



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAFAEL CARVALHO DE FREITAS

**PAPEL DO AMP_c E PROSTANOIDES NA ATIVAÇÃO E
INVASÃO DE MONÓCITOS HUMANOS INFECTADOS POR
*Trypanosoma cruzi***

RAFAEL CARVALHO DE FREITAS

**PAPEL DO AMP_c E PROSTANOIDES NA ATIVAÇÃO E
INVASÃO DE MONÓCITOS HUMANOS INFECTADOS POR
*Trypanosoma cruzi***

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

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

Londrina
2016

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

De Freitas, Rafael Carvalho .

Papel do AMPc e prostanoídes na ativação e invasão de monócitos humanos infectados por *Trypanosoma Cruzi* / Rafael Carvalho De Freitas. - Londrina, 2016.
85 f. : il.

Orientador: Phílino Pingé Filho.

Coorientador: Juliano Bordignon.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Imunopatologia da Doença de Chagas - Tese. 2. Prostanóides e AMPc - Tese. 3. Invasão Celular por *Trypanosoma Cruzi* - Tese. 4. Óxido Nítrico - Tese. I. Pingé Filho, Phílino . II. Bordignon, Juliano. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

RAFAEL CARVALHO DE FREITAS

**PAPEL DO AMP_c E PROSTANOIDES NA ATIVAÇÃO E INVASÃO DE
MONÓCITOS HUMANOS INFECTADOS POR *Trypanosoma cruzi***

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

BANCA EXAMINADORA

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

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

Dra. Lorena Bavia
Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz-PR

Londrina, 07 de novembro de 2014.

DE FREITAS, Rafael Carvalho. **Papel do AMPc e prostanoídes na ativação e invasão de monócitos humanos infectados por *Trypanosoma cruzi***. 2016. 85 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

RESUMO

Invasão celular por *Trypanosoma cruzi* e sua replicação intracelular são essenciais para a progressão do ciclo de vida do parasita e o desenvolvimento da doença de Chagas. Neste estudo, exploramos a função do inibidor de ciclo-oxigenase (COX), aspirina, na patogênese do *T. cruzi*. A aspirina é um agente não-seletivo que inibe irreversivelmente ambas isozimas COX, COX-1 e COX-2 (embora fracamente seletivo para COX-2). Nós demonstramos a inibição da infecção por *T. cruzi* em monócitos humanos utilizando aspirina. O tratamento de monócitos com SQ 22536, um inibidor de adenilato-ciclase, restaurou a capacidade de invasão de *T. cruzi*. Este restabelecimento foi associado com uma diminuição na produção de óxido nítrico e prostaglandina E2, e um aumento da interleucina-10 e interleucina-12 por células pré-tratadas com aspirina. No seu conjunto, estes resultados suportam a idéia de que a via da ciclooxigenase desempenha um papel fundamental no processo de invasão do parasita, e sugerem que a atividade da aspirina depende da elevação de AMPc em monócitos humanos por *T. cruzi*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Aspirina. Invasão celular. SQ 22536. Citocinas. Óxido nítrico.

DE FREITAS, Rafael Carvalho. **Role of cAMP and prostanoids in the activation and invasion of human monocytes infected by *Trypanosoma cruzi***. 2016. 85 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

ABSTRACT

Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* and its intracellular replication are essential for progression of the parasite life cycle and development of Chagas disease. In this study, we explored the role of cyclooxygenase (COX) inhibitor, aspirin, in *T. cruzi* pathogenesis. Aspirin is a non-selective agent that irreversibly inhibits both COX isozymes, COX-1 and COX-2 (though weakly selective for COX-2). We demonstrate the inhibition of *T. cruzi* infection in human monocytes using aspirin. The treatment of monocytes with SQ 22536, an adenylate-cyclase inhibitor, restored the invasiveness of *T. cruzi*. This reestablishment was associated with a decrease in nitric oxide and prostaglandin E₂ production, and an increase of interleukin-10 and interleukin-12 by cells pre-treated with aspirin. Altogether, these results support the idea that the cyclooxygenase pathway plays a fundamental role in the process of parasite invasion, and suggest that aspirin activity depends on cAMP elevation in *T. cruzi*-infected human monocytes.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Aspirin. Cell invasion. SQ 22536. Cytokines. Nitric oxid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Esquema do ciclo de vida de *T. cruzi*. Diferenciação das formas tripomastigotas metacíclicas em amastigotas no ser humano e diferenciação da forma tripomastigota e epimastigotas no inseto barbeiro11
- Figura 2** – Vias de invasão de *T. cruzi* na célula hospedeira. Mecanismo dependente e independente do recrutamento de lisossomos17
- Figura 3** – Estrutura da adenilato ciclase de *T. cruzi* a) e de mamíferos (b). Regiões catalíticas em vermelho com regiões homólogas em C1 e C221
- Figura 4** – Representação do metabolismo do ácido araquidônico e a atividade das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) através da iniciação promovida pelo ligante bradicinina25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AC	Adenilato ciclase
AINES	Antiinflamatórios não esteroidais
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ASA	Ácido acetilsalicílico
ATP	Adenosina trifosfato
CB	Citocalasinas B
CD	Citocalasinas D
CEL	Celebra
COX	Ciclooxigenase
DC	Doença de Chagas
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HETE	Ácidos hidroxeicosatetraenóico
HPETE	ácido hidroperoxieicotetraenóico
IFN γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
IRF-1	Fator de reconhecimento de interferon 1
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LX	Lipoxina
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio
NF κ B	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ²⁻	Ânion superóxido
OPB	Oligopeptidase B
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato
PDE	Fosfodiesterase

PG	Prostaglandina
PI-PLC	Fosfatidilinositol-fosfolipase C
PKA	Proteína quinase A
PLC	Fosfolipase C
PTK	Proteína tirosino quinase
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
SBF	Soro bovino fetal
SQ 22,536	Inibidor de adenilato ciclase
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TLR	Receptor semelhante a Toll
TM	Tripomastigota metacíclico
TMC	Tripomastigota de cultura
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TPA	ácido lipoteicoico
TS	Trans-sialidase
TX	Tromboxano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de CHAGAS.....	9
1.2	Reconhecimento e invasão de fagócitos por <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.3	Ativação da adenilato ciclase e AMPc.....	20
1.4	Metabolismo do Ácido Araquidônico.....	24
1.5	Vias das Ciclooxygenases.....	26
1.6	Prostanoides e doença de Chagas.....	27
1.7	Infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> e AINES.....	29
1.8	Papel do óxido nítrico na doença de Chagas.....	31
2	HIPÓTESE DE INVESTIGAÇÃO	34
2.1	Objetivo Geral.....	34
2.2	Objetivos Específicos.....	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Ética e biossegurança.....	35
3.2	Obtenção de monócitos humanos.....	35
3.3	Viabilidade celular e análise fenotípica.....	35
3.4	Tratamento de monócitos humanos com ácido acetil salicílico (ASA) e inibidor de adenilado ciclase (SQ 22536).....	36
3.5	Obtenção de formas tripomastigotas de cultura (TMC) do <i>T. cruzi</i> (cepa Y).....	36
3.6	Ensaio de internalização de TMC.....	37
3.7	Dosagem de IL-10 e IL-12p70.....	38
3.8	Dosagem de óxido nítrico (NO).....	38
3.9	Análise Estatística.....	38
4	RESULTADOS	39
4.1	Artigo: Crosstalk between adenylate-cyclase and cyclooxygenase-1 pathway in the regulation of anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> activity by human monocytes.....	39
5	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas.

As doenças tropicais negligenciadas afligem mais de 1 bilhão de pessoas, principalmente as de baixa renda que ocupam climas tropicais e subtropicais. Dentre os variados agentes etiológicos dessas patologias tem-se a Doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana, a qual é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae. DC constitui-se em uma antropozoonose típica das regiões tropicais e subtropicais da América Latina, estendendo-se da Patagônia até o sudeste dos Estados Unidos da América (DIAS, 2006; RASSI et al., 2012; WHO, 2012).

O parasito foi descoberto por Carlos Chagas em 1907 em animais silvestres e domésticos. Em 1909 Carlos Chagas descreveu o primeiro caso humano da doença causada por *T. cruzi*, a tripanossomíase americana ou doença de Chagas (CHAGAS, 1909).

T. cruzi constitui uma população heterogênea apresentando variabilidade genética e bioquímica que determina comportamentos diferentes para as diversas cepas o que dificulta a classificação taxonômica e a utilização de fármacos (BRENER, GAZZINELLI, 1997). Os diferentes isolados e clones de *T. cruzi* foram agrupados em duas linhagens filogenéticas principais, denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, utilizando marcadores bioquímicos e moleculares (ANONIMOUS, 1999).

As cepas do grupo II de *T. cruzi* (CL e Y) infectam células humanas quatro vezes mais do que as cepas do grupo I (F, Tulahen, M226, Sylvio-X10 Dm28c, Dm30 e Guafitas), que estão mais frequentemente associadas ao ciclo silvestre de transmissão (ANONIMOUS, 1999). A cepa Y tem preferência por macrófagos esplênicos, fígado e medula óssea, enquanto outras infectam principalmente células musculares (MELO, BRENER, 1978), resultando em manifestações clínicas diferentes no curso da infecção por uma ou outra cepa.

Estima-se que cerca de 8 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, em predominância na América Latina onde a DC é endêmica, e que mais de

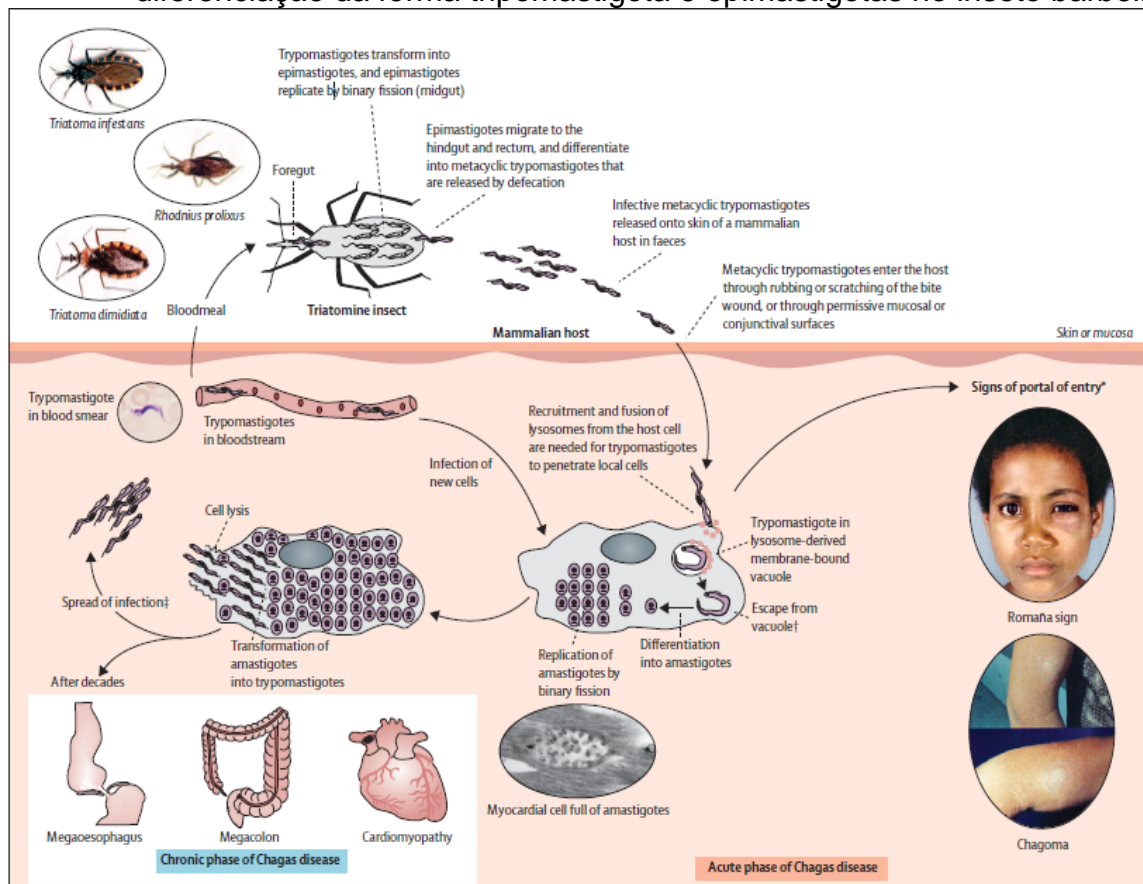
25 milhões estão sob risco de contrair a doença. No entanto, a incidência da doença aumentou em países não endêmicos na última década, como países da América do Norte, Europa e do Pacífico Ocidental, devido ao aumento das correntes imigratórias da população latina para o resto do globo e, embora menos frequente decorrente de infecções através de transfusão sanguínea, transmissão vertical e doação de órgãos. Em 2008, a DC causou óbito de mais de 10 mil pessoas, sendo que neste mesmo ano a soroprevalência da doença em crianças de até 5 anos foi da ordem de 1/100.000 (MASSAD, 2008; CDC, 2013; WHO 2013).

O custo do tratamento ainda é muito alto, conferindo maiores despesas no controle das comorbidades relativas à DC do que às medidas preventivas. Na Colômbia, o custo anual com os pacientes infectados é em torno de 267 milhões de dólares, já as despesas com inseticidas para controle vetorial é de aproximadamente 5 milhões de dólares (WHO, 2013).

Os registros oficiais de óbitos no Brasil indicam que ocorram aproximadamente seis mil mortes de pacientes portadores de DC crônicos anualmente (CHAPADEIRO et al., 1999), embora o país detenha o menor número de casos do continente, sendo que a partir de 2006 o país foi certificado como livre da transmissão da doença pelo principal vetor, *Triatoma infestans* (RASSI JR, RASSI, RESENDE, 2012).

O ciclo de vida do protozoário é complexo (Figura 1), caracterizado como um ciclo heteroxênico, onde o homem é atualmente classificado como um hospedeiro intermediário. *T. cruzi* detém três formas evolutivas predominantes, denominadas de tripomastigotas metacíclicos como a forma infectante de *T. cruzi* encontrada nos dejetos do vetor e circulantes no sangue do organismo infectado no início do processo de transmissão; epimastigotas como forma de multiplicação do parasito no vetor triatomíneo; amastigotas como formas que se multiplicam dentro das células do hospedeiro mamífero; e tripomastigotas sanguíneos que são as formas circulantes ativas do parasito (BURLEIGH, ANDREWS, 1995).

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



Fonte: Rassi et al. (2012).

No inseto vetor os tripomastigotas diferenciam-se no estômago em formas arredondadas, denominadas esferomastigotas. No intestino posterior, ocorre a nova diferenciação a epimastigotas e estes multiplicarão por divisão binária. Já na porção terminal do tubo digestivo do vetor ocorre a diferenciação na forma infectante, tripomastigotas metacíclicos, que poderão infectar outro mamífero no próximo repasto sanguíneo (PEREIRA NEVES et al., 2011).

Após o repasto sanguíneo, as formas tripomastigotas metacíclicos são eliminadas nas dejeções do vetor e invadem o hospedeiro por lesões de continuidade da pele ou diretamente em mucosas (GASCON et al., 2010; COUTINHO, DIAS, 1999). Após a invasão do parasito no tecido este se adere em variadas células do hospedeiro, principalmente fagócitos, como macrófagos. Ocorre englobamento do parasito por fagocitose com consequente formação de um vacúolo parasitóforo que irá se fundir com lisossomos recrutados no citosol com objetivo de degradar o agente agressor. O pH no vacúolo diminui ativando proteínas formadas

de poros nas membranas lisossômicas, o que culmina no extravasamento de enzimas líticas. No entanto, a forma tripomastigota não é sensível a ação deste mecanismo de degradação (BURLEIGH, ANDREWS, 1995).

À medida que o processo de internalização progride as formas tripomastigotas no vacúolo parasitóforo sofrem diferenciação para as formas amastigotas, que por divisão binária se multiplicam dentro da célula hospedeira. Em macrófagos, ocorre a formação de ninhos de amastigotas que após diferenciação em tripomastigotas provocam a ruptura do vacúolo e, conseqüentemente, ocasionando lise celular com liberação das formas sanguíneas circulantes (tripomastigotas) no interstício (COURA, BORGES-PEREIRA, 2012). Assim ocorre a invasão de novas células mediante a circulação das formas tripomastigotas no sangue, infectando células neuronais, musculares e epiteliais, além das células componentes do sistema imunológico. Desta forma, *T. cruzi* apresenta alta eficiência em infectar vários tipos celulares (PEREIRA, SINGER, MEIRELLES, 2000). Durante este processo alguns parasitos são destruídos por resposta imunológica dirigida, permanecem no hospedeiro invadindo novas populações celulares, ou podem ser ingeridos por outro triatomíneo hematófago não infectado, completando o ciclo biológico do parasito (PEREIRA NEVES et al., 2011).

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

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). As populações que apresentam

maior capacidade infectante não possuem as glicoproteínas de superfície gp90 e gp35/50. Tripomastigotas dos 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 kinase). Essa sinalização também envolve a ativação da fosfolipase C (PLC), a geração de IP3 (fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato) e, conseqüentemente, a mobilização de Ca²⁺ dos seus estoques intracelulares, provavelmente retículo endoplasmático (YOSHIDA et al., 2000).

A fase aguda da doença de Chagas começa em oito a dez dias após contato com *T. cruzi* ou até 40 dias após transfusão de sangue infectado, podendo ser sintomático ou não (RASSI JR, RASSI, REZENDE, 2012). Tal fase se caracteriza por elevada parasitemia de tripomastigotas e baixos títulos de anticorpos IgG, com possibilidade de presença de anticorpos da classe IgM (DOS SANTOS et al., 2012).

As manifestações clínicas características desta fase são o sinal de Romaña ou chagoma de inoculação, quando o parasito penetra a mucosa ocular ou pele lesionada, respectivamente (MACHADO et al., 2012). Além disso, ocorre resposta inflamatória inespecífica com comprometimento de linfonodos satélites, formando complexos cutâneos com presença maciça de parasitos. No transcorrer do processo de invasão e lise celular o paciente pode apresentar febre, mialgia, astenia, cefaleia, edemas localizados ou generalizados, quadro inflamatório em diversos órgãos e leucocitose com predomínio de linfocitose, que pode levar a leucopenia (REY, 2008). A morbidade nesta fase é mais prevalente em crianças na primeira infância se não houver tratamento imediato, sendo os sinais mais prevalentes a cardiopatia aguda, linfadenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia e meningoencefalite (VAZ, 2007, WESTPHALEN, BISUGO, DE ARAÚJO, 2012). O diagnóstico laboratorial é realizado por identificação direta do parasito na corrente sanguínea através de xenodiagnóstico ou hemocultura, em somatório de sorologia para anticorpos IgM e IgG (MACHADO et al., 2012).

Apenas 5% dos pacientes portadores de DC apresentam sintomatologia aparente na fase aguda com estimativa de mortalidade de até 1:5000 (TEIXEIRA et al., 2006). Após a fase aguda o paciente entra na fase indeterminada, caracterizada por ser assintomática, porém sorologicamente positiva. Esta fase pode perdurar por um tempo médio de até 10 anos, em que mesmo com ausência de

sintomatologia significativa, tem representado aumento de lesões miocárdicas em muitos pacientes chagásicos (PRATA et al., 2001).

Aproximadamente 20% dos pacientes portadores de DC desenvolvem a forma crônica caracterizada pela síndrome dos “megas” e acometimento de miocárdio, tubo digestório e sistema nervoso central e periférico. Tal sintomatologia contribui para a alta taxa de morbidade e mortalidade frequente na DC (ARAÚJO-JORGE et al., 2000; DIAS et al., 1999; MAGUIRRE et al., 1987; WANDERLEY et al., 1994).

A forma crônica cardíaca é representada por cardiomiopatia acompanhada de processo inflamatório de evolução potencialmente fatal, distúrbios cronotrópicos e tromboembólicos e insuficiência cardíaca congestiva decorrente de cardiomegalia (ANDRADE et al., 2000). O prognóstico da cardiopatia chagásica na fase crônica depende do grau de comprometimento do miocárdio, cardiomegalia e da insuficiência consequente, podendo ocasionar morte por bloqueio do estímulo de contração átrio-ventricular (BLITZMAN et al., 2014). Ao contrário da fase aguda onde ocorre intensa miocardite com maciço infiltrado inflamatório focalizado, o processo crônico é caracterizado por hipertrofia e fibrose (GODZEL et al., 2003; ROSSI et al., 1995). Além disso, o grande infiltrado leucocitário é acompanhado de estresse oxidativo intenso, que propicia extensivo remodelamento do miocárdio, ou seja, hipertrofia e aumento da deposição de componentes da matrix extracelular e intensificação da atividade de colagenases, dentre estas a matrix metalopeptidase 9 (MMP-9) (DHIMAN et al., 2011; ZACKS et al., 2005).

O comprometimento do trato digestório faz-se através da hipertrofia do esôfago e intestino grosso, decorrente de disfunção do sistema nervoso entérico, além do grande infiltrado inflamatório nos tecidos (ANDRADE et al., 2000). A resposta imunológica produzida contra o patógeno pode propiciar lesão tecidual por processo auto-imune ou reatividade a antígenos do parasito presente nos tecidos, além da produção de mediadores inflamatórios na tentativa de isolar e degradar o agente agressor (GIRONES, FRESNO, 2003).

O tratamento medicamentoso para a doença de Chagas é capaz de curar de 70 a 100 % dos pacientes na fase aguda, com os medicamentos nifurtimox (Lampit, Bayer) ou benzonidazol, porém na fase crônica o sucesso no tratamento é

observado em um número limitado de casos (ANDRADE et al., 1992 e VIOTTI et al., 1994) não passando de 36,5% (CANÇADO, 1997), Além da ineficiência dos medicamentos na fase crônica existe ainda o seu efeito tóxico, salientando que ainda há muitas dificuldades a vencer, como o desenvolvimento de vacinas contra *T. cruzi* utilizáveis para humanos.

No modelo murino da doença de Chagas, a resistência ou susceptibilidade do hospedeiro à infecção é dependente tanto da imunidade inata quanto da imunidade adquirida e está diretamente ligada ao padrão de produção de citocinas (DOS REIS, 1997; ABRAHAMSOHN 1998; TALVANI, et al., 2002). Nesse contexto a interleucina 12 (IL-12) é considerada essencial para o estabelecimento de uma imunidade mediada por células protetora durante os estágios iniciais da infecção por *T. cruzi* (GAZZINELLI et al., 1998). Essa citocina é capaz de estimular as células NK (“natural killer”) e células T a secretarem interferon-gama (IFN- γ), que exerce papel fundamental na ativação dos macrófagos para a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (MUÑOZ-FERNANDES, FRESNO, 1992). Essas duas moléculas em conjunto estimulam o macrófago a produzir óxido nítrico (NO), o principal efetor que controla a replicação intracelular do parasita (GAZZINELLI et al., 1992; VESPA et al., 1994).

Foi mostrado que o IFN- γ co-estimula a síntese de óxido nítrico (NO) na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, contribuindo para o controle da parasitemia em camundongos resistentes (COSTA et al, 2006). No entanto, interleucina 10 (IL-10) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) regulam negativamente a atividade tripanocida (SILVA et al., 1992), o que pode ser explicado pela diminuição da produção de IFN- γ e TNF- α , como um mecanismo endógeno de regulação e prevenção de choque endotoxêmico decorrente de altas concentrações de TNF- α (ABRAHAMSOHN, 1998).

Após a fase aguda ocorre a ativação da resposta imune adaptativa com subsequente ativação de células T e produção de citocinas do padrão Th1, as quais propiciam a modulação da função de macrófagos, o que determina o controle da parasitemia (DOS REIS, LOPES, 2000).

De uma forma geral as taxas de mortalidade, tempo de sobrevivência e parasitemia são avaliadas para se determinar a susceptibilidade ou resistência do

animal. Camundongos susceptíveis normalmente desenvolvem altas parasitemias e geralmente morrem entre duas e três semanas após o início da infecção, não sobrevivendo à fase aguda. Ao contrário, os camundongos resistentes apresentam parasitemia menos intensa, que é controlada e os animais sobrevivem à infecção (ANDRADE et al., 1985).

Estudos mostram que a resistência à infecção por *T. cruzi* é regulada por um controle multifatorial (TRISCHMANN; BLOOM, 1982). Por isso a utilização de camundongos isogênicos (endocriados), nos quais não haveria linhagens polares resistentes ou susceptíveis, mas sim um gradiente contínuo entre os fenótipos (ARAÚJO-JORGE, 2000), constitui os modelos experimentais mais utilizados nos estudos da tripanossomíase americana.

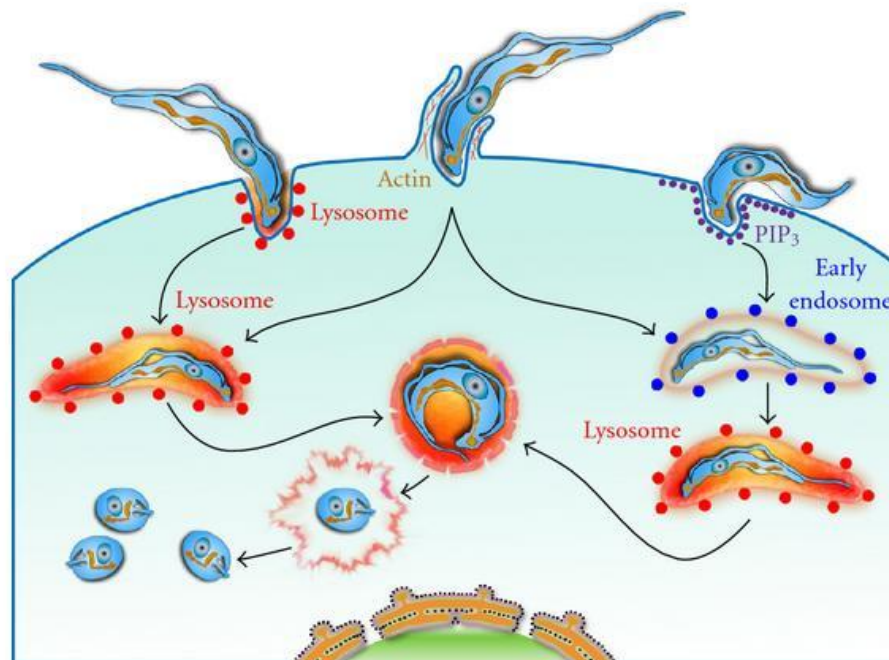
1.2 Reconhecimento e invasão de fagócitos por *Trypanosoma cruzi*.

O reconhecimento de *T. cruzi* pelas células do hospedeiro é realizado por uma complexa rede de interações entre glicofosfolípidios e peptidases de membrana do parasita e moléculas afins presentes no hospedeiro. Tais moléculas de superfície do protozoário são denominadas padrões moleculares associados a patógenos ou PMAPs (do inglês pathogen-associated molecular pattern ou PAMPs) e são devidamente reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrões ou RRP's (do inglês pattern recognition receptors (PRRs), deflagrando vias de sinalização intracelular com consequente ativação de NFκB e MAPK (Gazzinelli, Denkers, 2006). Os tipos de PRR's mais proeminentes no reconhecimento de PAMP's de *T. cruzi* são receptores do tipo Toll-like, dentre eles TLR4, TLR2, TLR6 e TLR9. A ativação dos receptores de membrana TLR4 e TLR2/TLR6 (ligação com glicoinositolfosfolípidios-ceramidas e glicosilfosfaditilinositol-mucinas, respectivamente) induz a fosforilação em cascata de quinases que culmina na ativação de NFκB, que ativa regiões promotoras específicas no DNA culminando na transcrição de RNA mensageiro de citocinas e quimiocinas essenciais na modulação da resposta do hospedeiro. Domínios CpG de DNA proveniente do protozoário ativam o receptor endossômico TLR9 propiciando a ativação da via das MAPK e NFκB (ROPERT et al., 2002; JUNQUEIRA et al., 2010).

O processo de invasão celular remete à complexa interação entre o

hospedeiro e o parasito. De certo modo o processo de engolfamento do parasito está relacionado com o aumento intracelular de íons cálcio (Ca^{2+}) por vias lisossomo-dependentes ou lisossomo-independentes (BURLEIGH, ANDREWS, 1995). A mobilização de Ca^{2+} por recrutamento de lisossomos é propiciada pela ativação de fosfolipase C (PLC) e proteínas tirosino quinases (PTK) com consequente geração de inositol trifosfato (YOSHIDA et al., 2000). A ativação de via de sinalização PI3K/Akt propicia o aumento de fosfatidilinositol trifosfato (PIP_3) que corrobora com a fusão de endossomos e rearranjo do citoesqueleto para a formação do vacúolo parasitóforo (TODOROV et al., 2000; WOOLSEY et al., 2003). A via independente de lisossomos estaria envolvida com o aumento de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que acionaria uma bomba de troca iônica $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ em acidocalcissomas no citoplasma com consequente mobilização de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, mas o mecanismo ainda não foi totalmente elucidado (YOSHIDA, 2006).

Figura 2 – Vias de invasão de *Typanosoma cruzi* na célula hospedeira. Mecanismo dependente e independente do recrutamento de lisossomos.



Fonte: DE SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010.

Dentre as variadas glicoproteínas e peptidases que englobam o pacote de reconhecimento e maquinaria de invasão celular do protozoário, a trans-sialidase (TS) contempla além destas funções já listadas, a evasão da resposta imune através

da inibição de ativação do sistema complemento de *T. cruzi* opsonizados. Além disso, promove a anulação da hiper-reatividade de linfócitos B por seu epítipo (SAPA) estar na região carbono terminal da peptidase, não influenciando a porção N-terminal da enzima onde se encontra o centro catalítico (LEGUIZAMON et al., 1994; PITCOVSKY et al., 2002; BUSCHIAZZO et al., 2012).

A superfamília gp85/TS compreende glicoproteínas ancoradas à glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo apenas uma parte dos genes codificadores responsável pela geração de peptídeos com atividade enzimática, porém o processo de invasão celular não necessita da sua ação catalítica (EPTING et al., 2010). A TS realiza a transferência de ácido siálico ligado a glicoconjugados nas células do hospedeiro (α -2,3 sialilados) para GPI-mucinas presentes na membrana de *T. cruzi*. Ocorre a sialilação de resíduos de galactose ligados a N-acetil-glucosamina e resíduos de serina/treonina na GPI, propiciando a proteção do parasita contra a resposta imune do hospedeiro e favorecimento da adesão celular, já que o ácido siálico não é produzido comumente por *T. cruzi* e constitui uma molécula natural do hospedeiro (MENDONÇA-PREVIATO, 2010; GIORGI; LEDERKREMER, 2011).

Além disso, o processo de sinalização via TS é essencial para um processo adequado de formação do vacúolo parasitóforo e impede o escape antecipado do parasito para o citoplasma (LEY et al. 1990; HALL et al. 1992; LOPEZ et al. 2002). O escape da resposta imune inata é associado à supressão da atividade protetiva Th1 através da atividade inibitória sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias. Siglecs E (lectinas semelhante à imunoglobulinas ligadas a ácido siálico) presentes em células dendríticas reconhecem GPI sialiladas na superfície do parasita, inibindo a síntese de IL-12 por macrófagos por um processo de sinalização cruzada (PILLAI et al., 2012; JACOBS et al., 2010). A TS liberada para o meio ainda pode induzir a apoptose de timócitos e ativação de linfócitos do padrão Th2, além de induzir a morte programada em linfócitos por processo de resialilação. O processo de sialilação e resialilação de aceptores glicoproteicos em linfócitos pode promover a proliferação de linfócitos T CD4+ mediante a interação da TS com CD43, com produção de citocinas do padrão Th2. Os mecanismos de ação da TS liberada no meio ainda não estão claros, porém pesquisas recentes mostram que um domínio altamente conservado denominado FLY contido em peptídeos de ligação à célula pertencente às proteínas da família das TS podem desempenhar variadas ações

que culminam na sobrevivência do parasito no hospedeiro (DOS REIS, 2011).

Em associação com a trans-sialidase ancorada à GPI-mucinas na superfície de *T. cruzi* ocorre uma fosfolipase específica denominada fosfatidilinositol-fosfolipase C (PI-PLC) que cliva a ancoragem da TS, liberando-a para o meio (MORTARA et al., 2001). Esta forma livre da peptidase induz trombocitopenia e eritropenia agravando a patologia e além de ser responsável por algumas alterações imunológicas descritas anteriormente, como ativação de linfócitos e apoptose de timócitos (PITCOVSKY et al., 2001; BUSCAGLIA et al., 2006).

A proteína sinaptotagmina VII, membro da família sinaptotagmina, possui domínio de ligação aos íons cálcio que possibilita a mobilização de Ca^{2+} durante o processo de internalização do parasito (CALER et al., 2001; YOSHIDA, 2006). A oligopeptidase B (Opb), uma endopeptidase expressa nas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, tem a capacidade de ativar a cascata de sinalização de íons cálcio dependente de PLC e IP_3 (BURLEIGH, ANDREWS, 1995; RODRÍGUEZ et al., 1996). Outras moléculas também participam do processo de invasão celular, como a cruzipaina, uma cisteína proteinase expressa em todas as formas evolutivas do parasito que também realiza a ativação da cascata para mobilização de Ca^{2+} (PAIVA et al., 1998).

Foi mostrado por Tribullati *et al.* (2005) que camundongos infectados por *T. cruzi*, rapidamente desenvolvem trombocitopenia e anemia, parcialmente relacionada à liberação de TS no sangue, a qual realiza a depleção de ácido siálico plaquetário.

Outra via sinalizadora envolve o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) que é uma citocina que além de desempenhar funções relativas à regulação da resposta imune, está ativa na embriogênese e no processo de remodelamento da matrix extracelular e angiogênese. Experimentos com células epiteliais pulmonares deficientes para receptores para TGF- β demonstraram resistência à infecção por *T. cruzi* (MING et al., 1996). Além disso, Waghbi e colaboradores (2007) mostraram que o bloqueio farmacológico de TGF- β com SB-431542 pode ser uma nova ferramenta terapêutica para o controle de infecção de células miocárdicas por *T. cruzi*.

Estudos *in vitro* da interação parasito com o hospedeiro não pode ser totalmente extrapolado para os alvos celulares da infecção humana. Isto é importante no que concerne a infecção chagásica humana, sendo que ainda é prevalente a discussão de qual o mecanismo chave que ocorre no processo de invasão em células fagocíticas e fagocíticas não profissionais (BARBOSA, 1999). Embora se tenha uma literatura vasta sobre o tema, ainda permite muita análise e discussão.

1.3 Ativação da adenilato ciclase e AMPc.

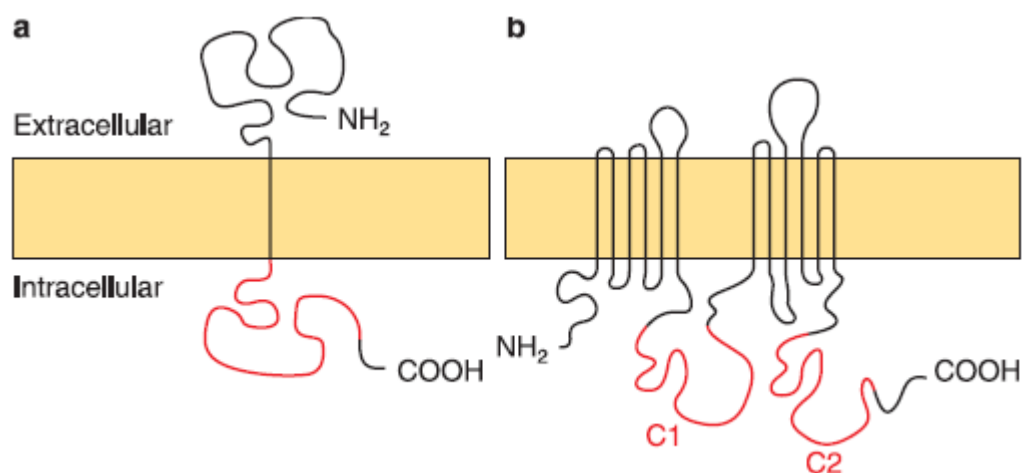
O AMPc é um segundo mensageiro comum na transdução de sinais via interação receptor-ligante com importante papel sobre a regulação da proliferação e diferenciação celulares, regulação hormonal, transdução de sinais sensoriais, além de estar relacionado ao mecanismo fisiopatológico de várias patologias (KASAI et al., 2010). Sua síntese é controlada majoritariamente pela ação de um tipo de enzimas ligadas à membrana plasmática de células eucariotas, a adenilato ciclase (AC), utilizando adenosina trifosfato (ATP) como substrato (DIEL et al., 2008).

A AC está ligada a uma classe de proteínas heptahelicoidais transmembrana, denominadas proteínas G de cunho estimulatório (Gs) ou inibitório (Gi). Pode ser ativada por vários mediadores, entre eles prostanoídes (PGE₂ e PGI₂), alguns hormônios, catecolaminas e peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (PAVAN et al., 2009). A geração de AMPc pode ser regulada negativamente pela atividade de fosfodiesterases (PDEs) que clivam o segundo mensageiro a 5'-adenosina monofosfato (5'-AMP). A principal proteína ativadora da via é a proteína quinase A (PKA) que realiza o aumento da taxa de produção de AMPc via adenilato ciclase além de ativar canais iônicos específicos (PIDOUX; TASKÉN, 2010; GLOERICH; BOS, 2010).

A AC foi purificada da membrana plasmática de formas epimastigotas de *T. cruzi* e descrita primeiramente há algumas décadas por Zingales *et al.* (1979). Dois genes e um pseudogene estão associados a proteína, além disso foi caracterizado que proteínas da estrutura flagelar de *T. cruzi* ativam a AC e que esta aumenta a mobilização de íons cálcio de forma dose-dependente (D'ANGELO et al., 2002; TAYLOR et al., 1999). Esses dados sugerem que tanto o AMPc quanto o

aumento intracelular de Ca^{2+} estão envolvidos no processo de diferenciação do parasita (LAMMEL et al., 1996), podendo estar relacionado com o processo de invasão de formas tripomastigotas em células hospedeiras, embora este processo ainda necessite de maiores investigações.

Figura 3 – Estrutura da adenilato ciclase de *T. cruzi* a) e de mamíferos (b). Região catalíticas em vermelho com regiões homólogas em C1 e C2.



Fonte: NAULA; SEEBECK, 2000.

A AC de tripanossomatídeos apresenta-se como uma proteína ancorada à membrana plasmática com a porção amino-terminal no meio extracelular e a carboxi-terminal no citoplasma. Embora muitas diferenças na sequência global da proteína, a ciclase de tripanosomatídeos e mamíferos tem alto grau de conservação em seu domínio catalítico (NAULA; SEEBECK, 2000).

A descrição da via de transdução de sinal dependente de AMPc em tripanosomatídeos revela a regulação negativa que o segundo mensageiro opera na proliferação celular. Desta forma, o aumento de AMPc intracelular inibe a síntese de proteínas, RNA e DNA. Em adição, desempenha papel importante na diferenciação de formas de *T. cruzi*, com aumento significativo dos seus níveis durante a transição de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas (TM). Durante a diferenciação para as formas amastigotas no hospedeiro, a ligação do parasito à fibronectina na membrana é concomitante ao aumento intracelular de AMPc. Além disso, foi observado AMPc na urina do triatomíneo *Rodnius prolixus*. No entanto, o entendimento sobre o mecanismo biológico completo do sinal envolvendo AMPc e *T.*

cruzi ainda não está totalmente esclarecido (NAULA; SEEBECK, 2000).

O recrutamento e fusão de lisossomos é uma via essencial para a invasão de *T. cruzi* na célula hospedeira. Essa mobilização é dependente do aumento do fluxo de cálcio no retículo endoplasmático e proveniente de acidocalciosomas. Tal mobilização de íons cálcio é prioritariamente mediada por oligopeptidase B (*opb*). Caler *et al.* (2000) mostraram que a deleção do gene OPB prejudicou a internalização do parasito e que o aumento de AMPc pode alterar positivamente a invasão como uma forma alternativa mediante a ausência de OPB. Além disso, a exocitose de lisossomos disparados por íons cálcio está relacionado com o aumento do AMPc intracelular durante a interação parasito e célula hospedeira (RODRIGUEZ *et al.*, 1999).

Morris *et al.* (1992) descreveram a alteração do metabolismo do AMPc em células endoteliais humanas infectadas por *T. cruzi*. A infecção resultou em aumento de 60% na produção de AMPc enquanto que o controle não infectado teve 100% de ativação da via após o tratamento com inibidores de fosfodiesterases. Já em 1984, Wirth e Kierzenbaum, utilizando análogos do AMPc induziram efeitos inibitórios na relação parasito e célula hospedeira, sendo que em macrófagos de camundongos Swiss ocorreu redução na porcentagem de tripomastigotas internalizados.

O aumento de AMPc intracelular durante internalização do parasito parece estar relacionado com a interação de gp35/50 com a célula hospedeira, no entanto esta glicoproteína de membrana é característica de cepas pouco virulentas de *T. cruzi* (FERREIRA *et al.*, 2006; MAEDA; CORTEZ; YOSHIDA, 2012), o que não pode ser suficiente para desclassificar a sinalização via adenilato ciclase como um mecanismo eventual do processo invasivo por mobilização de íons cálcio, além da modulação da resposta pós infecção.

Talvani *et al.* (2008) mostraram que macrófagos murinos estimulados com GPI-mucinas de *T. cruzi* reduziram a liberação de NO e da quimiocina CCL2 mediante o aumento de AMPc intracelular, assim a modulação dos níveis de AMPc poderia controlar significativamente a liberação de mediadores inflamatórios durante a infecção por *T. cruzi*. Outros autores mostraram que a inibição da expressão de iNOS ao nível proteico por inibidor de GLP-1 (peptídeo 1 semelhante ao glucagon)

em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS é dependente da ativação da via AMPc/PKA (CHANG et al., 2013).

Feng *et al.* (2000) mostraram que substâncias que aumentam os níveis de AMPc, tais como toxina colérica (CTx) e 8-Bromo-AMPc inibiram a expressão gênica de IL-12, IL-1a e IL-6, mostrando o efeito inibitório da via, mas que esse efeito pode ter sido em parte contribuído pelo aumento da expressão de IL-10 e IL-1Ra em macrófagos peritoneais estimulados com LPS. Desta forma, a inibição da síntese de prostaglandinas poderia diminuir a atividade da AC, favorecendo a uma menor concentração de AMPc intracelular.

Diversos trabalhos têm demonstrado que o aumento do AMPc redireciona a produção de citocinas em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo (LPS) (BENBERNOU et al., 1997; EIGLER et al., 1998; MEISEL et al., 1996; VAN DER POUW KRAAN et al., 1995). Além disso, indutores de AMPc e seus derivados nucleotídicos tem demonstrado a diminuição da produção de IL-12 e TNF- α em macrófagos murinos previamente estimulados (EIGLER et al., 1998; KAMBAYASHI et al., 1995a, b; PANINA-BORDIGNON et al., 1997; VAN DER POUW KRAAN et al., 1995). Outros achados revelam que o efeito inibitório sobre a produção de TNF- α estaria relacionado com o aumento da síntese de IL-10 mediante a sinalização por AMPc (SELDON et al., 1998; STRASSMANN et al., 1994), no entanto a modulação sobre IL-12 ainda permanece obscura.

Feng *et al.* (2002) mostraram que substâncias que aumentam os níveis de AMPc em macrófagos murinos estimulados com LPS inibiram a expressão de IL-12p40 através da interferência na fosforilação de p38 MAPK, revelando que a ligação do promotor de IL-12p40 a NFkB não foi alterada significativamente.

A utilização de inibidores de PDE, substância que aumenta os níveis de AMPc, controlam mais eficientemente as citocinas do padrão Th1, como IL-2 e IFN- γ , do que as do padrão Th2, principalmente IL-4 e IL-5. A elevação do AMPc em PBMC decorrente do emprego destes inibidores suprimiu os níveis das citocinas do padrão Th1, sem qualquer efeito pronunciado no padrão de resposta Th2 (YOSHIMURA et al., 1998).

Além disso, culturas de PBMC primados com antígeno de *T. cruzi*

estimulam o aumento da síntese de IL-12 que propicia a produção de citocinas do padrão Th1 por linfócitos T, e INF- γ por células NK e linfócitos CD₄⁺. Ocorre também a modulação da resposta por IL-12, através da indução de IL-4 em linfócitos T, além do aumento de IL-10, executando um a retroalimentação negativa para controlar infecção por *T. cruzi* e amenizar a irrestrita ativação do perfil Th1 (DE-BARROS-MAZON et al., 1997). Em adição, o emprego de análogos de PGI₂, ativadores da AC, suprime a secreção de TNF- α em células THP-1 (WANG et al., 2011).

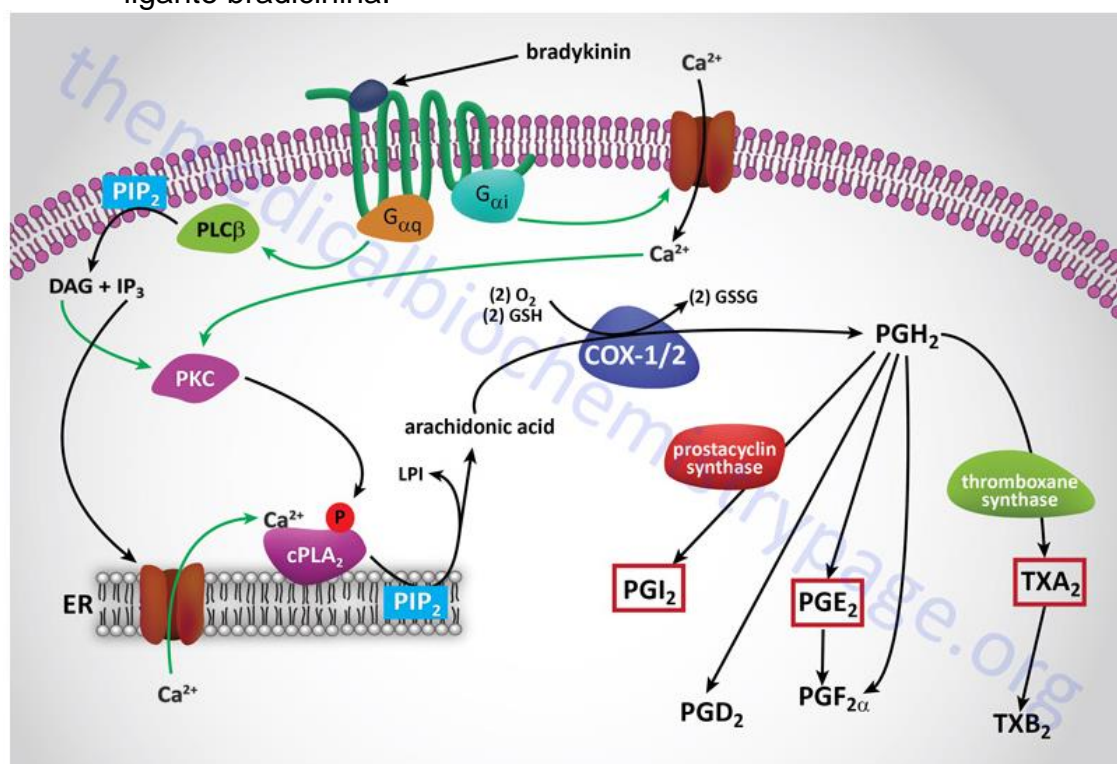
Muitos são os efeitos biológicos desempenhados pela via AC/AMPC sobre *T. cruzi* e as células do hospedeiro, revelando uma nova alternativa de investigação de novas terapêuticas que podem auxiliar no controle da infecção e redução de comorbidades associadas à doença de Chagas.

1.4 Metabolismo do Ácido Araquidônico.

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo poli-insaturado composto de 20 átomos de carbono, o qual é substrato para a via enzimática das ciclooxigenases (COXs), que propicia a síntese de prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs), e das lipoxigenase (LOs) desencadeantes da síntese de leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LXs), ácidos hidroieicosatetraenóico (HETE) e ácido hidroperoxieicotetraenóico (HPETE), e a via do citocromo P-450 monoxigenase, ativadora da síntese de epóxidos e ácidos hidroieicosatetraenóico (NARABA et al., 1998; TAKAHASHI et al., 2005).

As COXs apresentam duas atividades catalíticas: 1) de ciclooxigenase, a qual oxida o AA à prostaglandina G₂ (PGG₂) e 2) de peroxidase que reduz PGG₂ à prostaglandina H₂ (PGH₂) que é instável e logo é alvo de isomerases e sintases tecido específicas em prostanóides, sendo estes as prostaglandinas (PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α}), prostaciclina (PGI₂) e tromboxano A₂ (TXA₂) (SERHAN et al., 2008).

Figura 4 – Representação do metabolismo do ácido araquidônico e a atividade das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) através da iniciação promovida pelo ligante bradicinina.



Fonte: <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/eicosanoids-sp.php>

Os prostanoides apresentam tanto atividade em processos fisiológicos quanto patológicos. Prostaglandinas (PGD_2 e PGE_2) e prostacilinas são vasodilatadores, enquanto que TXA_2 desempenha propriedades vasoconstritoras, além de induzir a agregação plaquetária, processo inverso é induzido por PGI_2 . PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGI_2 controlam a secreção ácida no estômago e induz a secreção de muco para proteger a mucosa do órgão, além da secreção de íons bicarbonato para controle da acidez estomacal. $\text{PGF}_{2\alpha}$ e TXA_2 são broncoconstritores, $\text{PGF}_{2\alpha}$ ainda efetiva contração da musculatura uterina, e TXA_2 promove aumento da permeabilidade vascular levando ao edema local. Além disso, PGE_2 e PGI_2 estimulam o fluxo sanguíneo e assim, a diurese (GRISWOLD et al., 1996; VANE et al., 1990).

Durante processo inflamatório em eminência de algum distúrbio patológico a geração de mediadores prostanóides intensifica suas funções fisiológicas contribuindo para o aumento do fluxo sanguíneo local (rubor), aumento da permeabilidade vascular e assim, edema tecidual, além de redução do limiar de dor, com ativação de fibras sensoriais periférica e presença de febre (SAMAD et al.,

2002).

As COX 1 e 2 estão melhor caracterizadas, sendo que COX-1 é constitutivamente sintetizada na maioria dos tecidos, incluindo feto, epitélio uterino e células amnióticas. Está envolvida na agregação plaquetária, hemostasia e homeostasia do trato digestório e renal (TRAUTMAN et al., 1996). Já a COX-2 é constitutiva nos rins, cérebro, ovários, próstata e útero, sua expressão é aumentada ou induzida em processo inflamatório condicionado a participação de mediadores como TNF- α , IL-1, LPS e TPA. Por sua síntese ser intensificada pelo processo inflamatório, COX-2 tem papel importante na geração de prostanoídes (BLOBAUM et al., 2007; CHOI et al., 2009; CROFFORD et al., 2000; VANE et al., 1998).

1.5 Via das Ciclooxygenases.

As COX 1 e 2 de mamíferos contém alto grau de homologia de suas sequências de aminoácidos (cerca de 65%) na mesma espécie e até 90% de identidade entre as isoformas individuais de diferentes espécies (GARAVITO et al., 1999; SMITH et al., 1996; SPENCER et al., 1999). São proteínas integrais de membrana contendo um grupamento heme em seu sítio catalítico. A COX-1 está localizada na superfície do retículo endoplasmático enquanto que a COX-2, principalmente no envoltório nuclear (MORITA et al., 1995). Suas estruturas tridimensionais foram determinadas por difração de raios-X, sendo que ambas se apresentam como homodímeros, com cada monômero compreendido por três unidades dobradas entre si:

- 1) um domínio N-terminal ligado ao fator de crescimento epidermal (EGF);

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

- 3) um grande domínio catalítico globular C-terminal com sítio ativo da enzima, os quais acomodam o substrato ou um inibidor e uma peroxidase que detém o grupamento heme. O sítio ativo da COX é similar em ambas isoformas (LUONG et al., 1996; SMITH, SONG, 2002), consistindo de um longo e estreito canal hidrofóbico que se estende desde a ancoragem da membrana até o sítio catalítico (KURUMBAIL

et al., 1996; PICOT et al., 1994).

O sítio de ligação do ácido araquidônico está localizado no meio superior do canal, entre Arg-120 e Tyr-385. A aspirina, inibidor preferencial de COX-1, realiza a acetilação da Ser-530 no meio do canal (LOLL et al., 1995). Embora vasta semelhança estrutural, o sítio ativo da COX-2 é cerca de 20% maior que a COX-1, além de discretas diferenças no tamanho e na forma do seu sítio ativo, decorrente de variações na sequência de dois aminoácidos (GARAVITO et al., 2002).

1.6 Prostanoides e Doença de Chagas

As prostaglandinas são imunomoduladores potentes e contribuem para a imunossupressão observada durante a infecção por *T. cruzi* (PINGE-FILHO et al., 1999). A descoberta de que tripanossomatídeos produzem PGs indica que estes mediadores desempenham alguma função na patogenia da doença de Chagas (KUBATA et al., 2007). Somando-se à afirmativa anterior, o efeito supressor de PGE₂ / TGF-β sobre a síntese de citocinas pró-inflamatórias poderia criar um microambiente favorável para a multiplicação do parasito no interior de macrófagos (FADOK, et al., 1998).

Vários grupos de pesquisa tem sugerido que o papel das prostaglandinas está em regular a resposta imunológica do hospedeiro contra o parasito, permeando a transição da fase aguda para a cronicidade (KRISTENSSON et al., 2010; PINGE-FILHO et al., 1999; STERIN-BORDA et al., 1996). No transcorrer da fase aguda foi demonstrado que PGE₂ modula a virulência de algumas cepas de *T. cruzi*. A cepa não letal, K98-2, provocou aumento dos níveis de PGE₂ circulante, o que não foi verificado em cepas letais, RA (CELENTANO et al., 1995). Além disso, foi demonstrado que a inibição da COX aumentou a mortalidade de camundongos infectados com a cepa K98-2 de *T. cruzi*, mas a administração de PGE₂ não melhorou a sobrevivência em camundongos infectados com a cepa RA.

Oliveira *et al.* (2010) verificaram que PGE₂ liberada de monócitos polariza a resposta imune para o padrão Th1, controlando a parasitemia, e que também pode ser liberada a partir de macrófagos ativados e linfócitos T CD8⁺. A

liberação de PGE_2 também é importante na supressão de $TNF-\alpha$ e linfoproliferação no hospedeiro, tanto humano quanto no modelo animal (BORGES et al., 1998; DE-BARROS-MAZON et al., 2004; PINGE-FILHO et al., 1999), e a inibição da sua síntese, reduz o número de ninhos de parasitos, infiltrado leucocitário e fibrose miocárdica, durante a evolução chagásica aguda (ABDALLA et al., 2008).

No transcorrer da fase aguda da infecção por *T. cruzi*, ocorre aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e mediadores lipídicos, o que é essencial para a sobrevivência do hospedeiro durante a fase aguda da infecção (BORGES et al., 2009; TATAKIHARA et al., 2008). O plasma de animais infectados, a partir do décimo dia pós-infecção, apresentaram aumento nos níveis de $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 , PGE_2 e TXA_2 quando comparados com animais controles (TANOWITZ et al., 1990; PINGE-FILHO et al., 1999; CARDONE, ANTUNEZ, 2004).

O prostanoide TXA_2 liberado de *T. cruzi* parece auxiliar na sobrevivência do hospedeiro durante a fase aguda e na transição para a fase crônica (ASHTON et al., 2007). A trombocitopenia frequente na fase aguda inibe a ação tripanocida direta das plaquetas, produtoras de TXA_2 , e assim, elucida um mecanismo de escape do parasito (MOMI et al., 2000; TANOWITZ et al., 1990).

TXA_2 também apresenta propriedades imunossupressivas, constatada em camundongos nocautes para o receptor de TXA_2 que apresentaram aumento de infiltrado inflamatório e da carga parasitária no miocárdio (ASHTON et al., 2007). Em contraste com outros prostanóides, somente os níveis de TXA_2 estão elevados na fase crônica (CARDONI, ANTUNES, 2004). Nesta fase, TXA_2 promove dano tecidual especialmente no miocárdio, podendo aumentar a progressão da cardiomiopatia chagásica levando a falência do órgão. Isto foi constatado experimentalmente quando camundongos na fase crônica da infecção e tratados com aspirina, apresentaram melhora da função cardíaca. Desta forma, a secreção de tromboxanos parece controlar a iniciação de uma resposta imune adaptativa pelo hospedeiro e promove um melhor controle na proliferação de parasitos (ASHTON et al., 2007; KABASHIMA et al., 2003).

Prostanoides podem contribuir para o remodelamento do tecido cardíaco e alterações funcionais do coração após infecção por *T. cruzi*. Assim, a inibição da COX do hospedeiro tem um potencial terapêutico evidente (MOLINA-

BERRIOS et al., 2013), no entanto vários estudos utilizando diferentes anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) para determinar o papel de prostanóides no controle da carga parasitária e resistência à infecção por *T. cruzi* são discrepantes (CELENTANO et al., 1995; FREIRE-DE-LIMA, 2000; PINGE-FILHO et al., 1999; TATAKIHARA et al., 2008).

1.7 Infecção por *Trypanosoma cruzi* e AINES.

A função de prostaglandinas como mediadores da regulação imunológica foi proposta por PHIPPS *et al.* (1991), a partir disto o comportamento específico de diferentes prostanóides e ciclooxigenases na patogenia e fisiologia da resposta imunológica passou a ser alvo de maior investigação (HARRIS et al., 2002).

A inibição de COXs com AINES reduz a febre que é causada por processo inflamatório infeccioso através da inibição da geração de PGE₂ via COX-1. PGE₂ é um importante mediador na ativação do centro regulador da temperatura localizado no hipotálamo, sendo que altos níveis desta prostaglandina em estados inflamatórios e infecciosos estão relacionados ao aumento da temperatura corporal, sem excluir as ações mediadas por citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 (FERREIRA et al., 1971; RODRIGUES, 1992).

A definição das variantes isotípicas de COXs e sua contribuição no processo fisiológico de controle da homeostase e no processo inflamatório elencaram novos alvos terapêuticos e viabilizaram novas temáticas a serem investigadas. A descoberta da COX-3 (BOTTING; AYOUB, 2005) e da COX-4 (SIMMONS; BOTTING, 2004), e as possíveis diferenciações entre COX-1a e COX-1b, entre COX-2a, COX-2b e COX-2c, e ainda COX-3 com seus subtipos alfa e beta, contribuíram para os avanços no estudo da relação estrutura atividade de AINEs já utilizados na clínica, assim propiciaram a produção de moléculas mais seletivas.

Em estudos prévios nossa equipe avaliou efeitos de diferentes AINES sobre o curso da infecção experimental por *T. cruzi* (Cepa Y)(PINGE-FILHO et al., 1999, HIDEKO TATAKIHARA et al., 2008). Utilizando camundongos BALB/c e C57BL/6 (modelos de susceptibilidade e resistência à infecção para a Cepa Y,

respectivamente), mostramos que o bloqueio farmacológico da produção de PGs com os inibidores não seletivos para COX-1/COX-2 e seletivos para COX-2, provocaram o aumento da parasitemia dos camundongos C57BL/6 e mortalidade de 100% no décimo segundo dia de infecção. Em relação aos camundongos BALB/c, o tratamento com celecoxibe (inibidor seletivo de COX-2) aumentou a parasitemia enquanto que o tratamento com indometacina ou aspirina (inibidores não seletivos para COX) provocou uma tendência de redução nos níveis de parasitemia, mas não foi capaz de aumentar a sobrevivência dos mesmos.

A análise histopatológica do tecido cardíaco de grupos experimentais e controles revelou a existência de um aumento no número de ninhos de amastigotas no coração de camundongos C57BL/6 infectados que foram tratados com aspirina (ASA) ou com celecoxibe (12º dia pós-infecção). Foi constatado ainda que o uso de AINES provocou um aumento significativo no número de ninhos de parasitos no coração dos camundongos BALB/c em comparação aos camundongos controles (infectados e não tratados) (TATAKIHARA et al., 2008).

As curvas de sobrevivência dos camundongos C57BL/6 e BALB/c mostraram que o tratamento com indometacina provocou a morte de 100% dos camundongos C57BL/6 precocemente (12º dia de infecção) (MALVEZI et al., 2004, HIDEKO TATAKIHARA et al., 2008), mas não foi capaz de modificar a taxa de mortalidade dos camundongos BALB/c (100%, no 28º dia de infecção). O bloqueio preferencial da COX-2 com celecoxibe aumentou a carga parasitaria significativamente e provocou a morte dos camundongos C57BL/6, mas não alterou o curso da infecção em camundongos BALB/c tratados (HIDEKO TATAKIHARA et al., 2008).

A terapêutica disponível atualmente para a amenização dos sinais clínicos da doença de Chagas ainda não permite a cura apresentando inúmeros efeitos colaterais, Várias cepas de *T. cruzi* não respondem aos fármacos utilizados atualmente, necessitando desta forma de novos agentes tripanocidas (CERECETTO, GONZALEZ, 2002), de inibidores de internalização das formas tripomastigotas metacíclicas ou moduladores da resposta imune contra o parasito.

1.8 Papel do óxido nítrico na doença de Chagas.

O óxido nítrico (NO) tem sido objeto da investigação científica desde a descoberta de seus efeitos biológicos (FURCHGOT, ZAWADSKI, 1980). Um grande número de células constituintes do sistema imune sintetiza e responde ao NO, tais como: células dendríticas, células NK, mastócitos, monócitos, micróglia, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, além de outras células relacionadas aos processos imunes, como células endoteliais e epiteliais, condrócitos e células de Schwan (BOGDAN, 2001; COLEMAN, 2001).

A síntese de NO é realizada através da ação de um conjunto de enzimas, denominadas de óxido nítrico sintase (NOS), que desaminam a L-arginina para liberar o NO, com produção de L-citrulina, na presença de NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio), íons cálcio e ânion superóxido (O_2^-) (BLOODSWORT et al., 2000; MULLIGAN, HEVEL, MARLETTA, 1991).

As isoformas de NOS diferem quanto a sua regulação, duração da produção de NO e sua distribuição tecidual e celular (MACMICKING et al., 1997; STUEHR, NATHAN, 1989). São agrupadas em sintase do óxido nítrico induzível (iNOS), sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS) e sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), sendo as duas últimas classificadas como constitutivas (cNOS), decorrente da sua baixa síntese do óxido nítrico no sistema nervoso central (SNC) e endotélio vascular, respectivamente (BLOODSWORT et al., 2000; MONCADA et al., 1991; PALMER et al., 1998).

A expressão da iNOS é regulada por citocinas e determinada primariamente pela síntese do RNAm (CARPENTER et al., 2001; MACMICKING et al., 1997; RODRIGUEZ-PASCUAL et al., 2000). Já as cNOS estão nas células como proteínas pré-formadas e sua atividade é modulada pela liberação de Ca^{2+} ligado à calmodulina em resposta a neurotransmissores ou aminas vasoativas (STUEHR, 1999). Já a iNOS catalisa a conversão de arginina em citrulina, liberando NO, que pode combinar com O_2^- gerando peroxinitrito ($ONOO^-$) que é altamente reativo. O peroxinitrito além de seu potencial no processo de lipoperoxidação é molécula chave do processo microbicida de várias infecções microbianas (DE GROOTE, FANG,

1984).

Muitos são os fatores de transcrição operantes no aumento da expressão de iNOS, tais como NF κ B, AP-1, STAT1 α , IRF-1 e NF-IL-6 (GANSTER et al., 2001; MACMICKING et al., 1997). A expressão de iNOS parece estar associada a um mecanismo de retroalimentação de acordo com a quantidade de NO sintetizado (CONNELLY et al., 2001; UMANSKY et al., 1998). Além disso, iNOS pode ter sua degradação aumentada por via proteassomal, assim como cNOS, por mecanismo supressor dependente de TGF- β , comprovando sua modulação frente a citocinas específicas (MACMICKING et al., 1997; FELLE-Y-BOSCO et al., 2000; MUSIAL, EISSA, 2001; NOGUSHY et al., 2000).

Concentrações fisiopatológicas de NO produzido durante a fase inicial da infecção aguda por *T. cruzi* podem participar da morte dos parasitos nos macrófagos através de mecanismos NO-dependentes (VESPA et al., 1994). E assim, a modulação farmacológica da resposta imune contra *T. cruzi* através do controle dos níveis de NO tem sido aceito como alvo terapêutico (MAYA et al., 2007). Além disso, o emprego de indutores da iNOS, de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, aumentaram a produção de NO por cardiomiócitos e o controle do crescimento parasitário, demonstrando que o NO exerce atividade tripanocida no tecido cardíaco de camundongos infectados por *T. cruzi* (MACHADO et al., 2000).

Dados obtidos por nosso grupo de pesquisa mostraram que a anemia que se desenvolve em camundongos C57BL/6 infectados por *T. cruzi* (cepa Y) é independente de NO, sendo a supressão da medula óssea atribuída a ação de citocinas como TNF- α e IFN- γ (MALVEZI et al., 2004). Além disso, foi demonstrado que o uso de inibidores de prostaglandinas ou o bloqueio de TNF- α provocaram aumento de reticulócitos no mesmo isotipo de camundongo e que esse aumento ocorre no momento de maior supressão (14^o dia pós-infecção) e que o mesmo foi revertido pelo bloqueio da produção de NO com aminoguanidina, bloqueador de iNOS (MALVEZI et al., 2004; HIDEKO TATAKIHARA et al., 2008).

A principal atividade tripanocida exercida por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c é exercida por aumento da produção de óxido nítrico nas células tratadas com inibidores de COXs (MALVEZI et al., 2014). No entanto, macrófagos de camundongos C57BL/6 tiveram aumento na produção de NO apenas

quando tratados com inibidor preferencial de COX-2, o que demonstra a importância do padrão de resposta imunológica Th-1 no controle da patologia (HIDEKO TATAKIHARA et al., 2008).

Além disso, o composto rutênio doador de NO em doses específicas conseguiu eliminar ninhos de amastigotas no tecido cardíaco de camundongos, através da liberação seletiva de óxido nítrico, garantindo a sobrevivência dos animais infectados e provendo nova possibilidade terapêutica (SILVA et al., 2009).

2 HIPÓTESE DE INVESTIGAÇÃO

O entendimento sobre o processo de invasão e ativação de fagócitos mononucleares por *T. cruzi* já galgou inúmeros passos no estabelecimento de mecanismos de internalização e modulação da resposta imune inata. Em modelos murinos a atividade de prostaglandinas, leucotrienos e AMPc tem sido bem caracterizada, embora várias perguntas ainda necessitem de respostas. Macrófagos murinos peritoneais estimulados com LPS *in vitro* e tratados com indutores de AMPc inibiram a expressão de IL-12p40 de forma independente da indução da síntese de IL-10 (FENG et al., 2002). Além disso, o emprego de inibidores de AMPc aumentaram a atividade de IL-12, sem promover alterações significativas para TNF- α , presumivelmente devido a síntese *de novo* da proteína, possivelmente devido síntese de IL-10 (PROCÓPIO et al., 1999). Mesmo no modelo murino, já bem caracterizado, a imunomodulação do hospedeiro infectado por *T. cruzi* e outros estímulos microbianos através da via do AMPc e prostanóides necessita de maiores investigações visando espaço para novas alternativas para o controle da infecção por *T. cruzi*.

2.1 Objetivo Geral

Desta forma, é do nosso interesse avaliar os efeitos combinados de inibição da produção de prostanoides e AMPc sobre a infecção de monócitos humanos pelo protozoário *T. cruzi* (Cepa Y).

2.2 Objetivos Específicos

1. Compreender os efeitos da inibição de AMPc e de ciclooxigenases (COX 1 e 2) sobre a produção de NO, IL-10 e IL-12 por monócitos humanos infectados por *T. cruzi* (Cepa Y).
2. Testar a hipótese de que o c-AMP é um modulador da ativação e invasão de fagócitos mononucleares humanos por *T. cruzi* e está sujeito às ações de mediadores lipídicos e do óxido nítrico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ética e biossegurança

Os protocolos para a manutenção da cepa Y de *T. cruzi* e a obtenção de sangue periférico dos voluntários foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEL – processo nº 5492.2012.22) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP/UEL – processo nº 5491/2012) da Universidade Estadual de Londrina.

3.2 Obtenção de monócitos humanos

Os monócitos humanos foram obtidos a partir da cultura *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de doadores voluntários saudáveis. O sangue coletado (aproximadamente 100mL) foi diluído ½ em salina estéril ou tampão fosfato (PBS). Cada 37 mL de sangue foi lentamente adicionado sobre 12 mL de Meio de Separação de Linfócitos (densidade 1,077 g/mL Lonza, Walkersville, MD USA), em tubos cônicos estéreis de 50mL. Após centrifugação (750 g por 20 minutos, a temperatura ambiente) o anel de leucócitos formado na interfase do tampão com o Ficoll foi recuperado e submetido a três lavagens por centrifugação com PBS suplementado com EDTA e BSA (900 g por 10 minutos a 4°C). Na segunda lavagem ao “pellet” foi adicionado 5mL de solução de cloreto de amônio a 5% (NH₄Cl) e mantido no gelo por 5 minutos. Os “pellets” obtidos foram ressuspensos em 5 mL de meio RPMI suplementado com L-glutamina 1%, penicilina-estreptomicina 1%, HEPES 20 mM, soro bovino fetal (SBF 10%, Gibco, BRL) seguido da contagem de células em câmara de Neubauer. As células obtidas foram semeadas (1x10⁶/ml/poço) em meio RPMI com 10% de SBF nas placas de cultura. A seleção de monócitos humanos foi realizada mediante aderência por 24 horas em estufa de CO₂ a 5% e 37°C, sendo as células não aderentes retiradas através da lavagem com PBS morno antes da execução dos tratamentos e infecção.

3.3 Viabilidade celular e análise fenotípica

A viabilidade dos monócitos humanos frente a diferentes tratamentos com ASA durante período de 24 horas foi realizada através da redução do MTT (Sigma-Aldrich®). 8×10^5 PBMCs foram semeadas em placa de 24 poços, com incubação de 24 horas para adesão na placa. Em seguida tratados com ácido acetilsalicílico (ASA) nas concentrações de 10 a 0,1mM e incubados por 24 horas em estufa de CO₂ a 5% e 37°C. Lavados 2x com PBS morno seguido da adição de 2,5mg/mL de solução de MTT e incubados por 2 horas. Ao término da incubação com o MTT, o meio foi substituído por 300µL de DMSO, agitado por 30 minutos, e transferido para placa de 96 poços para leitura em leitor de microplaca a 510nm.

O enriquecimento de monócitos humanos foi realizado com a fenotipagem utilizando anticorpos específicos anti-CD14 por citometria de fluxo (ACCURI®).

3.4 Tratamento de monócitos humanos com ácido acetil salicílico (ASA) e inibidor de adenilado ciclase (SQ 22536)

Os monócitos humanos aderidos em microplaca foram tratados com ácido acetilsalicílico (ASA) 1,25, 0,625 e 0,312mM e incubados por 1 hora em estufa de CO₂ a 5% e 37°C. Então as células foram lavadas 2x com PBS morno e tratadas com inibidor de adenilato ciclase (SQ 22,536 20µM) por 30 minutos. Novamente as células foram lavadas 2x com PBS morno e infectadas com 1×10^6 de formas tripomastigotas de cultura de *T. cruzi* (cepa Y) por 24 horas. Os monócitos forma lavados 2x com PBS morno ao término do período de infecção e incubados com meio RPMI suplementado para monócitos por 24 horas em estufa de CO₂. O sobrenadante de cultura foi armazenado a -80°C até a realização das dosagens de óxido nítrico e citocinas.

3.5 Obtenção de formas tripomastigotas de cultura (TMC) do *T. cruzi* (cepa Y)

Foi utilizado *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) gentilmente cedido pelo Dr. Paulo Araújo do Departamento de Imunologia da Universidade Estadual de Campinas. A cepa Y mantida em camundongos Swiss foi transferida do sangue coletado dos mesmos para garrafas de cultura de 25 cm² contendo uma

monocamada de células LLC-MK₂ (monkey kidney fibroblast cell line) mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, St Louis, USA) suplementado com L-glutamina, L-arginina, piruvato de sódio, penicilina/estreptomicina, gentamicina, tylosin, vitaminas, aminoácidos não essenciais e 5% de SBF.

As culturas mantidas 2 horas a 37°C em 5% de CO₂ seguido da lavagem com PBS morno por quatro vezes para retirada do sangue e a seguir adicionou-se 5 mL de meio RPMI suplementado. As culturas infectadas foram mantidas a 37°C em 5% de CO₂ com troca do meio de cultura a cada 48 horas.

Para utilização das formas TMC o meio de cultura de células LLC-MK₂ foi transferido para tubos cônicos de 15 mL e centrifugados a 450 g por 10 minutos para retirada dos restos celulares. A seguir o sobrenadante foi transferido para outro tubo estéril de 15 mL e centrifugado 30 minutos a 2.000 g e temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspensionado com 2 mL de meio RPMI suplementado seguido de contagem das formas viáveis em câmara de Neubauer. Os parasitos obtidos foram utilizados em diferentes ensaios biológicos.

3.6 Ensaio de internalização de TMC

Índice de internalização. 1×10^6 PBMC obtidos de separação por gradiente de densidade através do Meio de Separação de Linfócitos (densidade 1,077 g/mL Lonza, Walkersville, MD USA) foram semeados em placa de cultura de 24 poços contendo lamínulas redondas. As culturas em triplicatas foram mantidas por 24 h a 37°C em CO₂ para adesão das células. Em seguida as culturas foram lavadas exaustivamente com PBS morno para remoção das células não aderentes. Logo em seguida, as culturas foram tratadas com ASA e mantidas por 1 hora a 37°C em atmosfera rica em CO₂. A seguir, as culturas eram lavadas por 3 vezes com PBS morno e incubadas na presença de 1×10^6 formas tripomastigotas de cultura celular de *T. cruzi* (cepa Y, razão 5:1). 24 horas depois, as culturas de monócitos humanos foram submetidas ao processo de lavagem com PBS morno (3x). Os experimentos com inibidor de adenilato ciclase (SQ) seguiu tratamento por 30 minutos após os com ASA. Depois das lavagens, as lamínulas eram cuidadosamente removidas, colocadas para secar. Após a secagem, as lamínulas foram coradas pelo método de Bouin/Giemsa, montadas com Permount (Fisher Scientific) e analisadas por

microscopia óptica (microcópico Olympus, aumento final de 1000x). O índice de internalização foi calculado com base na contagem de 200 células/lamínula segundo a fórmula: (número de células infectadas/número total de células)x(número total de *T. cruzi*/número de células infectadas).

3.7 Dosagem de IL-10 e IL-12p70

Os níveis de IL-10 e IL12p70 no sobrenadante de cultura de monócitos humanos submetidos a diferentes tratamentos foram quantificados por ELISA, utilizando o kit Elisa-Ready-SET-Go! (Bioscience, San Diego, CA) de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. As absorbâncias foram lidas em leitor de microplaca (Syngiy HT, Biotek) no comprimento de onda de 450nm.

3.8 Dosagem de óxido nítrico (NO)

A concentração de nitrito, indicador indireto da produção de NO, nos sobrenadantes de cultura de monócitos humanos foi determinada pelo método de Griess (STUERHR, NATHAN, 1989). O reagente de Griess (0,1% N-1 Naftil-etilenediamina e 1% de sulfanilamida em 5% de H₃PO₄) foi adicionado às amostras na proporção de 1:1 (v/v) em placa de 96 poços. Após 5 minutos a temperatura ambiente, a absorbância foi medida em leitor de microplaca (Syngiy HT, Biotek) a 550nm e os resultados expressos em micromolar de acordo com uma curva padrão de NaNO₂ (100-0µM) montada a cada leitura.

3.9 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa GraphPad (San Diego, CA). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. Análise de variância ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonfferoni, considerando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo: Cyclic AMP and cyclooxygenase pathway in the regulation of anti-*Trypanosoma cruzi* activity by human monocytes.

Elsevier Editorial System(tm) for Chemo-
Biological Interactions
Manuscript Draft

Manuscript Number:'

Title: Crosstalk between adenylate-cyclase and cyclooxygenase-1 pathway
in the regulation of anti-*Trypanosoma cruzi* activity by human monocytes

Article Type: Research paper

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Aspirin; Cell invasion; SQ 22536; Cytokines;
Nitric oxide

Corresponding Author: Prof. Phileno Pinge-Filho, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Universidade Estadual de Londrina

First Author: Rafael C de Freitas, Master

Order of Authors: Rafael C de Freitas, Master; Sandra C Heim Lonien,
Master; Aparecida D Malvezi, Ph.D; Guilherme F Silveira, Ph.D; Priscilla
F Wowk, Ph.D; Rosiane V da Silva, Ph.D; Lucy M Yamauchi, Ph.D; Sueli F
Yamada-Ogatta, Ph.D; Luiz V Rizzo, Ph.D; Juliano Bordignon, Ph.D;
Phileno Pinge-Filho, Ph.D

Abstract: Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* and its intracellular
replication are essential for progression of the parasite life cycle and
development of Chagas disease. We demonstrated here that aspirin, a
pharmacological antagonist for cyclooxygenase-1, caused inhibition of *T.*
cruzi infection in human monocytes. The treatment of monocytes with SQ
22536, an adenylate-cyclase inhibitor, restored the invasiveness of *T.*
cruzi. This reestablishment was associated with a decrease of nitric
oxide (NO), PGE2 production, and an increase of IL-10 and IL-12 by cells
pre-treated with aspirin. Altogether, these results support the idea that
the cyclooxygenase-1 pathway plays a fundamental role in the process of
parasite invasion, and suggest that aspirin activity depends on cAMP
elevation in *T. cruzi*-infected human monocytes.

Crosstalk between adenylate-cyclase and the cyclooxygenase pathway in the regulation of anti-*Trypanosoma cruzi* activity by human monocytes

Rafael Carvalho de Freitas^a, Sandra Cristina Heim Lonien^a, Aparecida Donizette Malvezi^a, Guilherme Ferreira Silveira^b, Pryscilla Fanini Wowk^b, Rosiane Valeriano da Silva^a, Lucy Megumi Yamauchi^c, Sueli Fumie Yamada-Ogatta^c, Luiz Vicente Rizzo^d, Juliano Bordignon^b, Phileno Pinge-Filho^{a*}

^a*Laboratório de Imunopatologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil*

^b*Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz, Curitiba, 81350-010, Paraná, Brasil*

^c*Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil*

^d*Hospital Israelita Albert Einstein, Avenida Albert Einstein 627-701, Subsolo Bloco A., 05651-901 São Paulo, São Paulo, Brasil*

***Corresponding author at:** Phileno Pinge-Filho, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil. Tel: + 55 43 3371-4267; Fax: + 55 43 3371-4465.

E-mail: pingefilho@uel.br

Abstract

Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* and its intracellular replication are essential for progression of the parasite life cycle and development of Chagas disease. In this study, we explored the role of cyclooxygenase (COX) inhibitor, aspirin, in *T. cruzi* pathogenesis. Aspirin is a non-selective agent that irreversibly inhibits both COX isozymes, COX-1 and COX-2 (though weakly selective for COX-2). We demonstrate the inhibition of *T. cruzi* infection in human monocytes using aspirin. The treatment of monocytes with SQ 22536, an adenylate-cyclase inhibitor, restored the invasiveness of *T. cruzi*. This reestablishment was associated with a decrease in nitric oxide and prostaglandin E₂ production, and an increase of interleukin-10 and interleukin-12 by cells pre-treated with aspirin. Altogether, these results support the idea that the cyclooxygenase pathway plays a fundamental role in the process of parasite invasion, and suggest that aspirin activity depends on cAMP elevation in *T. cruzi*-infected human monocytes.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Aspirin; Cell invasion; SQ 22536; Cytokines; Nitric oxide

1. Introduction

Trypanosoma cruzi is an intracellular parasite that causes Chagas disease, characterized by an inflammatory progressive reaction. In humans, the disease exhibits an acute phase followed by a chronic, lifelong phase. Approximately 30% to 40% patients progress to the symptomatic form and develop heart disease [1]. An estimated 14,000 people worldwide die from the disease each year [2].

During the acute phase, a robust immune response is mounted by the host, which leads to the control of parasitemia. Although the exact mechanism of parasite control has not yet been clarified in humans [3], it is believed that it relies greatly on the function of innate immune cells such as natural killer (NK) cells, neutrophils, and macrophages [4]. *T. cruzi* parasites induce monocytes and macrophages to produce endogenous mediators including cytokines, nitric oxide (NO), and prostaglandin (PG) E₂ (PGE₂) [5-7].

PGE₂ is produced by conversion of arachidonic acid (AA) to PGH₂, catalyzed by either PG endoperoxide H synthase-1 or -2, commonly known as cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2), respectively [8, 9]. The relevance of these enzymes is not well understood in parasitic disease, although the role of eicosanoids in the pathogenesis of Chagas disease has emerged [10-13].

Aspirin (weakly more selective for COX-1 than COX-2), celecoxib (COX-2-specific inhibitor), and indomethacin (nonselective inhibitor of COX-1 and COX-2) have been found to increase mortality and parasitemia (parasite load in peripheral blood and cardiac tissue), regardless of the mouse model or *T. cruzi* strain used [14, 15]. Moreover, evidence suggests that administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) may enhance mortality in mice infected with non-lethal

T. cruzi strain [16]. Effective parasite control probably requires the participation of both, innate and adaptive immune cells that secrete pro-inflammatory cytokines (e.g., interleukin [IL]-12 or interferon [IFN]- γ). Additionally, parasite control also requires naive T cells for the generation of parasite-specific CD4+ and CD8+ effector T cells, which produce Th1 cytokines such as IFN- γ and, in lesser quantities, Th2 cytokines such as IL-4 and IL-10 [7, 17]. This process involves microbicidal effects derived from toxic free radicals (peroxynitrite and superoxide) generated after NO production, as well as regulation/enhancement of the inflammatory response induced during *T. cruzi* infection, a dual role of the immune system that is usually observed with generation of NO [18].

Inhibition of COX-1 and COX-2 reciprocally regulates NO release from M1 and M2 macrophages, which may correlate with resistance to infection [15]. More recently, we showed that aspirin (ASA) inhibits the entry of *T. cruzi* into murine macrophages [11] and cardiac cells [12]. Additionally, the protective effect of ASA is probably mediated by the synthesis of 15-epi-Lipoxin A₄ [11, 19].

Adenosine-3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) is a quintessential member of the family of second messenger molecules and is a multipronged controller of macrophage function and a down-regulator of host antimicrobial defense functions [20, 21].

The immunomodulatory effects of PGE₂ are largely derived from the ability to increase intracellular cAMP levels via stimulatory guanine nucleotide binding protein-coupled prostaglandin E₂ receptor (EP₂ and EP₄) [22]. In phagocytes, the effects of PGE₂ are usually anti-inflammatory since PGE₂ has been demonstrated to inhibit the production of pro-inflammatory molecules and increase the secretion of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 [23]. However, PGE₂ also exhibits

immunostimulatory properties due to binding to EP₃, which results in decreased cAMP levels [24].

Given the increasing interest in the role of eicosanoids in *T. cruzi* infection, we decided to investigate the combined effect of aspirin and SQ 22536, an adenylate-cyclase inhibitor (Fig.1), on the entry of *T. cruzi* in human monocytes.

2. Material and Methods

2.1 Reagents

Dimethyl sulfoxide (DMSO), aspirin (ASA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and an adenylate-cyclase inhibitor, 9-(tetrahydro-2-furanyl)-9*H*-purin-6-amine (SQ 22536) were purchased from Sigma-Aldrich, Co. Penicillin, streptomycin sulfate, gentamicin, RPMI 1640 medium, and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Gibco Co

2.2 Parasites

Trypomastigotes of the *T. cruzi* Y strain were obtained from the supernatant of *T. cruzi*-infected Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells (LLC-MK2) culture cells (ATCC CCL-7; American Type Culture Collection, Rockville, MD) grown in RPMI 1640 medium containing 10% inactivated fetal bovine serum (FBS), 40 µg ml⁻¹ gentamicin, 100 units penicillin ml⁻¹, 100 µg ml⁻¹ streptomycin. Subconfluent cultures of LLC-MK2 were infected with 5 × 10⁶ trypomastigotes. Free parasites were removed after 24 h and cultures were maintained in 10% FBS-RPMI 1640. Five days following infection, free trypomastigote forms could be found in the cell supernatants.

2.3 Monocyte isolation

Primary human monocytes were isolated from peripheral blood of healthy adult volunteers who were seronegative for Chagas disease. Ethical clearance for

the blood collection was obtained from the Ethical Committee in Research Involving Human Subjects of State University of Londrina (Process number: 5491/2012, CONEP number: 5231). Monocytes were isolated using lymphocyte separation medium (density 1.077 g/ml, Lonza, Walkersville, MD USA) gradient centrifugation at 750 ×g for 20 min. Human monocytes were selected from mononuclear cells via adherence. The purity of the monocyte preparations used in this study was > 75% (Fig. 2) as assessed by morphology on Giemsa-stained preparations and by flow cytometry using monocyte-specific monoclonal antibody anti-CD14 (Alexa Fluor 488, Becton Dickinson, Biosciences, CA, USA).

2.4. Treatments and infection

Cells (1×10^6 /ml) were incubated in RPMI 1640 (Gibco, BRL) medium supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL), 2 mM L-glutamine and antibiotics (penicillin [100 U/ml] and streptomycin [100 µg/ml]) incubator overnight at 37°C and 5% CO₂.

The non-adherent cells were then discarded and the remaining adherent cells were washed extensively with warm phosphate-buffered saline (PBS) before the interaction assays. In addition, 2.0×10^5 monocytes were cultured on 48-well dishes. One set of plates was used to quantify cAMP, PGE₂, IL-10, IL-12 and the other set for NO detection.

Before *T. cruzi* infection, monocytes were incubated for 1 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in the presence of different concentrations ASA (0.1, 0.312, 0.625, 1.0, 1.25 and 10 mM) as previously described [11]. After incubation, the medium containing ASA was removed and cells were allowed to interact with trypomastigote forms added in a ratio of 5 parasites per cell. The interaction was allowed to proceed

for 24 h, at 37°C under 5% CO₂ atmosphere. Other treatments included incubation of ASA (1.25 mM) for 1 h prior to addition of SQ 22536 (20 to 100 µM) for 30 min at 37°C [25].

2.5 Invasion assay and determination of internalization index.

After treatment, the monocytes were washed three times, fixed with Bouin's fixative, stained with Giemsa (Merck), and observed with a light microscope at 1000x magnification. The quantification of intracellular amastigotes was carried out using light microscopy; a total 200 cells were randomly counted.

The internalization index was calculated by multiplying the percentage of infected cells by the mean number of parasites per infected cell [26]. All internalization indices were normalized. Experiments were performed in triplicate and four independent experiments were completed. All experiments included untreated, infected monocytes as controls.

2.6 Viability of cells

The viability of the cells obtained from the cultures before and after incubation experiments was determined using MTT (Sigma-Aldrich) assay, showing the mitochondrial activity of living cells. Cells were incubated with MTT (final concentration 0.5 mg/ml, 0.1%) at 37°C for 4 h. The supernatant was aspirated and DMSO was added. Insoluble crystals were dissolved by mixing and the plates were read using a BioRad multiplate reader (Hercules, CA), at a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 630 nm. The cell viability percentage was calculated using the formula: % cell viability = (mean absorbency in test wells)/mean absorbency in control wells) × 100.

2.7 Enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) for cAMP, PGE₂, IL-10 and IL-12

Monocytes that were either uninfected or infected with *T. cruzi* in 96-well plates and were untreated, treated with ASA, or treated with ASA and SQ 22536, were incubated at 37°C for 24 h. cAMP concentration in the supernatant was assessed by competitive ELISA (Cayman, Chemical, USA), according to the manufacturer protocol. The assay permits cAMP measurement within the standard curve range of 0.09 to 200 pmol/ml and sensitivity (80% bound/maximum bound [B/B₀]) of approximately 0.6 pmol/ml. PGE₂ levels were determined by Competitive Enzyme Immunoassay (EIA) according to the manufacturer protocol (Cayman, Chemical, USA). The level of sensitivity of PGE₂ assay was 10 pg/ml.

Levels of human IL-10 and IL-12 in 100 µl medium were measured by commercial ELISA kits (Ready-SET-Go! eBioscience, San Diego, CA), according to the manufacturer instructions. The levels of sensitivity for the IL-10 and IL-12 assays were 2 and 4 pg/ml, respectively.

2.8 Nitrite measurements

Production of NO was determined by measuring the level of accumulated nitrite, a metabolite of NO, in the culture supernatant using Griess reagent (Sigma-Aldrich). After 24h treatment with ASA (1.25 mM), SQ 22536 (20 µM), or both, the culture supernatant was collected and mixed with an equal volume of Griess reagent in 96-well culture plates, and incubated at room temperature for 10 min. The absorbance was measured at 540 nm and nitrite concentrations were calculated using a standard curve for sodium nitrite.

2.9 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni's multiple comparison test. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean. The results were considered significant when $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1 Aspirin decreases T. cruzi human monocyte infection

We first determined whether COX-derived mediators are involved in *T. cruzi* internalization into human monocytes. As shown in Figure 3A, ASA markedly inhibited the internalization of trypomastigote by monocytes, at all ASA concentrations tested. Thus, PGE₂ synthesis inhibition using ASA could improve human monocytes response against *T. cruzi* infection. ASA cytotoxicity for monocytes was evaluated by MTT assay. The final concentration of DMSO in all incubations was constantly 0.2% and did not affect cell viability. ASA (Fig. 3B) did not induce cell death and confirmed previous reports, where no cytotoxicity was noted with low concentrations of aspirin [11, 12, 27].

3.2 SQ 22536 restores ASA effects on T. cruzi entry into human monocytes

Since PGE₂ stimulates adenylate cyclase (AC) and subsequently cAMP formation in macrophages [28], agents inhibiting cAMP in fibroblasts infected with *T. cruzi* caused a marked reduction in level of infection [29]. We further examined the effect of adenylate-cyclase inhibition by SQ 22536 on the entry of *T. cruzi* into human monocytes.

First, to further support the hypothesis that cAMP is the second messenger involved in ASA inhibition of the COX pathway, we used a specific AC inhibitor to block the generation of cAMP-evoked by PGE₂, induced by the parasite. As shown in

Fig. 4 and Fig. 5, an elevation in cAMP and PGE₂ levels was detected in monocytes after exposure to the infective *T. cruzi* trypomastigote, respectively ($P < 0.05$). The pretreatment of cells with SQ 22536 (AC inhibitor) reduced the production of both, cAMP and PGE₂ (Fig.4 and Fig.5). The pretreatment of cells with ASA associated with SQ 22536 also reduced the production of cAMP (Fig. 4, $P < 0.01$) and PGE₂ (Fig. 5, $P < 0.01$) compared with controls.

As shown in Figure 6A, the treatment of monocytes with SQ 22536 reduced *T. cruzi* entry into human monocytes ($P < 0.05$). SQ 22536 prevented the inhibitory effect of ASA (Fig. 6B) on *T. cruzi* infection. Neither SQ 22536 alone (Fig.6C), nor the combination with SQ 22536 showed cytotoxicity against uninfected monocytes (data not shown).

3.3 SQ 22536 modulates IL-10, IL-12 and NO production by human monocytes infected with *T. cruzi*

The internalization of *T. cruzi* into human monocytes stimulated the release of IL-10 (Fig.7A, $P < 0.05$), IL-12 (Fig.7B, $P < 0.05$) and NO (Fig.8, $P < 0.05$). ASA decreased IL-10 (Fig.7A, $P < 0.05$) and increased IL-12 (Fig.7B, $P < 0.05$) levels compared with controls and had no significant effect on NO synthesis by monocytes (Fig.8). SQ 22536 together with ASA preferentially increased the production of IL-10 (Fig.7A, $P < 0.05$) and IL-12 (Fig.7B, $P < 0.05$), whereas there was a decrease in NO production by *T. cruzi*-infected human monocytes (Fig.8, $P > 0.05$).

4. Discussion

Recent evidence suggests that NSAIDs modulates innate inflammatory response and inhibit the entry of *T. cruzi* into macrophages [11, 27] and cardiac cells [12] thereby controlling Chagas disease progression [10, 19, 30]. Together with NO

and TNF- α , PGE₂ participates in a complex circuit that controls lymphoproliferative and cytokine responses in *T. cruzi* infection [6, 31]. However, the involvement of COX-mediated PG production in the entry of *T. cruzi* into human monocytes is largely unexplored. Our data clearly show that the treatment of monocytes with aspirin significantly inhibits internalization of trypomastigotes forms of *T. cruzi*. These results strongly support the idea that the COX pathway plays a fundamental role in the process of parasite invasion [11, 12, 27]. In fact, PGE₂ production increases significantly in *T. cruzi*-infected murine macrophages compared to that in uninfected macrophages [6] and improves the activity of nifurtimox and benznidazole on infected RAW 264.7 cells in a synergistic manner [27].

Interestingly, invasion by *T. cruzi* may trigger the release of cAMP in host cells [29, 32]. Here, we observed elevated cAMP in human monocytes after exposure to trypomastigotes. The cAMP released may be functionally active as it may enhance Ca⁺²-dependent lysosome exocytosis and cell invasion by the parasite [29]. Although not tested explicitly, we speculate that PGE₂ inhibition by ASA leads to a reduction in intracellular cAMP, accounting for the anti-*T. cruzi* activities of NSAIDs observed in the present study [11, 12]. Our results suggest that aspirin activity depends on cAMP elevation in *T. cruzi*-infected monocytes. This was demonstrated by the reversal of ASA-induced inhibition of *T. cruzi* entry into human monocytes by SQ 22536.

Leukocytes respond to microbial invasion by a balanced release of pro- and anti-inflammatory mediators. An elevated cAMP level suppresses the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α [33], IL-12 [34] and molecules with trypanocidal activity, as NO [35]. We investigated whether cAMP could alter the production of IL-12, IL-10, and NO by monocytes infected with *T. cruzi*. This pro-inflammatory response (i.e., cytokines and NO production) were induced during

acute infection with *T. cruzi* in mice, playing an obligatory role in parasite clearance and host survival [17, 36, 37].

We found that SQ 22536 increased the production of IL-12 and decreased NO production by *T. cruzi*-infected human monocytes. Hence, the net effect of cAMP elevation or decrease in the course of *T. cruzi* infection is very complex (Fig. 9). For example, an agent causing cAMP decrease, SQ 22536, increased the production of IL-10 and IL-12 by human monocytes that were previously treated with ASA (Fig. 7) and increased the internalization of trypomastigote forms of *T. cruzi*.

Previously was demonstrated that cAMP regulates lysosomal exocytosis triggered by Ca^{2+} and the parasite/host cell interaction known to involve Ca^{2+} -dependent lysosomal fusion [29]. We found that trypomastigotes showed the capacity to elevate host cell cAMP. Additionally, the residual invasion capacity of these parasites was restored to near-normal levels by treating host cells with ASA and SQ 22536, which decreases PGE_2 and cAMP production. These results indicate that *T. cruzi* triggers at least two dependent signaling pathways that facilitate lysosomal recruitment and fusion, a process required for successful invasion of monocytes by parasites. The finding that PGE_2 and cAMP levels have a more marked influence on the invasion of trypomastigotes suggests that the COX pathway modulates the invasion process depending on Ca^{2+} from intracellular stores. Although cAMP can affect a number of different cellular mechanisms, it is noteworthy that elevation in cAMP levels induces dispersion of lysosomes from the perinuclear area to the cell periphery, the site of *T. cruzi* invasion [38]. It is thus conceivable that when the number of lysosomes in the proximity of the plasma membrane is increased, Ca^{2+} influx through plasma membrane channels may provide a sufficient stimulus for lysosome exocytosis, allowing parasite entry [29]. In fact, PGE_2

accumulates cAMP via the prostanoid EP₄ receptor, which stimulates cAMP-regulated exocytosis [39, 40]. Moreover, cAMP accumulation enhances Ca²⁺-regulated exocytosis in antral mucous cells [41].

The results of this study provide evidence to show that alterations in PGE₂ and cAMP levels can profoundly influence the immune functions of human monocytes and alter the course of *T. cruzi* infection.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This work was supported by CNPq (Edital Universal 14/11, process 474792/2011-0, process 306497/2013) and Fundação Araucária (Convênio 419/2009). RCF, SCHL, and RV da Silva received scholarships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). LVR and PPF received research fellowship from CNPq. PFW and JB received research fellowship from Fundação Araucária.

Acknowledgment

We thank Vera L.H.Tatakihara, Maria I. Lovo-Martins, Nagela G. Zanluqui for technical support and Dr. Waldiceu A. Verri Junior for suggestions and criticism. We are grateful to Wagner Nagib de Souza Birbeire for the final art of figure 9.

Figure 1

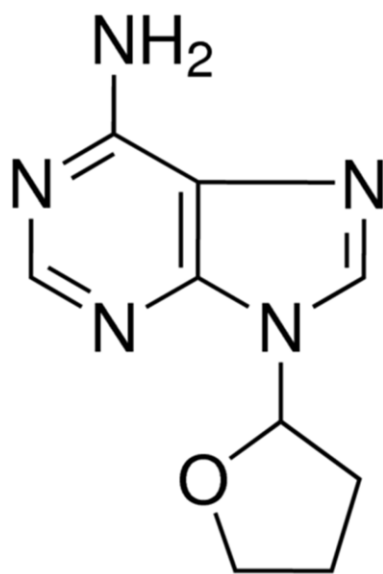
**SQ 22536: 9-(tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine**

Figure 2

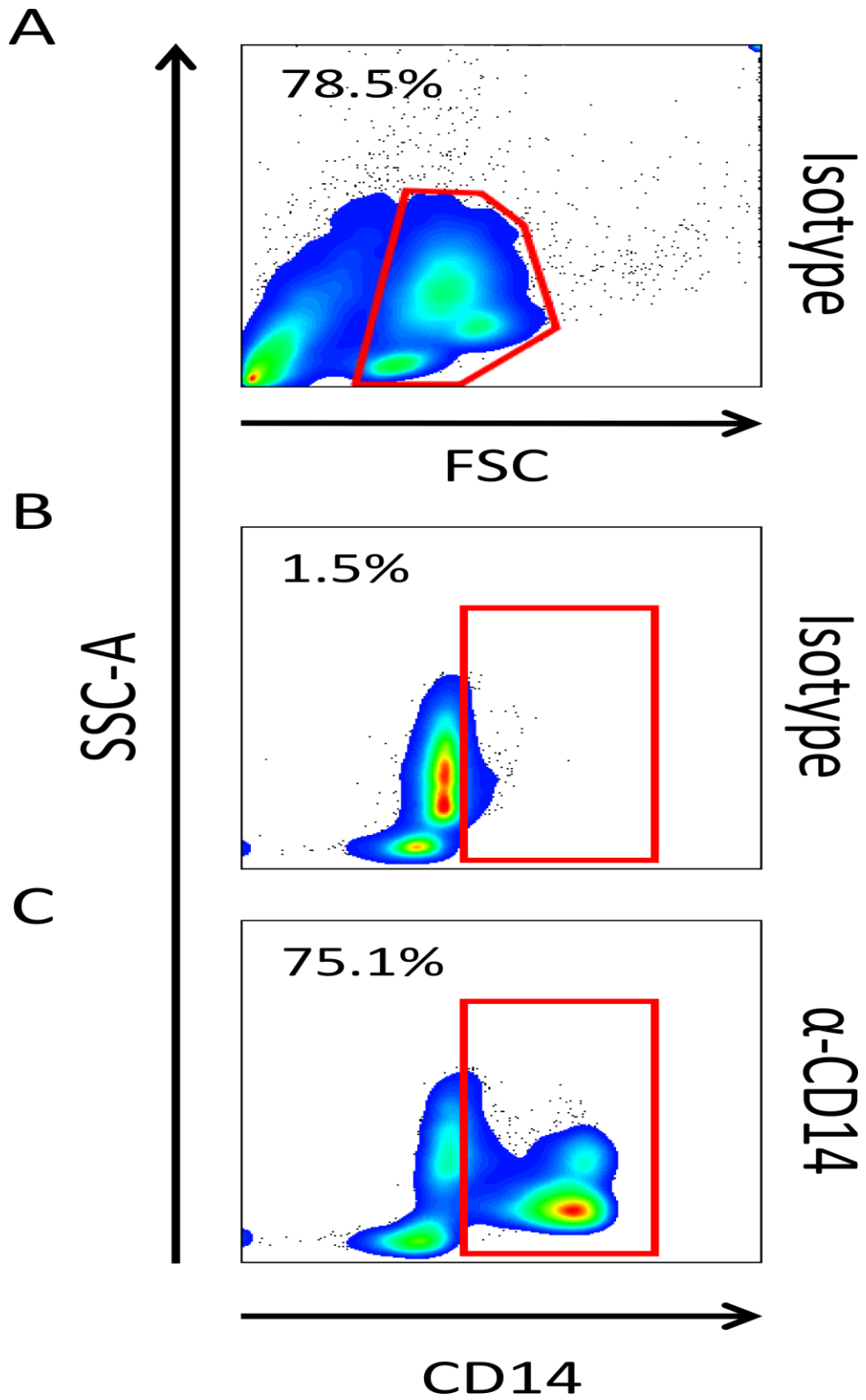


Figure 3

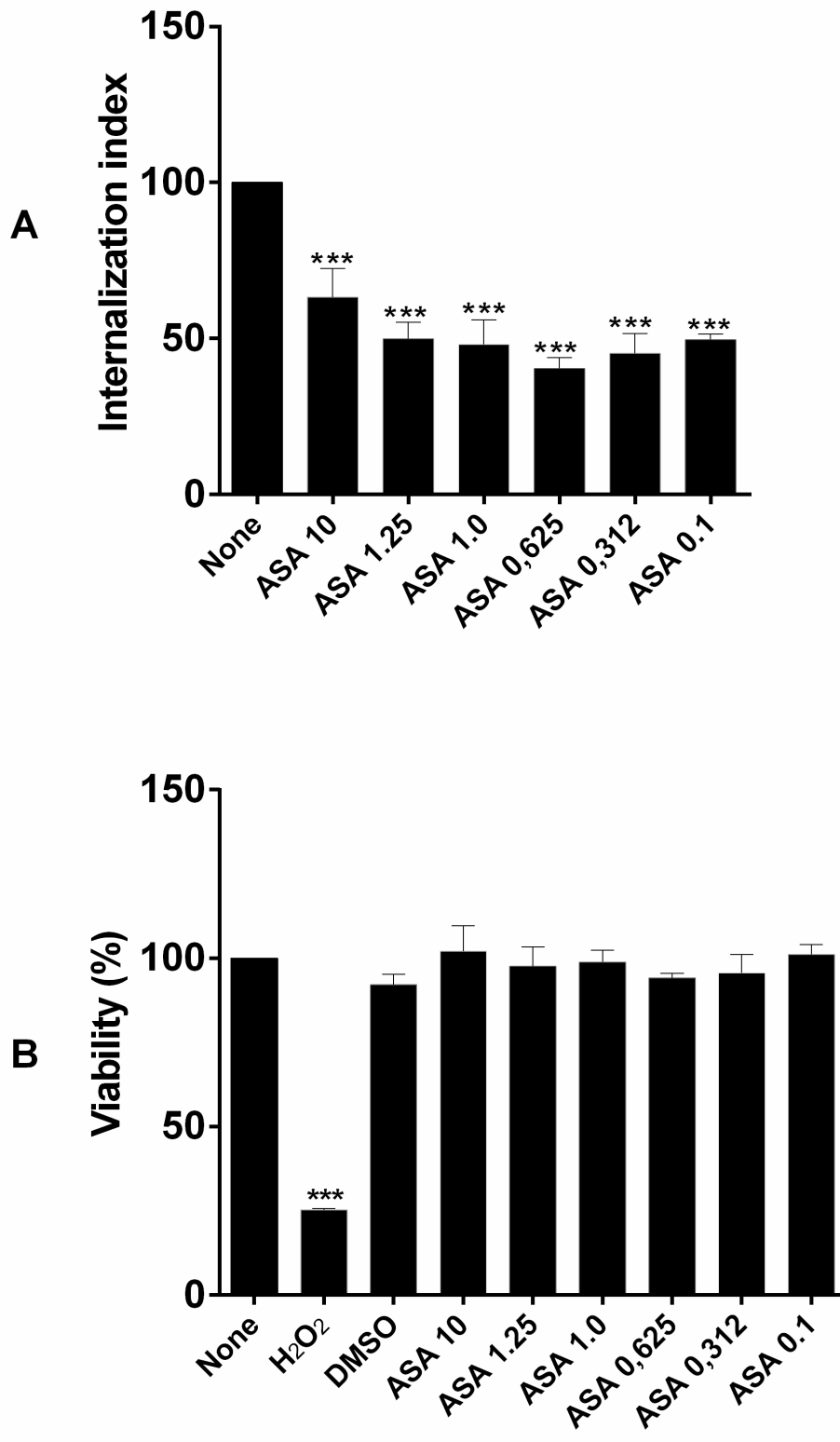


Figure 4

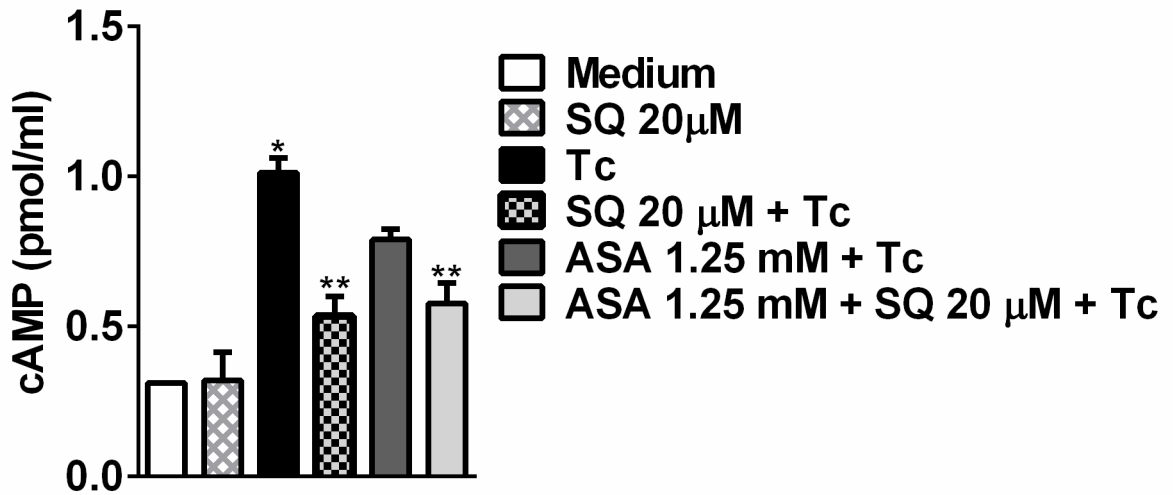


Figure 5

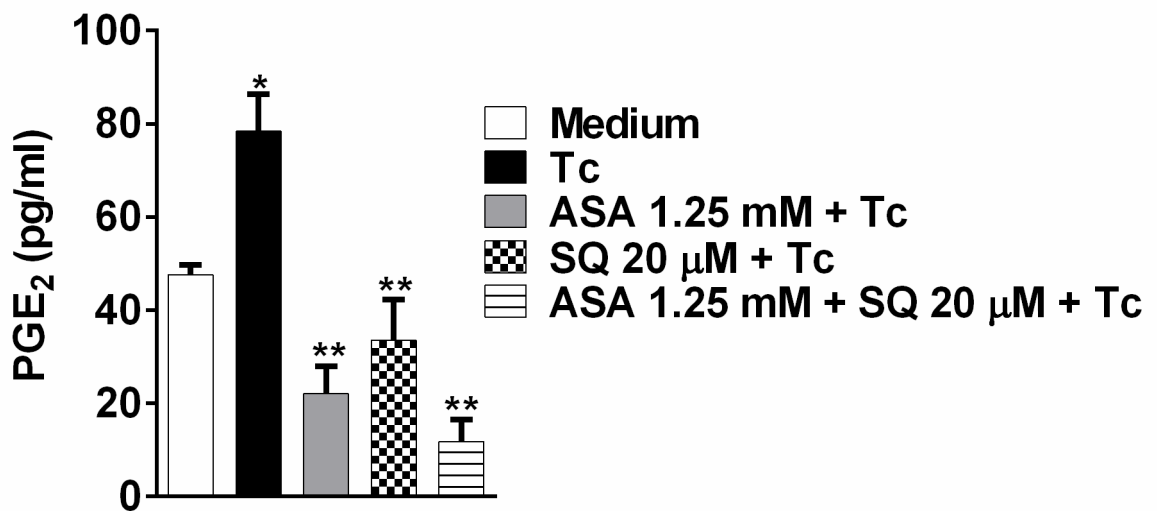


Figure 6

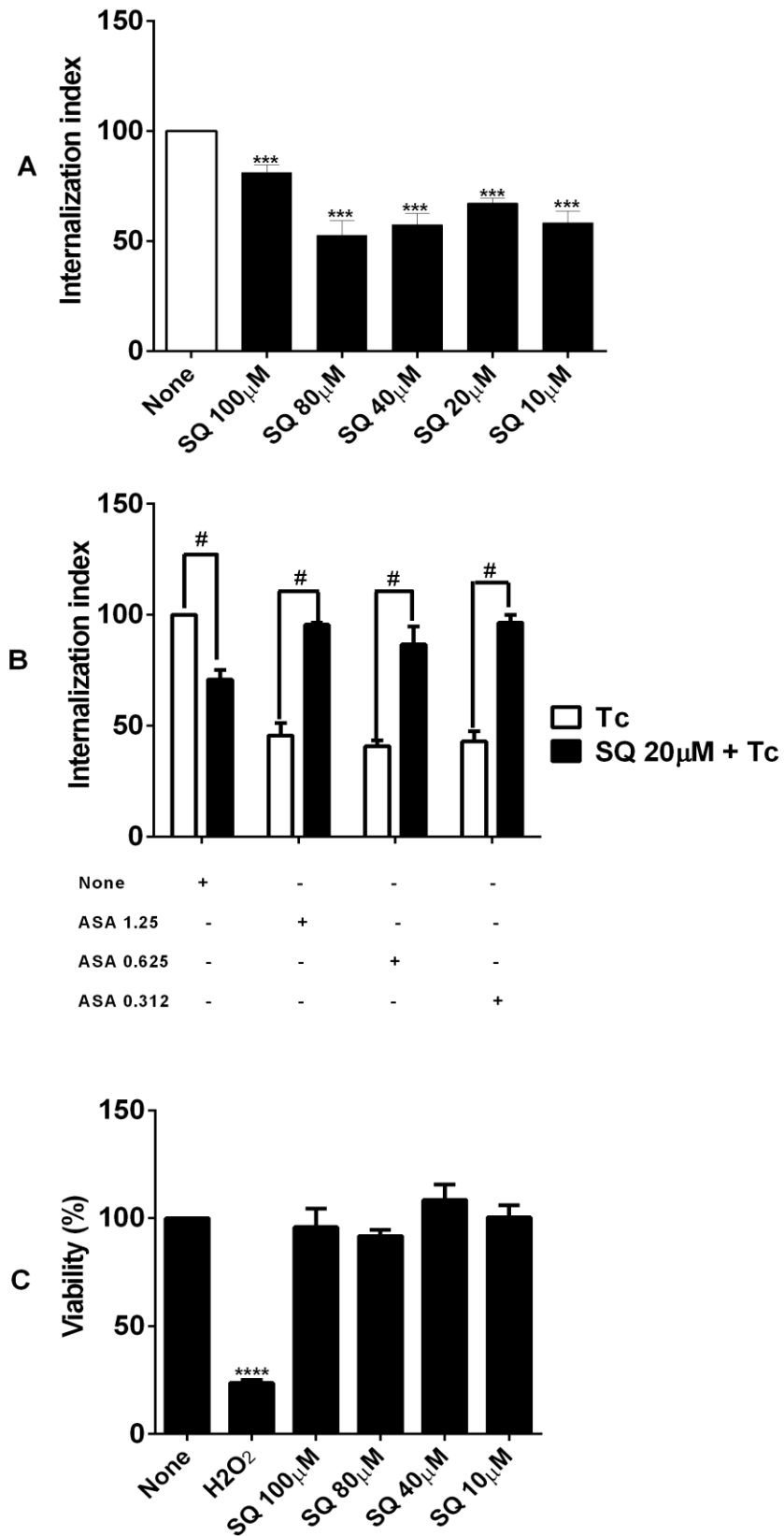


Figure 7

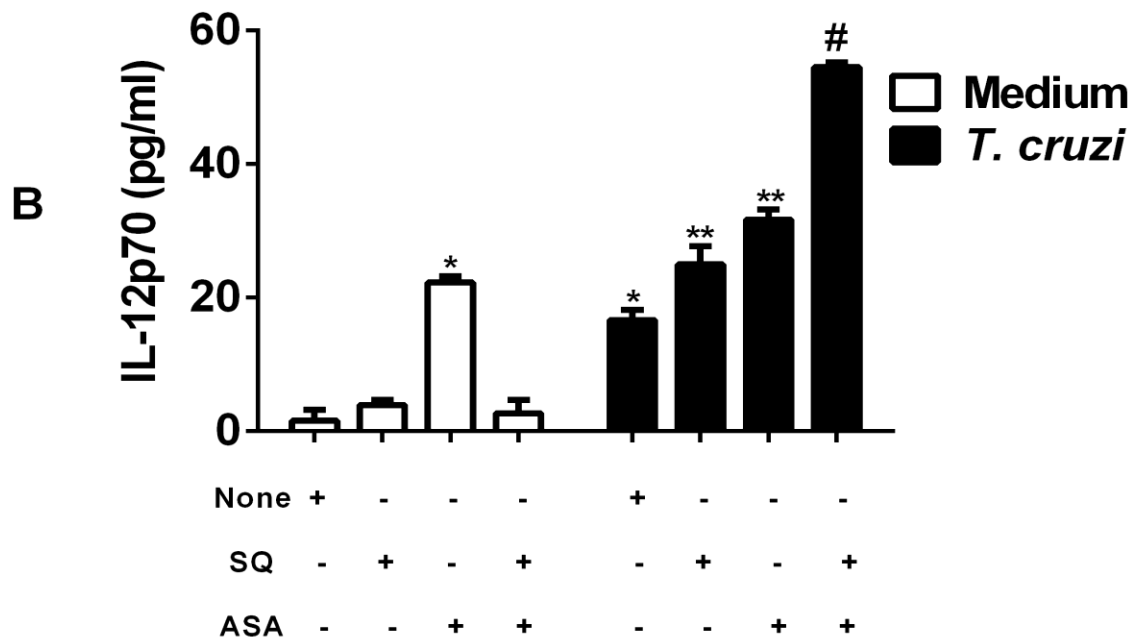
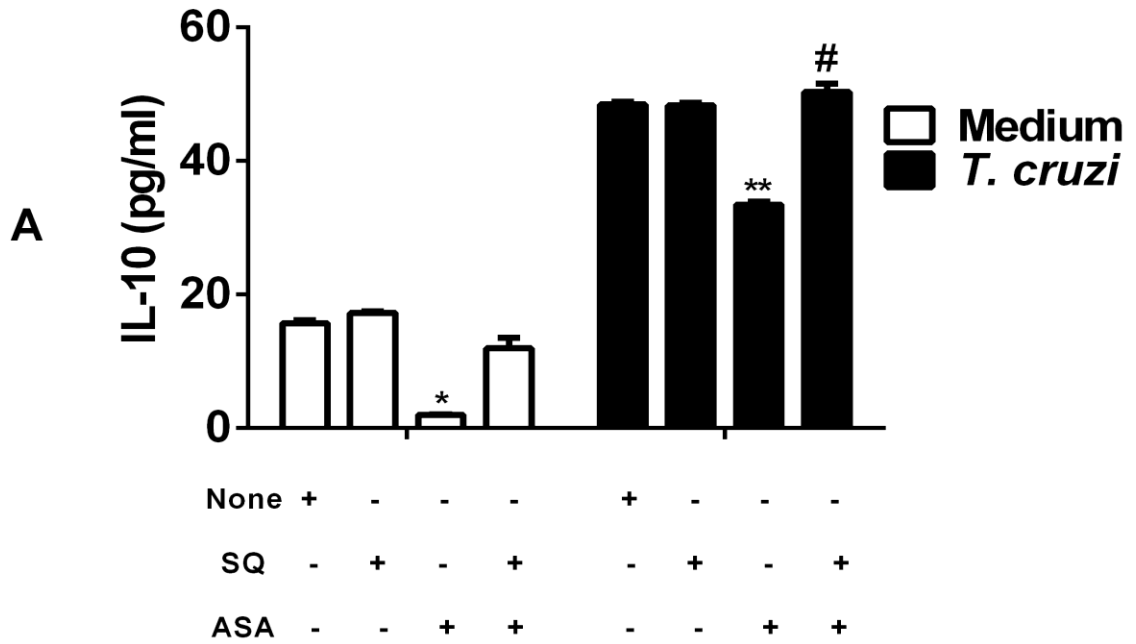


Figure 8

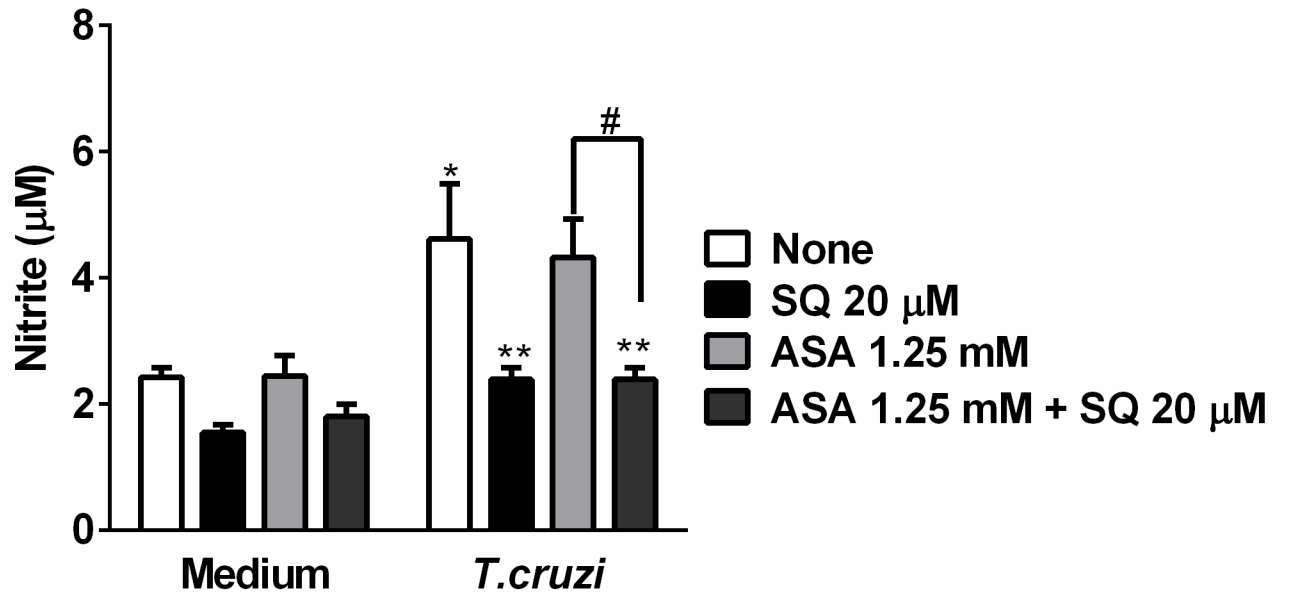


Figure 9

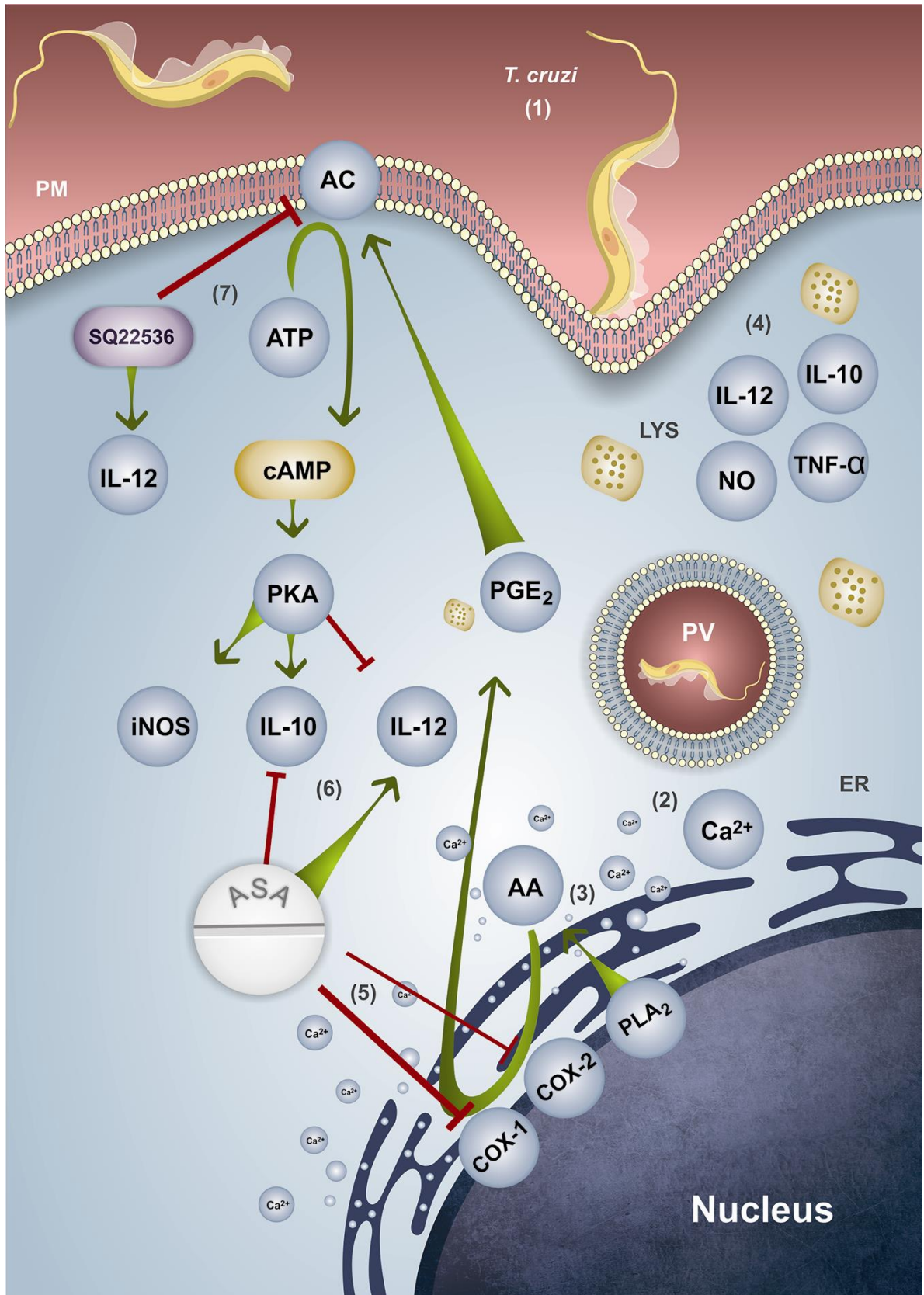


Figure Legends

Figure 1. SQ 22536, 9-(tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine, [C₉H₁₁N₅O]. SQ 22536 is a cell-permeable adenylyl cyclase inhibitor.

Figure 2. Cultures of human cells enriched for CD14⁺ monocytes. A representative density plot analysis for human cells culture. Cultures with >75% of CD14⁺ cells were considered enriched for monocytes. (A) Gate strategy excluding debris from the analysis. (B) Isotype control was used to obtain the percentage of (C) monocytes (α -CD14 mAb) present in the culture.

Figure 3. Aspirin impairs *T. cruzi* entry into human monocytes. (A) Relationships between aspirin (ASA) dose and the internalization indexes of parasite. Monocytes were treated for 1h with increasing concentrations of ASA. After treatment, monocytes interacted with 5:1 trypomastigotes for 24h, were washed, fixed with Bouin's fixative and stained with Giemsa. Quantification was carried out under a light microscope where the number of intracellular parasites was counted in 200 cells. (B) MTT assay to measure cell viability in monocytes after treatment with ASA. H₂O₂ (1000 μ M) was used as positive control. Values are the mean \pm standard error of four experiments. ***P < 0.001 versus control (none) using one way-ANOVA and Bonferroni post hoc test. None = only cells with medium untreated.

Figure 4. *Trypanosoma cruzi* stimulated cAMP production in human monocytes. Intracellular cAMP levels were measured in cells after treatment with ASA alone, SQ 22536 alone or ASA and SQ 22536. Monocytes uninfected and infected were included incubation of ASA (1.25 mM) for 1 h prior to addition of SQ 22536 (20 μ M) for 30 minutes at 37°C and the supernatant was collected after 24 h and assayed for cAMP. *P < 0.05 versus control (none), ** P < 0.01 versus Tc (*T. cruzi*-infected monocytes) using one way-ANOVA and Bonferroni post hoc test. Aspirin = ASA, None = only cells with medium untreated.

Figure 5. Adenylate-cyclase activity regulates PGE₂ production by human monocytes

infected with *T. cruzi*. PGE_2 levels were measured in cells after treatment with ASA, SQ 22536, ASA and SQ 22536. Monocytes uninfected and infected were cultured with ASA (1.25 mM) for 1 h prior to addition of SQ 22536 (20 μ M) for 30 minutes at 37°C and the supernatant was collected after 24 h and assayed for PGE_2 . * P < 0.05 versus control (medium), ** P < 0.01 versus infected cells cultured in medium alone. Aspirin = ASA.

Figure 6. Adenylate-cyclase activity regulates cell invasion by *T. cruzi*. (A) Inhibition of adenylate-cyclase decreases *T. cruzi* infection and (B) reduces aspirin effects restoring *T. cruzi* infection into human monocytes. Internalization indexes of the interaction process between monocytes treated for 1h with increasing concentrations of ASA. After treatment with ASA, monocytes were washed and treated with SQ 22536 (20 μ M) for 30 minutes. Next, the cells were washed and incubated with 5:1 trypomastigotes for 24 h. After, were washed and fixed with Bouin's fixative, stained with Giemsa for quantification of a number of intracellular parasites. Results are the mean \pm standard error of triplicate determinations and are representative of three independent experiments. *** P < 0.01 versus control (none), # P < 0.05 versus infected cells cultured in medium alone. **** P < 0.001, for a comparison with infected cells cultured in medium alone. Aspirin = ASA.

Figure 7. SQ 22536 modulates IL-10 and IL-12 production by human monocytes infected with *T. cruzi*. Monocytes were treated for 1h with ASA (1.25 mM). After, cells were washed and treated with SQ 22536 (20 μ M) for 30 minutes. Next, the cells were washed and incubated with 5:1 trypomastigotes for 24 h. IL-10 (A) and IL-12 (B) levels in the supernatant were measured by a specific enzyme-linked immunosorbent assay. Results are the mean \pm standard error. * P < 0.05 versus control (none), ** P < 0.05 versus infected and untreated cells. # P < 0.05 versus infected cells treated with ASA alone. Aspirin = ASA.

Figure 8. SQ 22536 modulates nitric oxide (NO) synthesis by human monocytes infected with *T. cruzi*. Monocytes were treated for 1h with ASA (1.25mM). After

treatment, monocytes were washed and treated with SQ 22536 (20 μ M) for 30 minutes. After, the cells were washed and incubated with 5:1 trypomastigotes for 24h. Nitrite levels in the supernatant were measured by Griess reaction. Results are the mean \pm standard error of duplicate determinations. * P < 0.05 versus control (none), ** P < 0.05 versus infected and untreated cells. # P < 0.05 versus infected cells treated with ASA alone. Aspirin = ASA.

Figure 9. Aspirin and cAMP actions in monocytes, model for the *T. cruzi* cell invasion mechanism. (1) Infective trypomastigotes triggers release of Ca^{2+} from host cell intracellular stores. Signaling events that include intracellular free calcium transients mobilize lysosomes to the trypomastigote attachment site at the plasma membrane. (2) Ca^{2+} - regulated fusion of lysosomes with the plasma membrane originates the parasitophorous vacuole, which is subsequently disrupted, releasing the parasite to replicate in the cytosol. (3) Upon cell stimulation, PLA_2 is activated, and (AA) is released from the cellular membranes. AA is then metabolized by COX-1 or COX-2 in different cellular compartments and further metabolized by different synthases, which leads to the generation of mediators as $TNF-\alpha$, IL-12, IL-10 and NO (4). (5) Aspirin (ASA) inhibits COX activity, subsequently reducing PGE_2 , cAMP, and NO levels. (6) ASA treatment reduces IL-10 production and enhances IL-12. (7) SQ 22536 inhibits AC function and reduces cAMP and NO levels. Thus, in *T. cruzi* infection context, cAMP may be elevated in infected cells and modulating the production of Ca^{2+} , cytokines and NO, important molecules for dealing the infection.

AA – arachidonic acid; AC -adenylate-cyclase; ASA - acetylsalicylic acid; cAMP - cyclic AMP; ATP - adenosine triphosphate; COX-1 – cyclooxygenase -1; COX-2 – cyclooxygenase -2; LYS – lysosome; iNOS – inducible nitric oxide synthase; PGE_2 – prostaglandin-E2; PKA – protein kinase A; PLA_2 – phospholipase A₂; PM – plasma membrane; PV - parasitophorous vacuole; ER - endoplasmic reticulum; SQ 22536 - adenylyl-cyclase inhibitor.

References

- [1] E. Cunha-Neto, C. Chevillard, Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics, *Mediators Inflamm*, 2014 (2014) 683230.
- [2] G.A. Schmunis, Z.E. Yadon, Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem, *Acta Trop*, 115 (2010) 14-21.
- [3] J.M. Alvarez, R. Fonseca, H. Borges da Silva, C.R. Marinho, K.R. Bortoluci, L.R. Sardinha, S. Epiphanyo, M.R. D'Imperio Lima, Chagas disease: still many unsolved issues, *Mediators Inflamm*, 2014 (2014) 912965.
- [4] D.V. Andrade, K.J. Gollob, W.O. Dutra, Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease, *PLoS Negl Trop Dis*, 8 (2014) e3010.
- [5] J.A. Gomes, A.M. Molica, T.S. Keesen, M.J. Morato, F.F. de Araujo, R.C. Fares, J.A. Fiuza, A.T. Chaves, V. Pinheiro, C. Nunes Mdo, R. Correa-Oliveira, M.O. da Costa Rocha, Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease, *Hum Immunol*, 75 (2014) 20-28.
- [6] M.M. Borges, J.K. Kloetzel, H.F. Andrade, Jr., C.E. Tadokoro, P. Pinge-Filho, I. Abrahamsohn, Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF-alpha production during *Trypanosoma cruzi* infection, *Immunol Lett*, 63 (1998) 1-8.
- [7] L.C. Abel, L.R. Ferreira, I. Cunha Navarro, M.A. Baron, J. Kalil, R.T. Gazzinelli, L.V. Rizzo, E. Cunha-Neto, Induction of IL-12 production in human peripheral monocytes by *Trypanosoma cruzi* is mediated by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins and potentiated by IFN-gamma and CD40-CD40L interactions, *Mediators Inflamm*, 2014 (2014) 345659.
- [8] B. Rocca, G.A. FitzGerald, Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response, *Int Immunopharmacol*, 2 (2002) 603-630.
- [9] J.Y. Park, M.H. Pillinger, S.B. Abramson, Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases, *Clin Immunol*, 119 (2006) 229-240.
- [10] F.S. Machado, S. Mukherjee, L.M. Weiss, H.B. Tanowitz, A.W. Ashton, Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection, *Adv Parasitol*, 76 (2011) 1-31.
- [11] A.D. Malvezi, R.V. da Silva, C. Panis, L.M. Yamauchi, M.I. Lovo-Martins, N.G. Zanluqui, V.L. Tatakijara, L.V. Rizzo, W.A. Verri, Jr., M.C. Martins-Pinge, S.F. Yamada-Ogatta, P. Pinge-Filho, Aspirin modulates innate inflammatory response and inhibits the entry of *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages, *Mediators Inflamm*, 2014 (2014) 580919.
- [12] A.D. Malvezi, C. Panis, R.V. da Silva, R. Carvalho de Freitas, M.I. Martins, V.L. Tatakijara, N.G. Zanluqui, E. Cunha Neto, S. Goldenberg, J. Bordignon, S.F. Yamada-Ogatta, M.C. Martins-Pinge, P. Pinge-Filho, Inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 impairs *Trypanosoma cruzi* entry in cardiac cell and promotes

differential modulation of inflammatory response, *Antimicrob Agents Chemother*, (2014).

[13] N.A. Guerrero, M. Camacho, L. Vila, M.A. Iniguez, C. Chillon-Marinas, H. Cuervo, C. Poveda, M. Fresno, N. Girones, Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 Signaling through Prostaglandin Receptor EP-2 Favor the Development of Myocarditis during Acute *Trypanosoma cruzi* Infection, *PLoS Negl Trop Dis*, 9 (2015) e0004025.

[14] A.M. Celentano, G. Gorelik, M.E. Solana, L. Sterin-Borda, E. Borda, S.M. Gonzalez Cappa, PGE2 involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations, *Prostaglandins*, 49 (1995) 141-153.

[15] V.L. Hideko Tatakijara, R. Cecchini, C.L. Borges, A.D. Malvezi, V.K. Graca-de Souza, S.F. Yamada-Ogatta, L.V. Rizzo, P. Pinge-Filho, Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 52 (2008) 47-58.

[16] L. Sterin-Borda, G. Gorelik, N. Goren, S.G. Cappa, A.M. Celentano, E. Borda, Lymphocyte muscarinic cholinergic activity and PGE2 involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection, *Clin Immunol Immunopathol*, 81 (1996) 122-128.

[17] I.A. Abrahamsohn, R.L. Coffman, *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection, *Exp Parasitol*, 84 (1996) 231-244.

[18] F.R. Gutierrez, T.W. Mineo, W.R. Pavanelli, P.M. Guedes, J.S. Silva, The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1 (2009) 236-245.

[19] A. Molina-Berrios, C. Campos-Estrada, N. Henriquez, M. Faundez, G. Torres, C. Castillo, S. Escanilla, U. Kemmerling, A. Morello, R.A. Lopez-Munoz, J.D. Maya, Protective role of acetylsalicylic acid in experimental *Trypanosoma cruzi* infection: evidence of a 15-epi-lipoxin A(4)-mediated effect, *PLoS Negl Trop Dis*, 7 (2013) e2173.

[20] M. Peters-Golden, Putting on the brakes: cyclic AMP as a multipronged controller of macrophage function, *Sci Signal*, 2 (2009) pe37.

[21] C.H. Serezani, M.N. Ballinger, D.M. Aronoff, M. Peters-Golden, Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 39 (2008) 127-132.

[22] Y. Sugimoto, S. Narumiya, Prostaglandin E receptors, *J Biol Chem*, 282 (2007) 11613-11617.

[23] G. Menard, V. Turmel, E.Y. Bissonnette, Serotonin modulates the cytokine network in the lung: involvement of prostaglandin E2, *Clin Exp Immunol*, 150 (2007) 340-348.

[24] A. Medeiros, C. Peres-Buzalaf, F. Fortino Verdán, C.H. Serezani, Prostaglandin

E2 and the suppression of phagocyte innate immune responses in different organs, *Mediators Inflamm*, 2012 (2012) 327568.

[25] D.O. Procopio, M.M. Teixeira, M.M. Camargo, L.R. Travassos, M.A. Ferguson, I.C. Almeida, R.T. Gazzinelli, Differential inhibitory mechanism of cyclic AMP on TNF- α and IL-12 synthesis by macrophages exposed to microbial stimuli, *Br J Pharmacol*, 127 (1999) 1195-1205.

[26] E.S. Barrias, L.C. Reignault, W. De Souza, T.M. Carvalho, Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages, *PLoS One*, 5 (2010) e7764.

[27] R. Lopez-Munoz, M. Faundez, S. Klein, S. Escanilla, G. Torres, D. Lee-Liu, J. Ferreira, U. Kemmerling, M. Orellana, A. Morello, A. Ferreira, J.D. Maya, *Trypanosoma cruzi*: In vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole, *Exp Parasitol*, 124 (2010) 167-171.

[28] D. Gems, M. Seitz, W. Kramer, W. Grimm, G. Till, K. Resch, Ionophore A23187 raises cyclic AMP levels in macrophages by stimulating prostaglandin E formation, *Exp Cell Res*, 118 (1979) 55-62.

[29] A. Rodriguez, I. Martinez, A. Chung, C.H. Berlot, N.W. Andrews, cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes, *J Biol Chem*, 274 (1999) 16754-16759.

[30] S. Mukherjee, F.S. Machado, H. Huang, H.S. Oz, L.A. Jelicks, C.M. Prado, W. Koba, E.J. Fine, D. Zhao, S.M. Factor, J.E. Collado, L.M. Weiss, H.B. Tanowitz, A.W. Ashton, Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease, *PLoS One*, 6 (2011) e16959.

[31] P. Pinge-Filho, C.E. Tadokoro, I.A. Abrahamsohn, Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection, *Cell Immunol*, 193 (1999) 90-98.

[32] E.V. Caler, R.E. Morty, B.A. Burleigh, N.W. Andrews, Dual role of signaling pathways leading to Ca²⁺ and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*, *Infect Immun*, 68 (2000) 6602-6610.

[33] D.M. Aronoff, J.K. Carstens, G.H. Chen, G.B. Toews, M. Peters-Golden, Short communication: differences between macrophages and dendritic cells in the cyclic AMP-dependent regulation of lipopolysaccharide-induced cytokine and chemokine synthesis, *J Interferon Cytokine Res*, 26 (2006) 827-833.

[34] T.C. van der Pouw Kraan, L.C. Boeije, R.J. Smeenk, J. Wijdenes, L.A. Aarden, Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production, *J Exp Med*, 181 (1995) 775-779.

[35] D. Mullet, R.H. Fertel, D. Kniss, G.W. Cox, An increase in intracellular cyclic AMP modulates nitric oxide production in IFN- γ -treated macrophages, *J Immunol*, 158 (1997) 897-904.

- [36] J.C. Aliberti, M.A. Cardoso, G.A. Martins, R.T. Gazzinelli, L.Q. Vieira, J.S. Silva, Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes, *Infect Immun*, 64 (1996) 1961-1967.
- [37] F. Cardillo, J.C. Voltarelli, S.G. Reed, J.S. Silva, Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells, *Infect Immun*, 64 (1996) 128-134.
- [38] A. Rodriguez, M.G. Rioult, A. Ora, N.W. Andrews, A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca^{2+} mobilization and microfilament rearrangement in host cells, *J Cell Biol*, 129 (1995) 1263-1273.
- [39] A. Ohnishi, C. Shimamoto, K. Katsu, S. Ito, Y. Imai, T. Nakahari, EP1 and EP4 receptors mediate exocytosis evoked by prostaglandin E(2) in guinea-pig antral mucous cells, *Exp Physiol*, 86 (2001) 451-460.
- [40] S. Fujiwara, C. Shimamoto, Y. Nakanishi, K. Katsu, M. Kato, T. Nakahari, Enhancement of Ca^{2+} -regulated exocytosis by indomethacin in guinea-pig antral mucous cells: arachidonic acid accumulation, *Exp Physiol*, 91 (2006) 249-259.
- [41] T. Nakahari, S. Fujiwara, C. Shimamoto, K. Kojima, K. Katsu, Y. Imai, cAMP modulation of Ca^{2+} -regulated exocytosis in ACh-stimulated antral mucous cells of guinea pig, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282 (2002) G844-856.

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que o bloqueio de COX-1 por ácido acetil salicílico provoca redução dos índices de internalização do *T. cruzi* em monócitos humanos *in vitro*, o que foi revertido com o tratamento conjunto com inibidor de adenilato ciclase. Desta forma, sugere o potencial papel do AMPc neste modelo experimental.

O AMPc modulou negativamente a liberação de NO corroborando os ensaios de internalização, embora não possa concretizar que a reativação da internalização foi propiciada exclusivamente pela redução de NO, molécula de atividade tripanocida já bem estabelecida.

O nível de IL-10 foi modulado pela diminuição de AMPc nos tratamento com inibidor de AC. No entanto o tratamento conjunto com ASA representou um aumento em relação com o somente com ASA, sugerindo a ativação de via acessória para o aumento de IL-10, o que poderia ser explicado pelo aumento da síntese de lipoxinas.

Já IL-12p70 descreve uma regulação positiva sobre o tratamento conjunto com inibidores da COX e da adenilato ciclase, sugerindo que a diminuição do AMPc efetiva uma resposta de padrão inflamatório com mudança no fenótipo dos monócitos humanos para um padrão M1 semelhante aos macrófagos inflamatórios. Isto corrobora os dados da internalização e pressupõe que indutores de AC poderiam controlar a infecção por *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, G. K.; FARIA, G. E.; CASTRO, K. T.; REIS, M. A.; MICHELIN, M. A. *Trypanosoma cruzi*: role of PGE₂ in immune response during the acute phase of experimental infection. **Exp. Parasitol.** 118: 514-521, 2008.
- ABEL LC, FERREIRA LR, CUNHA NAVARRO I, et al. Induction of IL-12 production in human peripheral monocytes by *Trypanosoma cruzi* is mediated by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins and potentiated by IFN- γ and CD40-CD40L interactions. **Mediators Inflamm** 2014;2014:345659.
- ABRAHAMSOHN, I.A.; Cytokines in innate and acquired immunity to *T. cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31:177-121; 1998.
- ABRAHAMSOHN IA, COFFMAN RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp Parasitol** 1996;84:231-244.
- ALIBERTI JC, CARDOSO MA, MARTINS GA, GAZZINELLI RT, VIEIRA LQ, SILVA JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect Immun** 1996;64:1961-1967.
- ALVAREZ JM, FONSECA R, BORGES DA SILVA H, et al. Chagas disease: still many unsolved issues. **Mediators Inflamm** 2014;2014:912965.
- ANDRADE DV, GOLLOB KJ, DUTRA WO. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Negl Trop Dis** 2014;8:e3010.
- ANDRADE, S. G. Patologia experimental da doença de Chagas. In: Brener, Z.; Andrade, Z. A.; Barral-Netto, M (Eds.), ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 177-200, 2000.
- ANDRADE, S. G.; RASSI, A.; MAGALHÃES, J. B.; FERRIOLLI FILHO, F.; LUQUETTI, A. O. Specific chemotherapy of Chagas Disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 86: 624-626. 1992.
- ANDRADE, V.; BARRAL-NETO, M.; ANDRADE, S. G. Patterns of resistance of inbred mice to *T. cruzi* are determined by parasite strain. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 18: 499-506, 1985.
- ANONIMOUS. Recommendations from a Satellite Meeting. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 94 suppl 1: 429-432, 1999.
- ARAUJO-JORGE, E. T. Modelos animais para o estudo *in vivo* da doença de Chagas e de seus aspectos histopatológicos (O Camundongo). In **Doença de Chagas: manual para experimentação animal**, Tânia C. de Araújo-Jorge Solange Lisboa de Castro (Org) Rio de Janeiro: Fiocruz- Instituto Oswaldo Cruz, 2000.
- ARONOFF DM, CARSTENS JK, CHEN GH, TOEWS GB, PETERS-GOLDEN M. Short communication: differences between macrophages and dendritic cells in the

cyclic AMP-dependent regulation of lipopolysaccharide-induced cytokine and chemokine synthesis. **J Interferon Cytokine Res** 2006;26:827-833.

ASHETON, A. W.; MURKERJEE, S.; NAGAJYOTHI, F. N.; HUANG, H.; BRAUNSTEIN, V. L.; DESRUISSEAU, M. S. Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.** 204: 929-940, 2007.

ASHON, A. W.; MUKHERJEE, S.; NAGAJYOTHI, F. N.; HUANG, H.; BRAUNSTEIN, V. L.; DESRUISSEAU, M. S.; FACTOR, S. M.; LOPEZ, L.; BERMAN, J. W.; WITTNER, M.; SCHERER, P. E.; CAPRA, V.; COFFMAN, T. M.; SERHAN, C. N.; GOTLINGER, K.; WU, K. K.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Med.** 204: 929-940, 2007.

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

BARRIAS ES, REIGNAULT LC, DE SOUZA W, CARVALHO TM. Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages. **PloS One** 2010;5:e7764.

BENBERNOU, N.; ESNAULT, S.; SHIN, H. C.; FEKKAR, H.; GUENOUNOU, M. Differential regulation of IFN-gamma, IL-10 and inducible nitric oxide synthase in human T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway. **Immunology.** 91(3):361-8, 1997.

BLITZMAN, M. Enfermedad de Chagas-Mazza-ler congress virtual de cardiologia. Disponível em <http://www.fac.org.ar>. 2007. Acesso em 01 de setembro de 2014.

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

BLOODSWORT, A.; O'DONNELL, V. B.; FREEMAN, B. A. Nitric oxide regulation of free radical and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation, **Arterioscl. Vasc. Biol.** 20(7): 1707-15, 2000.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.** v.2. p.907-916, 2001.

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

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

BOTTING R., AYOUB, S.S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 72: 85-87, 2005.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *T. cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. In: **Arch. Allergy Immunol**, 114 103-110, 1997.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. A 120-k-Da alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca^{+2} signaling factor for mammalian cells. **J Biol Chem**, 270: 5172-5180, 1995.

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat Rev Microbiol**. 3:229-36, 2006.

BUSCHIAZZO, A., AMAYA, M.F., CREMONA, M.L., FRASCH, A.C., ALZARI, P.M. The crystal structure and mode of action of *trans*-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis. **Mol Cell**. 10: 757–768, 2002.

CALER, E. V.; MORTY, R. E.; BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. Dual role of signaling pathways leading to $Ca(2+)$ and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **INFECT IMMUN**. 68(12):6602-10, 2000.

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

CANÇADO, JR. Terapêutica específica. In: Dias, J. C. P.; Coura, J. R. (Eds) **Clínica e terapêutica da doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 323-352, 1997.

CARDILLO F, VOLTARELLI JC, REED SG, SILVA JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect Immun** 1996;64:128-134.

CARDONI, R. L.; ANTUNEZ, M. I. Circulating levels of ciclooxigenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Mediators Inflamm**. 13(4): 235-40, 2004.

CARPENTER, L.; CORDERY, D.; BIDEN, T. J. Protein kinase C δ activation by interleukin 1- β stabilizes inducible nitric oxide synthase mRNA in pancreatic β -cells. **J. Biol. Chem**. 276: 5368-74, 2001.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). 2013. **Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>** Acesso em: 12 set. 2014.

CELENTANO, A. M.; GORELINK, G.; SOLANA, M. E.; STERIN-BORDA, L.; BORDA, E.; GONZÁLEZ CAPPA, S. M. PGE2 involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. **Prostaglandins**. 49: 141-153, 1995.

CERECETTO, H., GONZÁLEZ, M. Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. **Curr Top Med Chem**. 11:1187-213, 2002.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen., s.sp. agente etiológico de uma nova

entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1: 159-218, 1909.

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

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

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

CONNELLY, L.; PALACIOS-CALLENDER, M.; ,AMEIXA, C.; MONCADA, S.; HOBBS, A. J. Biphasic Regulation of NF- κ B Activity Underlies the Pro- and Anti-Inflammatory Actions of Nitric Oxide. **J Immunol** 166:3873-3881, 2001.

CORTEZ, M.; NAIRA, I.; FERREIRA, D.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. ATAYDE, V. D.; YOSHIDA, N. Infections by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule gp30. **Infect Immun**. 71: 6184-91, 2003.

COSTA, V. M.; TORRES, K. C.; MENDONÇA, R. C.; GRESSER, I.; GOLLOB, K. J.; ABRAHAMSOHN, I. A. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. immunol**. 177(5): 3193-3200, 2006.

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

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

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

CUNHA-NETO E, CHEVILLARD C. Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. **Mediators Inflamm** 2014;2014:683230.

D'ANGELO, M. A.; MONTAGNA, A. E.; SANGUINETI, S.; TORRES, H. N.; FLAWIÁ, M. M. A novel calcium-stimulated adenylyl cyclase from *Trypanosoma cruzi*, which interacts with the structural flagellar protein paraflagellar rod. **J Biol Chem**. 20;277(38):35025-34, 2002.

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

DE GROOTE, M. A.; FANG F. C. Antimicrobial properties of nitric oxide. **In nitric oxide and infections (ed Fang F. C.)**. 231-261, 1984.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol.** pii:295394, 2010.

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

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

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

DIEL, S.; BEYERMANN, M.; LLORÉNS, J. M.; WITTIG, B.; KLEUSS, C. Two interaction sites on mammalian adenylyl cyclase type I and II: modulation by calmodulin and G(β gamma). **Biochem J.** 15;411(2):449-56, 2008.

DOS REIS, G. A.; LOPES, M. F. A resposta imune à infecção pelo *T. cruzi* em modelos experimentais. In Brener, Z.; Andrade, Z.A.; Barral-Neto, M. (Eds) **T. cruzi e Doença de Chagas.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2000.

DOS REIS, G.A. Cell-mediated immunity in experimental *T. cruzi* infection. **Parasitol Today.** 13(9):335-42, 1997.

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

EIGLER, A.; SIEGMUND, B.; EMMERICH, U.; BAUMANN, K. H.; HARTMANN, G.; ENDRES, S. Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. **J Leukoc Biol.** 63(1):101-7, 1998.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol.** 126(3):283-91, 2010.

FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; KONOWAL, A.; FREED, P. W.; WESTCOTT, L. Y.; HENSON, P. M. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂ and PAF. **J. Clin Invest.** 15;101(4): 890-8, 1998.

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

FENG, W. G, WANG, Y. B, ZHANG, J. S, WANG, X. Y, LI, C. L, CHANG, Z. L. cAMP elevators inhibit LPS-induced IL-12 p40 expression by interfering with phosphorylation of p38 MAPK in murine peritoneal macrophages. **Cell Res.** (5-

6):331-7, 2002.

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

FERREIRA, S.H.; MONCADA, A.; VANE, J.R. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin released from the spleen. **Nature**, 231:237-239, 1971.

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

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

GANSTER, R. W.; TAYLOR, B. S.; SHAO, L.; GELLER, D. A. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NFκB. **Proc Natl Acad Sci.** 17; 98(15): 8638-43, 2001.

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

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

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-γ-treated macrophages against *T. cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-β. **Eur J. Immunol.** 22: 2501-2506, 1992.

GAZZINELLI, R. T.; TALVANI, A.; CAMARGO, M. M.; OLIVEIRA, M. A. P.; VIEIRA, L. Q.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C. S.; SILVA, J. S. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. **Braz. J. Med. Biol. Res.**31:89-104, 1998.

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

GEMSA D, SEITZ M, KRAMER W, GRIMM W, TILL G, RESCH K. Ionophore A23187 raises cyclic AMP levels in macrophages by stimulating prostaglandin E formation. **Exp Cell Res** 1979;118:55-62.

GIORGI, M. E.; DE LEDERKREMER, R. M. Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite. **Carbohydr Res.** 346(12):1389-93, 2011.

GIRONES, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity,

parasite persistence, or both? **Trend. Parasitol.** 19(1): 19-22, 2003.

GLOERICH, M.; BOS, J. L. Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 50:355-75, 2010.

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

GOMES JA, MOLICA AM, KEESEN TS, et al. Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease. **Hum Immunol** 2014;75:20-28.

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

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

HARRIS S.G, PADILLA J, KOUMAS L, RAY D, PHIPPS R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends Immunol.**, 23:144-150, 2002.

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

JACOBS, T.; ERDMANN, H.; FLEISCHER, B. Molecular interaction of Siglecs (sialic acid-binding Ig-like lectins) with sialylated ligands on *Trypanosoma cruzi*. **Eur J Cell Biol.** 1:113-6, 2010.

JUNQUEIRA, C.; CAETANO, B.; BARTHOLOMEU, D. C.; MELO, M. B.; ROPERT, C.; RODRIGUES, M. M.; GAZZINELLI, R. T. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Exper Rev Mol Med.** 12: e29, 2010.

KABASHIMA, K.; MURATA, T.; TANAKA, H.; MATSUOKA, T.; SAKATA, D.; YOSHIDA, N. Thromboxane A₂ modulates interaction of dendritic cells and T. cells and regulates acquired immunity. **Nat. Immunol.** 4: 694-701, 2003.

KAMBAYASHI T¹, ALEXANDER HR, FONG M, STRASSMANN G. Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. Colon-26-derived prostaglandin E2 inhibits TNF-alpha release via a mechanism involving IL-10. **J Immunol.** 154(7):3383-90, 1995b.

KASAI, H.; HATAKEYAMA, H.; OHNO, M.; TAKAHASHI, N. Exocytosis in islet beta-cells. **Adv Exp Med Biol.** 654:305-38, 2010.

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

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

LAMMEL, E. M.; BARBIERI, M. A.; WILKOWSKY, S. E.; BERTINI, F.; ISOLA, E. L. Trypanosoma cruzi: involvement of intracellular calcium in multiplication and differentiation. **Exp Parasitol.** 83(2):240-9, 1996.

LEGUIZAMÓN, M. S.; CAMPETELLA, O. E.; GONZÁLEZ CAPPÀ, S. M.; FRASCH, A. C. Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of *trans*-sialidase that inhibit its activity. **Infect Immun.** 62: 3441–3446., 1994.

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

LOLL, P. J.; PICOT, D.; GARAVITO, R. M. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. **Nat Struct Biol.** 2(8): 637-43, 1995.

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

LOPEZ-MUNOZ R, FAUNDEZ M, KLEIN S, et al. Trypanosoma cruzi: In vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. **Exp Parasitol** 2010;124:167-171.

LUONG, C.; MILLER, A.; BARNETT, J.; CUW, J.; RAMESHA, C.; BROWNER, M. F. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2 **Nat. Struct Biol.** 1;89(15): 927-33, 1996.

MACHADO, F. S. *et al.* Chagas heart disease: report on recent development. **Cardiol. Rev.** 20: 53-65, 2012.

MACHADO FS, MUKHERJEE S, WEISS LM, TANOWITZ HB, ASHTON AW. Bioactive lipids in Trypanosoma cruzi infection. **Adv Parasitol** 2011;76:1-31.

MACHADO, F. S; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C. S.; MESTRINER, F. L. A. C.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation.** 24:3003-8, 2000.

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

MAEDA, F. Y., CORTEZ, C., YOSHIDA, N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Front Immunol.** 3:361, 2012.

MAGUIRRE, J. H.; HOFF, R. Cardiac morbidity and mortality due of Chagas disease: prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. **Circulation**. 75(6): 1140-45, 1987.

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

MALVEZI, A. D.; DA SILVA, R. V.; PANIS, C.; YAMAUCHI, L. M.; LOVO-MARTINS, M. I.; ZANLUQUI, N. G.; TATAKIHARA, V. L.; RIZZO, L. V.; VERRI, W. A. JR.; MARTINS-PINGE, M. C.; YAMADA-OGATTA, S. F.; PINGE-FILHO, P. Aspirin modulates innate inflammatory response and inhibits the entry of *Trypanosoma cruzi* in mouse peritoneal macrophages. **Mediators Inflamm**. 14:580919. 2014.

MASSAD, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. **Epidemiol Infect**, 136(9): 1153-64, 2008.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FEÚDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with mammalian host. **Comp. Biochem. Physiol**. 146: 601-620, 2007.

MEISEL, C.; VOGT, K.; PLATZER, C.; RANDOW, F.; LIEBENTHAL, C.; VOLK, H. D. Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 expression. **Eur J Immunol**. 26(7):1580-6, 1996.

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

MENDONÇA-PREVIATO L, TODESCHINI AR, FREIRE-DE-LIMAL, PREVIATO JO. The *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* a putative target for trypanocidal agents. **Open Parasitol J**. 4: 111-115, 2010 .

MING, M.; EWEN, M. E.; PEREIRA, M. E. A. *Trypanosoma* invasion of mammalian cells requires activation of the TGF β signaling pathway. **Cell**. 84: 431-442, 1996.

MOLINA-BERRÍOS, A.; CAMPOS-ESTRADA, C.; HENRIQUEZ, N.; FAÚDEZ, M.; TORRES, G.; CASTILLO, C.; ESCANILLA, S.; KEMMERLING, U.; MORELLO, A.; LÓPEZ-MUÑOZ, R. A.; MYA, J. D. Protective effect of acetylsalicylic acid in experimental *Trypanosoma cruzi* infection: evidence of a 15-epi-lipoxin A₄-mediated effect. **PLoS Negl Trop Dis**. 7(4): e2173, 2013.

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

MONCADA, S.; PALMER R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev** 43: 109-140, 1991.

MORITA, I.; SCHINDLER, M.; REGIER, M. K.; OTTO, J. C.; HORI, T.; DEWITT, D.

L.; SMITH, W. L. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. **J Biol Chem.** 270(18):10902-8, 1995

MORTARA, R. A.; MINELLI, L. M.; VANDEKERCKHOVE, F.; NUSSENZWEIG, V.; RAMALHO-PINTO, F. J. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) cleavage of GPI-anchored surface molecules of *Trypanosoma cruzi* triggers in vitro morphological reorganization of trypomastigotes. **J Eukaryot Microbiol.** 1:27-37, 2001.

MUKHERJEE S, MACHADO FS, HUANG H, et al. Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease. **PloS One** 2011;6:e16959.

MULLET D, FERTEL RH, KNISS D, COX GW. An increase in intracellular cyclic AMP modulates nitric oxide production in IFN-gamma-treated macrophages. **J Immunol** 1997;158:897-904.

MULLIGAN, M. S.; HEVEL, J. M.; MARLETTA, M. A.; WARD, P. A. Tissue injury caused by deposition of immune complexes in L-arginine dependent. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 88: 6338-42, 1991.

MUNOZ-FERNANDES, M. A.; FRESNO, M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *T. cruzi* by TNF- α and IFN- γ through a nitric oxide-dependent mechanism. **Immunology Letters**, 33: 35-45, 1992.

MUSIAL, A.; EISSA, N. T. Inducible nitric oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. **J. Biol. Chem.** 276: 24268-73, 2001.

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

NAULA, C.; SEEBECK, T. Cyclic AMP signaling in trypanosomatids. **Parasitol Today.** 16(1):35-8, 2000.

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

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

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

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

PANINA-BORDIGNON, P.; MAZZEO, D.; LUCIA, P. D.; D'AMBROSIO, D.; LANG, R.; FABBRI, L.; SELF, C.; SINIGAGLIA, F. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. **J Clin Invest.** 15;100(6):1513-9, 1997.

PARK JY, PILLINGER MH, ABRAMSON SB. Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. **Clin Immunol** 2006;119:229-240.

PAVAN, B.; BIONDI, C.; DALPIAZ, A. Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals. **Drug Discov Today.** 14(19-20):982-91, 2009.

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

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

PETERS-GOLDEN M. Putting on the brakes: cyclic AMP as a multipronged controller of macrophage function. **Sci Signal** 2009;2:p37.

PHIPPS R.P, STEIN S.H., ROPER L. A New view of prostaglandin E regulation of the immune response. **Immunol Today** 12: 349-352, 1991.

PIDOUX, G.; TASKÉN, K. Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. **J Mol Endocrinol.** 44(5):271-84, 2010.

PILLAI, S.; NETRAVALI, I. A.; CARIAPPA, A.; MATTOO, H. Siglecs and immune regulation. **Annu Rev Immunol.** 30:357-92, 2012.

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A. Prostaglandin-mediated suppression of lymphoproliferation and cytokine synthesis during the early phase of *T. cruzi*. **Infection Cell. Immunol.** 193 (1): 90-98, 1999.

PITCOVSKY TA, BUSCAGLIA CA, MUCCI J, CAMPETELLA O .A functional network of intramolecular cross-reacting epitopes delays the elicitation of neutralizing antibodies to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **J Infect Dis** 186: 397–404, 2002.

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

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

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

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas

Disease). **Infect Dis Clin N Am**, 26:275-291, 2012.

REY L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos*, 4th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

ROCCA B, FITZGERALD GA. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. **Int Immunopharmacol** 2002;2:603-630.

RODRIGUES, L.E.A. Prostaglandinas, tromboxanas, leucotrienos e lipoxinas: aspectos bioquímicos e médicos. **Atheneu**. Rio de Janeiro. 1992.

RODRIGUEZ, A.; MARTINEZ, I.; CHUNG, A.; BERLOT, C. H.; ANDREWS, N. W. cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. **J Biol Chem**. 274:16754–16759, 1999.

RODRÍGUEZ, A.; RIOULT, M. G.; ORA, A.; ANDREWS, N. A trypanosome-soluble factor induces IP₃ formation, intracellular Ca⁺² mobilization and microfilament rearrangement in host cells. **J Cel Biol**. 129: 1263-1273, 1996.

RODRIGUEZ-PASCUAL, F. Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR. **J. Mol. Chem**. 275: 26040-49, 2000.

ROPERT, C.; FERREIRA, L. R.; CAMPOS, M. A.; PROCÓPIO, D. O.; TRAVASSOS, L. R.; FERGUSON, M. A.; REIS, L. F.; TEIXEIRA, M. M.; ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Microbes Infect**. 9:1015-25, 2002.

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

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

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

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

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

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop** 2010;115:14-21.

SELDON, P. M.; BARNES, P. J.; GIEMBYCZ, M. A. Interleukin-10 does not mediate the inhibitory effect of PDE-4 inhibitors and other cAMP-elevating drugs on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α generation from human peripheral blood monocytes. **Cell Biochem Biophys.** 29(1-2):179-201, 1998.

SEREZANI CH, BALLINGER MN, ARONOFF DM, PETERS-GOLDEN M. Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. **Am J Respir Cell Mol Biol** 2008;39:127-132.

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

SILVA, J. J. N.; PAVANELLI, W. R.; PEREIRA, J. C. M.; SILVA, J. S.; FRANCO, D. W. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection using ruthenium nitric oxide donors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** p. 4414-4421, 2009.

SILVA, J. S.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDERSON, D. ; REED, S. G. Interleukin 10 and Interferon gamma regulation of experimental *T. cruzi* infection. **J. Exp. Med.** 175:169-174, 1992.

SIMMONS, D. L.; BOTTING R.M.; HIA T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. **Pharmacol. Rev.**, 56:387-437, 2004.

SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M.; DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxidase J synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **J Biol Chem.** 27;271(52): 3157-60, 1996.

SMITH, W. L.; SONG, I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases -1 and -2. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** 68-69: 115-128, 2002.

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

STERIN-BORDA, L.; GORELIK, G.; GOREM, N.; CAPPA, S. G.; CELENTANO, A. M.; BORDA, E. Lymphocyte muscarinic cholinergic activity and PGE₂ involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Clin. Immunol. Immunopathol.** 81: 122-128, 1996.

STRASSMANN, G.; PATIL-KOOTA, V.; FINKELMAN, F.; FONG, M.; KAMBAYASHI, T. Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E₂. **J Exp Med.** 1;180(6):2365-70, 1994.

STUEHR, D. J.; NATHAN, C. F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J Exp Med.** 169(5):1543-55, 1989.

STUEHR, D. Mammalian nitric oxide synthase. **Biochim. Biophys. Acta.** 141: 217-230, 1999.

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

TALVANI, A.; MACHADO, F.S.; SANTANA, G.C.; KLEIN, A.; BARCELOS, L.; SILVA, J.S.; TEIXEIRA, M.M. Leukotriene B₄ induces Nitric Oxide Synthesis in *T. cruzi* – Infected Murine Macrophages and Mediates Resistance to Infection. **Infect. Immun.** 12:4247-4253; 2002.

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

TAYLOR, M. C.; MUHIA, D. K.; BAKER, D. A.; MONDRAGON, A.; SCHAAP, P. B.; KELLY, J. M. *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase is encoded by a complex multigene family. **Mol Biochem Parasitol.** 104(2):205-17, 1999.

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

TODOROV, A. G.; EINICKER-LAMAS, M.; DE CASTRO, S.L.; OLIVEIRA, M. M.; GUILHERME, A. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. **J Biol Chem.** 275: 32182–32186, 2000.

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

TRIBULATTI, M. V.; MUCCI, J.; VAN ROOIJEN, N. LEGUIZAMÓN, M. S.; CAMPETELLA, O. The trans-Sialidase from *Trypanosoma cruzi* Induces Thrombocytopenia during Acute Chagas' Disease by Reducing the Platelet Sialic Acid Contents. **Infect Immun.** 73:201-207, 2005.

TRISCHMANN, T. M.; BLOOM, B. Genetics of murine resistance to *T. cruzi* **Infect. Immun.** 35: 546, 1982.

UMANSKY, V. et al. Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF-κB implies a physiological self-amplifying mechanism. **Eur. J. Immunol.** 28, 2276–2282, 1998.

VAN DER POUW KRAAN, T. C.; BOEIJE, L. C.; SMEENK, R. J.; WIJDENES, J.; AARDEN, L. A. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. **J Exp Med.** 1;181(2):775-9, 1995.

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

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

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

2007.

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

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C. ARMENTI, H.; SEGURA, E. Treatment of Chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. **Am Heart J.** 127: 151-162. 1994.

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

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

WANG, Y. P.; WU, Y.; LI, L.Y.; ZHENG, Y.; LIU, R. G.; ZHOU, J.P.; YUAN, S. Y.; SHANG, Y.; YAO, S.L. Aspirin-triggered lipoxin A₄ attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses by inhibiting activation of NF-κB and MAPKs in BV-2 microglial cells. **J. of Neuroinflamm.** 8 (95): 1-12, 2011.

WESTPHALEN, E. V. N.; BISUGO, M. C.; DE ARAÚJO, M. F. L. Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano. **BEPA, Bol. epidemiol. paul.** 105(9): 18-35, 2012.

WHO, World Health Organization. **Why are some tropical disease called “neglected”?** 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/features/qa/58/en/>> Acesso em 07 jun. 2012.

WHO, World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis).** 2013. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> Acesso em 01 set. 2013.

WIRTH, J. J.; KIERSZEMBAUM, F. Effectes of leucotriene C₄ on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. **J.Immunol.** 134: 1989-1993, 1985.

WOOLSEY, A. M.; SUNWOO, L.; PETERSEN, C. A.; BRCHMANN, S. M.; CANTLEY, L. C.; BURLEIGH, B. A. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **J Cell Sci.** 116: 3611–3622, 2003.

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

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

YOSHIMURA T, NAGAO T, NAKAO T, WATANABE S, USAMI E, KOBAYASHI J, YAMAZAKI F, TANAKA H, INAGAKI N, NAGAI H. Modulation of Th1- and Th2-like cytokine production from mitogen-stimulated human peripheral blood mononuclear cells by phosphodiesterase inhibitors. **Gen Pharmacol.** 1998; 30(2):175-80

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

ZINGALES, B.; CARNIOL, C.; ABRAMHAMSOHN, P. A.; COLLI, W. Purification of an adenylyl cyclase-containing plasma membrane fraction from *Trypanosoma cruzi*. **Biochim Biophys Acta.** 19:550(2):233-44, 1979.