON, A. J.; VOORHIS, W. C. VAN. Detection of Live *Trypanosoma cruzi* in Tissues of Infected Mice by Using Histochemical Stain for β -Galactosidase. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 403–409, 1999.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annual Reviews Microbiology**, v. 49, p. 175–200, 1995.

CALER, E. V et al. The Exocytosis-regulatory Protein Synaptotagmin VII Mediates Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 9, p. 1097–1104, 2001.

CAMARGO, M. M. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 12, p. 5890 LP – 5901, 15 jun. 1997.

CARDILLO, F. et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice by Gamma Interferon and Interleukin 10: Role of NK Cells. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 1, p. 128–134, 1996.

CARDILLO, F. et al. NK1.1+ Cells and T-Cell Activation in Euthymic and Thymectomized C57Bl/6 Mice during Acute *Trypanosoma cruzi* Infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, p. 96–104, 2002.

CARDONI, R. L.; ANTÚNEZ, M. INÉS. Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Mediators of Inflammation**, v. 13, n. 4, p. 235–240, 2004.

CARDONI, R. L.; ROTTENBERG, M. E.; SEGURA, E. L. Increased Production of

Reactive Oxygen Species by Cells from Mice Acutely Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Cellular Immunology**, v. 128, n. 1, p. 11–21, 1990.

CELENTANO, A. M. et al. PGE₂ Involvement in Experimental Infection With *Trypanosoma cruzi* Subpopulations. **Prostaglandins**, v. 49, n. 3, p. 141–153, 1995.

CHAGAS, C. **Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz**, 1909.

CHEN, R. et al. Induction of IFN α or IL-12 depends on differentiation of THP-1 cells in dengue infections without and with antibody enhancement. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1, 2012.

CHIANG, N. et al. Aspirin triggers antiinflammatory 15-epi-lipoxin A4 and inhibits thromboxane in a randomized human trial. 2004.

CHUENKOVA, M. V et al. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: A potent and specific survival factor for human Schwann cells by means of phosphatidylinositol 3-kinase – Akt signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 17, p. 9936–9941, 2001.

CILLARI, E.; LIEW, F. OO Y.; LELCHUK, R. Suppression of Interleukin-2 Production by Macrophages in Genetically Susceptible Mice Infected with *Leishmania major*. **Infection and Immunity**, v. 54, n. 2, p. 386–394, 1986.

COELHO, P. S. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN- γ -primed-macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, p. 837–844, 2012.

CONFALONIERI, U. E. C.; MARGONARI, C.; QUINTÃO, A. F. Acta Tropica Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. **Acta Tropica**, v. 129, p. 33–41, 2014.

CONTE, F. P. et al. Lipoxin A4 attenuates zymosan-induced arthritis by modulating endothelin-1. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, n. 4, p. 911–924, 2010.

COSTA, V. M. A. et al. Type I IFNs Stimulate Nitric Oxide Production and Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 3193–3200, 2006.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. DE. **A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2002.

CUERVO, H. et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Infiltrate the Heart in Acute *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 5, p. 2656–2665, 2011.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.

DOCAMPO, ROBERTO.; MORENO, SILVIA N.J.; VERCESI, A. E. Effect of

- thapsigargin on calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and epimastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 59, p. 305–313, 1993.
- FADOK, V. A. et al. Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine / Paracrine Mechanisms Involving TGF- β . **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 4, p. 890–898, 1998.
- FERGUSON, M. A. J. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. **Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences**, v. 352, n. 1359, p. 1295–1302, 1997.
- FIERRO, I. M.; SERHAN, C. N. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 555–566, 2001.
- FINZI, J. K. et al. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 133, n. 2004, p. 37–43, 2003.
- FREIRE-DE-LIMA, C. G. et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, v. 403, p. 199–203, 2000.
- FU, J.-Y. et al. The Induction and Suppression of Prostaglandin H2 Synthase (Cyclooxygenase) in Human Monocytes. **The Journal of Biological**, v. 265, n. 28, p. 16737–16740, 1990.
- FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1871 LP – 1875, 30 nov. 2001.
- GIORDANO, R. et al. Cloning of a Surface Membrane Glycoprotein Specific for the Infective Form of *Trypanosoma cruzi* Having Adhesive Properties to Laminin *. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 6, p. 3461–3468, 1999.
- GODSON, C. et al. Cutting Edge: Lipoxins Rapidly Stimulate Nonphlogistic Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by Monocyte-Derived Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 1663–1667, 2000.
- GRONERT, K. et al. Transcellular Regulation of Eicosanoid Biosynthesis. **Methods in Molecular Biology**, v. 120, n. 4, p. 119–144, 1999.
- GUALDE, N.; HARIZI, H. Arachidonic-acid-derived eicosanoids : roles in biology and immunopathology. **Cell Press**, v. 14, n. 10, p. 461–469, 2008.
- GUERRERO, N. A. et al. Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 Signaling through Prostaglandin Receptor EP- 2 Favor the Development of Myocarditis during Acute *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1–23, 2015.
- HALL, B. S. et al. Cell-specific activation of nuclear factor-kappaB by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection. **Molecular biology of the cell**, v. 11, n. 1, p. 153–160, jan. 2000.
- HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. On the Mechanism of the Biosynthesis

Prostaglandins E1, and F1 α *. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 242, n. 25, p. 5336–5343, 1967.

HARRIS, S. G. et al. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 3, p. 144–150, 2002.

HARRIS, T. H. et al. Signal Transduction , Gene Transcription , and Cytokine Production Triggered in Macrophages by Exposure to Trypanosome DNA. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 8, p. 4530–4537, 2006.

HATCHER, F. M. et al. Increased natural killer cell activity in experimental American trypanosomiasis. **The Journal of Immunology**, v. 127, n. 3, p. 1126 LP – 1130, 1 set. 1981.

HINZ, B.; BRUNE, K.; PAHL, A. Prostaglandin E 2 Upregulates Cyclooxygenase-2 Expression in Lipopolysaccharide-Stimulated. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 748, n. 3, p. 744–748, 2000.

HUANG, H. et al. Infection of endothelial cells with *Trypanosoma cruzi* activates NF-kappaB and induces vascular adhesion molecule expression. **Infection and immunity**, v. 67, n. 10, p. 5434–5440, out. 1999.

HUANG, H. et al. Activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B in murine Chagasic myocarditis. **Infection and immunity**, v. 71, n. 5, p. 2859–2867, maio 2003.

HUBBARD, L. L. N. et al. A Role for IL-1 Receptor-Associated Kinase-M in Prostaglandin E2 -Induced Immunosuppression Post-Bone Marrow Transplantation. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 11, p. 6299–6308, 2014.

IKEGAMI, R. et al. The Expression of Prostaglandin E Receptors EP 2 and EP 4 and Their Different Regulation by Lipopolysaccharide in C3H/HeN Peritoneal Macrophages. **The Journal of Immunology**, n. 166, p. 4689–4696, 2001.

JÓZSEF, L. et al. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-kappa B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 13266–13271, 1 out. 2002.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity : lessons for and beyond Chagas disease lessons for and beyond Chagas disease. p. 1–23, 2019.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 7, p. 511–517, 2010.

KIELIAN, T. L.; BLECHA, F. CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide: a review. **Immunopharmacology**, v. 29, p. 187–205, 1995.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COMINI, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, p. 1236–1248, 2008.

- KUBATA, B. K. et al. A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of experimental medicine**, v. 196, n. 9, p. 1241–1251, 4 nov. 2002.
- KUNKEL, S. L. et al. Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 737, n. 1, p. 404–410, 1986.
- LINDGREN, J.; EDENIUS, C. Transcellular biosynthesis of leukotrienes and lipoxins via leukotriene A4 transfer. **Cell Press**, v. 14, n. 10, p. 351–354, 1993.
- LONIEN, S. C. H. et al. Response to *Trypanosoma cruzi* by human blood cells enriched with dendritic cells is controlled by cyclooxygenase-2 pathway. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, 2017.
- LÓPEZ-MUÑOZ, R. et al. Experimental Parasitology *Trypanosoma cruzi*: In vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 2, p. 167–171, 2010.
- LOPEZ, M. et al. Role for sialic acid in the formation of tight lysosome-derived vacuoles during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 119, p. 141–145, 2002.
- MACHADO, F. S. et al. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nature Medicine**, v. 12, n. 3, p. 330–334, 2006.
- MACHADO, F. S. et al. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. **Microbes and infection**, v. 10, n. 14–15, p. 1558–1566, 2008.
- MACHADO, F. S. et al. Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 4, p. 1743–1758, 1 jan. 2012.
- MACKENZIE, K. F. et al. PGE 2 Induces Macrophage IL-10 Production and a Regulatory-like Phenotype via a Protein Kinase A–SIK–CRTC3 Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 2, p. 565–577, 2013.
- MADERNA, P. et al. Lipoxins Induce Actin Reorganization in Monocytes and Macrophages But Not in Neutrophils Differential Involvement of Rho GTPases. **American Journal of Pathology**, v. 160, n. 6, p. 2275–2283, 2002.
- MAEDA, F. Y.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 361, p. 1–7, 2012.
- MALVEZI, A. D. et al. Aspirin modulates innate inflammatory response and inhibits the entry of *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014a.
- MALVEZI, A. D. et al. Response and Inhibits the Entry of *Trypanosoma cruzi* in Mouse Peritoneal Macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–9, 2014b.
- MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization : tumor-associated macrophages as

a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 549–555, 2002.

MARCILI, A. et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, n. 6, p. 641–655, 2019.

MARNETT, L. J. et al. Arachidonic Acid Oxygenation by COX-1 and COX-2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 33, p. 22903–22906, 1999.

MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in bioscience**, n. 4, p. 453–461, 2008.

MARTINS, R. M. et al. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 943–954, 2011.

MEDEIROS, A. et al. Prostaglandin E 2 and the Suppression of Phagocyte Innate Immune Responses in Different Organs. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2012, n. II, p. 1–13, 2012.

MEIRER, K.; STEINHILBER, D.; PROSCHAK, E. Inhibitors of the arachidonic acid cascade: Interfering with multiple pathways. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 114, n. 1, p. 83–91, 2014.

MEJA, K. K.; BARNES, P. J.; GIEMBYCZ, M. A. Characterization of the prostanoid receptor(s) on human blood monocytes at which prostaglandin E2 inhibits lipopolysaccharide- induced tumour necrosis factor- α generation. **British Journal of Pharmacology**, v. 122, n. 1, p. 149–157, 1997.

MICHELIN, M. A.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. C. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Experimental parasitology**, v. 111, n. 2, p. 71–79, 2005.

MING, M.; EWEN, M. E.; PEREIRA, M. E. A. Trypanosome Invasion of Mammalian Cells Requires Activation of the TGF β Signaling Pathway. **Cell Press**, v. 82, p. 287–296, 1995.

MOGENSEN, T. H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. v. 22, n. 2, p. 240–273, 2009.

MOLINA-BERRÍOS, A. 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**, v. 7, n. 4, 2013.

MONTEÓN, V. M. et al. American Trypanosomiasis: In Situ and Generalized Features of Parasitism and Inflammation Kinetics in a Murine Model. **Experimental Parasitology**, v. 83, n. 3, p. 267–274, 1996.

MORAES, K. C. M.; DINIZ, L. F.; BAHIA, M. T. Role of cyclooxygenase-2 in *Trypanosoma cruzi* survival in the early stages of parasite host-cell interaction.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 110, n. 2, p. 181–191, 2015.

MUKHERJEE, S. et al. Aspirin Treatment of Mice Infected with *Trypanosoma cruzi* and Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16959, 2011.

NAGAJYOTHI, F. et al. *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 2, p. e953–e953, 1 fev. 2011.

NAKAYASU, E. S. et al. GPIomics : global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Systems Biology**, v. 5, n. 261, p. 1–17, 2009.

NUGTEREN, D. H.; HAZELHOF, E. ISOLATION AND PROPERTIES OF INTERMEDIATES IN PROSTAGLANDIN BIOSYNTHESIS. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 326, n. August 1972, p. 448–461, 1973.

ORTIZ-ORTIZ, L. et al. **Enhanced mononuclear phagocytic activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice.** [s.l: s.n.]. v. 50

OVERTVELT, L. VAN et al. *Trypanosoma cruzi* Infects Human Dendritic Cells and Prevents Their Maturation : Inhibition of Cytokines , HLA-DR , And Costimulatory Molecules. **Infection and immunity**, v. 67, n. 8, p. 4033–4040, 1999.

PAIVA, C. N. et al. High expression of a functional cruzipain by a non-infective and non-pathogenic *Trypanosoma cruzi* clone. **Parasitology**, v. 117, n. 5, p. 483–490, 1998.

PATZ, J. A. et al. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1395–1405, 2000.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, p. 82–94, 2018.

PHIPPS, R. P.; STEIN, S. H.; ROPER, R. L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. **Immunology Today**, v. 12, n. 10, p. 349–352, 1991.

PIACENZA, L. et al. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **The Biochemical journal**, v. 410, n. 2, p. 359–368, 1 mar. 2008.

PICOT, D.; LOLL, P. J.; GARAVITO, R. M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. **Nature**, v. 367, n. January, p. 243–249, 1994.

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. D. A. Prostaglandins Mediate Suppression of Lymphocyte Proliferation and Cytokine Synthesis in Acute *Trypanosoma cruzi* Infection. **Cellular Immunology**, v. 98, p. 90–98, 1999.

QIU, F. et al. Aspirin-triggered lipoxin A 4 and lipoxin A 4 up-regulate transcriptional corepressor NAB1 in human neutrophils. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 14, 2001.

RASSI, A. J.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RASSI, A. J.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.

REINER, N. E.; MALEMUD, C. J. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. **The Journal of Immunology**, v. 134, n. 1, p. 556–563, 1985.

RICCIOTTI, M.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, 2012.

ROBERTS, A. B. et al. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 1, p. 119–123, jan. 1985.

RODRÍGUEZ, A. et al. A Trypanosome-soluble Factor Induces IP3 Formation, Intracellular Ca²⁺ Mobilization and Microfilament Rearrangement in Host Cells. **Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 5, p. 1263–1273, 1995.

ROMANO, M.; MADDOX, J. F.; SERHAN, C. N. Activation of human monocytes and the acute monocytic leukemia cell line (THP-1) by lipoxins involves unique signaling pathways for lipoxin A4 versus lipoxin B4: evidence for differential Ca²⁺ mobilization. **The Journal of Immunology**, v. 157, p. 2149–2154, 1996.

ROUGERON, V. et al. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. **PNAS**, v. 106, n. 25, p. 10224–10229, 2009.

SCHENKMAN, S.; MORTARA, R. A. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Journal of Cell Science**, v. 101, p. 895–905, 1992.

SCHOTT, W. A. et al. Regulation of arachidonic acid metabolism by macrophage activation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 155, p. 1148–1160, 1982.

SEREZANI, C. H. et al. Prostaglandin E₂ Suppresses Bacterial Killing in Alveolar Macrophages by Inhibiting NADPH Oxidase. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 37, p. 562–570, 2007.

SERHAN, C. N. Lipoxins and Novel Aspirin-Triggered 15 ϵ -Lipoxins (ATL): A Jungle of Cell-Cell Interactions or a Therapeutic Opportunity? **Prostaglandins**, v. 53, p. 107–137, 1997.

SERHAN, C. N. Lipoxins and aspirin-triggered 15- ϵ -lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 73, n. 3–4, p. 141–162, 2005.

SHIMOKAWA, T.; SMITH, W. L. Prostaglandin Endoperoxide Synthase: The aspirin acetylation region. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 17, p. 12387–

12392, 1992.

SHINOMIYA, S. et al. Regulation of TNF α and interleukin-10 production by prostaglandins I2 and E2: studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype-selective synthetic agonists. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 2001, p. 1153–1160, 2000.

SMITH, W. L.; MURPHY, R. C. The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. In: **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**. 4^a ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2002. p. 341–371.

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

SOTO, C. D. A. et al. Trypanosoma cruzi Infection Modulates In Vivo Expression of Major Histocompatibility Complex Class II Molecules on Antigen-Presenting Cells and T-Cell Stimulatory Activity of Dendritic Cells in a Strain-Dependent Manner. **Infection and immunity**, v. 71, n. 3, p. 1194–1199, 2003.

SOUZA, W. DE. Basic Cell Biology of Trypanosoma cruzi. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 269–285, 2002.

STAFFORD, J. B.; MARNETT, L. J. Prostaglandin E2 inhibits tumor necrosis factor- α RNA through PKA type I. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 366, n. 1, p. 104–109, 2008.

STERIN-BORDA, L. et al. **Lymphocyte muscarinic cholinergic activity and PGE2 involvement in experimental Trypanosoma cruzi infection.** **Clinical immunology and immunopathology**, 1 dez. 1996.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014.

STRASSMANN, G. et al. Evidence for the Involvement of Interleukin 10 in the Differential Deactivation of Murine Peritoneal Macrophages by Prostaglandin E2. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 2365–2370, 1994.

TAI, H. et al. Prostaglandin catabolizing enzymes. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 68, n. 69, p. 483–493, 2002.

TARDIEUX, I. et al. Lysosome Recruitment and Fusion Are Early Events Required for Trypanosome Invasion of Mammalian Cells. **Cell Press**, v. 71, p. 1117–1130, 1992.

TARLETON, R. L.; ZHANG, L. Chagas Disease Etiology: Autoimmunity or Parasite Persistence? **Parasitology Today**, v. 15, n. 3, p. 94–99, 1999.

TATAKIHARA, V. L. H. et al. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine Trypanosoma cruzi infection. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, p. 47–58, 2008.

TIBAYERENC, M.; AYALA, F. J. Towards a Population Genetics of Micro-organisms :

The Clonal Theory of Parasitic Protozoa. **Prasitology Today**, v. 7, n. 9, p. 228–232, 1991.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. **Isozyme variability in Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas Disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance.** **Evolution**, 1998.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature**, v. 26, n. 138, p. 584–585, 1971.

VIEIRA, M.; DE CARVALHO, T.; DE SOUZA, W. Effect of Protein Kinase Inhibitors on the Invasion Process of Macrophages by Trypanosoma cruzi. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 203, n. 2, p. 967–971, 1994.

VON EULER, U. S. On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). **The Journal of physiology**, v. 88, n. 2, p. 213–234, 6 nov. 1936.

WHO ChagasDisease. Disponível em < <https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/> > Acesso em 03/12/2018

WIEDENMANN, B. et al. Lipoxins and resolvins in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 13, n. 6, p. 797–799, 2007.

WILKOWSKY, S. E. et al. Trypanosoma cruzi: Phosphatidylinositol 3-Kinase and Protein Kinase B Activation Is Associated with Parasite Invasion. **Experimental Cell Research**, v. 218, p. 211–218, 2001.

WOOLSEY, A. M. et al. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 3611–3622, 2003.

WU, L. et al. Lipoxin A4 Activates Nrf2 Pathway and Ameliorates Cell Damage in Cultured Cortical Astrocytes Exposed to Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion Insults. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 56, n. 4, p. 848–857, 2015.

YAROVINSKY, F. et al. TLR11 Activation of Dendritic Cells by a Protozoan Profilin-Like Protein. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1626 LP – 1629, 10 jun. 2005.

YONG, E. C.; CHI, E. Y.; HENDERSON JR, W. R. Toxoplasma gondii Alters Eicosanoid Release by Human Mononuclear Phagocytes: Role of Leukotrienes in Interferon γ -induced Antitoxoplasma Activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 1637–1648, 1994.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 87–111, 2006.

ZANLUQUI, N. G.; WOWK, P. F.; PINGE-FILHO, P. Journal of Clinical & Cellular Macrophage Polarization in Chagas Disease. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 6, n. 2, p. 1–6, 2015.

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite Persistence Correlates with Disease Severity and Localization in Chronic Chagas' Disease. **The Journal of Infectious Diseases**,

v. 10, n. 2, p. 480–486, 1999.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B. et al. Infection , Genetics and Evolution The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature : Rationale , epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.

ZONGDUO, G. et al. Lipoxin A4 Reduces Inflammation Through Formyl Peptide Receptor 2/p38 MAPK Signaling Pathway in Subarachnoid Hemorrhage Rats. **Stroke**, v. 47, n. 2, p. 490–497, 1 fev. 2016.

ANEXO 1:

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais - Manutenção do *Trypanosoma cruzi*



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 19/2017

Londrina, 17 de Fevereiro de 2017.

Prezado Pesquisador,


Certificamos que o projeto intitulado "**Manutenção do *Trypanosoma cruzi* (Cepas Y, G e CL), agente causador da Doença de Chagas**", protocolo CEUA nº 24841.2016.41, sob a responsabilidade de **Phileno Pinge Filho**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL), em reunião realizada em **07/02/2017**.

O objetivo do projeto é a manutenção do *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi* Cepa Y, G e CL serão mantidas no laboratório por meio da realização de repiques semanais realizados pela inoculação intraperitoneal de sangue rico em tripomastigotas sanguíneas diluído em PBS 0,01M em camundongos Swiss. Cinco camundongos Swiss serão inoculados a cada 10 dias pela via intraperitoneal com 2x10⁵ formas tripomastigotas sanguíneas. A infecção será confirmada por meio da observação direta em microscópio óptico de 50 campos em 5 µL de sangue heparinizado colhido da veia da cauda do camundongo no aumento de 400x, a partir do sétimo dia após a infecção. A obtenção dos parasitas será realizada por meio de sangria por punção cardíaca, conforme a demanda do laboratório. Após a sangria, os animais sob efeito dos anestésicos, serão sacrificados por deslocamento cervical. GI 1.

Vigência do Projeto	07/01/2017 a 07/01/2019
Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	360
Peso/idade	20 g / 7 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central / UEL
Amostras a serem coletadas	Sangue

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UDEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Prof. Dra.  Glaucia Scantamburlo Alves Fernandes
Coordenadora da CEUA/UDEL

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Phileno Pinge Filho
Coordenador do Projeto

Departamento de Ciências Patológicas / Centro de Ciências Biológicas
Com cópia para Coordenação do Biotério Central / UEL; Chefe do Departamento de Ciências Patológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas