



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUANA APARECIDA COSSENTINI

**TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COM ASPIRINA POR  
VIA ORAL E IMPLICAÇÕES PARA A INVASÃO DA MUCOSA  
GÁSTRICA POR *Trypanosoma cruzi* (CEPAS CL14 E G)**

---

Londrina  
2015

LUANA APARECIDA COSSENTINI

**TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COM ASPIRINA POR  
VIA ORAL E IMPLICAÇÕES PARA A INVASÃO DA MUCOSA  
GÁSTRICA POR *Trypanosoma cruzi* (CEPAS CL14 E G)**

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

Orientador: Prof. Dr. Phileno Pinge Filho.

Londrina  
2015

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

Cossentini, Luana Aparecida .

Tratamento com aspirina em camundongos e implicações para a invasão gástrica por *Trypanosoma cruzi* cepas CL 14 e G / Luana Aparecida Cossentini. - Londrina, 2015.  
69 f. : il.

Orientador: Phileo Pinge Filho.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Doença de Chagas - Tese. 2. Aspirina - Tese. 3. Lesão Gástrica - Tese. I. Pinge Filho, Phileo . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental . III. Título.

LUANA APARECIDA COSSENTINI

**TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COM ASPIRINA POR VIA ORAL  
E IMPLICAÇÕES PARA A INVASÃO DA MUCOSA GÁSTRICA POR  
*Trypanosoma cruzi* (CEPAS CL14 E G)**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Graziela Sciantti Ceravolo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de agosto de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais  
Aparecida e Osmar e a minha avó Emília,  
que me ensinaram a ser uma boa pessoa.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço inicialmente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida que sempre me ajudaram, e com fé me fizeram chegar até aqui.

Agradecer aos meus pais Osmar Cossentini e Aparecida Oliveira Santos Cossentini por estarem sempre ao meu lado, mesmo não entendendo mas sempre acreditando nos meus sonhos.

Agradecimento especial para o professor Dr. Phileo Pinge Filho, por toda a ajuda, motivação e paciência para comigo e esse trabalho.

A todos os (as) colegas de laboratório: Sandra Lonien, Nágela Ghabdan, Isabel Lovo Martins, Vera Lúcia Tatakihara, Rosiane Valeriano, Helena Tiemi, Aparecida Malvezi, Bruno Luchetti, Tassiani Rodrigues e Rafael de Freitas, meu apreço.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos e do departamento: Pedro Sebastião Dionízio, Adernal dos Santos, Jesus Antônio Vargas, Laís Sábio, Rizia, Tatiane, Ediel Clementino da Costa, por serem sempre prestativos.

Agradeço o professor Dr. Eduardo José de Almeida Araújo, por ajudar com as fotografias e correção deste trabalho, meu muito obrigada.

Aos amigos para toda vida Mariana Magalhães, Talita Peres, Luís Miguel Carrilho, Vanessa Almeida, Jean Fujiyama, Rafael Silveira (in memoriam), Paula Oliveira e Nelson Medeiros. Obrigada!

A aprendizagem que me deram,  
Desci dela pela janela das traseiras da  
casa.  
Fui até ao campo com grandes propósitos.  
Mas lá encontrei só ervas e árvores,  
E quando havia gente era igual à outra.

Tabacaria - Fernando Pessoa (Álvaro  
de Campos) – 15/01/1928

COSENTINI, Luana Aparecida. **Tratamento com aspirina em camundongos e implicações para a invasão gástrica por *Trypanosoma cruzi* cepas CL 14 e G**, 2015. 69f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

A infecção oral por *Trypanosoma cruzi* tem contribuído para o surgimento de novos casos da Doença de Chagas e se dá principalmente pela ingestão de formas tripomastigotas metacíclicas (TM) presentes em diferentes alimentos. Fármacos que atuam sobre a inibição de enzimas catalizadoras como a ciclooxigenase (COX), predominantemente a COX-1, levam a um desequilíbrio da homeostasia gastrointestinal, que pode ocasionar lesões da mucosa gástrica. Desta forma, foi utilizado ácido acetil salicílico/Aspirina (ASA) como modelo de lesão gástrica em camundongos BALB/c, por via oral, problematizando a entrada do parasito na mucosa gástrica lesionada e sua capacidade de desenvolver a infecção sistêmica. Para tal, utilizamos TM de duas cepas do *T. cruzi*, a CL14 e a G, obtidas a partir de ensaios de metaciclogênese *in vitro*. ASA foi administrada nos dias 0, 1, 2, 3 e 4 após restrição alimentar de 16 horas na dose de 100 mg/kg. Os camundongos foram distribuídos em grupos para determinação da lesão (grupo sem tratamento e grupo tratado), e em grupos para avaliação da infecção (grupo infectado e grupo infectado e tratado) para ambas as cepas. Os animais foram infectados por via oral com  $4 \times 10^5$  para determinação de parasitemia e  $5 \times 10^7$  para determinação do parasitismo no estômago e dosagens de óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Para o ensaio de parasitismo e dosagens, os animais foram submetidos a eutanásia no quarto dia pós infecção para a retirada do estômago. Em outro ensaio, a partir do 13º dia pós-infecção, a carga parasitária no sangue foi determinada a cada dois dias. Nossos resultados mostram que o tratamento com ASA 100 mg/kg produziu lesão na mucosa gástrica caracterizada por score de lesão em torno de 2.5, produção diminuída de NO e aumento de TNF- $\alpha$ . Observamos ainda que camundongos previamente tratados apresentaram maior parasitemia para as cepas de *T. cruzi* utilizadas (CL 14 e G), e maior parasitismo na mucosa gástrica para a cepa CL 14. Evidenciando claramente que a lesão na mucosa gástrica atua com porta de entrada para cepas de *T. cruzi* pouco infectivas, podendo tornar indivíduos residentes em áreas endêmicas ainda mais susceptíveis a infecção.

**Palavras chave:** Aspirina. Doença de Chagas. Invasão gástrica. *Trypanosoma cruzi*.

COSENTINI, Luana Aparecida. **Aspirin treatment in mice and implications for gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* strains CL 14 and G**. 2015. 69p. Master Dissertation (Master in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2015.

## ABSTRACT

Oral infection by *Trypanosoma cruzi* has contributed to the emergence of new cases of the disease and mainly occurs by ingestion of metacyclic trypomastigotes (TM) present in different foods. Drugs that act on the inhibition of COX enzymes such as cyclooxygenase-1 (COX-1), leads to an imbalance of gastrointestinal homeostasis, which may cause gastric mucosal lesions. Therefore, we decided to use aspirin (ASA) and gastric injury model in BALB/c mice, orally, questioning the parasite enter the injured gastric mucosa and their ability to develop systemic infection. In order to this, use of TM two strains of *T. cruzi*, CL14 and G, obtained from metacyclogenesis *in vitro* assays. ASA was administered on days 0, 1, 2, 3 and 4 after a 16 hours food restriction on a concentration of 100 mg / kg. The mice were allocated into groups for determining the lesion (untreated group and treated group) and groups for assessment of infection (infected and infected group and treated group) to both strains. The animals were infected orally with for determining parasitaemia  $4 \times 10^5$  and  $5 \times 10^7$  to determine the parasitic in the stomach and nitric oxide dosages and TNF- $\alpha$ . For the parasitism and dosages' test the animals were euthanized on the fourth day after infection and proceeded to removal the stomach. In another test, from the 13th day post-infection, the parasitic load in the blood was determined every two days. Our results show that treatment with ASA 100 mg / kg produced damage gastric mucosal injury score wherein around 2.5, decreased production of nitric oxide and increased TNF- $\alpha$ . We also observed that previously treated mice showed a higher parasitaemia for *T. cruzi* strains used (and G 14 CL), and higher parasitism on the gastric mucosa to CL 14 strain. Clearly indicating that the injury to the gastric mucosa acts gateway to *T. cruzi* strains little infective, may becoming living individuals in endemic areas even more susceptible to infection.

**Keywords:** Aspirin. Chagas disease. Gastric invasion. *Trypanosoma cruzi*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Esquema do ciclo biológico do *T. cruzi*. Inseto vetor faz o repasto sanguíneo, adquirindo o parasito. Ao chegar a porção inicial do tubo digestório se diferencia em epimastigota. O inseto infectado elimina em suas fezes formas tripomastigotas metacíclicas do parasito. Dentro do hospedeiro o parasito sobrevive se diferenciando em amastigota. Podendo voltar a sua forma tripomastigota e infectar outras células .....14
- Figura 2** - Síntese de PG. Fosfolipases atuam sobre os fosfolipídios da membrana produzindo AA. A COX age sobre o AA produzindo vários subprodutos, entre eles as PGs, que desempenham papel protetor na mucosa gástrica .....25
- Figura 3** - AINEs induzem lesão na mucosa gástrica. Reduzindo parâmetros que atuam como barreira física na proteção do epitélio.....28
- Figura 4** - *Linha cronológica*. Os dias de experimentação foram distribuídos conforme a linha do tempo. As setas vermelhas indicam os dias de tratamento com ASA na dose de 100 mg/kg. A seta verde indica o dia de infecção. A seta rosa claro aponta o dia de retirada do estômago. As setas amarelas mostram o dia de início e fim da parasitemia .....31

### Manuscrito (Artigo)

<b>Figure 1</b> .....	64
<b>Figure 2</b> .....	65
<b>Figure 3 A</b> .....	66
<b>Figure 3B-C</b> .....	67
<b>Figure 4</b> .....	68

## LISTA DE QUADRO

**QUADRO 1** - Grupos Experimentais. Camundongos não tratados com ASA, que receberam apenas DMSO + PBS podendo ser ou não infectados foram chamados de VEÍCULO, e camundongos tratados com ASA 100 mg/Kg, infectados ou não, foram chamados de ASA.....32

## LISTA DE TABELA

Manuscrito (Artigo)

**Table 1** - Differential *in vitro* infectivity of *T. cruzi* isolates CL14 and G.....69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AINES	Anti-inflamatório não esteroide
ASA	Ácido acetil salicílico/aspirina
CEUA/UEL	Comissão de Ética no Uso de Animais/Universidade Estadual de Londrina
CONCEA	Conselho nacional de controle de experimento animal
COX	Ciclooxigenase
DC -	Doença de Chagas
DEAE	Dietilaminoetil
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HE	Hematoxilina e eosina
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LIT	Liver infusion triptose
LT	Leucotrieno
NK	Célula natural killer
NO	Óxido nítrico
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PSG	Tampão fosfato + glicose
SFB	Soro fetal bovino
TAU	Triatomine artificial urine
TGF	Fator de crescimento transformante
TM	Tripomastigota metacíclico
TNF	Fator de necrose tumoral
TX A2	Tromboxano A2
TX	Tromboxano
VCAM 1	Molécula de adesão vascular 1

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
1.1	<i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E DOENÇA DE CHAGAS (DC).....	12
1.2	INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR <i>T. CRUZI</i> EM CAMUNDONGOS .....	20
1.3	INFECÇÃO ORAL.....	22
1.4	PGE <sub>2</sub> E INFECÇÃO POR <i>T. CRUZI</i> .....	24
1.5	ASPIRINA E LESÃO GÁSTRICA.....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	30
2.1	OBJETIVO GERAL .....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
3.1	ANIMAIS .....	31
3.2	PARASITOS.....	31
3.3	LINHA DO TEMPO .....	31
3.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	31
3.5	TRATAMENTO COM ASA .....	32
3.6	AVALIAÇÃO DO SCORE DA LESÃO .....	33
3.7	OBTENÇÃO DAS FORMAS TM DE <i>T. CRUZI</i> .....	33
3.8	PARASITISMO NO ESTÔMAGO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>T. CRUZI</i> .....	34
3.9	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	34
3.10	DOSAGEM DE TNF- A .....	35
3.11	PARASITEMIA E SOBREVIDA.....	36
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIA</b> .....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	47

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 *TRYPANOSOMA CRUZI* E DOENÇA DE CHAGAS (DC)

A DC é uma antropozoonose característica da América Latina, descoberta em 1909 por Carlos Chagas. Essa doença tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, parasito intracelular que invade diferentes tipos de células nos mamíferos, relacionando-se com o hospedeiro através de receptores, como glicoproteínas e lipídeos, expressos tanto no parasito quanto nas células de mamíferos (CIMERMAN, 1999). O parasito possui flagelo e uma única mitocôndria chamada de Kinetoplasto (RASSI Jr, 2012 e PEREZ, 2014).

Pertencem ao filo *Sarcomastigophora*, subfilo *Mastigophora*, ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*. Os pertencentes à ordem Kinetoplastida incluem organismos unicelulares que possuem compartimentalização da glicólise, capacidade de evasão da resposta imune do hospedeiro a partir das suas moléculas de superfície e a capacidade de evadir-se do vacúolo parasitóforo (RASSI Jr, 2012).

O *T. cruzi* assume diferentes formas evolutivas, tendo um ciclo complexo (Figura 1), que reflete uma adaptação ao habitat e a situação que se encontra. Formas epimastigotas são encontradas no interior do inseto vetor na porção inicial do intestino e formas tripomastigotas metacíclicas são encontradas na porção final do tubo digestório do triatomíneo, enquanto formas amastigotas são encontradas no interior de células hospedeiras (CIMERMAN, 1999 e VILLALTA e KIERSZENBAUN, 1983).

Os vetores da DC são os triatomíneos, com cerca de 140 espécies, pertencentes a ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (LAZZARI, 2013). *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são os

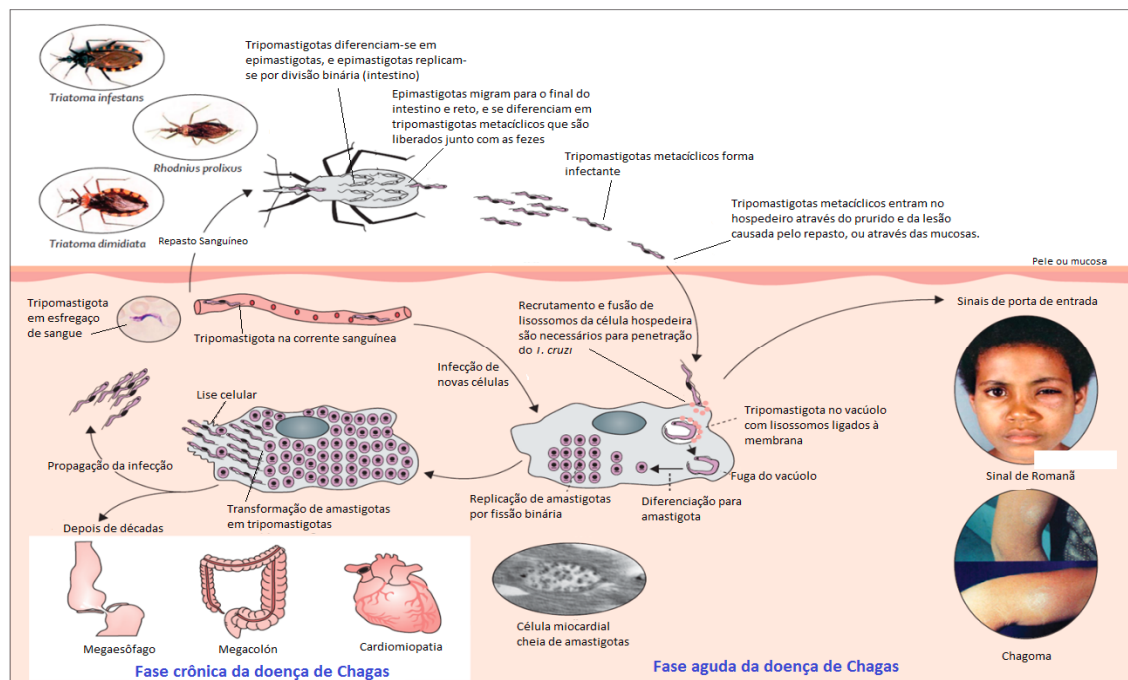
insetos vetores mais importantes na infecção por *T. cruzi*, e são encontrados em regiões entre o México e em áreas endêmicas do sul da América do Sul (RASSI Jr, 2010). Os estágios de adultos do vetor têm maior probabilidade de estarem infectados, pois se alimentaram mais vezes que seus estágios iniciais (RASSI Jr, 2010).

Esses insetos fazem o repasto sanguíneo no futuro hospedeiro, depositando suas fezes próximas ao local em que se alimentaram. A partir de arranhões e do prurido causado pela hematofagia do vetor, o parasito adentra no corpo do hospedeiro, podendo também entrar pelas mucosas (NUSSBAUM, 2010).

O ciclo inicia-se com o repasto sanguíneo do inseto sobre um mamífero infectado. O vetor, dessa forma, adquire o parasito na forma tripomastigota sanguíneo. Dentro do seu vetor, o *T. cruzi* segue até o intestino, onde se diferencia em epimastigota, devido as condições desfavoráveis do microambiente, e multiplica-se por fissão binária. Já na porção final do intestino do inseto, o parasito se diferencia para TM (forma infectante para os mamíferos) e é eliminado junto com as fezes e urina próximo ao local da picada adentrando no organismo (GASCON et al, 2010). Ao penetrar no hospedeiro mamífero, o parasito pode infectar qualquer célula nucleada, principalmente macrófagos, aderindo-se às membranas das células e induzindo sua fagocitose. Dentro da célula do hospedeiro, o parasito consegue escapar do vacúolo parasitóforo que está em formação. A medida que o processo de internalização progride, lisossomos se fundem aos vacúolos, diminuindo o pH do vacúolo, o que proporciona a ativação de proteínas formadoras de poros que rompe as membranas do conteúdo lisossomal, promovendo a degradação, porém a forma tripomastigota não é afetada pela ação deste mecanismo (BURLEIGH, ANDREWS, 1995).

Após a entrada na célula, o parasito se diferencia em amastigotas, que se multiplicam por fissão binária até a ruptura da célula, diferenciando-se em tripomastigotas sanguíneo. A partir deste momento voltam para a corrente sanguínea, onde podem infectar outras células e afetar órgãos como esôfago, intestino grosso e coração (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012). Alguns parasitos são destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro e outros podem ser ingeridos pelos triatomíneos, onde desenvolverão o seu ciclo extracelular (PEREIRA NEVES et al, 2011; SARMENTO, 2008). Em modelos murinos a modulação a susceptibilidade do hospedeiro à infecção dependente tanto da imunidade inata quanto adquirida. Estando diretamente ligada ao padrão de produção de citocinas, o qual é crítico para a ativação de macrófagos e controle do parasitismo durante as primeiras semanas após a infecção por *T. cruzi* (DOS REIS, 1997 e ABRAHAMSOHN, 1998).

**Figura 1 -** Esquema do ciclo biológico do *T. cruzi*. Inseto vetor faz o repasto sanguíneo, adquirindo o parasito. Ao chegar a porção inicial do tubo digestório se diferencia em epimastigota. O inseto infectado elimina em suas fezes formas tripomastigotas metacíclicas do parasito. Dentro do hospedeiro o parasito sobrevive se diferenciando em amastigota. Podendo voltar a sua forma tripomastigota e infectar outras células.



Fonte: RASSI-JR et al., 2010

Em termos de patogênese, considera-se o *T. cruzi* como um dos parasitos que apresenta maior plasticidade, devido a sua capacidade de infectar vários tipos celulares (PEREIRA et al, 2000).

A presença da DC na América data de pelo menos 9000 anos (MOLINA-BERRIOS, 2013). Apresentando-se como uma doença enzoótica de animais selvagens. Entretanto, com a expansão agrícola e pecuária, os humanos entraram acidentalmente no ciclo biológico do parasito, o que gerou uma adaptação do protozoário ao novo nicho e ao sangue humano e de animais domésticos, tornando então uma zoonose de grande relevância (COURA, 2007).

Milhões de pessoas são infectadas, sendo um problema de saúde pública, com significativo impacto sanitário e socioeconômico em todo o mundo (MELO e MACHADO, 2001).

Na América Latina, milhões de pessoas estão em risco de infecção (MUKHERJEE, 2011). Atualmente a DC afeta mais de 8 milhões de pessoas, acarretando em média 10.000 mortes por ano, sendo maior que a malária nessa mesma região. Dentre as doenças tropicais, a DC se encontra na faixa de 89% de mortes (MOLINA-BERRIOS, 2013). Dados mostram ainda que 28 milhões de pessoas correm o risco de estarem infectadas por *T. cruzi* nas regiões endêmicas da América Central e América do Sul (GUEDES, 2012).

Além da transmissão pelo vetor triatomíneo, a infecção por *T. cruzi* pode ser transmitida pelo vetor (triatomíneo), e ocasionalmente por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transmissão congênita e pela via oral a partir de ingestão de alimento contaminado. Derivados de açaí e cana-de-açúcar estão associados à grande presença de parasitos nos lugares produtores destes alimentos, resultando

em doença aguda severa e grande mortalidade (RASSI Jr., RASSI, MARIN-NETO, 2010).

A lesão cardíaca é a principal consequência causada pela infecção por *T. cruzi*, acometendo principalmente jovens adultos economicamente produtivos nos países endêmicos (MONCAYO, 2009). Isso pode acarretar uma diminuição de produtividade anual de 1,2 bilhões dólares relacionados à DC nos países mais acometidos (MOLINA-BERRIOS, 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, devido à mobilidade da população entre os países endêmicos e o resto do mundo, a DC tem sido diagnosticada em países como Estados Unidos da América, Canadá, países da Europa como Espanha e Itália (WHO, 2013). A migração induzida pelos progressos industriais levou a um êxodo urbano, culminando num empobrecimento das áreas rurais, crescendo a transmissão não vetorial do parasito (DIAS, 1993).

Evidências demonstram um número elevado de imigrantes latino-americanos vivendo no exterior que podem estar infectados, porém em um estado subclínico da doença, sendo necessário a implementação de medidas específicas para prevenir a infecção a partir de doação de sangue, transplantes de órgãos e transmissão secundária congênita (SCHMUNIS e YADON, 2010).

Ramírez e colaboradores (2013) sugeriram que, em áreas em que a transmissão vetorial foi interrompida, novos surtos agudos da doença podem emergir como um problema potencial em saúde pública.

Os custos do tratamento da DC ainda são altos. Somente na Colômbia, o custo anual com pacientes chagásicos é em torno de 267 milhões de dólares. Já o custo anual com inseticidas para controle vetorial é de aproximadamente 5 milhões de dólares (WHO, 2013). O Brasil é o país com menor número de casos do

continente. A partir de 2006 foi certificado como um país livre da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* (RASSI Jr *et al.*, 2012). Entretanto, registros oficiais indicam que no Brasil ocorre aproximadamente 6 mil mortes de pacientes chagásicos crônicos por ano (CHAPADEIRO *et al.*, 1999). Outros portadores da infecção na fase crônica podem ter redução de nove anos na expectativa de vida (BLITZMAN, 2007).

No final da fase crônica da doença, os parasitos que circulavam pelos vasos sanguíneos estão ausentes, enquanto que as manifestações clínicas de insuficiência cardíaca podem estar em evidência (MOLINA-BERRIOS, 2013).

Grande parte dos indivíduos que estão infectados apresentam-se assintomáticos na fase crônica (60 a 70%), qualificando-se na forma indeterminada da doença. Por outro lado, 30 a 40% dos pacientes em fase crônica têm progresso para insuficiência cardíaca e/ou distúrbios digestivos (GUEDES, 2012).

A inflamação intensa multifocal progressiva do miocárdio e os danos no endotélio vascular levam a vaso espasmos e redução do fluxo sanguíneo cardíaco, provocando alterações isquêmicas que levam a cardiomiopatia chagásica (ESPER, 2012 e MOLINA-BERRIOS, 2013). As alterações cardíacas se manifestam de forma insidiosa, com alterações no ritmo de contração, insuficiência cardíaca e eventos tromboembólicos. Ao exame anatomopatológico, o coração encontra-se em inflamação crônica e fibrose, pois tal manifestação ocorre anos após a infecção inicial. Para diagnóstico *in vivo* das alterações cardiovasculares causadas pela infecção por *T. cruzi*, utiliza-se exames como eletrocardiograma, ecocardiograma e ressonância magnética cardíaca (ESPER, 2012).

O endotélio vascular expressa moléculas de adesão intracelular-1 (ICAM-1 ou CD54), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1 ou CD106), e *E-selectina*. Moléculas essas que atuam no recrutamento de células de defesa. Observa-se que

tais moléculas estão aumentadas no miocárdio de pacientes infectados com *T. cruzi*, colaborando com a patogênese da miocardite na DC. Algumas moléculas, como receptores Toll e glicoproteínas de superfície também podem participar da interação entre a TM e as células do sangue (MOLINA-BERRIOS, 2013).

Lesões inflamatórias no coração são caracterizadas por infiltrados de células mononucleares com destruição das fibras cardíacas dentro do foco inflamatório, levando a áreas de fibrose e fenômenos tromboembólicos (ANDRADE, 1979).

A infecção crônica é dividida em crônica indeterminada, onde se encontra pacientes sem sintomatologia e sem manifestações clínicas, mas com presença de anticorpos; crônica cardíaca, onde cardiomiócitos são lesados; crônica digestiva, acometendo todo o tubo digestório principalmente esôfago e cólon (CIMERMAN, 1999).

O comprometimento do sistema nervoso entérico, principalmente o plexo mioentérico (KÖEBERLE, 1968) conduz a lesões no trato digestório em cerca de 8 a 10% dos pacientes infectados, manifestando-se inicialmente com dilatação do esôfago (megaesôfago) seguida por dilatação no cólon (megacólon) (DIAS, 1995).

O diagnóstico preciso da infecção é fundamental para o manejo clínico, entretanto torna-se ainda mais complicado pelo fato do ciclo de vida do parasito ser complexo e por sua capacidade de infectar células nucleadas (PEREZ, 2014).

O diagnóstico da infecção aguda se baseia na detecção do próprio parasito ou do ácido desoxirribonucleico (DNA) do parasito no sangue do paciente. Sintomas clínicos como febre, fadiga, anorexia, diarreia, vômito e sinais de porta de entrada como o chagoma, podem ser indícios de infecção por *T. cruzi* (PEREZ, 2014). Entretanto, na fase crônica da doença, a parasitemia se torna escassa, e a quantidade de IgG suficiente para ser detectadas por métodos imunológicos como

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RASSI Jr, 2010).

Em áreas do norte do Brasil, o diagnóstico sorológico da infecção por *T. cruzi* é extremamente complexo, devido ao grande número de reações cruzadas com outras infecções de grande ocorrência nesta área, incluindo a malária, leishmaniose, tuberculose, lepra e infecção *T. rangeli* (COURA, 2013).

Formas TM podem causar infecção quando administradas oralmente (HOFT, et al., 1996). Isso ocorre, pois tais formas apresentam moléculas de superfície que interagem com moléculas do hospedeiro (BURLEIGH and ANDREWS, 1995).

As gps são glicoproteínas que constituem um grupo de moléculas importantes para a invasão do *T. cruzi* nas células, sendo diferentemente expressas nas várias cepas do parasito (MORTARA, et al., 1992).

Moléculas como a gp82 se ligam aos seus receptores na superfície da célula hospedeira, desencadeando mobilização de  $Ca^{2+}$ . Cepas que expressão essa molécula em grande quantidade têm internalização mais eficiente (YOSHIDA, 2008).

Formas TM que apresentam gp90 e gp35/50 são não infectivas e pouco infectivas, respectivamente. Essas glicoproteínas estão pobremente expressas em cepas altamente infectivas (YOSHIDA, 2006). As cepas que as expressam têm baixa ou nenhuma infectividade devido a sua não indução ou pouca indução de influxo de  $Ca^{2+}$  (DORTA, et al., 1995).

Estudos recentes demonstraram que *T. cruzi* clone CL14 é pouco infectivo em comparação com a cepa CL. Isso ocorre porque há uma grande diferença no perfil das moléculas de superfície. Na CL encontra-se uma grande quantidade de gp-82, tornando-a altamente invasiva. Entretanto, na cepa clone CL14 essa expressão foi

deficiente e maior para a gp35/50, caracterizando essa cepa como pouco infectiva (ATAYDE, et al., 2004).

*T. cruzi* cepa G tem taxa de internalização quase nula, pois apresenta grande expressão de gp90 em sua superfície (YOSHIDA, 2006). Como mostrado por Málaga e Yoshida (2001), parasitos que contêm grande quantidade de gp90 quando tratados com oligonucleotídeos para não expressão de gp90, têm um aumento na habilidade de infectar as células hospedeiras.

## 1.2 INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *T. CRUZI* EM CAMUNDONGOS

Quando infectados com *T. cruzi*, os camundongos apresentam graves alterações, incluindo trombocitopenia, neutrofilia e eosinofilia, o que contribui para a morte do hospedeiro. Na infecção experimental aguda, observa-se também anemia, trombocitopenia, leucopenia e hipoplasia da medula óssea (TATAKIHARA, 2008).

Nesta fase, os modelos experimentais apresentam alta parasitemia e muitos infiltrados inflamatórios no coração, músculos esqueléticos e órgãos do trato digestório (BORGES, 2009). Os macrófagos montam a resposta através da atividade inflamatória antiparasitária, que inclui o aumento da produção de NO e peroxinitrito causando estresse oxidativo (LÓPEZ- MUÑOZ, 2010).

Foi relatado que, em modelos animais, as citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-6 (IL-6), NO e mediadores lipídicos, são muito importantes para a sobrevivência do hospedeiro durante a infecção aguda experimental (PANIS, 2011).

A imunidade desenvolvida pela infecção por *T. cruzi* é do tipo adaptativa, com células T auxiliares tipo I (Th1), que produzem em grandes concentrações:

Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-12 e TNF. A liberação dessas citocinas contribui para o controle da replicação do parasito no organismo do hospedeiro definitivo. Tais citocinas também são secretadas por macrófagos, quando estimulados por moléculas presentes no *T. cruzi* como mucinas glicosilfosfatidinositol e o seu DNA (ESPER, 2012).

A IL-12 secretada induz ativação de células natural killer (NK) que irão sintetizar IFN- $\gamma$ . Sua ação induzirá aumento nos níveis de IL-12 que voltará a esse ciclo maximizando a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK. O IFN- $\gamma$  também é estimulado pela ação de TNF e IL-1B por macrófagos por feedback positivo. IFN- $\gamma$  também age na indução e manutenção do controle da fase aguda da infecção. Reproduzindo o que acontece em humanos como demonstrado por GUEDES (2012), onde células mononucleares do sangue periférico de pacientes com alterações cardíacas relacionadas com a DC produzem mais IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, e menos IL-4 e IL-10, quando comparados com pacientes com a forma indeterminada da doença.

A resistência inicial em camundongos à infecção ocorre pelo equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias: IFN- $\gamma$  e anti-inflamatórias: IL-10, ocorrendo paralelamente a diminuição da síntese de IL-10 e fator de crescimento transformante (TGF) que estão relacionados com a suscetibilidade à infecção (ESPER, 2012).

Os eicosanoides produzidos a partir do ácido araquidônico (AA), tais como leucotrienos (LTs), prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX), possuem efeitos pleiotrópicos sobre uma vasta gama de tipos celulares dentro e fora do sistema imunológico (PANIS, 2010). Na infecção por *T. cruzi*, é demonstrado que o TX tem ação em todas as fases da infecção, sendo um regulador importante na patogênese da doença (BORGES, 2009).

Durante a infecção aguda, PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> E PGF<sub>2A</sub> são produzidos mais expressivamente. Isso provoca modulação da resposta imune do hospedeiro contra o parasito a partir da ação da PGE<sub>2</sub> e do TXA<sub>2</sub> facilitando a transformação da doença para a fase crônica. TXA<sub>2</sub> do parasito é importante para a sobrevivência do parasito, para a regulação da replicação amastigota durante a fase aguda e imunomodulação da doença cardíaca (MOLINA-BERRIOS, 2013).

A síntese de citocinas pró-inflamatórias é de grande importância para ativação da resposta imune mediada por linfócitos T, estando relacionada com a cardiomiopatia desencadeada pela DC. Já as citocinas reguladoras (IL-10) estão ligadas a uma proteção ao início das alterações cardíacas (GUEDES, 2012).

O equilíbrio da resposta imune no curso da infecção por *T. cruzi* é crítico para o controle da carga parasitária nos tecidos em que o parasito tem tropismo como tecido muscular cardíaco e tecido nervoso do trato gastrointestinal (ESPER, 2012).

Na fase aguda da infecção é caracterizada por imunossupressão induzida pelo agente etiológico, com a capacidade de evasão do sistema imune do hospedeiro. Essa imunossupressão é mediada por PGs e citocinas, como por exemplo, o TGF- $\beta$ . Ocorre aumento da concentração de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e TXA<sub>2</sub> no sangue de camundongos infectados com *T. cruzi*, que durante a fase aguda são produzidos por células do baço e por macrófagos (MOLINA-BERRIOS, 2013 e TATAKIHARA, 2008).

### 1.3 INFECÇÃO ORAL

A infecção oral por *T. cruzi* é uma das mais importantes formas de transmissão em várias regiões, devido a surtos de casos de DC aguda em determinadas regiões do país após ingestão de alimentos contaminados com o

parasito. Na Amazônia brasileira, 50% dos casos de DC registrados entre 1968 e 2000 são vinculados a infecção por via oral (YOSHIDA, 2008 e 2009).

A mucosa gástrica é uma das principais portas de entrada para infecção sistêmica. Moléculas de superfície presentes na forma TM são responsáveis pela viabilidade da infecção, entre elas temos a gp82 (YOSHIDA, 2008 e CORTEZ, 2012), glicoproteína presente na membrana plasmática de formas TM e em formas intermediárias da metaciclogênese localizada em estruturas vesiculares na região posterior do parasito (BAYER-SANTOS, 2013). Sua ação se dá pela ligação à mucosa gástrica a partir da porção carboxi-terminal desta adesina (STAQUICINI, 2010), desencadeando a mobilização da cascata de  $Ca^{2+}$  que induz a internalização do parasito (YOSHIDA, 2008) e o recrutamento de lisossomos para o local de entrada do parasito, para a produção do vacúolo parasitóforo durante a invasão da célula hospedeira (BAYER-SANTOS et al, 2013).

Outras moléculas presentes no parasito na forma TM, como a gp30, possuem baixo efeito de ligação e internalização, não ativando a cascata de  $Ca^{2+}$  o suficiente para internalização. A gp90 localiza-se na membrana plasmática nas proximidades do cinetoplasto, onde o complexo Golgiense e o bolso flagelar estão localizados (BAYER-SANTOS et al. 2013). Tal molécula tem efeito negativo à infecção, pois modula negativamente o aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular. Além disso, esta molécula é facilmente degradada pelas pepsinas e pelo pH ácido do meio estomacal, o que aumenta a taxa de internalização novamente (YOSHIDA, 2008 e 2009 e CORTEZ, 2012).

As formas do parasito que apresentam tais moléculas são obtidas a partir da metaciclogênese, processo onde ocorre a diferenciação de epimastigotas em TM, que são as formas infecciosas para o hospedeiro mamífero (BAYER-SANTOS et al. 2013).

O sistema imune pode responder de diversas formas à infecção por *T. cruzi* iniciada por via oral, devido ao risco de estabelecer infecção sistêmica a partir da transposição da mucosa gástrica. Ao invadir o epitélio gástrico, o parasito

permanece restrito às células gastrointestinais locais nos primeiros ciclos de invasão celular e replicação no hospedeiro, podendo ativar a imunidade mediada por células T CD8<sup>+</sup> (COLLINS, 2011).

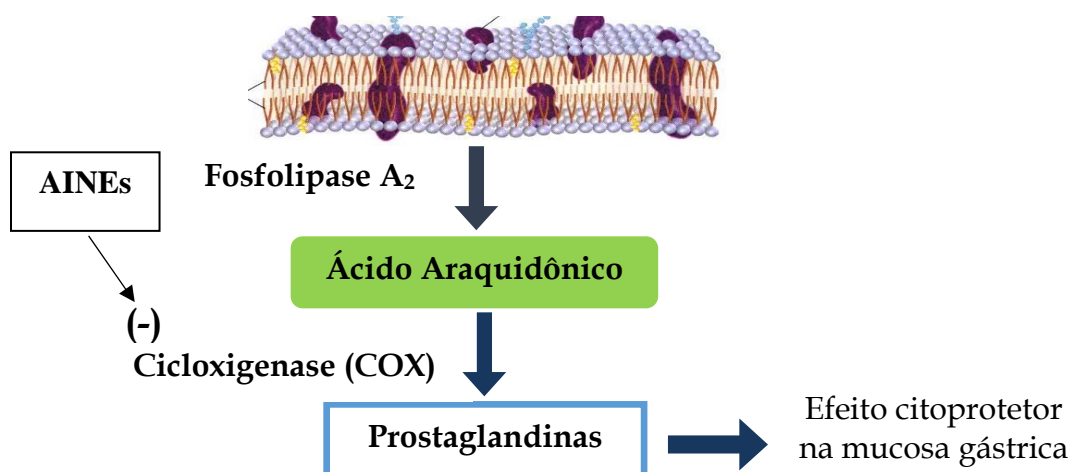
Proteínas são diferencialmente expressas em distintas fases do ciclo do *T. cruzi*, o q dificulta o desenvolvimento de uma vacina que estabeleça uma imunidade estéril. Embora a gp82 seja expressa apenas por parasitos na forma metacíclica, tal molécula se apresenta como um bom alvo para respostas imunológicas destinadas a fornecer proteção imunitária contra a invasão inicial e os ciclos de replicação intracelular. Seus resultados demonstram que a vacina da mucosa contendo anti-gp82 pode reduzir significativamente a infecção pela mucosa oral (EICKHOFF, 2010).

#### 1.4 PGE<sub>2</sub> E INFECÇÃO POR *T. CRUZI*

O AA é produzido a partir da ação de fosfolipases sobre os fosfolipídios da membrana plasmática, sendo substrato central para a síntese de eicosanoides. Para a produção de PGs a partir do AA, tem-se a ação de enzimas chamadas COX. Estas enzimas têm estrutura e ação enzimáticas semelhantes, mas com diferentes papéis fisiológicos. A COX-1 é constitutiva e seus produtos contribuem para produção de muco gástrico e agregação plaquetária, enquanto COX-2 é induzida e exibe funções na inflamação (Figura 2). A função de tais enzimas e seus produtos não são bem compreendidos em doenças parasitárias (MUKHERJEE, 2011 e GARG, 2014). A PGE é produzida a partir dessa cascata de eventos e atua, entre outros, na citoproteção gástrica (MILLER e JACOBSON, 1979).

A PGE<sub>2</sub> pode influenciar de duas maneiras a secreção ácida gástrica. Em baixas concentrações inibem a secreção ácida, através da interação com receptores EP<sub>3</sub> e em concentrações maiores estimulam a secreção ácida através da interação com receptores EP<sub>4</sub>. Ambos os receptores estão presentes nas células parietais da mucosa gástrica (DING et al, 1997). Sua ação está ligada a promoção da formação de muco, bem como da secreção de bicarbonato. Além disso, PGs podem obstruir a produção de gastrina e aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa (GARG, 2014).

**Figura 2 -** Síntese de PG. Fosfolipases atuam sobre os fosfolipídios da membrana produzindo AA. A COX age sobre o AA produzindo vários subprodutos, entre eles as PGs, que desempenham papel protetor na mucosa gástrica.



**Fonte:** MILLER e JACOBSON 1979 e GARG, 2014.

Eicosanóide, como PGE<sub>2</sub> e outros, podem contribuir para a reestruturação cardíaca e alterações funcionais no coração após a infecção por *T. cruzi*, sendo o bloqueio da ação das COX um potencial alvo terapêutico. Isto é reforçado pelo fato de que em macrófagos infectados, o tratamento prévio com a Aspirina (ASA), indometacina ou com celecoxibe (inibidor de COX-2) diminuiu parasitemia. Estudos recentes têm demonstrado que ASA tem ação como um interruptor metabólico no

sentido de uma via ligada a acetilação da isoenzima COX-1 resultando assim na inibição da produção de mediadores inflamatórios (MOLINA-BERRIOS, 2013).

A inibição dessas enzimas por fármacos como ASA, apresenta afirmações controversas. MUKHERJEE et al, 2011, demonstraram que camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com ASA apresentam um aumento da parasitemia e mortalidade, diretamente proporcional ao aumento da dose do fármaco. Este estudo indica que eicosanoides regulam a resposta do hospedeiro a evolução da infecção causada por *T. cruzi*, atuando na transição da fase aguda para a fase crônica da doença e contribui para a patogênese da DC (MUKHERJEE, 2011).

Por outro lado, alguns estudos sugerem que o uso de fármacos bloqueadores de COX aumentam a produção de moléculas de adesão em tecidos cardíacos e não tem efeito sobre os níveis de parasitemia e sobrevida dos animais infetados, em comparação com os controles. Estes dados ascendem novas possibilidades terapêuticas para a DC, indicadas especialmente para a melhoria do dano microvascular, que é consequência na cardiomiopatia chagásica crônica (MOLINA-BERRIOS, 2013).

Dados recentes, ainda demonstram que os efeitos combinados do ASA com os efeitos tóxicos de drogas anti-*T. cruzi* em macrófagos, são mecanismos complementares; e que uso de ASA para inibição da síntese de PGE<sub>2</sub> melhora a resposta dos macrófagos contra a infecção por *T. cruzi* (LÓPEZ- MUÑOZ, 2010).

### 1.5 ASPIRINA E LESÃO GÁSTRICA

Descoberta e isolada em 1897, a ASA se revelou como um dos principais medicamentos devido ao seu grande efeito terapêutico. Sendo desde então o mais

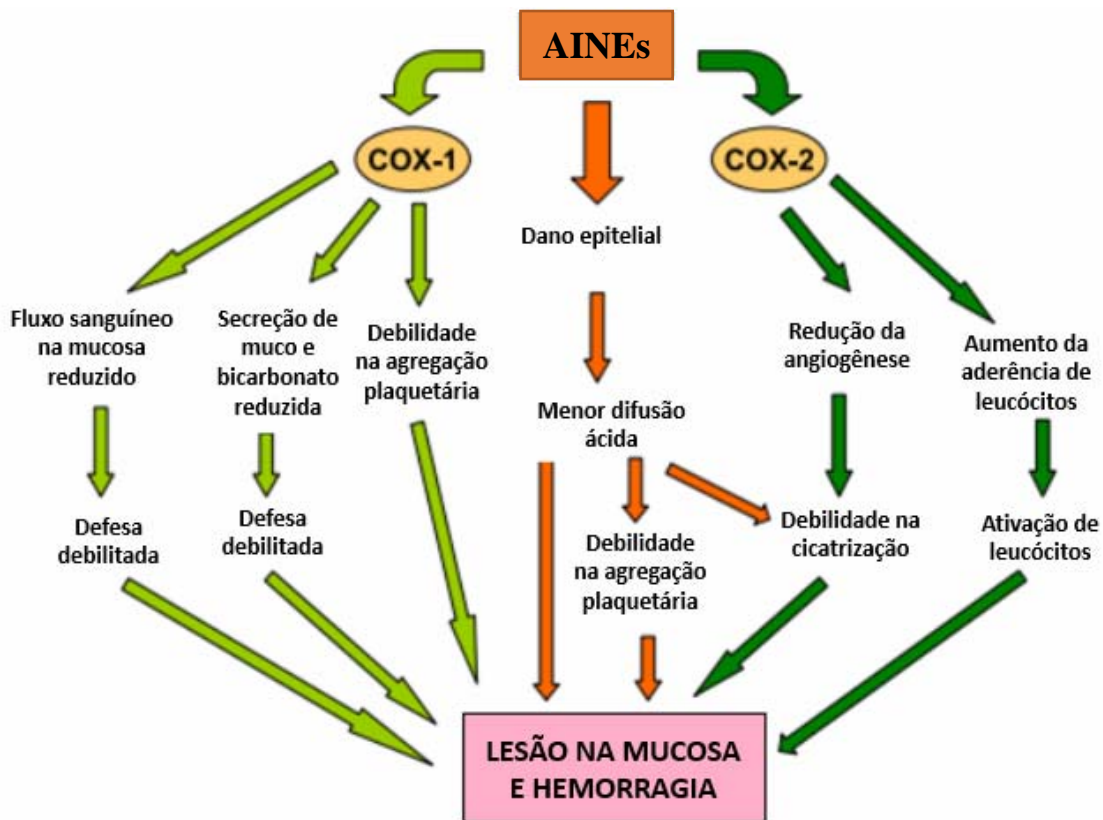
utilizado para tratamentos anti-inflamatórios e no tratamento de dores (GABRIEL, 1992 e TAKEUCHI, 2014). Além disso, ASA é comumente administrada para prevenção de doenças cardiovasculares (CRYER e MAHAFFEY, 2014).

Esse inibidor de COX é um reconhecido indutor de úlceras e até hemorragias no epitélio gástrico. Tal alteração patológica está relacionada com a inibição da COX 1 presente no estômago (FIORUCCI, 2011).

O risco atribuível de complicações da úlcera entre todos usuários de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) tem sido estimado entre 25% e 35% (HAWKEY, 2000).

As PGs, principalmente a PGE<sub>2</sub>, desempenham um papel importante na proteção da integridade da mucosa gástrica, tanto pelo aumento de sangue no local como pela secreção de muco e bicarbonato. Na ausência dessas moléculas o microambiente gástrico torna-se mais vulnerável a fatores exógenos e endógenos. (LETINO, 2010 e VERMA, 2013). A defesa da mucosa gástrica apresenta mecanismos classificados em: proteção pré-epitelial, epitelial e subepitelial (WALLACE, 2008). AINEs danificam a mucosa gástrica de animais experimentais e seres humanos por induzirem tal depleção na produção de PG (TAKEUCHI, 2014).

**Figura 3** - AINEs induzem lesão na mucosa gástrica. Reduzindo parâmetros que atuam como barreira física na proteção do epitélio.



Fonte: (WALLACE, 2008).

Os AINEs atuam no bloqueio da síntese de PGs (Figura 3), ocasionando alterações dos mucopolissacarídeos sulfatados do muco gástrico, o que causa a destruição do epitélio superficial e quebra da barreira mucosa (PERREIRA e COLLI, 1992).

As lesões da mucosa gástrica podem ser causadas por inibição de COX-1 e consequentemente de PGs, permeabilização de membranas (podendo ocorrer sem a inibição de COX) e produção de mediadores pró-inflamatórios adicionais como os LTs que favoreceram a inflamação no microambiente (SINHA et al., 2013).

Danos ultraestruturais são observados dentro de minutos, entretanto hemorragias endoscopicamente detectáveis e erosão no epitélio gastroduodenal

ocorrem dentro de várias horas. A longo prazo, observa-se adaptação do tecido como resposta frente ao agente lesivo (WOLFE, et al., 1999).

O óxido nítrico (NO) atua em vários níveis de proteção na mucosa gástrica, como no fluxo sanguíneo, secreção de muco e bicarbonato e manutenção da barreira física epitelial. Entretanto não está envolvido na modulação da secreção do ácido gástrico em condições basais. Sua inibição provoca danos ao epitélio gástrico. (BARRACHINA, et al., 2001).

A citocina pro-inflamatória TNF-  $\alpha$  é um mediador importante na fisiopatologia da inflamação gástrica, sendo secretado por macrófagos durante a indução de úlcera, estimulando a infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica desencadeando reação inflamatória intensa, estresse oxidativo e vias responsáveis por geração de danos no tecido do local (ROZZA, et al., 2014).

Dados obtidos em nosso laboratório mostram que a internalização do *T. cruzi* (Cepa Y) foi reduzida em 40% quando macrófagos eram previamente tratados com ASA; esta redução foi associada com aumento na produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e NO pelos macrófagos (MALVEZI et al., 2014). Assim, a inibição da enzima COX-1 do hospedeiro surge como um alvo terapêutico potencial. Recentemente foi demonstrado que ASA apresenta um efeito terapêutico em camundongos infectados por *T. cruzi*, quando administrada em doses baixas, este efeito desaparece quando as doses são aumentadas. Desta forma, decidimos investigar os efeitos do tratamento prévio de camundongos BALB/c com ASA, por via oral, como modelo de lesão gástrica, sobre a entrada do parasito na mucosa gástrica e sua capacidade de desenvolver a infecção sistêmica.

## 2. OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi analisar, comparativamente, o efeito do tratamento de camundongos com ASA (inibidor de COX) sobre a eficiência de infecção por via oral de formas metacíclicas de duas cepas do *T. cruzi*: CL14 e G.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar o modelo de lesão gástrica causado por tratamento com ASA;
- Analisar o efeito do tratamento com ASA sobre a produção de NO e TNF- $\alpha$  no estômago;
- Comparar o curso da infecção oral por *T. cruzi* cepas G e CL14 em camundongos tratados com ASA pela mesma via;
- Caracterizar o efeito do tratamento de camundongos com ASA sobre a eficiência de infecção da mucosa gástrica por formas metacíclicas das cepas: CL14 e G;
- Relacionar a lesão gástrica provocada pela ASA e a capacidade de infecção das cepas CL 14 e G do *T. cruzi*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

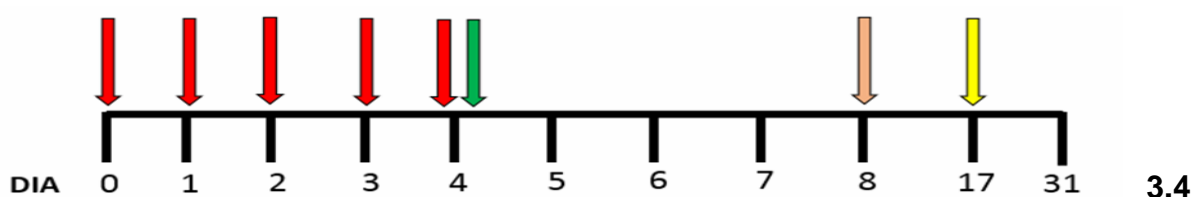
Foram utilizados camundongos isogênicos das linhagens BALB/c machos e fêmeas de 8 a 12 semanas de idade. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as Regulamentações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL, 8504.2015-71).

#### 3.2 PARASITOS

Utilizamos o protozoário *Trypanosoma cruzi*: cepa G e cepa CL 14 mantidas em meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT) segundo Camargo e colaboradores (1964) e em camundongos albinos, infectados com formas tripomastigotas sanguíneas. Os protocolos para a manutenção das cepas do *T. cruzi* já foram aprovados pela CEUA/UEL (processo 26369.2014.66).

#### 3.3 LINHA DO TEMPO

**Figura 4 - Linha cronológica.** Os dias de experimentação foram distribuídos conforme a linha do tempo. As setas vermelhas indicam os dias de tratamento com ASA na dose de 100 mg/kg. A seta verde indica o dia de infecção. A seta rosa claro aponta o dia de retirada do estômago. As setas amarelas mostram o dia de início e fim da parasitemia.



### 3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

**QUADRO 1** - Grupos experimentais. Camundongos não tratados com ASA, que receberam apenas DMSO + PBS podendo ser ou não infectados foram chamados de VEÍCULO, e camundongos tratados com ASA 100 mg/Kg, infectados ou não, foram chamados de ASA.

<b>Grupo Lesão</b>	
Sem tratamento e sem infecção	
Com tratamento e sem infecção	

<b>Grupo Parasitismo T. cruzi CL14</b> <b>5x10<sup>7</sup></b>	
Sem tratamento e infectado	
Com tratamento e infectado	

<b>Grupo Parasitismo T. cruzi G</b> <b>5x10<sup>7</sup></b>	
Sem tratamento e infectado	
Com tratamento e infectado	

<b>Grupo Dosagem T. cruzi CL14</b> <b>5x10<sup>7</sup></b>	
Sem tratamento e infectado	
Com tratamento e infectado	

<b>Grupo Dosagem T. cruzi G</b> <b>5x10<sup>7</sup></b>	
Sem tratamento e infectado	
Com tratamento e infectado	

<b>Grupo Parasitemia T. cruzi CL14</b> <b>4x10<sup>5</sup></b>	
Sem tratamento e infectado	
Com tratamento e infectado	

<b>Grupo T. cruzi G</b> <b>4x10<sup>5</sup></b>	
Sem tratamento e infectado	
Com tratamento e infectado	

### 3.5 TRATAMENTO COM ASA

Para tratamento dos animais, Ácido Acetil Salicílico (Sigma) foi administrado por via oral através de gavagem, na dose de 100 mg/Kg, uma vez ao dia por 5 dias consecutivos. Foi utilizado dimethyl sulfoxide (DMSO) 0,05% para solubilização do fármaco e PBS como veículo. O fármaco foi preparado diariamente e acondicionado fora do contato com a luz. Para os animais que não recebiam tratamento com ASA, foi administrado DMSO 0,05% e PBS, para que todos os grupos sofressem o mesmo efeito da gavagem e da ação do DMSO.

### 3.6 AVALIAÇÃO DO SCORE DA LESÃO

No 4º dia de infecção ou dia 8 na linha o tempo, camundongos do grupo lesão foram submetidos a eutanásia. O estômago foi removido e fixado em formalina tamponada 10% para posterior inclusão em parafina e confecção de cortes histológicos de 5 µm que foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscópio óptico. O critério para avaliação histológica foi de OSÓRIO (2011), que atribuiu scores aos parâmetros: edema (0-4), hemorragia (0-4), perda de células epiteliais (0-3) e infiltrado inflamatório (0-3), totalizando um máximo de 14 scores. As análises foram levadas como estudo cego.

### 3.7 OBTENÇÃO DAS FORMAS TM DE *T. CRUZI*

Formas epimastigotas do *T. cruzi* para cada cepa utilizada foram mantidas por meio de repiques realizados semanalmente em 50 mL de meio LIT, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), na concentração aproximada de  $1 \times 10^6$  parasitos/mL, a 28 °C. Ao fim de três repiques as células encontravam-se em fase estacionária de crescimento. Para obter epimastigotas em grande escala, nós efetuamos inóculos na concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos/mL em 250 ml de LIT. Após três dias de crescimento a 28 °C a cultura alcançava uma concentração em torno de  $1 \times 10^9$  parasitos/mL. O precipitado contendo o parasito era reunido em um único tubo e adicionado 30 mL de *Triatomine Artificial Urine* (TAU) não suplementado e incubado por 2 horas em estufa B.O.D., 28° C. As formas epimastigotas cultivadas em meio TAU eram centrifugadas a 1500 x g por 40 minutos. Após a centrifugação as células foram submetidas ao estresse nutricional em meio TAU 3.A.A.G. pH 6,0

(TAU Suplementado) por 4 dias a 28° C. Depois de 4 dias, já era possível observar no sobrenadante da cultura formas tripomastigotas metacíclicas diferenciadas (cerca de 70%). O sobrenadante da cultura foi centrifugado a 1500 x g por 40 minutos a 10°C, as formas parasitárias foram recuperadas em solução tampão fosfato + glicose (PSG) e purificadas por cromatografia de troca iônica em coluna de resina com Dietilaminoetil (DEAE) – celulose equilibrada em PSG pH 8 (De Souza, 1984).

### 3.8 PARASITISMO NO ESTÔMAGO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *T. CRUZI*

No 4º dia pós infecção ou dia 8 de experimento como mostrado na linha do tempo, camundongos do grupo parasitismo sofreu eutanásia por deslocamento cervical com prévia administração de relaxante muscular. Os estômagos foram imediatamente removidos por laparotomia e fixados em formalina tamponada 10% para posterior inclusão em parafina e confecção de cortes histológicos de 5 µm que foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscópio óptico. O parasitismo no estômago foi avaliado pela contagem do número de ninhos de amastigotas. Para cada estômago foram confeccionadas duas lâminas com dois cortes e analisada toda a extensão do corte.

### 3.9 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Ensaio com os camundongos do grupo dosagem foram executados e os estômagos foram retirados, lavados e seccionados transversalmente em 2 secções, no 4º dia pós infecção ou dia 8 na linha do tempo. Uma das secções foi armazenada

a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a preparação do tecido para a dosagem de NO e de TNF- $\alpha$ . A outra secção está acondicionada em refrigeração de  $-80^{\circ}\text{C}$ , para contra provas.

Os estômagos foram homogeneizados em tampão fosfato (100 mg de peso úmido de tecido por mililitro de tampão). Alíquotas do sobrenadante foram desproteinizadas com  $\text{ZnSO}_4$  (Merck) e solução de NaOH 55 mM (Merck). Os sobrenadantes finais foram recuperados e diluídos em solução tampão de glicina (Merck), numa proporção de 05:01. Tratamento com grânulos de cádmio (Fluka) foram utilizados para converter todo o nitrato em nitrito das amostras biológicas, proporcionando assim uma estimativa mais precisa do número total nas amostras originais. Grânulos ativados foram adicionados ao sobrenadante e agitados suavemente durante 10 minutos. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  eram transferidos para placas de 96 poços. Foi adicionado aos poços o reagente de Griess para revelação. Para determinar a concentração de nitrito, uma curva de calibração foi preparada por diluição de  $\text{NaNO}_2$  (Merck) em água destilada estéril para criar concentrações variando 125-0  $\mu\text{M}$ . A absorbância foi lida a 505 nm, utilizando um leitor de microplacas standard (Multiskan EX, LabSystems, Minnesota, EUA). Os resultados finais foram expressos em  $\mu\text{M}$  de nitrito.

### 3.10 DOSAGEM DE TNF- $\alpha$

Os níveis de TNF- $\alpha$  foram quantificados por ELISA, utilizando o *Kit Elisa-Ready-SET-Go!* (Bioscience, San Diego, CA). O mesmo triturado de estômago utilizado para dosagem de NO foi utilizado para a dosagem de TNF- $\alpha$ . Entretanto, sem a necessidade de desproteinização. Anticorpos de captura foram adicionados com Coating Buffer em placa de 96 poços. A placa foi selada e incubada durante a

noite a 4 ° C. Após incubação todos os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem (+/- 1 minuto) e fortemente impactados contra folhas de papel absorvente para remoção total dos resíduos de tampão. Adicionou-se o Diluente de Ensaio que permaneceu incubando à temperatura ambiente. A curva padrão foi obtida utilizando 8 pontos de padrões. Foi adicionado as amostras em seus devidos poços e selado a placa para incubação por 2 horas em temperatura ambiente. Lavou-se novamente 5 vezes. Adicionou-se o anticorpo de detecção com Avidina-HRP e incubado por 30 minutos. Após essa incubação, lavou-se novamente e foi adicionado à solução de substrato para revelação e solução de paragem. A absorbância foi lida a 450 nm, utilizando um leitor de microplacas standard (Multiskan EX, LabSystems, Minnesota, EUA).

### 3.11 PARASITEMIA E SOBREVIDA

A avaliação da presença de parasitos circulantes no sangue foi realizada a partir do 13º dia de infecção ou dia 17 na linha do tempo, por meio de contagem em microscópio óptico, do número de parasitos presentes em 5µl de sangue coletado da cauda dos camundongos do grupo parasitemia para ambas as cepas. Até o 31º dia pós infecção ou dia 48 na linha do tempo. Os resultados foram expressos em número de parasitos/mL de sangue, conforme descrito por Brener (1962). Em experimento paralelo, a taxa de sobrevivida desses mesmos camundongos foi avaliada até 31º dias após a infecção ou dia 48 da linha do tempo.

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

#### 4. REFERÊNCIA

1. Abrahamsohn, I. A., Coffman, R. L., 1998. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal Immunological**, 155, 3955-3963.
2. Andrade, Z. A., Andrade, S. G., 1979. Patologia. In *T. cruzi* e Doença de Chagas (Brener, Z., Andrade, Z. A., eds), pp. 199-248. **Editora Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro.
3. Atayde, V. D., Neiraa, D., Corteza, M., Ferreiraa, D., Freymüllerb, E., Yoshida, N., 2004. Molecular basis of non-virulence of *Trypanosoma cruzi* clone CL-14. **International Journal for Parasitology**, 34, 851–860.
4. Barrachina, M. D., Panés, J., Esplugues, J. V., 2001. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative disease: perspective for drugs development. **Current Pharmaceutical Design**, 7, 31-48.
5. Bayer-Santos, E., Cunha-e-Silva, N. L., Yoshida, N., da Silveira, J. F., 2013. Expression and cellular trafficking of gp82 and gp90 glycoproteins during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Parasites & Vectors**, 6, 127.
6. Blitzman, M., 2007. Enfermedad da Chagas-Mazza- Ler congresso virtual de cardiologia. Disponível em <<http://www.fac.org.ar>>. Acesso em 05 março de 2014.
7. Borges, C. L., Cecchini, R., Tatakihara, V. L. H., Malvezi, A. D., Yamada-Ogatta, S. F., Rizzo, L. V., Pinge-filho, P., 2009. 5-Lipoxygenase plays a role in the control of parasite burden and contributes to oxidative damage of erythrocytes in murine Chagas' disease. **Immunology Letters**, 123, 38–45.
8. Brener, Z., 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 4, 389-396.

9. Burleigh, B., Andrews, N. W., 1995. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca<sup>2+</sup>-signaling factor for mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**, 270, 5172-5180.
10. Chapadeiro, E., 1999. Clinical evolution and morbidity-mortality in Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 94, 309-310.
11. Cimerman, B., Cimerman, S. PARASITOLOGIA HUMANA E SEUS FUNDAMENTOS GERAIS. Ed. Atheneu, 1999.
12. Collins, M. H., Craft, J. M., Bustamante, J. M., Tarleton, R. L., 2011. Oral Exposure to *Trypanosoma cruzi* Elicits a Systemic CD8 + T Cell Response and Protection against Heterotopic Challenge. **Infection and immunity**, 8, 3397–3406.
13. Cortez, C., Martins, R. M., Alves, R. M., Silva, R. C., Bilches, L. C., Macedo, S., Atayde, V. D., Kawashita, S. Y., Briones, M. R. S., Yoshida, N., 2012. Differential Infectivity by the Oral Route of *Trypanosoma cruzi* Lineages Derived from Y Strain. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 6, 1804.
14. Coura, J. R., 2007. Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102, 113-122.
15. Coura, J. R., 2013. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 108, 962-967.
16. Coura, J. R., Borges-Pereira, J., 2012. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 45, 286-296.
17. Cryer, B., WMahaffey, K., 2014. Gastrointestinal ulcers, role of aspirin, and clinical outcomes: pathobiology, diagnosis, and treatment. **Journal of Multidisciplinary Healthcare**, 7, 137–146.

18. Dias, J. C. P. A., 1993. Doença de Chagas e seu Controle na América Latina. Uma Análise de Possibilidades. **Caderno de Saúde Pública** 2, 201-209.
19. Dias, J. C. P., 1995. História Natural da doença de Chagas. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, 65, 359-366.
20. Ding, M., Kinoshita, Y., Kishi, K., Nakata, H., Hassan, S., Kawanami, C., Sugimoto, Y., Katsuyama, M., Negishi, M., Narumiya, S., Ichikawa, A., Chiba, T., 1997. Distribution of prostaglandin E receptors in the rat gastrointestinal tract. **Prostaglandins**, 53, 199-216.
21. Dorta, M.L., Ferreira, A.T., Oshiro, M.E.M., Yoshida, N., 1995. Ca<sup>2+</sup> signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes surface molecules implicated in mammalian cell invasion. **Molecular Biochemistry Parasitology**, 73, 285–289.
22. Dos reis, G. A., 1997. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Today**, 13, 335-342.
23. Eickhoff, C. S., Giddings, O. K., Yoshida, N., Hoft, D. F., 2010. Immune responses to gp82 provide protection against mucosal *Trypanosoma cruzi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 5, 687–691.
24. **Esper, L., Roman-Campos, D., Lara, A., Brant, F., Castro, L. L., Barroso, A., Araujo, R. R., Vieira, L. Q., Mukherjee, S., Gomes, E. R., Rocha, N. N., Ramos, I. P., Lisanti, M. P., Campos, C. F., Arantes, R. M., Guatimosim, S., Weiss, L. M., Cruz, J. S., Tanowitz, H. B., Teixeira, M. M., Machado, F. S., 2012. Role of SOCS2 in Modulating Heart Damage and Function in a Murine Model of Acute Chagas Disease. American Journal of Pathology, 181, 130-140.**
25. Fiorucci, S., Mencarelli, A., Cipriani, S., Renga, B., Palladino, G., Santucci, L., Distrutti, E., 2011. Activation of the farnesoid-X receptor protects against

gastrointestinal injury caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs in mice. **British Journal of Pharmacology**, 164, 1929–1938.

26. Garg, T., Kumar, A., Rath, G., Goyal, A. K., 2014. Gastroretentive Drug Delivery Systems for Therapeutic Management of Peptic Ulcer. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 31, 531–557.
27. Gascon, J. Bern, C., Pinazo, M. J., 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta tropical**, 115, 22-27.
28. Guedes, P. M. M., Gutierrez, F. R. S., Silva, G. K., Dellalibera-Joviliano, R., Rodrigues, G. J., Bendhack, L. M., Rassi Jr, A., Rassi, A., Schmidt, A., Maciel, B. C., Marin Neto, J. A., Silva, J. S., 2012. Deficient Regulatory T Cell Activity and Low Frequency of IL-17-Producing T Cells Correlate with the Extent of Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 4, 1630.
29. Hawkey, C. J., 2000. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Gastropathy. **Gastroenterology**, 119, 521–535.
30. Hoft, D.F., 1996. Differential mucosal infectivity of different life stages of *Trypanosoma cruzi*. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**. 55, 360–364.
31. Lazzari, C. R., Pereira, M. H., Lorenzo, M. G., 2013. Behavioural biology of Chagas disease vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 108, 34-47.
32. Lettino, M., 2010. Inhibition of the antithrombotic effects of clopidogrel by proton pump inhibitors: facts or fancies? **European Journal of Internal Medicine**, 21, 484–489.

33. López-Muñoz, R., Faúndez, M., Klein, S., Escanilla, S., Torres, G., Lee-Liu, D., Ferreira, J., Kemmerling, U., Orellana, M., Morello, A., Ferreira, A., Maya, J. D., 2010. *Trypanosoma cruzi*: In vitro effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. **Experimental Parasitology**, 124, 167–171.
34. Málaga, S., Yoshida, N., 2001. Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. **Infection and Immunity**, 69, 353–359.
35. Malvezi, A. D., Silva, R. V., Panis, C., Yamauchi, L. M., Lovo-Martins, M. I., Zanluqui, N. G., Tatakihara, V. L. H., Rizzo, L. V., Verri Jr., W. A., Martins-Pinge M. C., Yamada-Ogatta, S. F., Pinge-Filho, P., 2014. Aspirin Modulates Innate Inflammatory Response and Inhibits the Entry of *Trypanosoma cruzi* in Mouse Peritoneal Macrophages. **Mediators of Inflammation**, 1-9.
36. Melo, R. C., Machado, C. R., 2001. *Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. **Experimental Parasitology**, 1, 15-23.
37. Miller, T. A., Jacobson, E. D., 1979. Gastrointestinal cytoprotection by Prostaglandins. **Gut**, 20, 75-87.
38. Molina-Berríos, A., Campos-Estrada, C., Henriquez, N., Faúndez, M., Torres, G., Castillo, C., Escanilla, S., Kemmerling, U., Morello, A., López-Muñoz, R. A., Maya, J. D., 2013. Protective Role of Acetylsalicylic Acid in Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection: Evidence of a 15-epi-Lipoxin A4-Mediated Effect. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 7, 2173.
39. **Molina-Berríos, A., Campos-Estrada, C., Lapier, M., Duaso, J., Kemmerling, U., Galanti, N., Ferreira, J., Morello, A., López-Muñoz, R., Maya, J. D., 2013. Protection of vascular endothelium by aspirin in a murine model of chronic Chagas' disease. Parasitology Research, 112, 2731–2739.**

40. Moncayo, A., Silveira, A. C., 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 104, 17-30.
41. Mortara, R. A., Silva, S., Araguth, M. F., Blanco, S. A., Yoshida. N.,1992. Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. **Infection and Immunity**, 60: 4673–4678.
42. Mukherjee, S., Machado, F. S., Huang H., Oz, H. S., Jelicks, L. A., Prado, C. M., Koba, W., Fine, E. J., Zhao, D., Factor, S. M., Collado, J. E., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B., Ashton, A. W., 2011. Aspirin Treatment of Mice Infected with *Trypanosoma cruzi* and Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **PLoS ONE** 6, 16959.
43. Nussbaum, K., Honek, J., Cadmus, C. M. C. v. C., Efferth, T.,2010. Trypanosomatid Parasites Causing Neglected Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, 17, 15.
44. Osório, C. B. H., 2011. **Atividade gastroprotetora do hidroxicitronelal em modelos de lesão gástrica aguda em camundongos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará.
45. Panis, C., Mazzuco, T. L., Costa, C. Z., Victorino, V. J., Tatakihara V. L., Yamauchi, L. M., Yamada-Ogatta, S. F., Cecchini, R., Rizzo, L. V., Pinge-Filho, P., 2011. *Trypanosoma cruzi*: Effect of the absence of 5 lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Experimental Parasitology** 127, 58–65.
46. Pereira Neves, D., De Melo, A. L., Linardi, P. M., Almeida Vitor, R. W. **Parasitologia Humana**. 12º Edição. São Paulo, SP. Editora Atheneu, p 89-114, 2011.

47. Perez, C. J., Lymbery, A. J., Thompson, R. C. A., 2014. Chagas disease: the challenge of polyparasitism? **Trends in Parasitology**, 30, 4.
48. Ramírez, J. D., Montilla, M., Cucunubá, Z. M., Floréz, A. C., Zambrano, P., Guhl, F., 2013. Molecular Epidemiology of Human Oral Chagas Disease Outbreaks in Colombia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 7, 2041.
49. Rassi, A. Jr., Rassi, A., Rezende, J. M., 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, 26, 275-291.
50. Rassi, A. Jr., Rassi, A., Marin-Neto, J. A., 2010. Chagas disease. **The Lancet**, 375, 1388-402.
51. Rey, L., Gomes, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3º edição, São Paulo, SP. Editora Guanabara Koogan, p. 67-76, 2011.
52. Rozza, A. L., Faria, F. M., Brito, A. R. S., Pellizon, C. H., 2014. The gastroprotective effect of menthol: involvement of anti-apoptotic, antioxidante and anti-inflammatory activities. **PLOS one**, 9(1): e86686.
53. Sarmiento, R. R. **Interação do *Trypanosoma cruzi* com células da resposta imune inata**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Triângulo Mineiro – MG, 2008.
54. Schmunis, G. A., Yadon, Z. E., 2010. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, 115, 14–21.
55. Sinha, M., Gautam, L., Shukla, P. K., Kaur, P., Sharma, S., Singh, T. P., 2013. Current Perspectives in NSAID-Induced Gastropathy. **Mediators of Inflammation**, 1-11.
56. Staquicini, D. I., Martins, R. M., Macedo, S., Sasso, G. R. S., Atayde, V. D., Juliano, M. A., Yoshida, N., 2010. Role of GP82 in the Selective Binding to Gastric Mucin during Oral Infection with *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 4, 613.

57. Takeuchi, K., Ohishi, M., Endo, K., Suzumura, K., Naraoka, H., Ohata, T., Seki, J., Miyamae, Y., Honma, M., Soga, T., 2014. Hydroxyproline, a Serum Biomarker Candidate for Gastric Ulcer in Rats: A Comparison Study of Metabolic Analysis of Gastric Ulcer Models Induced by Ethanol, Stress, and Aspirin. **Biomarker Insights**, 9.
58. Tatakihara, V. L. H., Cecchini, R., Borges, C. L., Malvezi, A. D., Souza, V. K. G., Yamada-Ogatta, S. F., Rizzo, L. V., Pinge-Filho, P., 2008. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 52, 47–58.
59. Verma, G., Marella, A., Shaquiquzzaman, M., Mumtaz, M., 2013. Immunoinflammatory responses in gastrointestinal tract injury and recovery. **Acta Biochimica Polonica**, 60, 143–149.
60. Villalta, F., Kierszenbaum, F., 1983. Role of cell surface mannose residues in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes**, 736, 39–44.
61. Wallace, J. L., 2008. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiological Reviews**, 88, 1547-1565.
62. WHO, World Health Organization. Chagas Disease. Disponível em <[http://www.who.int/topics/chagas\\_disease/en/](http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/)>. Acesso em 15 de junho de 2013.
63. Wolfe, M. M., Lichtenstein, D. R., Singh, G., 1999. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **The New England Journal of Medicine**, 340, 24.
64. Yoshida, N., 2006. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 78(1): 87-111.

65. Yoshida, N., 2008. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology International**, 57, 105–109.
  
66. Yoshida, N., 2009. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 104, 101-107.

[Download PDF](#)[Export](#)[Advanced search](#)**ELSEVIER**

## Experimental Parasitology

Available online 28 January 2016

In Press, Accepted Manuscript — Note to users



Full length article

### Aspirin treatment exacerbates oral infections by *Trypanosoma cruzi*

Luana Aparecida Cossentini<sup>a</sup>, Rosiane Valeriano Da Silva<sup>b</sup>, Sueli Fumie Yamada-Ogatta<sup>c</sup>, Lucy Megumi Yamauchi<sup>c</sup>, Eduardo José De Almeida Araújo<sup>d</sup>, Phileno Pinge-Filho<sup>a</sup>,  

[+ Show more](#)

doi:10.1016/j.exppara.2016.01.008

[Get rights and content](#)

## 5. RESULTADOS

Elsevier Editorial System (tm) for Experimental Parasitology

Manuscript Draft

**Manuscript Number:**

**Title:** Aspirin treatment exacerbates oral infections by *Trypanosoma cruzi*

**Article Type:** Research Paper

**Keywords:** Chagas disease; Gastric invasion; *Trypanosoma cruzi*; Aspirin

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

**Corresponding Author's Institution:** Universidade Estadual de Londrina

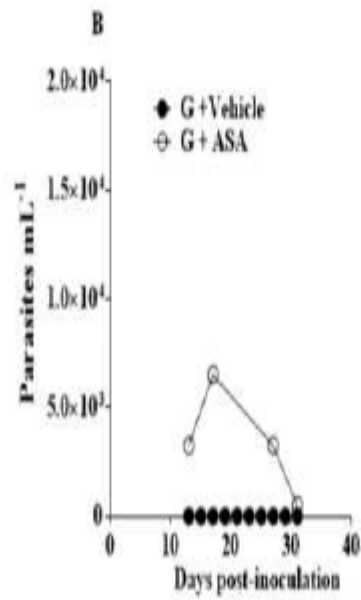
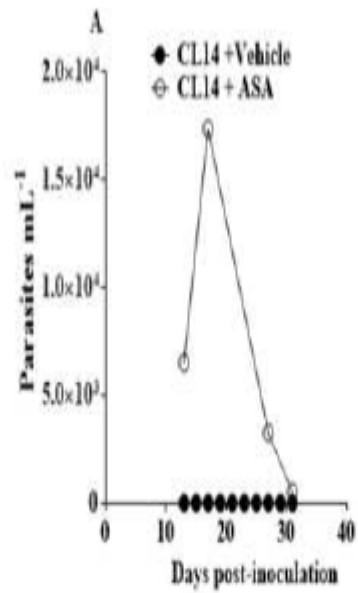
**First Author:** Luana A. Cossentini

**Order of Authors:** Luana A Cossentini; Rosiane V da Silva; Sueli F Yamada-Ogatta; Lucy M Yamauchi; Eduardo J de Ameida Araujo; Phileno Pinge-Filho, Ph.D

**Abstract:** Chagas disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* is now a potentially emergente global health problem. Oral transmission of Chagas disease has been documented in Latin American countries. Nevertheless, significant studies on the pathophysiology of this form of infection are largely lacking. The aims of this study was to investigate the effect of aspirin-induced gastric mucosal injury in mice on gastric infection of metacyclic trypomastigotes (MT) of CL14, a clone isolated from CL strain of *T. cruzi* and MT of G strain, characterized by their differential infectivity in mice. Herein, BALB/c mice were pretreated with aspirin (ASA, 100 mg·kg<sup>-1</sup>) by gavage. The oral treatment occurred for 5 days before the *T. cruzi* infection (4x10<sup>5</sup> parasites/mouse). Starting on 13 days post-inoculation, parasitemia was monitored in alternate days. The CL14 strain showed higher parasitemia than the G strain. In addition, groups of mice treated with ASA or not were inoculated by gavage with 5 x 10<sup>7</sup> MT of *T. cruzi* (CL14 or G strain). Four days post-infection, the stomach of each animal was collected and prepared to histological analysis and determination of nitric oxide and TNF- $\alpha$ . ASA was capable of producing injury to gastric mucosa in mice and improved the *T. cruzi* invasion; amastigotes net of CL14 strain were present in the stomach greater number compared with the G strain. Our study is a pioneer work that analyzes the features of use of ASA and *T. cruzi* infection by oral route. In addition, it provides new clues for Chagas pathology and stimulates background for the elucidation of disease features in orally exposed populations.

Londrina, August 7, 2015

## Graphical Abstract



## Highlights

- First study to examine the effect of aspirin in *T. cruzi* infection by oral route.
- Aspirin reduces nitrite and increases TNF- $\alpha$  gastric mucosal content.
- Aspirin exacerbates *T. cruzi* gastric mucosal invasion capacity upon oral infection.

# Aspirin treatment exacerbates oral infections by *Trypanosoma cruzi*

Luana Aparecida Cossentini<sup>a</sup>, Rosiane Valeriano Da Silva<sup>b</sup>, Sueli Fumie Yamada-Ogatta<sup>c</sup>, Lucy Megumi Yamauchi<sup>c</sup>, Eduardo José De Almeida Araújo<sup>d</sup>, Phileo Pinge-Filho<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratório de Imunopatologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.*

<sup>b</sup> *Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Curitiba, Paraná, Brasil.*

<sup>c</sup> *Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.*

<sup>d</sup> *Laboratório de Neurogastroenterologia, Departamento de Histologia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.*

**\*Corresponding author at:** Phileo Pinge-Filho Ph.D., Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP:

86051-970, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail address: pingefilho@uel.br (Pinge-Filho, P.), Tel: + 55 43 3371-4978; Fax: + 55 43 3371-4465.

*Abbreviations:* ASA, aspirin; COX, cyclooxygenase; MT, metacyclic trypomastigotes; NO, nitric oxide; p.i, post infection; PG, prostaglandins. iNOS, inducible nitric oxide synthase;

## Abstract

Oral transmission of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, has been documented in Latin American countries. The reported cases of infection were due to the ingestion of contaminated fresh fruit, juices or of sugar cane juice. There are few studies on the physiopathology of the disease in oral transmission cases. Gastritis is a common ailment that can be caused by poor dietary habits, intake of alcohol or other gastric irritants, bacterial infection or by the widespread use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). This study investigated in a mouse model whether gastric mucosal injury, induced by aspirin, would affect the course of disease in animals infected with *T. cruzi* by the oral route. The CL14 and G strains of *T. cruzi*, both of low-infectivity were used. To this end, groups of BALB/c mice were treated during 5 days with aspirin (100 mg·kg<sup>-1</sup>) before oral infection with *T. cruzi* metacyclic forms (4 x 10<sup>5</sup> or 5 x 10<sup>7</sup> parasites/mouse). Histological analysis and determination of nitric oxide and TNF- $\alpha$  were done in gastric samples obtained 5 days after infection. Parasitemia was monitored from the 13th day after infection. The results indicate that aspirin treatment of mice injured the gastric mucosa and facilitated invasion by both CL14 and G strains of *T. cruzi*. Strain CL14 led to more severe infection than the G strain as larger numbers of amastigote nests were found in the stomach and parasitemia levels were higher. Our study is novel in that it shows that gastric mucosa damage caused by aspirin, a commonly used NSAID, facilitates *T. cruzi* infection by the oral route.

**Keywords:** Chagas disease; Gastric mucosa; NSAIDs; *Trypanosoma cruzi*

## 1. Introduction

Chagas disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. It is still a major public health problem in Latin America and a potentially serious emerging threat to a number of countries throughout the world (Bonney, 2014, Carlier, 2011, Coura and Vinas, 2010). Transmission occurs by blood-sucking triatomine bugs; metacyclic forms of the parasite present in the triatomine feces contaminate the nearby bite wound or mucous membranes and conjunctiva (Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012). However, transmission by ingestion of contaminated food or beverages has been often reported during the last two decades and is presently considered an emergent health problem (Benchimol-Barbosa, 2010).

Ingestion of fruit or fruit juices contaminated with infected triatomines or their feces, which contain metacyclic trypomastigotes (MT) of *T. cruzi*, is the most common cause of human infection by the oral route (Yoshida, et al., 2011). Gastric invasion appears to be the main portal of entry for systemic *T. cruzi* infection after oral challenge (Hoft, et al., 1996). The parasites invade the gastric epithelium where they initially replicate (de Meis, et al., 2013).

In addition, it was shown that infection by insect-derived MT to BALB/c mice was more severe when the parasites were administered by the mucosal in comparison to the cutaneous route, which emphasizes the hazard of oral contamination (Eickhoff, et al., 2013). Yet mice inoculated with culture-derived MT by gavage or intraperitoneal routes developed comparable infections (Dias, et al., 2013). A recent study compared groups of mice infected with *T. cruzi* by parasites inoculated in the oral cavity (oral infection) or by gavage (gastrointestinal infection); the oral infection group developed more severe hepatic lesions and had higher mortality rates than the latter, in which heart inflammation was predominant (Barreto-de-Albuquerque, et al., 2015).

The variation in the prevalence and severity of contamination among persons exposed to a common source of *T. cruzi*-infected food or beverage indicates a wide range of individual susceptibility (Yoshida, 2008). The numbers of ingested parasites as well as the genetic background of each person certainly are major determinants of each person's susceptibility. Nevertheless, given the prevalence of gastritis of

different etiologies in the population, it is conceivable that gastric mucosal injury might favor invasion by ingested *T. cruzi* parasites.

In order to investigate this question we chose to verify the effect of aspirin-induced gastric injury on the outcome of oral infection by *T. cruzi* metacyclic forms. Gastric mucosal damage is a common side effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (Katzka, et al., 1987).

Aspirin and other NSAIDs, such as celecoxib and indomethacin, act on cyclooxygenases and inhibit the synthesis of prostaglandins (PG). Mice infected by the intraperitoneal route with *T. cruzi* blood forms and treated with NSAIDs showed a worsening of the infection, regardless of the mouse or parasite strain under investigation (Celentano, et al., 1995, Hideko Tatakahara, et al., 2008, Mukherjee, et al., 2011, Pinge-Filho, et al., 1999, Sterin-Borda, et al., 1996). The increased synthesis of arachidonic acid (AA)-derived lipids and of nitric oxide (NO) seen in the early phase of *T. cruzi* infection of mice correlate to resistance; however at later stages of infection these molecules were associated to tissue damage (Cardoni and Antunez, 2004).

On the other hand, other investigators, also working on intraperitoneal infections by *T. cruzi* blood forms, found that inhibition of PG synthesis/release decreases parasitemia and extends the survival of mice (Abdalla, et al., 2008, Freire-de-Lima, et al., 2000, Michelin, et al., 2005, Paiva, et al., 2007); these results correlated with reduction of circulating levels of the cytokines TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-10 (Michelin, et al., 2005).

The present study investigated the effect of aspirin-induced gastric mucosal injury in mice on the course of infection by metacyclic forms of the low-virulence *T. cruzi* strains, CL14 and G, given by the oral route.

## 2. Material and methods

### 2.1 Ethics statement

This study was performed in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation and the Federal Law 11.794 (10/2008). The protocols were approved by the Internal Scientific Commission and the Ethics in Animal Experimentation Committee of State University of Londrina (CEUA/UEL: 26369.2014.66, and 8504.2015-71).

### 2.2 Mice

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

### 2.3 Parasites and oral infection

Metacyclic trypomastigote forms from the low-virulence strains CL 14 (Lima, et al., 1995) and G (Yoshida, 2006) of *T. cruzi* were used to infect the mice. Parasites harvested from cultures at the stationary growth phase were purified to obtain metacyclic forms by passage through DEAE-cellulose columns, as described previously (Teixeira and Yoshida, 1986).

Metacyclic forms were inoculated by gavage in lightly anesthetized mice that had been treated with a suspension of ASA or with the vehicle (control groups). Mice infected with  $5 \times 10^7$  parasites were used to collect the stomach for histological analysis and determination of nitric oxide (NO) and TNF- $\alpha$ . Mice infected with  $4 \times 10^5$  parasites were used to collect blood samples for parasitemia determinations.

#### 2.4 ASA treatment and gastric mucosal injury

Mice were fasted for 16 h before administration of one of the following oral suspensions: ASA (100 mg·kg<sup>-1</sup>) or vehicle (PBS + DMSO 0.05%). The oral treatment was given daily during 5 days before *T. cruzi* infection (Fig.1).

ASA-treated and untreated mice were euthanized in order to collect the stomach for histological analysis. Initially, tissue samples from non-infected ASA-treated mice were analyzed to verify gastric mucosal injury. For this, half of each collected stomach was fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 h and then submitted to histological processing. Sections were stained with hematoxylin and eosin. Gastric mucosal damage was assessed as described previously (Fiorucci, 2009; Fiorucci, et al., 2011). The scoring was performed “blindly” by an observer who assessed the following parameters: edema (0-4), hemorrhage (0-4), loss of epithelial cells (0-3) and inflammatory infiltration (0-3).

#### 2.5 Evaluation of infection

The intensity of parasitism at the infection site was determined by counting the number of parasite nest in 5 micrometer-thick sections of the stomach stained with hematoxylin and eosin. The stomachs of ASA treated mice and of untreated *T. cruzi* infected mice were collected 4 days after infection (Fig.1), fixed and processed as described in section 2.4. All amastigote nests present in four non-serial sections obtained from each mouse were counted.

Follow up of the infection was evaluated by counting the number of parasites in fresh preparations of 5 microliter samples of tail-vein blood mounted under standard coverslips as described (Brener, 1962). Blood samples were obtained every second day, starting on the 13th day after infection.

#### 2.6 Determination of nitric oxide and TNF- $\alpha$ in gastric tissue

Nitric oxide (NO) concentration in stomach homogenates obtained from noninfected and infected mice (day 4) was estimated by measuring nitrite as described by Navarro-Gonzalez and collaborators with some modifications. It is a

method based on the Griess reaction, modified to include a shortened incubation period of nitrate with cadmium (Navarro-Gonzalvez, et al., 1998, Tatakahara, et al., 2015). Cadmium treatment is used to convert all nitrate into nitrite in biological samples, thus providing a more accurate estimation of total NO in the original samples. To determine the nitrite content in stomach samples (100 mg/mL), a calibration curve was prepared by diluting NaNO<sub>2</sub> (Merck) in distilled sterile water in order to create concentrations ranging from 0 to 125 µM. Griess reagent (100 µL) was added to each well and to the calibration curve run in triplicate in each microtiter plate. The absorbance was read at 550 nm using a Synergy HT microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, USA), and the results are expressed in µM nitrite.

The levels of TNF-α in stomach homogenates were measured using a commercial ELISA kit (Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!®, eBioscience, San Diego, CA), according to the manufacturer's instructions. Each sample was tested in duplicate. The optical densities were read using an ELISA reader (Biotek Instruments, Winooski, USA) at wavelengths of 430 nm. The sensitivity of this ELISA test is 8 pg/mL.

## *2.7 Statistical analysis*

The program GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used to determine significance by Student's *t* test. Values are presented as the mean ± standard error of mean (SEM). The results were considered significant when *P* < 0.05.

## **3. Results**

### *3.1 Aspirin treatment provoked gastric mucosal injury*

Aspirin (ASA) given orally to mice at a dose of 100 mg·kg<sup>-1</sup> during 5 days induced gastric mucosal injury as indicated by the high score of mucosal damage (Fig.2A) and significantly reduced the gastric mucosal nitrite level by 50% (Fig.2B) and increased TNF-α level by 25% compared to the control value (Fig.2C). These

findings are indicative of gastric mucosal damage by ASA treatment (Fiorucci, et al., 1999).

### *3.2 Treatment with aspirin exacerbated gastric mucosal parasitism in mice infected by CL14 strain of T. cruzi*

The intensities of gastric parasitism in vehicle-treated control mice infected with *T. cruzi* strains G or CL14 were compared (Fig.3A). Prior treatment by gavage with ASA of mice infected with CL14 caused a four-fold increased in the number of amastigote nests in the stomach in comparison with control mice given only vehicle solution. In contrast, gastric parasitism of mice infected with G strain was not changed by similar ASA treatment (Fig. 3A). These numerical results are illustrated by photomicrographs in Figs. 3B and 3C showing *T. cruzi* gastric parasitism by strains G and CL14 respectively.

To examine the effect of ASA in the intracellular parasite development *in vivo*, BALB/c mice treated with ASA (100 mg·kg<sup>-1</sup>) were inoculated orally with 5 x 10<sup>7</sup> MT forms of CL 14 and G (both lowly infective). It was observed that the number of CL14 strain amastigote nests was four times higher as compared to G strain-ones (Fig.3A). No difference was observed in the number of amastigote nests in the stomach of ASA-treated mice inoculated with G strain (Fig.3A). The distribution of parasite nests of G strain was sparser (Fig.3B) than that for the CL14 strain (Fig.3C).

### *3.3 Treatment with aspirin augmented the frequency of mice developing patent and elevated parasitemia levels*

The frequency of mice that developed patent parasitemia when infected with strains G or CL14 was increased in the groups given ASA prior to oral inoculation (Table 1). As expected, no mortality was observed in either group of animals (Table 1). Parasites became detectable by the 12th day and the peak of parasitemia occurred on the 17th day after infection for both *T. cruzi* strains (Fig.4A and Fig.4B). Peak parasitemia counts in CL14-infected mice were approximately twice those observed in G-infected mice. By day 31 parasite counts in the blood fell below the detection threshold of the method (Fig.4A and Fig.4B).

## 4. Discussion

Our main finding is that aspirin (ASA), one of most commonly prescribed NSAIDs drugs worldwide caused injury to the stomach and facilitated the infection by *T. cruzi* administered by the oral route. Gastric toxicity of ASA is believed to be mainly due to its non-selective inhibition of cyclooxygenases and consequent reduction of prostaglandins synthesis (Hunt and Yuan, 2011, Nishino, et al., 2010).

Invasion of the vertebrate host by *T. cruzi* depends primarily on events at the portal of entry. In case of oral ingestion the gastric mucosa appears to be the major portal of entry. We chose to verify the infectivity by the oral route of laboratory-adapted strains CL14 and G because they are representative of the low-infectivity *T. cruzi* strains that predominate in endemic areas (Atayde, et al., 2004, Yoshida, 2006). As expected, parasites in the blood were detected only in a limited percentage of mice when the infective inoculum was deposited inside normal stomach. In aspirin-treated mice, detectable parasitemia was seen in many more mice and for the CL14 strain (but not for the G strain); the higher frequency and parasitemia levels could be correlated to more intense parasitism of gastric mucosa.

A possible explanation for the difference between the two strains is that, in the stomach, metacyclic forms of different isolates can resist destruction by pepsin and acidic pH because they are protected by protease-resistant gp35/50 mucins. Metacyclics (MT) of CL and G isolates bind to gastric mucin via gp82, as the first step to traverse the mucin layer and reach the underlying epithelial cells. Once the epithelial cells are reached, MT of the CL isolate attach to and efficiently invade them in gp82-dependent manner, whereas MT of G strain enter epithelial cells poorly, due to the preferential adhesion through gp35/50 (Yoshida, 2006).

Aspirin treatment facilitated infection by both strains and in the case of CL14 strain, this is possibly related to the aspirin-induced damage to the gastric mucosa, that would facilitate attachment of the parasite and more invasion and/or proliferation at the portal of entry as indicated by the augmented parasitism of the mucosa; the elevated numbers of parasites in blood are consequence of the higher parasitism of the mucosa. Still aspirin pre-treatment also facilitated G strain infection, although to a lesser degree; however, this facilitation was not accompanied by increase in gastric

mucosa parasitism. Possible hypotheses are that the invasion by G parasites and/or the initial proliferation are delayed in comparison to the CL14 strain.

NSAIDs administration results in TNF- $\alpha$ -mediated activation of apoptosis and damage to endothelial cells (Fiorucci, et al., 1999). Nitric oxide (NO) and nitrogen oxide compounds (e.g. NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) counteract damaging events that occur following suppression of prostaglandins biosynthesis (Mac Naughton, et al., 1989). Nevertheless, we found in the gastric mucosa from ASA treated-mice reduction of NO levels despite increased levels of TNF- $\alpha$ . Because NO is a potent inhibitor of *T. cruzi* growth (Aliberti, et al., 1999, Fichera, et al., 2004) the low levels of NO may also favor survival and growth of the parasite in the damaged mucosa. Caution should be exercised when employing COX inhibitors to control fever or pain in patients with acute Chagas disease (Hideko Tatakihara, et al., 2008, Machado, et al., 2011).

## 5. Conclusions

This is the first report that examines the effect of ASA treatment on *T. cruzi* infection by oral route. We conclude that ASA treatment caused gastric mucosal injury and facilitated invasion of *T. cruzi* metacyclic forms administered by the oral route. People living in areas at risk for Chagas disease transmission who take NSAIDs or who have gastric lesions of other causes may be more susceptible to infection by ingested parasites. Hygienic processing of foods, fruits and fruit juices is still the most important way to avoid contamination.

## Acknowledgments

The authors thank Dr. Nobuko Yoshida (UNIFESP-SP, Brazil) and Dr. Iriane Eger (UEPG-PR, Brazil) for providing G and CL-14 strains, respectively. Dr. Ises de Almeida Abramsohn helped with English editing of the manuscript. Cossentini and R.V. da Silva received scholarships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). PPF received research fellowship from CNPq (306497/2012).

## 5. References

1. Abdalla, G. K., Faria, G. E., Silva, K. T., Castro, E. C., Reis, M. A., and Michelin, M. A., 2008. *Trypanosoma cruzi*: the role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. *Exp Parasitol* 118, 514-521.
2. Aliberti, J. C., Machado, F. S., Souto, J. T., Campanelli, A. P., Teixeira, M. M., Gazzinelli, R. T., and Silva, J. S., 1999. Beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 67, 4819-4826.
3. Atayde, V. D., Neira, I., Cortez, M., Ferreira, D., Freymuller, E., and Yoshida, N., 2004. Molecular basis of non-virulence of *Trypanosoma cruzi* clone CL-14. *Int J Parasitol* 34, 851-860.
4. Benchimol-Barbosa, P. R., 2010. Further comments on oral transmission of Chagas' disease in Brazil: epidemiology, geographical distribution and viability of the infective parasite. *Int J Cardiol* 141, 203-204.
5. Bonney, K. M., 2014. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite* 21, 11.
6. Brener, Z., 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 4, 389-396.
7. Cardoni, R. L. and Antunez, M. I., 2004. Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Mediators Inflamm* 13, 235-240.
8. Carlier, Y., 2011. Globalization of Chagas disease (American trypanosomiasis): the situation in Europe and Belgium. *Bull Mem Acad R Med Belg* 166, 347-355; discussion 356-347.
9. Celentano, A. M., Gorelik, G., Solana, M. E., Sterin-Borda, L., Borda, E., and Gonzalez Cappa, S. M., 1995. PGE2 involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Prostaglandins* 49, 141-153.
10. Coura, J. R. and Vinas, P. A., 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465, S6-7.
11. de Meis, J., Barreto de Albuquerque, J., Silva Dos Santos, D., Farias-de-Oliveira, D. A., Berbert, L. R., Cotta-de-Almeida, V., and Savino, W., 2013. *Trypanosoma cruzi* Entrance through Systemic or Mucosal Infection Sites Differentially Modulates Regional Immune Response Following Acute Infection in Mice. *Front Immunol* 4, 216.
12. Dias, G. B., Gruending, A. P., Araujo, S. M., Gomes, M. L., and Toledo, M. J., 2013. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. *Exp Parasitol* 135, 511-517.
13. Eickhoff, C. S., Dunn, B. A., Sullivan, N. L., and Hoft, D. F., 2013. Comparison of the infectivity of *Trypanosoma cruzi* insect-derived metacyclic trypomastigotes after mucosal and cutaneous contaminative challenges. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108, 508-511.

14. Fichera, L. E., Albareda, M. C., Laucella, S. A., and Postan, M., 2004. Intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release. *Infect Immun* 72, 359-363.
15. Fiorucci, S., 2009. Prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced ulcer: looking to the future. *Gastroenterol Clin North Am* 38, 315-332.
16. Fiorucci, S., Mencarelli, A., Cipriani, S., Renga, B., Palladino, G., Santucci, L., and Distrutti, E., 2011. Activation of the farnesoid-X receptor protects against gastrointestinal injury caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs in mice. *Br J Pharmacol* 164, 1929-1938.
17. Freire-de-Lima, C. G., Nascimento, D. O., Soares, M. B., Bozza, P. T., Castro-Faria-Neto, H. C., de Mello, F. G., DosReis, G. A., and Lopes, M. F., 2000. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403, 199-203.
18. Hideko Tatakahara, V. L., Cecchini, R., Borges, C. L., Malvezi, A. D., Graca-de Souza, V. K., Yamada-Ogatta, S. F., Rizzo, L. V., and Pinge-Filho, P., 2008. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52, 47-58.
19. Hunt, R. H. and Yuan, Y., 2011. Acid-NSAID/aspirin interaction in peptic ulcer disease. *Dig Dis* 29, 465-468.
20. Lima, M. T., Lenzi, H. L., and Gattass, C. R., 1995. Negative tissue parasitism in mice injected with a noninfective clone of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 81, 6-12.
21. Machado, F. S., Mukherjee, S., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B., and Ashton, A. W., 2011. Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection. *Adv Parasitol* 76, 1-31.
22. Michelin, M. A., Silva, J. S., and Cunha, F. Q., 2005. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol* 111, 71-79.
23. Mukherjee, S., Machado, F. S., Huang, H., Oz, H. S., Jelicks, L. A., Prado, C. M., Koba, W., Fine, E. J., Zhao, D., Factor, S. M., Collado, J. E., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B., and Ashton, A. W., 2011. Aspirin treatment of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and implications for the pathogenesis of Chagas disease. *PLoS One* 6, e16959.
24. Navarro-Gonzalvez, J. A., Garcia-Benayas, C., and Arenas, J., 1998. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 44, 679-681.
25. Nishino, M., Sugimoto, M., Kodaira, C., Yamade, M., Shirai, N., Ikuma, M., Tanaka, T., Sugimura, H., Hishida, A., and Furuta, T., 2010. Relationship between low-dose aspirin-induced gastric mucosal injury and intragastric pH in healthy volunteers. *Dig Dis Sci* 55, 1627-1636.
26. Paiva, C. N., Arras, R. H., Lessa, L. P., Gibaldi, D., Alves, L., Metz, C. N., Gazzinelli, R., Pyrrho, A. S., Lannes-Vieira, J., and Bozza, M. T., 2007.

- Unraveling the lethal synergism between *Trypanosoma cruzi* infection and LPS: a role for increased macrophage reactivity. *Eur J Immunol* 37, 1355-1364.
27. Pinge-Filho, P., Tadokoro, C. E., and Abrahamsohn, I. A., 1999. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol* 193, 90-98.
  28. Shikanai-Yasuda, M. A. and Carvalho, N. B., 2012. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis* 54, 845-852.
  29. Sterin-Borda, L., Gorelik, G., Goren, N., Cappa, S. G., Celentano, A. M., and Borda, E., 1996. Lymphocyte muscarinic cholinergic activity and PGE2 involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin Immunol Immunopathol* 81, 122-128.
  30. Tatakihara, V. L., Malvezi, A. D., Panis, C., Cecchini, R., Zanluqui, N. G., Yamauchi, L. M., Martins, M. I., da Silva, R. V., Yamada-Ogatta, S. F., Rizzo, L. V., Martins-Pinge, M. C., and Pinge-Filho, P., 2015. Nitric oxide-releasing indomethacin enhances susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection acting in the cell invasion and oxidative stress associated with anemia. *Chem Biol Interact* 227, 104-111.
  31. Teixeira, M. M. and Yoshida, N., 1986. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol* 18, 271-282.
  32. Yoshida, N., 2006. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* 78, 87-111.
  33. Yoshida, N., 2008. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int* 57, 105-109.
  34. Yoshida, N., Tyler, K. M., and Llewellyn, M. S., 2011. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends Parasitol* 27, 459-466.

## Figure legends

**Figure 1.** Experimental design. BALB/c mice were treated with aspirin (ASA, 100 mg·kg<sup>-1</sup>) for five days before *T. cruzi* infection. Control mice received vehicle (DMSO + PBS) alone. The mice were infected by gavage with 5 x 10<sup>7</sup> or 4 x 10<sup>5</sup> living forms of *T. cruzi*, strains G or CL14. Four days after infection the stomach of each animal was collected and processed for histological analysis and quantification of nitric oxide and TNF- $\alpha$ . Parasitemia was monitored in alternate days starting from day 13 until day 31 after infection.

**Figure 2.** Effect of ASA treatment on the gastric mucosa. ASA (100 mg·kg<sup>-1</sup>) treatment during 5 days caused: elevated gastric mucosal damage scores (A), and reduced nitrite (B) and increased TNF- $\alpha$  levels (C) in the gastric mucosa in comparison to samples obtained from vehicle treated mice. The means  $\pm$  SEM from 3 mice/group are presented (two different sections from each mouse were evaluated). \* $P < 0.05$ , compared to the control mice that received vehicle.

**Figure 3.** Effect of ASA treatment on the invasion capacity of strains G and CL14 of *T. cruzi* in the gastric mucosa. Stomach tissue sections of mice (n=3/group) were performed 5 days after oral infection with metacyclic trypomastigotes (5 x 10<sup>7</sup>). Number of amastigotes nests and distribution of amastigote-containing nests of G (B) and CL14 (C) strains. Note the multiple parasite nests of strain CL14 and a single nest of strain G, in equivalent sections of the stomach stained by were stained by Hematoxylin-Eosin (H.E). Bar: 25  $\mu$ m. Inserts show amastigote nests.\* $P < 0.05$ , compared to the untreated mice.

**Figure 4.** Effect of ASA in the course of infection in mice orally inoculated with G and CL14 metacyclic forms (MT). Differential infectivity of *T. cruzi* isolates G (A) and CL14 (B). Each data point corresponds to the mean parasitemia of four animals/group from at least two independent experiments.

Figure 1

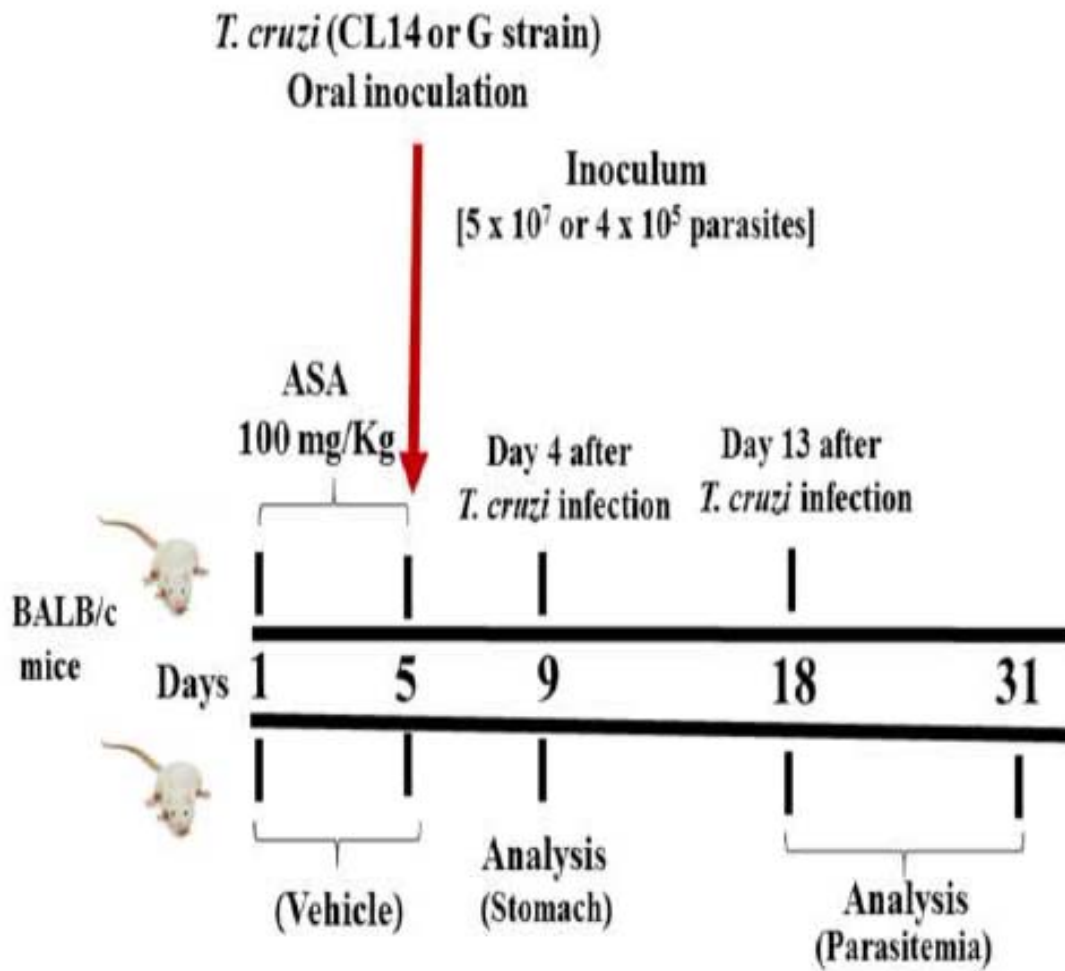
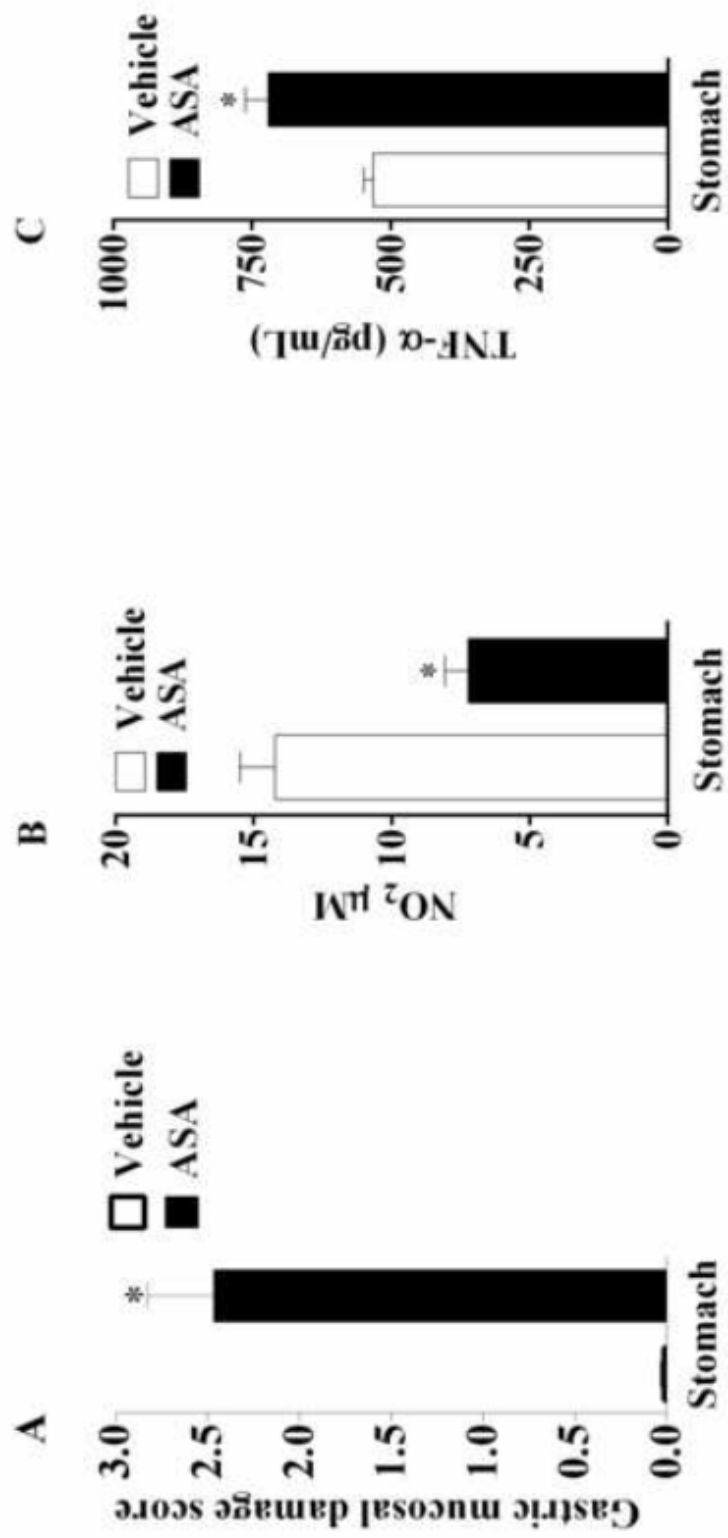
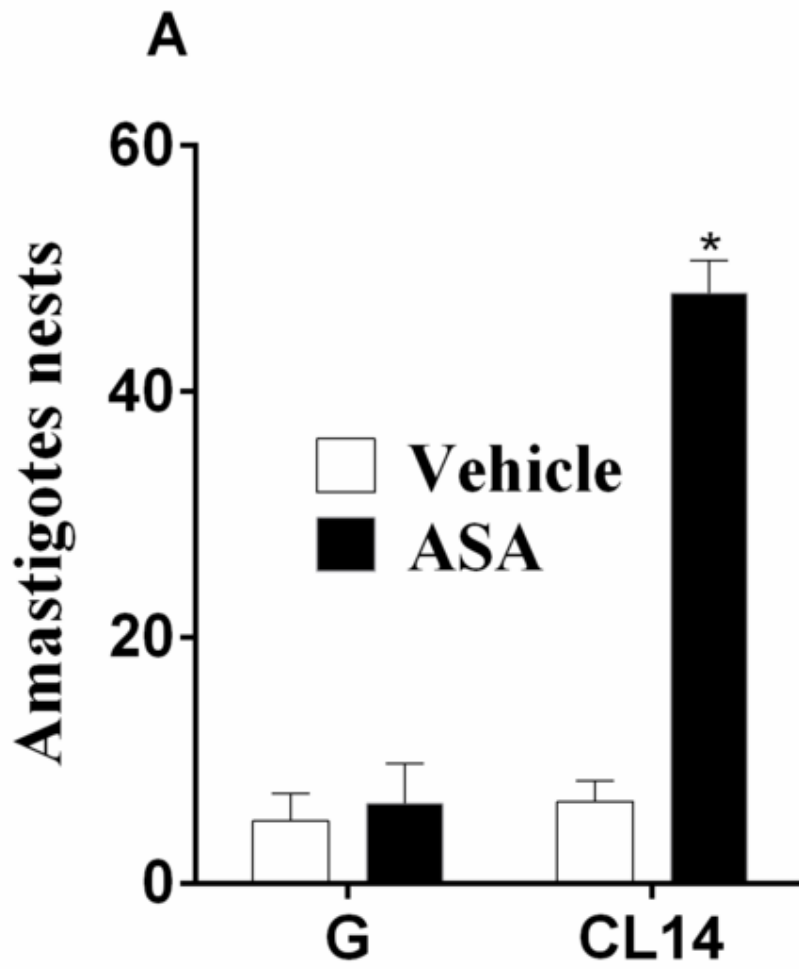
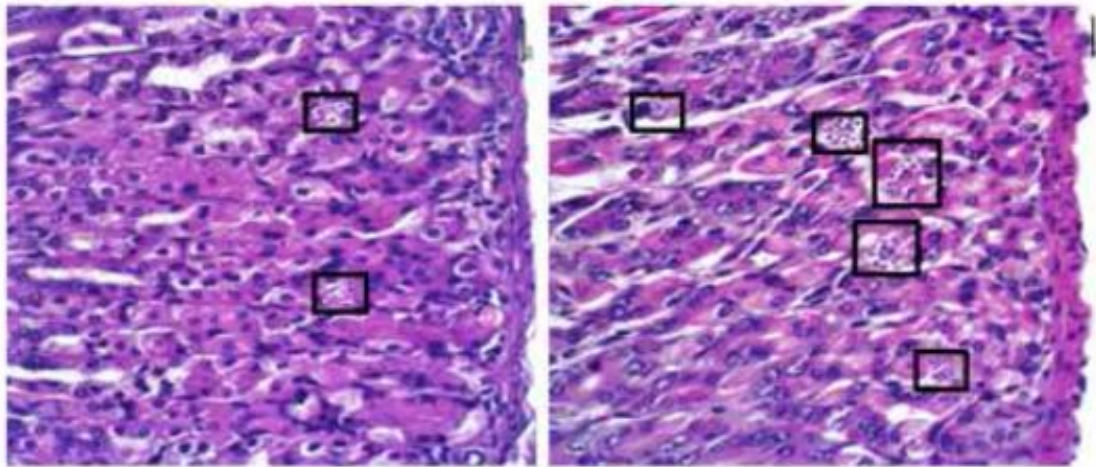


Figure 2



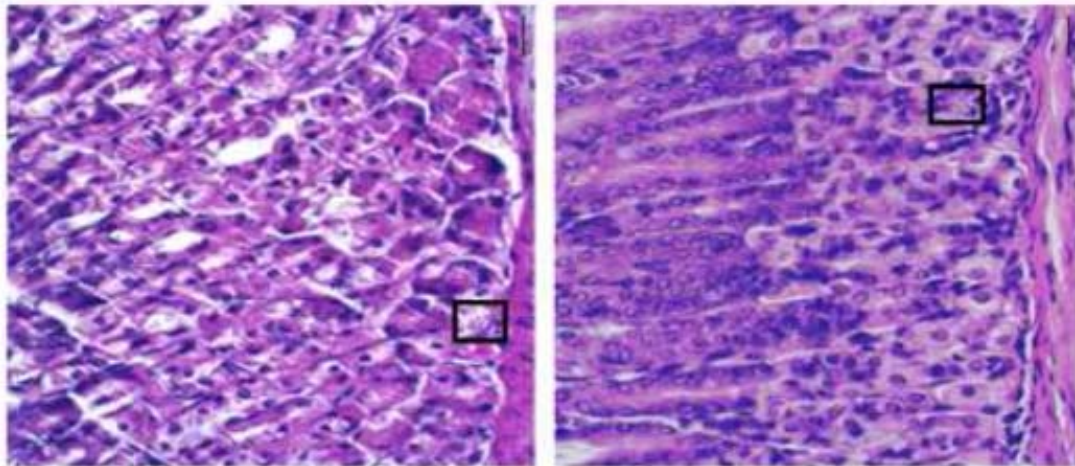




**C**

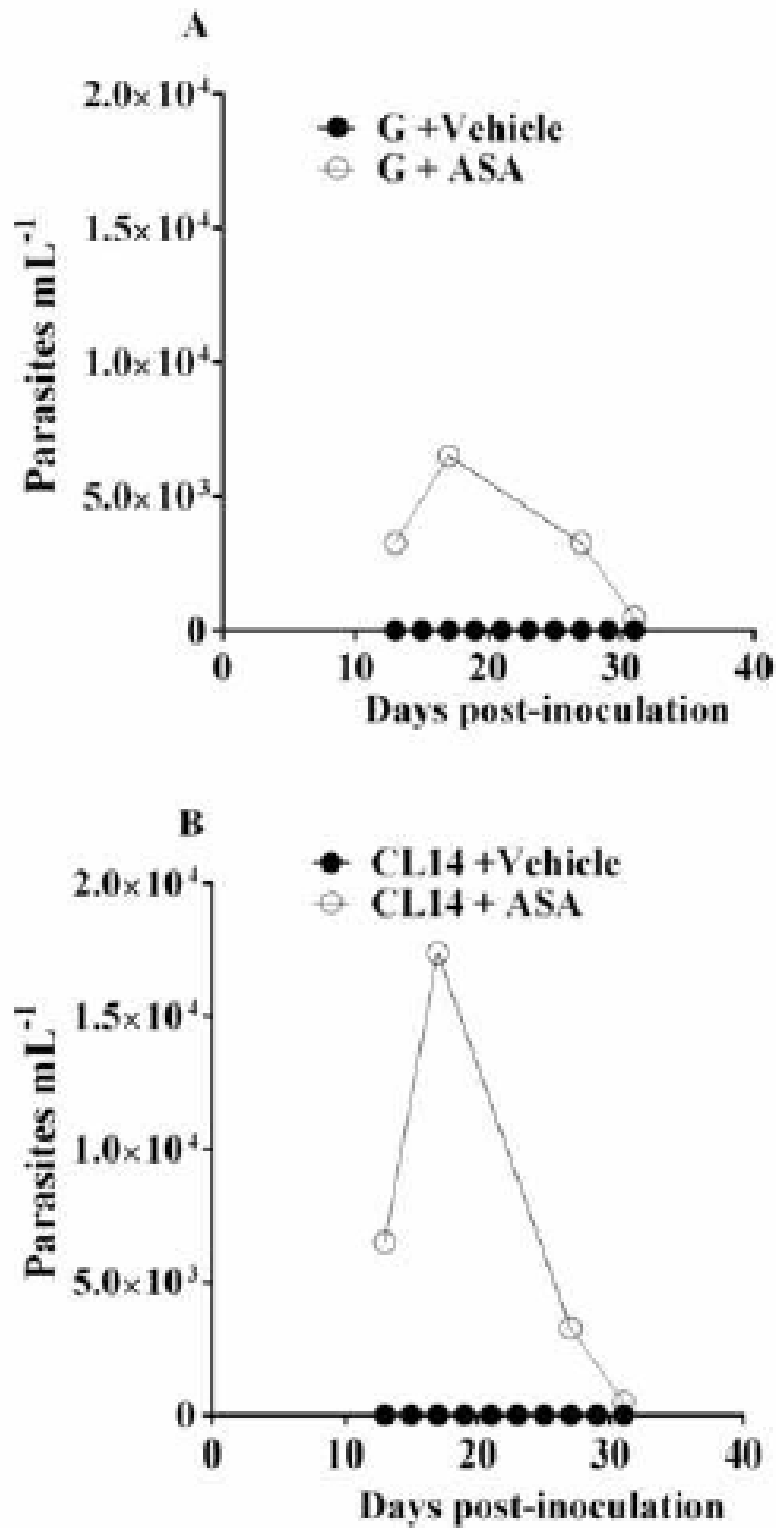
**Vehicle**

**ASA**



**B**

Figure 4



**Table 1.** Parasitological parameters of the infection with *T. cruzi* (CL14 and G strains) in ASA treated and untreated mice.

Strain	Treatment (for 5 days) <sup>a</sup>	No. of parasites orally inoculated <sup>b</sup>	No. of mice with positive parasitemia /No. of mice inoculated	% of survive 30° days post infection
CL14	Vehicle	4 x 10 <sup>5</sup>	3/12	100
	ASA	4 x 10 <sup>5</sup>	9/12	100
G	Vehicle	4 x 10 <sup>5</sup>	1/8	100
	ASA	4 x 10 <sup>5</sup>	5/8	100

<sup>a</sup> Mice were fasted for 16 h before administration of one of the following oral suspensions: ASA (100 mg·kg<sup>-1</sup>) or vehicle (PBS + DMSO 0.05%) by gavage.

<sup>b</sup> Suspension of metacyclic trypomastigotes (MT) was used as the inoculum