

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Análise da expressão de COX-2 em células H9c2
infectadas com *T. cruzi* cepa Berenice-62**

Cíntia Júnia Monteiro
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Análise da expressão de COX-2 em células H9c2
infectadas com *T. cruzi* cepa Berenice-62**

Cíntia Júnia Monteiro

Orientadora

Karen Cristiane Martinez de Moraes

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Ouro Preto como requisito
parcial para obtenção do Título de
Mestre em Bioquímica e Biologia
Molecular.

Ouro Preto
2013

M775a Monteiro, Cíntia Júnia.

Análise da expressão de COX-2 em células H9c2 infectadas com *T. cruzi* cepa Berenice-62 [manuscrito] / Cíntia Júnia Monteiro - 2013.

xv, 77f.: il., color; grafs.; tabs.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Karen Cristiane Martinez de Moraes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.

Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“Análise da expressão de COX-2 em células H9c2 infectadas com *Trypanosoma cruzi* cepa Berenice-62”

Aos treze dias do mês de Maio de 2013, às 14:00, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Cíntia Júnia Monteiro**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por aprovada a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Karen Cristiane Martinez de Moraes
Presidente

Prof.^a Dr.^a Cristina Pacheco Soares
Examinadora (UNIVAP)

Prof. Dr. Breno de Mello Silva
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 13/05/2013

Àqueles que me inspiram a ser uma pessoa melhor, dedico.

“E no final, o amor que você recebe é igual ao amor que você faz.”

The Beatles

AGRADECIMENTOS:

Aos meus pais pelo incentivo, apoio e dedicação.

Às minhas irmãs Patrícia e Luciana pelo apoio, companheirismo e cumplicidade.

Aos meus sobrinhos Vinícius e Beatriz por encherem nossas vidas de alegria.

À Professora Dra Karen Cristiane Martinez de Moraes pela oportunidade.

Ao Professores Renata Guerra de Sá, Marcelo Eustáquio Silva, Laurent Frédéric Gil, Vanja Maria Veloso e Elísio Alberto Evangelista pelos ensinamentos, ajuda e incentivo.

À Universidade Federal de Ouro Preto por mais esta oportunidade.

À equipe do Laboratório de Doença de Chagas por estarem sempre disponíveis para ajudar.

Ao professor Luis Carlos Crocco Afonso pela concessão do uso de seus laboratórios e equipamentos.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial ao Walmir, Érica, Victor, Suianne, Márcia, Luana e Fabiano pela ótima convivência e apoio.

Aos colegas de mestrado.

Aos professores, funcionários e colegas dos demais laboratórios que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concretizado.

Aos meus amigos por fazerem parte da minha vida.

Aos meus queridos primos Danilo e Dalila.

À CAPES pela concessão de bolsa durante este período.

Ao Walmir, que iniciou junto comigo este desafio e ao longo do caminho se tornou uma pessoa tão essencial que terá sempre um espaço em minha vida. Obrigada, amigo!

Sumário

AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
ABREVIATURAS.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	2
1.2 Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i>	4
1.4 Mecanismos de invasão celular.....	6
1.5 Fases clínicas da doença de Chagas.....	8
1.6 Tratamento da doença de Chagas.....	9
1.7 COX-2 e a doença de Chagas.....	10
1.8 Regulação pós-transcricional da COX-2.....	14
1.8.1 CUGBP2.....	16
1.8.2 microRNA.....	19
1.9 Justificativa.....	22
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Cultura de células.....	26
3.2 Infecção de célula H9c2 com <i>T. cruzi</i>	26
3.3 Ensaio de citotoxicidade.....	28
3.4 Dosagem de prostaglandina E2.....	28
3.5 Análise da expressão de RNAm.....	29
3.5.1 Extração do RNA total e síntese do cDNA.....	29
3.5.2 Reações de PCR semi-quantitativa.....	30
3.5.3 Reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	31
3.6 Microscopia de fluorescência.....	32

3.7	Análise da expressão proteica.....	33
3.8	Análise da expressão de miRNA.....	35
3.9	Análises estatísticas.....	36
4.	RESULTADOS.....	37
4.1	Resultados preliminares.....	38
4.1.1	Extração dos RNAs e transcrição reversa.....	38
4.1.2	Análise da eficiência dos oligonucleotídeos e da amplificação dos genes.....	39
4.2	Infecção das células H9c2 pela cepa Be-62.....	41
4.3	Ensaio da viabilidade de células H9c2 infectadas com Be-62	42
4.4	Nível de expressão do RNAm DE Bcl-2, BAX e Caspases 3 e 9 de células H9c2 infectadas com Be-62.....	42
4.5	Níveis de expressão do RNAm e da proteína COX-2.....	44
4.6	Dosagem de PGE2 em células H9c2 infectadas com Be-62.....	45
4.7	Imunolocalização da proteína COX-2 em células H9c2 infectadas com Be-62.	45
4.8	Expressão dos genes <i>nf-kb</i> , <i>c-Jun</i> , <i>c-Fos</i> e <i>c-Myc</i>	47
4.9	Expressão do RNAm e da proteína CUGBP2.....	49
4.10	Microscopia de fluorescência com marcação do RNAm de COX-2 e da proteína CUGBP2.....	50
4.11	Expressão de miRNAs.....	51
5.	DISCUSSÃO.....	53
5.1	CONCLUSÕES	62
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

RESUMO

O protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, a principal causadora de cardiomiopatia e insuficiência cardíaca em regiões de endemicidade na América Latina. A miocardite aguda, uma das consequências da doença, é caracterizada por uma resposta inflamatória intensa com envolvimento de mediadores inflamatórios; dentre estes imunomoduladores, a prostaglandina E2 (PGE2) apresenta um importante papel no desenvolvimento da doença contribuindo para o remodelamento cardíaco e deficiências funcionais deste órgão após a infecção pelo *T. cruzi*. Os níveis de produção deste eicosanoide estão diretamente relacionados com a expressão e atividade da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2). A regulação da expressão desta proteína pode se dar a nível transcricional, envolvendo a participação de fatores de transcrição, ou pós-transcricional, envolvendo proteínas que se ligam a RNAm, como a CUGBP2 e também por microRNAs. Desta forma, considerando-se que as respostas iniciais dos cardiomiócitos frente a invasão pelo *T. cruzi* desempenham um papel fundamental no estabelecimento da infecção a longo prazo e, assim, influenciam na progressão da doença, objetivou-se, neste estudo, avaliar a regulação e expressão de COX-2 em células H9c2 nos períodos iniciais após a infecção pela cepa Berenice-62 do *T. cruzi*. Para isso, foram estudados tempos de interação (período em que o parasito encontra-se no meio intracelular) de 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas após a infecção que foi realizada no período de 2 horas; células não infectadas foram utilizadas como controle. Foram realizadas análises da expressão dos transcritos e proteínas de COX-2, CUGBP2 e NF-κB; dos níveis de PGE2 produzidos durante a infecção; da expressão dos transcritos de Bcl-2, BAX e caspases 3 e 9, genes envolvidos na apoptose; da expressão de c-Myc, c-Jun e c-Fos (cujas proteínas se dimerizam para formarem o fator de transcrição AP1) e expressões de microRNAs envolvidos na modulação da expressão de COX-2, CUGBP2 e fosfolipase A2. Além disso, foi realizada microscopia de fluorescência para verificar a localização das proteínas COX-2, CUGBP2 e do RNAm de COX-2. Como resultados, observou-se que a infecção pela cepa Berenice-62 induz várias alterações celulares, dentre elas, o aumento da expressão e da atividade da proteína COX-2. O parasito também induz translocação desta proteína da região perinuclear para o núcleo e também para o citoplasma. Os fatores de transcrição NFκB,

AP1 e c-Myc parecem não estar envolvidos na expressão de COX-2. Em relação a regulação pós-transcricional, a CUGBP2 parece regular a tradução de COX-2, porém, os miRNAs estudados não parecem estar envolvidos nesta regulação. O parasito apresenta-se co-localizado à COX-2 e à CUGBP2, levantando a hipótese do parasito se aderir a estas moléculas, ou até mesmo, internalizá-las.

ABSTRACT

The intracellular protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas disease, the leading cause of cardiomyopathy and heart failure in regions of endemicity in Latin America. The acute myocarditis, one of the consequences of the disease, is characterized by an intense inflammatory response involving inflammatory mediators like prostaglandin E₂ (PGE₂) that plays an important role in disease development contributing to cardiac remodeling and functional failure of this organ after infection with *T. cruzi*. The PGE₂ production is directly related to the cyclooxygenase-2 (COX-2) protein expression and enzymatic activity. The control of *cox-2* expression basically occurs at two levels, prior to transcription, involving transcription factors and post-transcriptionally, involving microRNAs and proteins which bind to mRNA, as well as CUGBP2. Thus, considering that the initial responses of cardiomyocytes against invasion by *T. cruzi* play a key role in the establishment of long-term infection and thus influence the progression of the disease, the aim of this study was to evaluate the regulation and expression of COX-2 in H9c2 cells in the initial periods after infection by *T. cruzi*, Berenice -62 strain. In this regard, we studied the interaction time (period in which the parasite is intracellularly) 0, 2, 6, 12, 24 and 48 hours after the infection, which one was performed within 2 hours; uninfected cells were used as control. Analyses of the expression of transcripts and proteins COX-2, NF-κB and CUGBP2; levels of PGE₂ produced during the infection, the expression of gene transcripts involved in apoptosis, Bcl-2, BAX and caspases-3 and -9; expression of c-Myc, c-Jun and c-Fos (which proteins dimerize to form the transcription factor AP1) and expression of microRNAs involved in the expression's modulation of COX-2, phospholipase A2 and CUGBP2. Moreover, fluorescence microscopy was performed to verify localization of COX-2 protein and mRNA and CUGBP2. As a result, we observed that infection by Berenice-62 strain induces several cellular changes, among them, increased expression and activity of COX-2 protein. The parasite also induces translocation of this protein from the nucleus to the perinuclear region and also to the cytoplasm. The transcription factors NFκB, c-Myc and AP1 don't seem to be involved in the expression of COX-2. In relation to post-transcriptional regulation, the CUGBP2 seems to regulate the translation of COX-2, but not miRNAs. The parasite presents co-

located to COX-2 and CUGBP2, raising the possibility of parasites adhering to these molecules, or even thought, internalize them.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na PCR semi-quantitativa e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Tabela 02: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para análise da expressão relativa dos genes em células H9c2 infectadas com a cepa Berenice-62.

Tabela 03: Sequências dos miRNAs e alvos utilizados para análise da expressão relativa em células H9c2 infectadas com a cepa Berenice-62.

Tabela 04: Inclinação, Eficiência e R^2 obtidos através de curva de eficiência dos iniciadores.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Esquema com as estruturas celulares do *T. cruzi*.

Figura 02: Ciclo de vida do *T. cruzi*.

Figura 03: Cascata enzimática da síntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano.

Figura 04: Região rica em AU de COX-2.

Figura 05: Domínios RRM da proteína de CUGBP2.

Figura 06: Regulação da expressão de COX-2 pela proteína CUGBP2.

Figura 07: Biossíntese de miRNAs.

Figura 08: Expressão de β -actina, em gel de agarose 0,8%, obtida pela extração de RNA total de células H9c2.

Figura 09: *Plot* de amplificação referente à curva de eficiência do gene β -actina.

Figura 10: Curva padrão do gene β -actina.

Figura 11: Células H9c2 infectadas com a cepa Berenice-62 do *T. cruzi*.

Figura 12: Viabilidade de células H9c2 infectada com *T. cruzi*.

Figura 13: Níveis de expressão do RNAm de genes envolvidos na apoptose.

Figura 14: Níveis de expressão de COX-2.

Figura 15: Níveis de PGE₂.

Figura 16: Imunolocalização da proteína COX-2.

Figura 17: Níveis de expressão de NF- κ B.

Figura 18: Níveis de expressão de RNAm de c-Jun, c-Fos e c-Myc.

Figura 19: Níveis de expressão de CUGBP2.

Figura 20: Microscopia de fluorescência com marcação do RNAm de COX-2 e da proteína CUGBP2.

Figura 21: Níveis de expressão dos miRNAs.

Figura 22: Esquema da regulação da expressão da COX-2 em célula infectada com *T. cruzi*, cepa Be-62.

ABREVIATURAS

AA: Ácido Araquidônico

AMPc: Adenosina 3',5'-Monofosfato cíclico

AP-1: Proteína Ativadora -1

ARE: Região rica em AU.

ATP: Adenosina Trifosfato

Be-62: Berenice-62

BSA: Albumina Sérica Bovina

CCC: Cardiomiopatia Chagásica Crônica

cDNA: DNA complementar

CELF2: do inglês, CUGBP- ETR-3-like factors

COX: Ciclooxygenase

CUGBP2: do inglês, *CUG-binding protein 2*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNase: Desoxirribonuclease

dNTP: Desoxirribonucleosídeos Trifosfatados

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

hnRNP: do inglês, *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*

IFN: Interferon

IL: Interleucina

IP3: Fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato

kDNA: DNA de cinetoplasto

MHC: do inglês, *Major Histocompatibility Complex*

miRNA: microRNA

NF-κB: Fator de Transcrição Nuclear κB

PB: do inglês, *P-bodie*

PBS: Tampão Fosfato Salino

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PGE2: Prostaglandina E2

PGG2: Prostaglandina G2

PGH2: Prostaglandina H2

PLA2: Fosfolipase A2

PLC: Fosfolipase C

qRT-PCR: do inglês, *Quantitative Reverse Transcription PCR*

RNA: Ácido Ribonucleico

RNAm: RNA mensageiro

RRM: Região Reconhedora de RNA

RT-PCR: do Inglês, *Reverse Transcriptase PCR*

SDS: Sulfato Dodecil de Sódio

TLR: do inglês, *Toll-Like Receptor*

Tm: Temperatura de desnaturação

TNF: Fator de Necrose Tumoral

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

TXA2: Tromboxano A2

Tyr: Tirosina

1 – INTRODUÇÃO

1.1 O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, apesar de ter sido descoberta há mais de um século, continua sendo um sério problema de saúde pública. No Brasil, entre os anos de 2000 e 2010 foram registrados 1.086 casos da fase aguda da doença e os casos crônicos totalizam aproximadamente três milhões de indivíduos (Ministério da Saúde, 2012). Estima-se que, em todo mundo, há cerca 10 milhões de pessoas infectadas e vinte e cinco milhões correm risco de adquirirem a doença, a maior parte na América Latina (OMS, 2010).

A doença é causada pela infecção do *Trypanosoma cruzi*, um parasito intracelular obrigatório que pertence à Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae, caracterizada pela presença de um único flagelo e do cinetoplasto, uma organela que contém DNA e está localizada na mitocôndria (Figura 01). Seu ciclo de vida envolve a passagem alternada em hospedeiros vertebrados e invertebrados da Classe Hemiptera, Família Reduviidae e Sub-Família Triatominae (De souza 2002; Moreira, 2004).

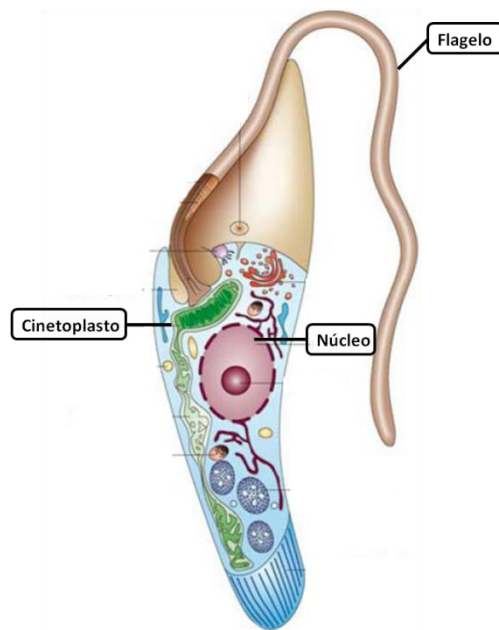


Figura 01. Esquema com as estruturas celulares do *T. cruzi* (Modificado de DOCAMPO *et al.*, 1975). Em destaque o núcleo, cinetoplasto e flagelo da forma epimastigota do parasito.

O *T. cruzi* possui uma população heterogênea que é atribuída a variações genéticas do parasito. Como consequência, ele apresenta uma extensa variedade de cepas, isoladas de populações de origens distintas, que apresentam diferentes características relacionadas à morfologia das formas sanguíneas, à parasitemia, à patogenicidade e virulência e à sensibilidade a medicamentos (Williams-Banglero *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2010).

Em relação aos aspectos morfológicos, as diferentes cepas podem ser divididas em dois grupos de acordo com as seguintes características apresentadas pela forma tripomastigota sanguínea: um grupo se caracteriza por ser mais espesso, possuir forma mais larga com movimentos lentos sobre si mesmo, apresentar cinetoplasto grande localizado na extremidade posterior e núcleo elíptico localizado no centro do parasito e, o outro, por possuir cinetoplasto situado próximo à extremidade posterior, núcleo alongado e apresentar-se sob formas mais finas com movimento ondulatório em linha reta e bastante rápido (Chagas, 1909; Romaña e Meyer, 1942).

Muitos estudos já relacionaram a morfologia do parasito com a intensidade da parasitemia. Em casos em que foi detectada prevalência de cepas que apresentam predomínio de formas delgadas foi observada parasitemia mais elevada em camundongos infectados quando comparadas àquelas que tinham predomínio de formas largas (Lana e Chiari, 1986; Marques de Araújo e Chiari, 1988). A cepa Y, por exemplo, que possui predomínio de formas delgadas, apresenta elevada infectividade *in vitro* ao contrário da cepa CL, que possui predominância de formas largas e baixa infectividade (Brener *et al.*, 1976; Berteli *et al.*, 1977; Bertelli e Brener, 1980).

Outro exemplo de cepa conhecida do *T. cruzi*, mas, pouco estudada, é a cepa Berenice 62 (Be-62) que foi isolada por xenodiagnóstico da paciente Berenice em Lassance, Minas Gerais, por Salgado e colaboradores em 1962. Esta cepa apresenta predominantemente a forma fina, induz infecções com altos níveis de parasitemia, possui população monoclonal e apresenta susceptibilidade a agentes quimioterápicos (Brener, 1965; Brener *et al.*, 1976).

Desta forma, devido à grande variabilidade genética apresentada pelo parasito, faz-se necessário o estudo das diferentes cepas para que se conheça as particularidades de cada uma em relação a sua interação com o indivíduo infectado, manifestações clínicas e danos que elas podem causar ao indivíduo.

1.2 Ciclo evolutivo do *T. cruzi*

O *T. cruzi* foi observado pela primeira vez no trato intestinal do inseto vetor pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas que, posteriormente, identificou a presença do parasito na paciente Berenice, em 1909 (Chagas, 1909). Carlos Chagas descreveu todas as formas evolutivas do *T. cruzi* (epimastigota, tripomastigota e amastigota) e também seu ciclo evolutivo (Figura 02) que tem início quando o hospedeiro invertebrado ingere a forma tripomastigota durante o repasto sanguíneo. No intestino médio do inseto vetor, a tripomastigota se diferencia na forma epimastigota onde se multiplica por divisão binária. A intensa multiplicação resulta em um considerável aumento do número de parasitos que são estimulados a migrarem para a parte posterior do tubo digestivo onde ocorre o processo de metaciclogênese. Esta diferenciação é estimulada pela alteração das condições ambientais, como temperatura, pH e osmolaridade e, como resultado, ocorrem mudanças na expressão gênica, síntese de proteínas e morfologia do parasito (González-Perdomo *et al.*, 1988).

A transmissão para o hospedeiro vertebrado ocorre quando o inseto vetor ingere grande quantidade de sangue e libera, juntamente com as fezes, a forma tripomastigota metacíclica que pode penetrar através da pele ou mucosa, entrar na corrente sanguínea e invadir as células próximas ao local da infecção diferenciando-se na forma amastigota que sofre diversos ciclos de divisão binária no citoplasma da célula para finalmente se diferenciar na forma tripomastigota, que rompe a célula e alcança a circulação sanguínea podendo atingir órgãos distantes da infecção primária ou serem ingeridas pelo inseto vetor fechando o ciclo (Chagas, 1909; Cançado e Brener, 1979; De Souza, 1984; Revisto por Tyler e Engman, 2001).

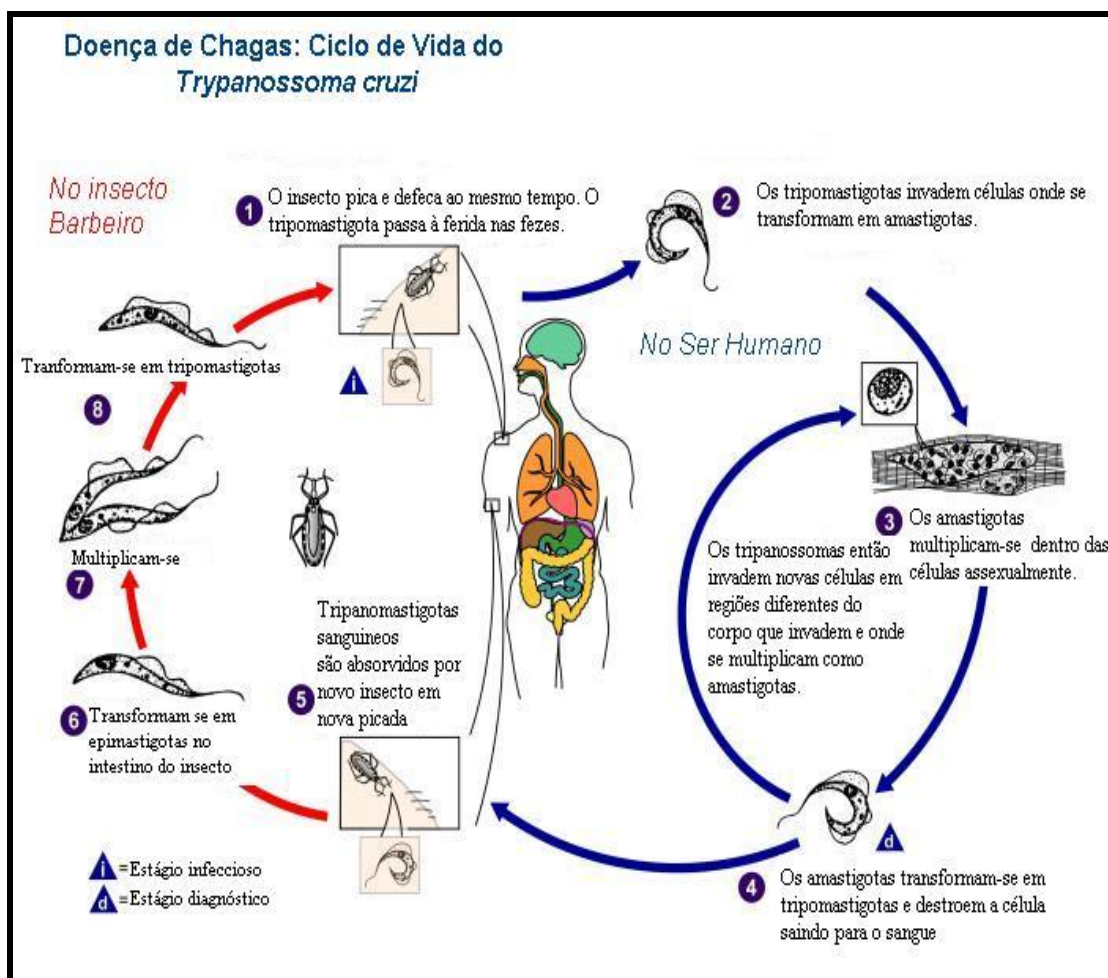


Figura 02: Ciclo de vida do *T. cruzi*. As diferentes formas do *T. cruzi* ao longo do seu ciclo evolutivo no hospedeiro vertebrado e invertebrado (modificado de www.dpd.cdc.gov/dpdx).

Além da transmissão vetorial, a doença de Chagas pode ser transmitida através de transfusão sanguínea, principal forma de transmissão em países não endêmicos como Canadá, Estados Unidos e Espanha; transmissão vertical, que ocorre durante a gestação; transmissão por via oral através da ingestão de alimentos contendo o triatomíneo ou suas dejeções; através do leite materno; por acidentes laboratoriais e por transplante de órgão. (Benchimol Barbosa, 2006; Dias, 2006; CDC, 2009).

1.4 Mecanismos de invasão celular

O *T. cruzi*, na sua forma tripomastigota, invade as células do hospedeiro utilizando diferentes mecanismos, dentre eles, a fusão de lisossomos no local de entrada do parasito, através de participação de receptores ou ligantes presentes na membrana plasmática ou por fusão de endossomos iniciais no local de invasão (Araújo-Jorge *et al.*, 1992; Barbara *et al.*, 2005). O início do processo de invasão pode ocorrer pela adesão do parasito à superfície da célula com a participação de glicolipídeos e glicoproteínas presentes na superfície do parasito e da célula hospedeira (Meirelles *et al.*, 1999; Calvet *et al.*, 2004; Yoshida, 2006). Acredita-se que a mobilização do cálcio intracelular, importante para o processo de invasão do *T. cruzi*, seja dependente das glicoproteínas de superfície do parasito; inclusive, sua capacidade de invadir as células pode estar associada ao perfil de expressão dessas glicoproteínas que possuem atividade sinalizadora de cálcio. A família da glicoproteína gp82 está presente na superfície das cepas mais infectivas e está envolvida na ativação da proteína tirosina quinase, ativação de fosfolipase e geração de IP3 (fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato) com posterior mobilização de cálcio. Em cepas menos infectivas, a família da glicoproteína de ligação à célula hospedeira é gp35/50. Ela induz uma cascata de sinalização menos eficiente, que possivelmente envolve AMPc (Yoshida, 2006).

Os receptores presentes na célula do hospedeiro relacionados com o reconhecimento do *T. cruzi* são conhecidos como receptores do tipo Toll (TLRs) que são transmembrana e atuam na resposta imune inata. Seu domínio extracelular é o responsável pelo reconhecimento do parasito e pelo processo de dimerização dos receptores, essencial para sua ativação (Frantz *et al.*, 1999; Wyllie *et al.*, 2000; de Kleijn e Pasterkamp, 2003). O TLR2 é o responsável pelo reconhecimento das âncoras de glicofosfatidilinositol do parasito, mas, para que ocorra sua ativação, é necessário que ele se dimerize com TLR6 ou TLR1 (Ozinsky *et al.* 2000; Campos *et al.*, 2001). TLR 2 ativada promove uma cascata de transdução de sinal que culmina na ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) que desempenha um importante papel na regulação da resposta imune contra infecção. (Gazzineli *et al.*, 2001).

Estudo realizado com formas tripomastigotas e amastigotas extracelulares das cepas G e CL mostrou que microdomínios ricos em colesterol presentes nas membranas de células de mamíferos também estão envolvidos no processo de infecção pelo *T. cruzi* (Fernandes *et al.*, 2007). Outra possibilidade que poderia ser utilizada pelo *T. cruzi* para invadir a célula do hospedeiro mamífero envolve o mecanismo de reparo da membrana celular. Fernandes *et al* (2011) mostraram que o parasito lesiona a membrana externa da célula, provavelmente através de sua intensa movimentação e, por esta lesão, íons de cálcio que são abundantes no meio extracelular entram no interior da célula. Este aumento do cálcio intracelular induz a fusão de lisossomos com a membrana externa ao redor da lesão culminando com internalização desta membrana e também do *T. cruzi*. Desta forma, a maior afinidade do parasito pelas células musculares poderia ser explicada pelo fato de que elas são mais propensas à lesão, então, utilizam com maior frequência o mecanismo de reparo da membrana.

Ao entrar na célula, inicialmente, o parasito se aloja no interior de um vacúolo endocítico, conhecido como vacúolo parasitóforo, que tem sua formação dependente do aumento do nível de cálcio intracelular (Carvalho e De Souza, 1989; Andrews, 1995; Barbara, 2005). Os vacúolos parasitóforos, por serem formados através da fusão da membrana com o lisossomo, contêm fosfatase ácida e também glicoproteínas marcadoras de lisossomos. Este meio ácido pode favorecer a diferenciação de tripomastigotas em amastigotas além de estimular o parasito a secretar a proteína TcTox, essencial para formação de poros no vacúolo que permitem a passagem para o citoplasma onde poderão se dividir e continuar o ciclo (Tanowitz *et al.*, 1992; Kirchhoff, 1996; Burleigh e Woolsey, 2002).

1.5 Fases clínicas da doença de Chagas

Em geral, a doença de Chagas apresenta duas fases distintas: a aguda, que se caracteriza como a fase inicial que dura aproximadamente de 30 a 90 dias e a crônica, que se manifesta subsequentemente até o óbito do indivíduo infectado (Prata, 2001).

Na fase aguda da doença de Chagas ocorre intensa multiplicação e invasão de células pelo parasito, caracterizando-se pelo alto número do protozoário na corrente sanguínea e tecidos, porém, na maioria dos casos é pouco sintomática. Alguns sinais e sintomas inespecíficos podem ser observados tais como febre, taquicardia, linfadenopatia e esplenomegalia. Os sinais característicos da fase aguda são inchaços decorrentes da reação inflamatória local causada pela entrada do parasito, como o chagoma de inoculação e o sinal de Romaña, inchaço que aparece nas pálpebras. Nessa fase, formas amastigotas podem ser encontradas em quase todos os órgãos do hospedeiro. (Guarner *et al.*, 2001; Barret *et al.*, 2003).

O aumento da parasitemia e da infecção de tecidos faz com que aumente também a intensidade da resposta imune, conseqüentemente, o número de parasitos circulantes diminui até que estejam quase inexistentes na corrente sanguínea, caracterizando, então, o final da fase aguda. Curiosamente, na fase crônica apenas um raro número de parasitos permanecem viáveis no interior das células infectadas. Nessa fase, 70% dos pacientes permanecem assintomáticos e os indivíduos que apresentam a fase crônica sintomática podem desenvolvê-la em um período de 10 a 30 anos após a infecção (Prata, 2001; Barret *et al.*, 2003; Moncayo *et al.*, 2009). Os sintomas da doença caracterizam-se basicamente pelas formas clínicas digestiva e cardíaca. Os pacientes podem apresentar arritmia cardíaca devido a diminuição da capacidade de bombeamento do coração e esta pode evoluir para uma arritmia cardíaca fatal. A hipertrofia cardíaca pode também estar presente, assim como as hipertrofias do esôfago e do intestino grosso, causando dificuldades de deglutição, engasgos e pneumonias por aspiração, além de constipação crônica e dor abdominal (Tanowitz *et al.*, 1992; Prata, 2001; Moncayo *et al.*, 2009).

Sabe-se que algumas cepas do *T. cruzi* possuem tropismo maior pelo tecido muscular estriado, isto resulta em um acentuado parasitismo das células miocárdicas (Andrade *et al.*, 1974; Andrade *et al.*, 2010) fazendo com que, em aproximadamente

90% dos casos de acometimento do tecido cardíaco ocorra comprometimento da integridade de suas células na qual podem ser observadas necrose miocitolítica focal e fibrose reparadora causada pela destruição dos miócitos e pela ação das células inflamatórias (Tanowitz *et al.*, 1992). A miocardiopatia chagásica, uma das consequências decorrentes da doença, é mais agressiva se comparada com outras cardiomiopatias, entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis pela sua gravidade são pouco conhecidos.

Veloso *et al.* (2008) avaliaram a cinética da parasitemia e sua correlação com o parasitismo durante dois anos de infecção através de exame de sangue a fresco, hemocultura e ensaios de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) em coração de cães da raça Beagle inoculados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *Trypanosoma cruzi*. Os resultados obtidos evidenciaram que o parasito ou o kDNA é facilmente detectado durante a fase aguda em todos os animais infectados. Entretanto, poucos testes positivos foram verificados durante a fase crônica da infecção. O percentual de positividade em hemocultura e utilizando-se a técnica de PCR nas amostras de animais inoculados com as cepas Berenice-78 e ABC foram semelhantes e significativamente maiores quando comparados aos animais infectados com a cepa Y. Desta forma, foi sugerido que a sensibilidade do método da PCR e da hemocultura dependem da cepa, porém, verificou-se que no tecido cardíaco a PCR apresenta maior sensibilidade, independentemente da cepa analisada.

1.6 Tratamento da doença de Chagas

A doença de Chagas ainda não possui cura. Os únicos medicamentos disponíveis atualmente para o tratamento dos indivíduos infectados são o Nifurtimox e o Benzonidazol, porém, estes medicamentos possuem alta toxicidade, apresentam muitos efeitos colaterais além de não serem totalmente eficazes no combate ao parasito porque algumas cepas apresentam alta refratariedade ao tratamento e outras cepas podem desenvolver resistência ao medicamento. O tratamento com estas drogas deve ser

iniciado logo após a infecção porque torna-se menos ativo em estágios avançados da doença (Bern *et al.*, 2011).

Atualmente, tem-se aumentado a conscientização de que um tratamento específico deve ser oferecido a todos os pacientes, (Clayton, 2010; Leslie, 2011) apesar disso, o desenvolvimento de novos fármacos que possam combater a doença continua não tendo interesse comercial para as indústrias farmacêuticas. Recentemente, Villalta *et al.* (2013) realizaram um estudo utilizando a VNI, uma pequena molécula que inibe seletivamente o esterol 14 α -demetilase que é essencial para multiplicação e integridade celular do *T. cruzi*, e alcançaram a cura experimental da doença. Neste estudo, foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo* utilizando-se a cepa Tulahuen e, como resultado, obtiveram 100% de sobrevivência e cura de ratos que se apresentavam nas fases aguda e crônica da doença, além disso, não foram observados efeitos colaterais.

Esta descoberta abre novos caminhos para cura de pacientes portadores da doença de Chagas, todavia, é necessário que pesquisas continuem sendo realizadas. É importante esclarecer os mecanismo que envolvem a interação do parasito com a célula do hospedeiro no início da infecção pois eles culminam com a resposta imune do hospedeiro contra o parasito e, conseqüentemente, a progressão da doença.

1.7 COX-2 e a doença de Chagas

Ciclooxigenases (COXs), também conhecidas como Prostaglandina G/H sintase, Prostaglandina H2 sintase ou Prostaglandina endoperóxido sintase são oxigenases que atuam na formação de peróxidos bicíclicos a partir da oxigenação de ácidos graxos poliinsaturados (Marnett *et al.*, 2000).

A proteína ciclooxigenase apresenta-se sob as isoformas COX-1 e COX-2. As duas enzimas possuem sítios catalíticos distintos: o de ciclooxigenase e o de peroxidase (Chandrasekharan e Simmons, 2004). Apesar de serem proteínas semelhantes com aproximadamente 60% de homologia e peso molecular de cerca de 70 kD, a COX-1 e a COX-2 são codificadas por genes distintos localizados em diferentes cromossomas (Smith *et al.*, 1996). Além disso, a regulação da expressão e a função que desempenham nas células e tecidos são bastante diferentes entre elas (Cao e Prescott, 2002). COX-1 é expressa constitutivamente em diversos tecidos como os rins, pulmões e trato

gastrointestinal (Williams *et al.*, 1999) exercendo várias funções fisiológicas que permitem a manutenção da homeostasia (Lee *et al.*, 2003). A COX-2 é expressa em baixas quantidades em células e tecidos normais podendo ter sua expressão aumentada em resposta a estímulos como fatores de crescimento, citocinas, lipossacarídeos bacterianos, hormônios, promotores tumorais (Chandrasekharan e Simmons, 2004; Chwirot e Kuzbicki, 2007) e também espécies reativas de oxigênio e radiação ultravioleta (Goulet *et al.*, 2003). O aumento local da sua expressão tem sido associado ao processo inflamatório (Warner e Mitchell, 2004). Em condições normais, o RNAm de COX-2 é degradado rapidamente, porém, durante o processo inflamatório, ocorre aumento dos níveis transcricionais e também aumento da estabilidade deste RNAm (Shao *et al.*, 2000; Sully *et al.*, 2004). Esta relação pode ser explicada pelo fato da COX-2 ser a enzima limitante da produção de prostaglandina (PG), importante mediador inflamatório, pela via do ácido araquidônico (AA). Além das PGs, as COXs também metabolizam o ácido araquidônico em tromboxano A₂ (TXA₂) e prostaciclina (Smith, Marnett, 1991; Vane *et al.*, 1998).

As PGs são eicosanoides, família de lipídeos que possuem em comum um esqueleto com 20 carbonos. São considerados importantes mediadores da resposta inflamatória (Oliveira, 2000) atuando na modulação da resposta imune, na função renal, na liberação de neurotransmissores e na agregação plaquetária (Harris *et al.*, 2002). Esses eicosanoides são produzidos à partir de estímulos fisiológicos ou patológicos que ativam a fosfolipase A₂ cálcio dependente (PLA₂) que atua hidrolisando fosfolipídeos da membrana plasmática produzindo o AA. Um anel ciclopentano é formado e a enzima COX, através do seu sítio ciclooxigenase, introduz quatro átomos de oxigênio. O sítio peroxidase da COX catalisa a transferência de 2 elétrons de um grupamento 15-hidroxiperoxi para um grupamento 15-hidroxila dando origem à prostaglandina G₂ (PGG₂) que é rapidamente convertida em prostaglandina H₂ (PGH₂), substrato de diversas enzimas conhecidas como prostaglandinas sintetases. Estas enzimas são responsáveis pela produção de diversas PGs, dentre elas a prostaglandina E₂ (PGE₂), que é a mais abundante no corpo humano e está relacionada com a resposta imunológica. Além das PGs, tromboxano e prostaciclina também são produzidos nesta via (Figura 03) (Wang, 2007; Greenhough *et al.*, 2009).

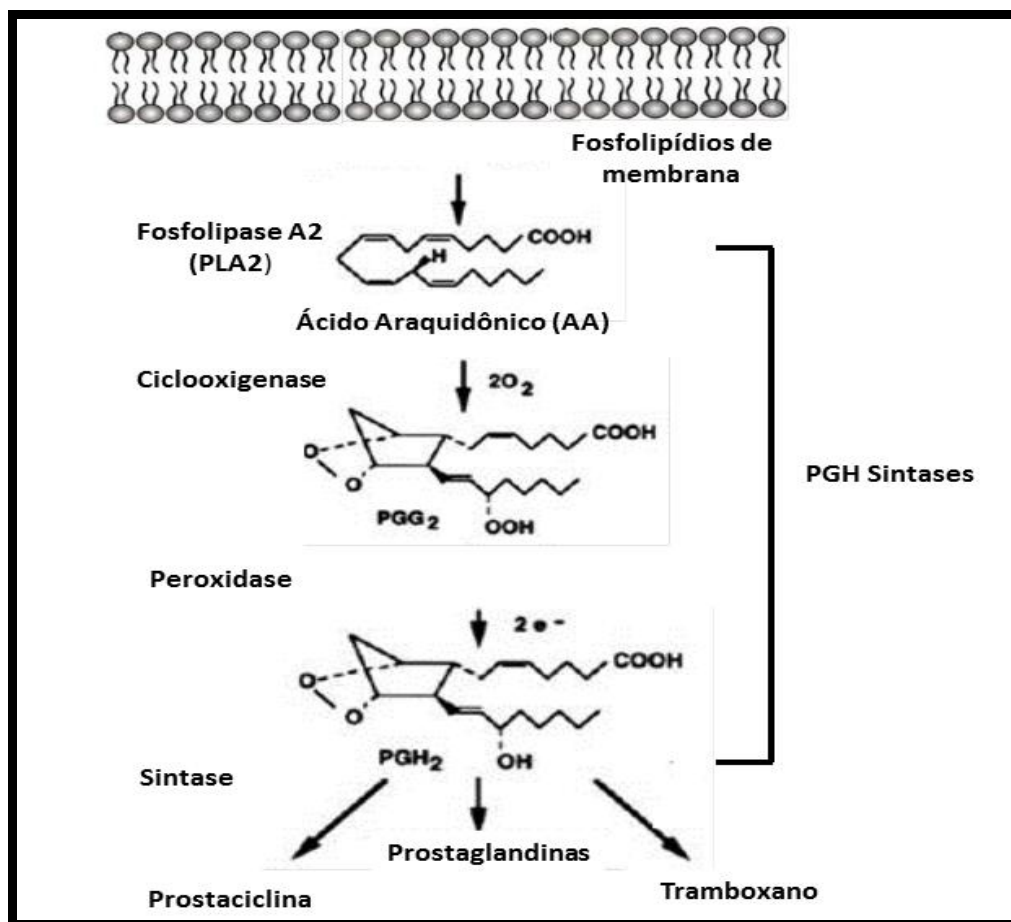


Figura 03. Cascata enzimática da síntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano (Adaptado de Mollace *et al.*, 2005)

A ação das PGs na célula se dá pela sua ligação a receptores transmembrana acoplados à proteína G denominados EP1, EP2, EP3 e EP4. A ativação destes receptores leva a ativação de diferentes vias de sinalização, algumas delas envolvidas com o aumento ou diminuição de cAMP, ativação de trifosfato inositol e aumento dos níveis de cálcio intracelular (Sugimoto e Narumiya, 2007; Dorsan e Gutkind, 2007).

Estudos mostram que a infecção pelo *T. cruzi* aumenta os níveis de PGE2 e este aumento pode estar relacionado com a progressão da doença, uma vez que a miocardite, que pode evoluir para cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) que é uma das manifestações mais importantes na doença de Chagas, é causada pelo processo inflamatório e resposta imune exacerbada do hospedeiro contra o parasito (Abdalla *et*

al.,2008). Entretanto, a relevância da enzima COX-2 e de seus produtos metabólicos ainda não estão bem esclarecidos nesta doença.

Esta resposta exacerbada do hospedeiro é causada, possivelmente, por um desequilíbrio nos mecanismos imunorregulatórios com prevalência da resposta inflamatória devido à falha de mecanismos reguladores. Alguns estudos sugerem que o balanço entre as citocinas inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α , que estão relacionados com a indução do aumento dos níveis de PGE₂, e imunomodulatórias, como a IL-10, determinariam o destino da infecção e progressão da doença (GOLLOB, 2008; RASSI JR. *et al.*, 2009; DUTRA *et al.*, 2009; CUNHA-NETO *et al.*, 2009). As consequências para o indivíduo infectado incluem alterações estruturais e funcionais no tecido cardíaco, tais como necrose, injúrias microvasculares, isquemia, desregulação da auto-ritimicidade, fibrose e hipertrofia, além de autorreatividade tecidual. Essas alterações contribuem para a ocorrência de arritmias, tromboembolismo e insuficiência cardíaca, podendo levar à morte súbita (RASSI JR. *et al.*, 2009).

Curiosamente, o *T. cruzi* também produz eicosanoides, principalmente o TXA₂. Estes eicosanoides podem contribuir para a diferenciação do parasito e sua sobrevivência no hospedeiro (Sterin-Borda, *et al.*, 1996; Ashton *et al.*, 2007). Além disso, estudos mostram que tripanosomas são capazes de metabolizar o ácido araquidônico, isto demonstra a importância destes lipídeos na resposta do hospedeiro e na progressão da doença (Kabututu *et al.*, 2003).

Abdalla *et al.* (2008) observaram que níveis aumentados de PGE₂ levavam a maiores danos teciduais no coração de animais infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, além disso, o tratamento com drogas que inibem seletivamente a COX-2 diminuíram essas lesões. Entretanto, estudo realizado com animais infectados com a cepa Y, durante a fase aguda da doença e tratados com salicilato de sódio e meloxicam, fármacos que inibem a atividade da proteína COX-2, diminuíram os níveis de PGE₂ e reduziram significativamente a parasitemia nesses animais, além de aumentar a síntese de IL-2 (Michelin *et al.*, 2005).

Além disso, estudos realizados *in vitro* e na fase aguda da doença de Chagas mostraram que PGE₂ induz imunossupressão ao interferir no processo de apresentação de antígeno e inibir a expressão de moléculas MHC classe II, inibir a produção de IL-2, reduzir a ativação de linfócitos T, reduzir a secreção de IFN- γ e a linfoproliferação

(Celentano *et al.*, 1995; Sterin Borda *et al.*, 1996). Estes eventos podem levar a uma diminuição das lesões teciduais.

Experimentos realizados por Mukherjee *et al.* (2011) com camundongos infectados com *T. cruzi* cepa Brasil e tratados à partir do quinto dia de infecção com aspirina, fármaco que atua como inibidor não seletivo da COX, mostrou que a diminuição da atividade de COX aumentou a parasitemia em doze vezes além de aumentar a mortalidade dos animais em duas vezes. Não foi observada diferença em relação à estrutura histopatológica ou função cardíaca. Neste mesmo estudo, outros camundongos foram tratados com aspirina com início de tratamento na fase crônica da doença, sessenta dias após a infecção, e não foi observado aumento na parasitemia e mortalidade dos animais.

Desta forma, apesar de não estar claro qual a função da atividade da COX-2 e da PGE2 na doença de Chagas, é evidente que eles possuem um papel importante e diferenciado durante a evolução da doença, sendo necessário maiores estudos para sua compreensão.

1.8 Regulação pós-transcricional da COX-2

O controle da síntese e degradação do RNAm é um processo altamente regulado e assume a principal função na modulação da expressão gênica dos mamíferos. Além disso, esta regulação da cinética de degradação do RNAm permite que a célula responda rapidamente à estímulos que ocorrem através de sinais intra e extracelulares (Garneau *et al.*, 2007).

O RNAm de eucariotos possuem duas regiões características que são fundamentais para que possam desempenhar suas funções: 5' *cap* e a cauda poli(A). Nas células dos mamíferos, a maioria da degradação do RNAm inicia pela diminuição da cauda poli(A) – deadenilação. Neste ponto, a degradação se inicia na região 5' e envolve a remoção do 5' *cap*. Alternativamente, o RNAm pode ter sua degradação iniciada na região 3' pelo complexo de exonucleases conhecido como exosomo (Garneau *et al.*, 2007). Muitos destes RNAs marcados para degradação estão localizados em *P-bodies*, que são pequenas grânulos no citoplasma que contém componentes para degradação de RNAm tanto de 3' para 5' quanto de 5' para 3'. Em

situações de estresse celular, observa-se que o RNAm é levado para grânulos de estresse presentes no citoplasma, onde estes RNAm são silenciados, ou seja, não são traduzidos (Garneau *et al.*, 2007; Eulalio *et al.*, 2007).

Atualmente, acredita-se que há uma interação entre os *P-bodies* e os grânulos de estresse, sendo que os RNAs destinados a serem degradados são primeiro selecionados nos grânulos de estresse e, posteriormente, levados para os *P-bodies* para serem degradados (Anderson e Kedersha, 2008).

Uma característica intramolecular do RNAm que controla a expressão de muitas citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e protooncogenes é o elemento rico em AU ou ARE (*AU rich element*) (Barreau *et al.*, 2005). Estes elementos ricos em AU funcionais estão presentes na região 3' não traduzida (3'UTR) e são, frequentemente, compostas por sequências de motivos AUUUA (Barreau *et al.*, 2005; Bakheet *et al.*, 2006). O RNAm de COX-2 possui uma curta meia vida, aparentemente, devido a existência de uma região de 116 nucleotídeos contendo um aglomerado de seis sequências de elementos AUUUA localizados perto do códon de terminação de COX-2 (Figura 04) que atua como uma ARE funcional (Dixon *et al.*, 2000; Dixon, 2004; Young e Dixon, 2010).

A regulação pós-transcricional tem sido mostrada como sendo dependente das AREs porque a presença destas regiões confere rápida degradação do RNAm repórter estável. Além disso, esta região rica em AU é altamente conservada tanto em relação à sequência quanto a localização na COX-2 entre várias espécies indicando que a função de ARE tem sido conservada durante o processo evolutivo (Dixon, 2003).



Figura 04. Região rica em AU de COX-2 (Adaptado de Dixon *et al.*, 2000). Representação do RNAm de COX-2 apresentando a sequência de 116 nucleotídeos da região rica em AU contendo seis motivos AUUUA.

A função regulatória mediada pela ARE é dada através da sua associação com proteínas que se ligam ao RNAm e apresentam alta afinidade por estas regiões. As proteínas que se ligam a AREs mais bem estudadas promovem rápida degradação, estabilização ou silenciamento traducional do RNAm. As proteínas hnRNP A1 e Apobec-1 estão associadas à estabilidade do RNAm de COX-2, CUGBP2, TIA-1, TTP, TIAR e AUF1 atuam impedindo a tradução desta molécula de RNAm degradando-a ou bloqueando sua tradução (Mukhopadhyay *et al.*, 2003; Murmu *et al.*, 2004, Garneau *et al.*, 2007).

Atualmente, dezesseis diferentes proteínas que se ligam ao RNA tem sido relatadas por se ligar a 3'UTR de COX-2 (Young e Dixon, 2010). No presente trabalho será enfatizado o papel da proteína CUGBP2 (*CUG-binding protein 2*) na regulação pós transcricional de COX-2.

1.8.1 CUGBP2

O processamento do RNA é importante para garantir a diversidade proteica e modular os níveis da expressão das proteínas. CUGBP2, também conhecida como CELF2, ETR3, NAPOR-2 ou NAPOR-3 e BRUNOL2, é uma proteína expressa ubiquitivamente que regula várias etapas de processamento de RNA no núcleo e no citoplasma, incluindo *splicing* (Good *et al.*, 2000; Goo e Cooper, 2009), edição (Anant *et al.*, 2001), degradação (Morales *et al.*, 2006) e tradução do RNAm (Mukhopadhyay *et al.*, 2003).

Apesar de estar presente em todos os tecidos, elas estão expressas em baixas quantidades em células saudáveis, indicando que sua regulação é muito importante para a manutenção da homeostase celular. Uma pesquisa realizada com pacientes que apresentavam distrofia miotônica mostrou que há alterações no padrão das funções da proteína CUGBP2 nesta doença e, além da degeneração neuromuscular, foi observado também problemas de condutância e falha cardíaca (Day e Ranum, 2005), conduzindo ao aparecimento de hipertrofia do órgão em alguns casos (Igarashi *et al.*, 1998). Os níveis elevados de CUGBP2 também têm sido relatado nas distrofias musculares de Duchenne e Becker (Bakay *et al.*, 2002; Sironi *et al.*, 2002).

A proteína CUGBP2 pertence à família de proteínas homólogas denominadas proteínas CELF (CUGBP- ETR-3-like factors), caracterizadas por possuírem três domínios RRM (Região Reconhedora de RNA – *RNA Recognition Motif*), sendo dois deles na porção N- terminal e o terceiro domínio na porção C-terminal da proteína (Figura 05). A região entre as sequências RRM2 e RRM3 é chamada domínio divergente (Burd e Dreyfuss, 1994). Deleções nessa região compromete a função de *splicing* alternativo mas não afeta a capacidade de CUGBP2 se ligar ao RNA (Dujardin *et al.*, 2010).



Figura 05. Domínios RRM da proteína de CUGBP2. (Modificado de Dasgupta e Ladd, 2012). Região contendo domínios RRM (Região Reconhedora de RNA – *RNA Recognition Motif*) e domínio divergente na proteína CUGBP2, sendo dois deles na porção N- terminal e o terceiro domínio na porção C-terminal.

Várias regiões de CUGBP2 estão relacionadas ao controle de sua localização subcelular. Através dos 20 aminoácidos da região C-terminal e do último quadrante do domínio divergente é possível saber se a localização da proteína é nuclear ou citoplasmática. A CUGBP2 possui em seu C-terminal resíduos de arginina e lisina, típicos de sinais de localização nucleares convencionais, enquanto que o domínio divergente não os possui. Além disso, o domínio divergente contém uma região que confere localização citoplasmática através da exportação nuclear via exportina 1. Isso permite a esta proteína ser translocada do núcleo para o citoplasma (Ladd e Cooper, 2004).

A regulação do *splicing* alternativo é considerada a principal função da CUGBP2 no núcleo das células de mamíferos, juntamente com a edição do RNA (Anant *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2007). O mecanismo que envolve o *splicing* alternativo mediado pela CUGBP2 ainda não está bem entendido.

No citoplasma, esta proteína está associada a regulação da estabilidade e da tradução do RNA. CUGBP2, como mostrado na Figura 06, liga-se à sequência rica em

AU da região 3'UTR do RNAm de COX-2 e o estabiliza, ao mesmo tempo que impede a sua tradução (Mukhopadhyay *et al.*, 2003).

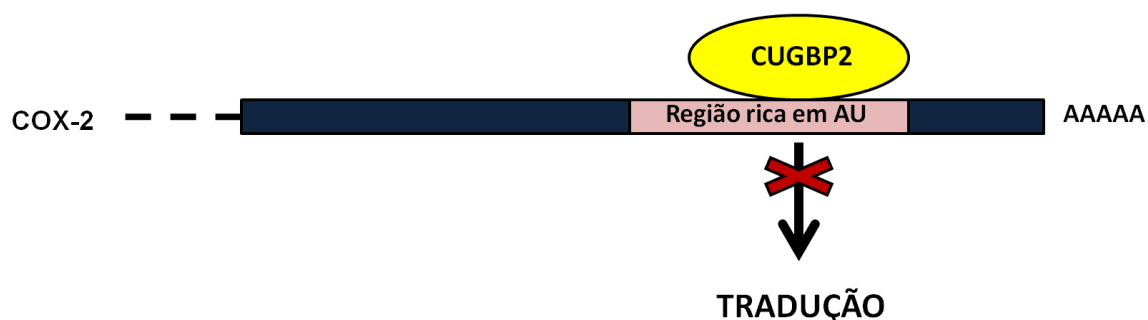


Figura 06. Regulação da expressão de COX-2 pela proteína CUGBP2. (Modificado de Dasgupta e Ladd, 2012). CUGBP2 liga-se a sequência rica em AU da região 3'UTR do RNAm de COX-2 e impede a sua tradução.

Estudos realizados com objetivo de avaliar a regulação da expressão de COX-2 no câncer de cólon e no epitélio intestinal submetido à radiação ionizante demonstraram que, também em células cancerosas, a CUGBP2 regula a expressão de COX-2 a nível pós-transcricional (Mukhopadhyay *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2008). Como abordado anteriormente, a proteína COX-2 é uma enzima importante na via de síntese das prostaglandinas, que fornecem efeito protetor contra a radiação ionizante. CUGBP2 apresenta alta afinidade pela região ARE de COX-2 e a radiação ionizante induz o aumento de sua expressão levando à estabilização e impedimento da tradução do RNAm de COX-2 pela inibição de sua acoplagem ao ribossomo (Zhang *et al.*, 2008). O silenciamento de CUGBP2 aumenta a expressão de COX-2 e a diminuição da apoptose induzida pela radiação (Mukhopadhyay *et al.*, 2003a; Mukhopadhyay *et al.*, 2003b).

Prostaglandinas inibem a expressão de CUGBP2 em células intestinais, indicando que a COX-2 pode regular CUGBP2 em uma retroalimentação negativa (Murmu *et al.*, 2004). Foi demonstrado que CUGBP2 compete com a proteína Hur para se ligar aos elementos ricos em AU na região 3'UTR de COX-2. Hur é uma proteína que quando se liga ao RNAm promove a sua tradução. Porém, este mecanismo de competição ainda não está bem compreendido (Sureban *et al.*, 2007).

Um dos mecanismos utilizados pela célula para controlar a atividade de CUGBP2 é através da sua fosforilação. Xu *et al.* (2007) trabalhando com cultura de célula de aorta torácica de ratos estimuladas com o fator de crescimento derivado de

plaquetas (PDGF), mostraram que ocorre uma estabilização do RNAm de COX-2 e esta estabilidade envolve a fosforilação da tirosina da CUGBP2 pela c-Src. Além disso, esta fosforilação parece aumentar a interação da CUGBP2 com o RNAm de COX-2. Os prováveis sítios de fosforilação da tirosina em CUGBP2 estão em Tyr-453, Tyr-410, Tyr-384, e Tyr-39.

Cunha-Neto *et al.* (2005) observaram que ocorrem alterações nos níveis do RNAm da proteína NAPOR3, também reconhecida pelo nome de CUGBP2, em células cardíacas infectadas pelo *T. cruzi*, porém não foi encontrado na literatura nenhum estudo desenvolvido com o objetivo de avaliar a expressão de CUGBP2 e seu provável papel na regulação do RNAm de COX-2 na doença de Chagas.

1.8.2 microRNA

Outro mecanismo utilizado para a regulação gênica pós-transcricional em diversos processos celulares envolve os microRNAs (miRNAs) que são pequenas moléculas de ácido ribonucleico (RNA) não codificadores de proteínas que possuem de 18 a 25 nucleotídeos (Fabian *et al.*, 2010). Eles podem estar localizados em éxons, íntrons ou regiões intergênicas (Li *et al.*, 2006). Os miRNAs regulam a expressão do gene influenciando tanto na tradução quanto na degradação do RNAm alvo (Fabian *et al.*, 2010). Em animais, ocorre predominantemente a repressão da tradução do RNAm alvo sem que haja alteração na estabilidade (Seggerson *et al.*, 2002). Eles reconhecem seu RNAm alvo por pareamento de bases entre os nucleotídeos 2 e 7 da extremidade 5' do miRNA (região *seed*) com os nucleotídeos complementares na região 3'UTR do alvo (Brennecke *et al.*, 2005; Grimson *et al.*, 2007).

Estima-se que cerca de 90% dos genes humanos sejam regulados por miRNA (Lewis *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2006). Curiosamente, um único miRNA pode regular muitos genes diferentes (Selbach *et al.*, 2008; Krek *et al.*, 2005) e diferentes miRNAs podem regular um mesmo RNAm (Kuhn *et al.*, 2008). Eles são transcritos como molécula precursora, o transcrito primário de miRNA (pri-mirna), que possui a estrutura em forma de grampo (*hairpin*) e é processado de forma gradual envolvendo endonucleases do tipo Rnase-III nucleares e citosólicas, para produzir a forma ativa do miRNA (Fabian *et al.*, 2010). No núcleo são desenvolvidas as funções do complexo

formado pela enzima Drosha para processamento de pri-mirnas em grampos de cerca de 70 nucleotídeos, denominado pré-miRNAs. Estes pré-mirnas são, então, transportados para o citoplasma pela exportina-5 onde eles são transformados pela endonuclease Dicer. Uma ou ambas as cadeias do duplex mirna geram miRNAs maduros que podem ser carregados para integrar o complexo RISC que atuará na repressão da tradução do RNAm (Figura 07) (Fabian *et al.*, 2010).

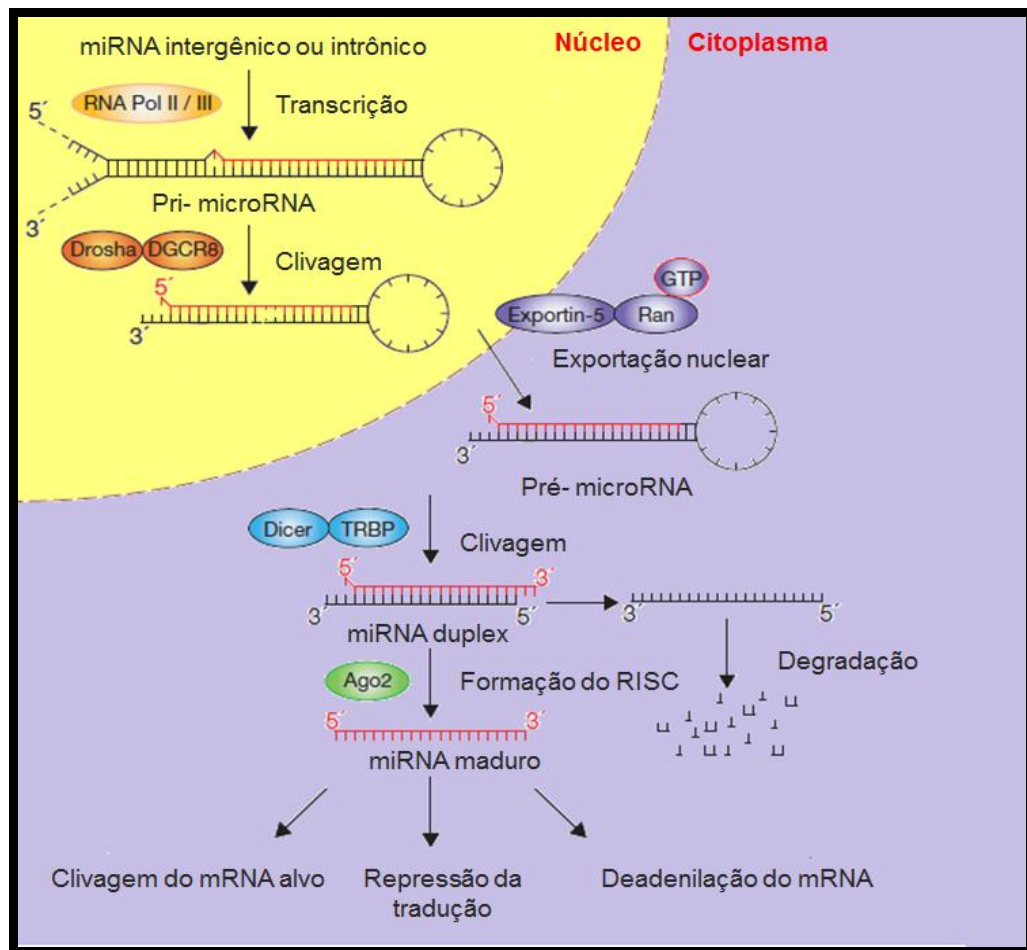


Figura 07. Biossíntese de miRNAs - adaptado de Winter *et al.* (2009). Esquema da síntese de miRNAs à partir da molécula precursora pri-mirna com a participação de RNAs nucleares e citosólicas.

A nomenclatura utilizada para denominar um miRNA é feita utilizando-se um prefixo com três ou quatro letras para indicar a espécie; por exemplo, mmu para designar a espécie *Mus musculus* e hsa para designar *Homo sapiens* acompanhadas de

números. As sequências maduras são denominadas miR, com “R” maiúsculo, os precursores são denominados mirna, com “r” minúsculo. Esta nomenclatura permite que se faça uma relação com suas funções, como por exemplo, o miRNA em humanos hsa-miR-101 são ortólogos do miRNA do camundongo mmu-miR-101. Sequências parálogas que possuem diferença em apenas uma ou duas posições recebem mesma designação mas uma letra como sufixo diferentes, exemplo, mmu-miR-10a e mmu-miR-10b. Os miRNAs que possuem precursores distintos mas que originam miRNAs maduros idênticos possuem números como sufixo, como por exemplo, na *Drosophila melanogaster* dme-miR-281-1 e dme-miR-281-2 (Griffiths-Jones *et al.*, 2006).

Alterações na expressão do miRNA está relacionado com o surgimento de uma grande variedade de doenças. Estas alterações são devidas a deleções gênicas, aumento no número de cópias, silenciamento epigenético, desregulação na maquinaria da biogênese do miRNA ou mutações envolvendo *loci* de miRNA (Croce, 2009).

Vários estudos demonstraram que os níveis da proteína COX-2 podem ser regulados por miRNAs; a maioria destes estudos foram realizados em células cancerosas (Chakrabarty *et al.*, 2007; Daikoku *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Os miRNAs 26a e 26b foram identificado como dois dos miRNAs relacionados com a regulação da expressão da COX-2, desta forma, a diminuição dos níveis destes miRNAs está relacionado com o aumento dos níveis de COX-2 (Ji *et al.*, 2009).

Um dos produtos da enzima COX-2, a PGE2, tem seus níveis associados à progressão da doença de Chagas. Não há na literatura estudos que investigam se a invasão pelo *T. cruzi* e seu ciclo nas células do hospedeiro vertebrado envolve o controle da expressão de COX-2 por miRNA, porém, averiguar se há o envolvimento destas molécula no estabelecimento da doença é importante para o maior esclarecimento da doença de Chagas, principalmente no início da interação célula/parasito, momento da infecção que é pouco estudado.

1.9 Justificativa

A proteína COX-2 é a enzima chave na produção da prostaglandina E2, importante eicosanoide envolvido com a progressão da doença de Chagas. A regulação da expressão desta proteína pode se dar a nível transcricional, envolvendo a participação de fatores de transcrição, ou pós-transcricional, envolvendo miRNAs e proteínas que se ligam a RNAm, como a CUGBP2.

O *T. cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas, possui várias cepas que apresentam variações quanto a morfologia, infectividade, patogenicidade e virulência. Isto faz com que seja necessário o desenvolvimento de pesquisas com as diferentes cepas para melhor conhecimento sobre a doença. Poucos estudos foram realizados com a cepa Berenice-62, desta forma, pouco se conhece sobre seu comportamento biológico e a resposta da célula frente a sua infecção.

Sendo assim, o presente estudo se justifica porque contribui para uma melhor compreensão sobre a doença de Chagas à partir do conhecimento da expressão e regulação da COX-2 na fase inicial da infecção pelo *T. cruzi*, cepa Berenice-62, período essencial para o desenvolvimento da doença.

2 – OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a regulação e o perfil de expressão de COX-2 na fase inicial da infecção de células H9c2 pelo *T. cruzi*, cepa Berenice-62.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a infectividade da cepa Berenice-62 do *T. cruzi* em células H9c2 nas condições estudadas;
- Analisar se a infecção pelo *T. cruzi* induz a morte celular;
- Analisar o perfil da expressão do RNAm e da proteína COX-2;
- Verificar os níveis de prostaglandina E2 produzidos pelas células infectadas com *T. cruzi*;
- Verificar a imunolocalização da proteína COX-2 durante os períodos de interação célula-parasito;
- Verificar se os fatores de transcrição NF-kB, AP1 e Myc podem estar envolvidos na modulação da expressão de COX-2 durante a infecção pelo *T. cruzi*;
- Analisar o perfil da expressão de CUGBP2 e verificar se há uma possível regulação da expressão da COX-2 por esta proteína durante a infecção pelo *T. cruzi*.
- Verificar se miRNAs podem estar envolvidos na regulação da expressão da COX-2 e da CUGBP2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Técnicas usuais de biologia molecular utilizadas foram realizadas de acordo com as metodologias descritas e/ou adaptadas de Sambrook *et al.* 2001.

3.1 Cultura de células

Células da linhagem H9c2 (*American Type Culture Collection*, ATCC: CRL-1446) provenientes de células cardíacas de ratos neonatos e da linhagem VERO (*American Type Culture Collection*, ATCC: CRL-1587) proveniente do rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) foram crescidas em garrafas estéreis de 175 cm² com meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (10% para H9c2 e 5% para VERO) e 100 unidades (U)/ mL de Penicilina. As culturas foram mantidas em estufa em atmosfera contendo 5% de CO₂, com umidade controlada de 95% e temperatura constante de 37°C.

3.2 Infecção de célula H9c2 com *T. cruzi*

As formas tripomastigota da cepa Be-62 do *T. cruzi* foram obtidas através da retirada de 500 µL de sangue (~ 10⁷ parasitos), com auxílio de pipeta Pasteur estéril e anticoagulante heparina, no dia do pico de parasitema de camundongos infectados mantidos pelo Laboratório de Doença de Chagas da Universidade Federal de Ouro Preto. O sangue foi vertido em garrafa contendo aproximadamente 60% de confluência de célula VERO, que foi mantida em estufa a 37°C e 5% CO₂ para permitir a infecção. Após 48 horas, o sangue, juntamente com os parasitos que não infectaram as células, foi retirado da garrafa através da lavagem com tampão fosfato salino 1X (PBS: 2,7 mM de KCl, 1,5 mM de KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 8 mM de Na₂HPO₄, pH 7,4). À garrafa foi adicionado meio fresco e a mesma foi mantida a 33°C e 5% CO₂ para que houvesse a diferenciação da forma amastigota intracelular para forma tripomastigota. Após serem liberadas para o meio extracelular, as tripomastigotas foram coletadas. Para isso, foi realizada primeiro uma centrifugação de 600 rpm por 3 minutos à temperatura ambiente

para precipitar as eventuais células VERO que estivessem presentes e, logo após, uma centrifugação de 1300 rpm por 15 minutos à 4°C para coleta dos parasitos.

Para infecção das células H9c2, 1×10^7 dos parasitos coletados foram incubados juntamente com 1×10^6 de célula por 2 horas a 37°C e 5% CO₂. Após este período, os tripomastigotas que não penetraram nas células foram removidos através de lavagens com PBS. Novo meio de cultura foi adicionado à garrafa de células e elas foram incubadas novamente a 37°C e 5% CO₂ por diferentes intervalos respeitando-se os tempos de interação (tempo de contato do parasito após a invasão da célula H9c2) que foram de 0 hora (ou seja, logo após a invasão), 2, 6, 12, 24 e 48 horas. Os extratos destas células infectadas e de células não infectadas (controle) foram utilizadas posteriormente para análise da expressão de RNAs, miRNAs e proteínas.

A utilização de animais para estes experimentos foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de animal da Universidade Federal de Ouro Preto sob o Protocolo nº 2011/76 “Manutenção de cepas do *T. Cruzi in vivo*” válido até 10/2015.

Para confirmar a infecção das células H9c2 com a cepa Be-62 foi utilizada a solução de Giemsa para corar as células infectadas. O Giemsa cora os grupos fosfato do DNA (ácido desoxirribonucleico) nas regiões onde se encontram grandes quantidades de ligações adenina-timina. Desta forma, após a coloração, é possível visualizar os núcleos das células e dos parasitos que as infectaram. Para isso, $3,0 \times 10^4$ células H9c2 foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas. Após atingirem 80% de confluência, as células foram infectadas com *Trypanosoma cruzi*, como descrito acima, respeitando a relação 1:10 (célula/parasito) e, após atingirem os tempos de interação de 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas, foram lavadas 2 vezes com PBS 1 X e imersas em metanol por 7 minutos para fixação. Logo após, as lamínulas foram imersas em solução de Giemsa diluída em água na proporção 1:40 por 25 minutos, foram lavadas em água e secas a temperatura ambiente. Em seguida, montaram-se as lâminas utilizando Entellan®. Foram feitas fotomicrografias do material em microscópio modelo Leica DMLB com sistema fotográfico Leica MPS-30. As células e os parasitos que as infectaram foram contados em todas as lâminas obtidas para avaliar a infectividade da cepa Be-62 em células H9c2 nas condições estudadas.

3.3 Ensaio de citotoxicidade

Para avaliar a viabilidade das células H9c2 infectadas com a cepa Be-62 do *T. cruzi* nas condições estudadas foi realizado o ensaio de citotoxicidade celular conhecido como MTT. Este método avalia a atividade metabólica das células através da quantificação da redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH resultando na produção de cristais de formazan no interior das células. Estes cristais podem ser dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo, o DMSO (dimetil sulfóxido), permitindo a sua quantificação através de espectrofotometria (Mossman, 1983).

Desta forma, $1,5 \times 10^4$ células foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% CO₂. Quando as células atingiram aproximadamente 80% de confluência, elas foram infectadas com a cepa Be-62 respeitando a relação 1:10 (célula/parasito) e seguindo a metodologia de infecção descritas acima. Os tempos de interação utilizados neste teste foram de 0, 24 e 48 horas. Células não infectadas foram utilizadas como controle. Posteriormente, foi adicionado 0.5 mg/mL do reagente MTT e incubadas por 2 horas a 37°C e 5% CO₂. Logo após, foi adicionado DMSO e, após 30 minutos, foi feita a leitura a 540 nm em um leitor de ELISA.

3.4 Dosagem de Prostaglandina E2

O sobrenadante das células H9c2 cultivadas em garrafas de 175 cm² e infectadas com a cepa Be-62 foi recolhido para mensuração da PGE₂. Foram analisados os níveis de PGE₂ produzidos nos diferentes tempos de interação célula/parasito (0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas) como descrito anteriormente e comparados com os níveis de PGE₂ do sobrenadante de células não infectada (controle). As dosagens foram realizadas utilizando o produto *Prostaglandin E2 EIA- Monoclonal*® comercializado pela Cayman, Chemical, USA. O ensaio se baseia no método de ELISA competitivo entre PGE₂ e PGE₂-Acetilcolinesterase conjugado. A quantificação foi feita em leitor de ELISA utilizando-se comprimento de onda de 412 nm. Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

3.5 Análise da expressão de RNAm

3.5.1 Extração do RNA total e síntese do cDNA

Após a infecção de células H9c2 com a cepa Be-62 e decorridos os tempos de interação de 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas, utilizando-se metodologia descrita anteriormente, 1×10^6 células foram retiradas da garrafa de cultivo utilizando-se tripsina-PBS/EDTA e, com os extratos destas células infectadas e de células não infectadas, foi extraído o RNA total. A extração foi feita utilizando-se *TRIZOL*[®] Reagent (*Invitrogen*). Após a adição do *TRIZOL*[®], os extratos foram ressuspensos com auxílio de pipeta e centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. A seguir, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Sigma – St. Louis, Mo, USA) para cada 1 mL de *TRIZOL*[®] utilizado; a mistura foi homogeneizada vigorosamente utilizando-se vórtex e incubada à temperatura ambiente por 3 minutos. Foi realizada nova centrifugação de 12.000 g por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde se adicionou 0.5 mL de álcool isopropílico para cada 1 mL de *TRIZOL*[®] utilizado. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, centrifugou-se novamente a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi lavado com etanol 70% preparado com água livre de RNase e centrifugado a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. Removeu-se o sobrenadante e o precipitado obtido foi seco à temperatura ambiente por 5 minutos. Os RNAs obtidos foram quantificados utilizando espectrofotômetro a 260 nm e o grau de pureza das amostras foi estimado pela razão entre as absorvâncias medidas a 260, 280 e 230 nm de acordo com Sambrook (2001).

A reação de transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) com 1 µg do RNA total extraído, 10 µM de oligonucleotídeos randômicos (10x RT *Random primer*), 8 mM de dNTPs [25x dNTP *Mix*], 1,25 U de transcriptase reversa (*Multi Script*[™] *Reverse Transcriptase*) seguindo as especificações do fabricante.

3.5.2 Reações de PCR semi-quantitativa

Após a extração do RNA total e a obtenção do cDNA, como descrito no item 3.5.1, foi realizada a PCR semi-quantitativa para verificar o perfil de expressão do transcrito dos genes envolvidos na apoptose *bax*, *caspase 3*, *caspase 9* e *bcl2* em células H9c2 infectadas com a cepa Be-62. Para isso, foram desenhados oligonucleotídeos com sequências específicas que podem ser encontradas na Tabela 01. As reações de polimerização em cadeia foram realizadas com volume final de 25 µl, utilizando 3 µl de cDNA na sua concentração real, 10 µM de cada oligonucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, solução tampão para PCR (1X), 250 µM de dNTP e 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase. A amplificação foi realizada em termociclador nas seguintes condições: 95°C por 3 minutos, 95°C por 1 minuto seguido de T_m (temperatura de desnaturação) específica para cada oligonucleotídeo (Tabela 01) por 1 minuto, seguido de 72°C por 45 segundos durante 36 ciclos e a 72°C por 10 minutos. A visualização dos produtos amplificados foi feita em gel de agarose 0,8%.

Tabela 01. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na PCR semi-quantitativa e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Gene alvo	Sequência	T _m
<i>bcl2</i>	F: 5'TTTGAGTTCGGTGGGGTCAT	54°C
	R: 5'TGACTTCACTTGTGGCCCAG	
<i>bax</i>	F: 5'TGGCAGCTGACATGTTTTCTGAC	56°C
	R: 5' GTCCCAACCACCCTGGTCTTGG	
<i>caspase 3</i>	F: 5' GCACACATTATAGCTACTGG	54°C
	R: 5' GTTAAACTCCGACGACGTATTA	
<i>caspase 9</i>	F: 5' CGTGGTGGTCATTCTCTCTCA	54°C
	R: 5' CTTGACACTGCGTCCAGCTG	
<i>β-actina</i>	F: 5'GATCATGTTTGAGACCTTCAACAC	54°C
	R: 5'CGTCACACTTCATGATGGAGTTGA	

3.5.3 Reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Após a extração do RNA total e a obtenção do cDNA, como descrito no item 3.5.1, foi realizada a PCR quantitativa em tempo real para verificar o perfil de expressão dos transcritos COX-2, CUGBP2, Myc, c-Jun, c-Fos e NF-kB em 1×10^6 células H9c2 infectadas com a cepa Be-62. Os oligonucleotídeos (Tabela 02) foram desenhados utilizando o programa GeneRunner (Version 3.05), à partir das sequências dos RNAm de *Rattus Norvegicus* disponíveis no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

Tabela 02. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para análise da expressão relativa dos genes em células H9c2 infectadas com a cepa Berenice-62.

Gene	Oligonucleotídeos
<i>COX-2</i>	F:5' CAGCCCACCAACTTACAATG R:5' CATCAGCCACAGGAGGAAG
<i>CUGBP2</i>	F:5'AACAGGGAAGGCAGAGGAG R:5'GGGCATTAGTGGAAGAAACG
<i>nf-kb</i>	F:5' TGCGACAGATGGGCTACAC R:5' TGTGGAGGAGGACGAGAGAG
<i>c-Myc</i>	F:5'AAAGCCACCGCCTACATC R:5'CGCCGTTTCCTCAGTAAG
<i>c-Fos</i>	F:5' TCCGTCTCTAGTGCCAAC R:5' ACGGAGGAGACCAGAGTG
<i>c-Jun</i>	F:5' CATCGCTGCCTCCAAGTG R:5' TGCCACCTGTTCCCTGAG
<i>β-actina</i>	F:5' TGGTGGGTATGGGTCAGAAG R:5' CAATGCCGTGTTCAATGG

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o produto SYBR® *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) em placas de 96 poços (MicroAmp® *Optical 96 Well Reacion Plate* – Applied Biosystems) e seladas com o adesivo óptico (MicroAmp™ *Optical Adhesive Film* – Applied Biosystems) ao final do procedimento. Em uma reação de volume final de 10 μ L em cada poço, foram utilizados 0,75 μ M de oligonucleotídeos, 2 μ L de cDNA diluído 10 vezes e 5 μ L de

SYBR® *Green PCR Master Mix*. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica para todos os genes avaliados. A β -actina, utilizada como controle endógeno, estava presente em todas as placas analisadas. Levando-se em consideração que o mesmo gene foi comparado em diferentes grupos, foram ajustados os valores da *baseline* em 3-15 ciclos e do *threshold* em 0,2 para todas as amostras. O método escolhido para análise foi o de quantificação relativa da expressão gênica (ΔC_T), pois, ele permite que se quantifique diferenças no nível de expressão de um alvo específico entre diferentes amostras. As reações de qRT-PCR foram realizadas conforme programação contida no aparelho ABI 7500 *Applied Biosystems*.

3.6 Microscopia de Fluorescência

A análise de microscopia de fluorescência foi realizada utilizando-se $3,0 \times 10^4$ células H9c2 cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas. Após atingirem 80% de confluência, as células foram infectadas com *Trypanosoma cruzi*, como descrito anteriormente, utilizando a relação 1:10 (célula/parasito) e, após os intervalos de interação as células foram fixadas utilizando-se solução de paraformaldeído a 3,8% em PBS 0,5 X contendo 0,2% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) por 7 minutos a 37°C e, em seguida, foram lavadas com PBS 0,5 X. As células fixadas nas lamínulas foram incubadas com solução de albumina bovina 1% por 2 horas para impedir marcações inespecíficas. Essas células foram utilizadas para marcação fluorescente do núcleo, RNAm de COX-2 e proteínas COX-2 e CUGBP2 como descrito a seguir.

Para a marcação do RNAm de COX-2, as células foram incubadas com solução de SSC 2X (1 X SSC = 0,15 M de NaCl e 0,015 M de citrato de sódio, pH 7,0), contendo 40 % de formamida, por 10 minutos à temperatura ambiente. Logo após, as células foram hibridadas com sonda de RNA COX-2 conjugado na posição 5' com Alexa-Flúor 647 (5'-Alexa 647- TTGGTGGGCTGCATTGTAAG) (Invitrogen, SP, Brasil) na concentração de 1ng/ μ l juntamente com solução contendo formamida a 40%, 2 X SSC e 0,2% de BSA por 2 horas a 37°C. Após este período, as células foram lavadas com 40% de formamida e 1 x SSC por 30 minutos a 37°C e, em seguida, lavadas com 1 X SSC por 1 hora à temperatura ambiente.

Para averiguar se a proteína CUGBP2 estava co-localizada com o RNAm de COX-2, foi realizada a sua marcação utilizando-se anticorpo primário anti-CUGBP2 diluído 100 x por aproximadamente 12 horas a 4°C. Em seguida, após lavagem com PBS, foram adicionados anticorpo secundário IgG de cabra anti-coelho (Invitrogen, Camarillo, CA, EUA) e anticorpo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluído 50 vezes e incubado durante 60 minutos à temperatura ambiente. Logo após, as células foram lavadas com PBS 0,5 X.

A marcação da proteína COX-2 foi realizada para avaliar a sua localização durante o período de interação entre o *T. cruzi* e a célula H9c2. A metodologia utilizada foi a mesma descrita acima para a marcação da CUGBP2, porém, foi utilizado anticorpo primário anti-COX-2.

A marcação do núcleo foi realizada por último, após a marcação do RNAm e da proteína. Para isso, foi adicionado à célula fixada na lamínula o corante DAPI (4,6 diamino-2-fenilindol) na concentração 3,33 ng/mL diluído em PBS, logo após, as células ficaram sob agitação por 5 minutos. Após este período, foram lavadas com PBS 0,5 X por 3 vezes de 8 minutos sob agitação constante. As lamínulas foram retiradas da placa e montadas sobre lâminas contendo 200 mM de N-propil-galato (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) preparado em glicerol a 90% e foram vedadas com esmalte. Foram feitas fotomicrografias do material em microscópio de epifluorescência modelo Leica DMLB com sistema fotográfico Leica MPS-30.

3.7 Análise da expressão proteica

Foram realizadas análises das expressões das proteínas COX-2, CUGBP2, NF- κ B e β -actina em células H9c2 infectadas com a cepa Be-62 nos tempos de interação de 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas como descrito anteriormente. Para isso, 1×10^6 células infectadas foram coletadas, homogeneizadas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7.9, glicerol 10 %, 100 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,5% NP-40/Igepal, 0.5% Triton X-100, 05 mM ditioneitol (DTT)) contendo inibidores de proteases (40 μ M leupeptina e 0,5 mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) - Sigma) e deixadas a 4°C por 20 minutos. O material foi centrifugado sob refrigeração a 2000 rpm por 3 minutos, logo

após, o sobrenadante foi aliquotado em microtubo e sonicado por 5 vezes de 25 segundos. As proteínas foram quantificadas seguindo-se o protocolo descrito por Bradford (1976) e utilizando diluições de albumina sérica bovina (BSA) a 20 µg/mL para construção da curva padrão.

Após a quantificação, 200 mM de DTT e 4 % de SDS foram adicionados a 60 µg de proteína que foram posteriormente desnaturadas a 95°C por 5 minutos e separadas em gel de poliacrilamida 10%. As bandas obtidas após a eletroforese puderam ser observadas após serem coradas utilizando-se solução azul de *Coomassie*.

A transferência das proteínas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) foi realizada após os géis serem imersos em solução de transferência (25 mM Tris-HCl, 0,192 M de glicina, 10% metanol) por 5 minutos. A transferência foi realizada por 2 horas e 30 minutos sob corrente elétrica de 250 mA utilizando-se aparelho de transferência do tipo *Semi-Dry*. Logo após a transferência, as membranas foram bloqueadas utilizando-se 5% de leite em pó desnatado diluídos em TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.6) por 3 horas e, a seguir, lavadas com TBS durante 5 minutos.

As membranas foram, então, incubadas por 4 horas a 4°C sob agitação com os anticorpos primários policlonais de coelho de COX-2 (Cayman), CUGBP2 (Santa Cruz Biotechnology), NF-kB (Santa Cruz Biotechnology) e β-actina (Santa Cruz Biotechnology) diluídos em TBS nas concentrações de 1:250 cada. Os anticorpos primários que não se ligaram foram retirados através de lavagens da membrana com TBS por 3 vezes de 6 minutos. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário policlonal anti IgG de coelho conjugado a peroxidase (Cayman) diluído em TBS na concentração de 1:5.000 e mantidos durante 4 horas sob agitação a temperatura ambiente. Procedeu-se novamente à lavagem da membrana a fim de retirar os anticorpos secundários que não se ligaram e, em seguida, as membrana foi revelada utilizando-se o produto *Western Blotting Luminol Reagent, Kit* (GE) de acordo com as especificações do fornecedor.

A quantificação da expressão proteica foi realizada utilizando-se o programa Quantity One® (Biorad), no qual a densidade ótica de cada banda foi avaliada.

3.8 Análise da expressão de miRNA

Foram realizadas análises das expressões de miRNAs relacionados com a modulação da expressão das proteínas COX-2, CUGBP2 e PLA2 em células H9c2 infectadas com a cepa Be-62 nos tempos de interação de 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas como descrito anteriormente. Para isso, 1×10^6 células infectadas foram coletadas e os miRNAs foram extraídos com o auxílio do produto *miRNAse mini kit* (Qiagen®) seguindo as recomendações do fabricante.

Foi realizada a transcrição reversa com os reagentes do produto *MiScript II RT Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fornecedor.

Os níveis de expressão dos miRNAs foram obtidos através da quantificação por PCR em tempo real utilizando-se o *miScript SYBR® Green PCR Kit* (Qiagen®) com os oligonucleotídeos de interesse (Tabela 04) desenhados à partir da sequência dos miRNAs maduros disponíveis em banco de dados do *miRBase* (www.miRBase.org).

As análises dos resultados foram realizadas utilizando-se o método do ΔCt , para cálculo da expressão gênica relativa dos miRNAs, utilizando-se como gene normalizador o U6 e seguindo as recomendações do fabricante do aparelho de qPCR 7500 (*Applied Biosystems - Life Technologies*).

Tabela 03. Sequências dos miRNAs e alvos utilizados para análise da expressão relativa em células H9c2 infectadas com a cepa Berenice-62.

miRNA	Sequência	Alvo*
Rno-miR-26a	5'TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	COX-2, CUGBP2
Rno-miR-26b	5'TTCAAGTAATTCAGGATAGGT	COX-2, CUGBP2
Rno-miR-340-3p	5'TCCGTCTCAGTTACTTTATAGCC	CUGBP2
Rno-miR-1	5'TGGAATGTAAAGAAGTGTGTAT	PLA2
Rno-miR-451	5'AAACCGTTACCATTACTGAGTT	PLA2
Rno-miR-U6	5'TGGCCCCTGCGCAGGATG	Normalizador

*Referência: Banco de dados *TargetScan*. Disponível em <http://www.targetscan.org>

3.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste estatístico *One Way* ANOVA seguido de teste de Dunnett. Valores que apresentavam $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantivos. As análises foram realizadas com o auxílio do programa Prisma (Graph Pad Prism® 5).

4. RESULTADOS

Os resultados apresentados abaixo foram obtidos a partir da infecção de células H9c2 com a cepa Be-62 do *T. cruzi*. O tempo de infecção utilizado neste estudo foi de 2 horas. Para avaliar as alterações celulares ocorridas durante os momentos iniciais de interação entre a linhagem H9c2 e o *T. cruzi* foram utilizados os tempos de 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas, como detalhado anteriormente. Denominamos tempo de interação os momentos posteriores à invasão do parasito, quando o *T. cruzi* está internalizado na célula. Os resultados obtidos foram comparados com o controle, ou seja, células não infectadas.

4.1 Resultados preliminares

4.1.1 Extração dos RNAs e Transcrição reversa

Para avaliar a qualidade dos RNAs extraídos e a efetividade da transcrição reversa, foi realizada amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene normalizador β -actina. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente *TRIZOL*® seguindo-se as recomendações do fabricante. Foram utilizadas células H9c2 infectadas com a cepa Be-62 com períodos de interação entre a célula e o parasito, como já descrito anteriormente. Também foi utilizada célula controle não infectada. Foi realizada a síntese do cDNA por transcrição reversa e este utilizado para realização da PCR do normalizador β -actina. Após a análise das bandas (Figura 08) verificou-se que a extração garantiu RNA de qualidade e a transcrição reversa foi realizada de forma eficaz.

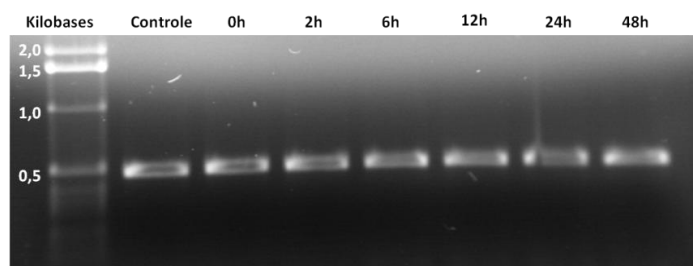


Figura 08. Expressão de β -actina, em gel de agarose 0,8%, obtida pela extração de RNA total de células H9c2. Foram utilizadas células H9c2 infectadas com a cepa Be-62 com tempo de interação entre a célula e o parasito de 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas e células não infectadas (controle).

4.1.2 Análise da eficiência dos oligonucleotídeos e da amplificação dos genes

Para avaliar a eficiência da amplificação dos genes analisados e do controle endógeno foram construídas curvas padrão para cada amplificação de uma mesma amostra utilizando-se gráfico de regressão linear semi log onde o eixo x representa os valores de C_T e o eixo y representa o log do valor inicial do ácido nucleico. Foi utilizado o cDNA do controle em seis diluições seriadas de 10 vezes, como mostrado na Figura 09. Para estimar a eficiência de amplificação foi utilizada a inclinação da curva padrão. Uma reação 100% eficiente produzirá um aumento de dez vezes na quantidade de produto amplificado a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação ($\log_2 10 = 3,3219$). O cálculo da estimativa da eficiência (E) foi realizado utilizando-se a fórmula: $E = (10^{-1/\text{inclinação}} - 1) \times 100$. Os oligonucleotídeos foram considerados eficientes para ser utilizado pelo sistema *SYBR® Green* quando apresentaram eficiência de reação acima de 80% e abaixo de 120%. Os valores de *baseline* foram ajustados para 3,15 ciclos e o *threshold* fixado em 0,2 para todas as amostras (Figura 10).

Foi realizada as análises da curva de dissociação das amplificações para identificar a formação de produtos inespecíficos no final de cada corrida (Tabela 03).

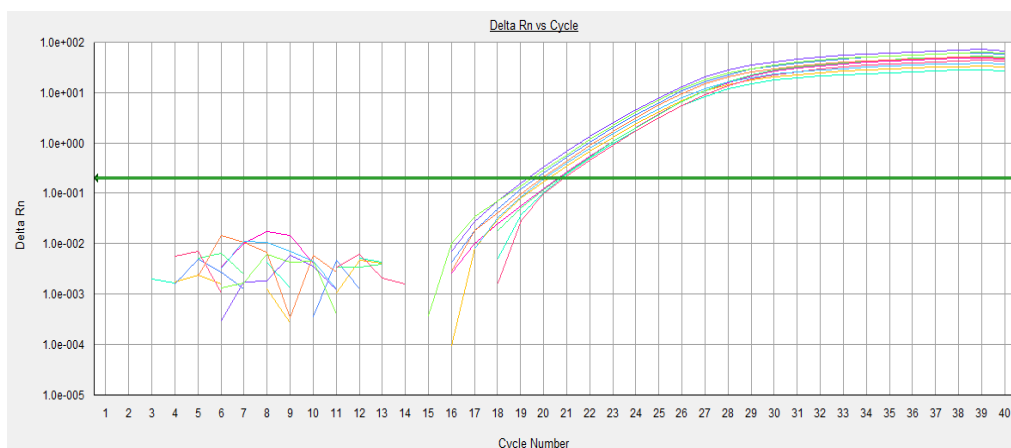


Figura 09. Plot de amplificação referente à curva de eficiência do gene β -actina. No eixo x está representado os valores dos ciclos de PCR e no eixo y os valores de ΔRn . Foi utilizado cDNA controle e seis diluição seriada de 10 vezes.

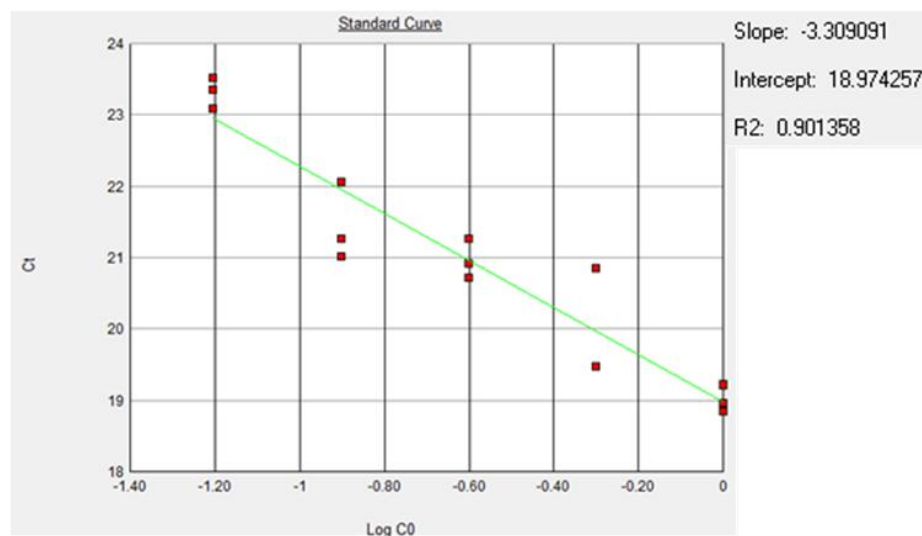


Figura 10. Curva padrão do gene β -actina. O eixo x representa os valores de log da concentração de cDNA e o eixo y os valores de CT correspondente a cada diluição. Os valores da inclinação e do coeficiente de linearidade podem ser visualizados a direita do gráfico. Foi utilizado cDNA do controle.

Tabela 04. Inclinação, Eficiência e R^2 obtidos através de curva de eficiência dos iniciadores.

Oligonucleotídeo	Inclinação	Eficiência	R^2
<i>COX-2</i>	-3,325647	99,84	0,996758
<i>CUGBP2</i>	-3,340578	99,22	0,981869
<i>Nf-kb</i>	-3,563979	90,80	0,979865
<i>c-Fos</i>	-3,369452	98,05	0,919624
<i>c-Jun</i>	-3,616497	89,02	0,996179
<i>c-Myc</i>	-3,485521	93,59	0,987655
<i>β-actina</i>	-3,309091	100,53	0,901338

Através destas análises, verificou-se que a amplificação e os oligonucleotídeos utilizados são eficientes para realização das análises.

4.2 Infecção das células H9c2 pela cepa Be-62

Para verificar se nas condições estudadas houve infecção de células H9c2 pela cepa Be-62, as células cardíacas foram cultivadas em lamínulas e infectadas com o parasito por 2 horas. Após os intervalos de interação, as lamínulas foram coradas com Giemsa e a infecção verificada pela visualização do núcleo das células cardíacas e dos parasitos que as infectaram (Figura 11). Todas as células presentes nas lamínulas foram contadas e constatou-se que houve um índice de 30% de infecção.

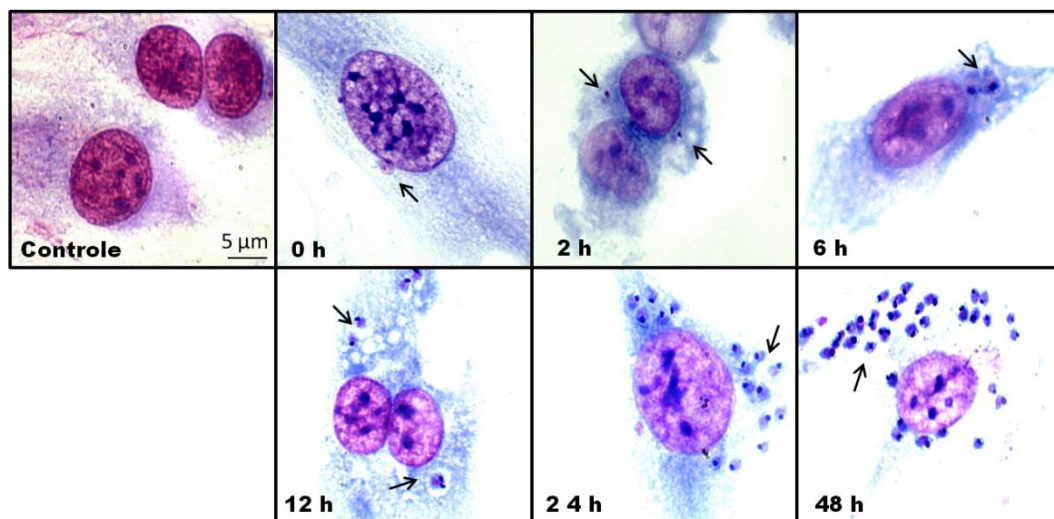


Figura 11. Células H9c2 infectadas com a cepa Berenice-62 do *T. cruzi*. Células H9c2 foram infectadas com a cepa Be-62 e coradas com Giemsa após os tempos de interação de 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas. As setas indicam o núcleo do parasito no interior da célula.

4.3 Ensaio da viabilidade de células H9c2 infectadas com a cepa Be-62

Com o objetivo de avaliar se a infecção pela cepa Be-62 induz a morte das células H9c2 nas condições estudadas, foi realizado o teste de viabilidade celular conhecido como MTT. Foram analisados os tempos de 0, 24 e 48 horas de interação entre as células H9c2 e o parasito e observou-se que nos tempos de 0 e 24 horas não ocorreu variação da viabilidade celular em relação ao controle (célula não infectada), porém, no tempo de 48 horas de interação, observou-se que o parasito reduziu a viabilidade celular em cerca de 50% (Figura 12).

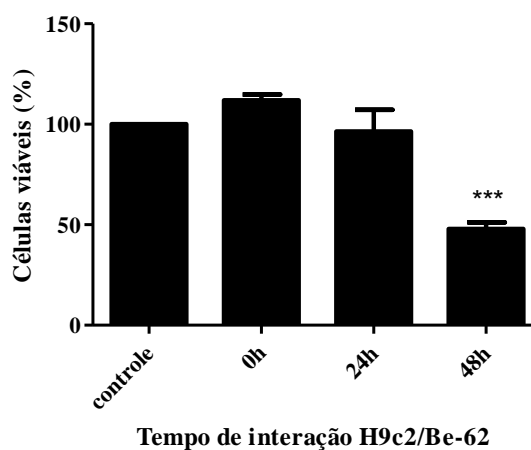


Figura 12. Viabilidade de células H9c2 infectada com *T. cruzi*. Células H9c2 infectadas com Be-62 com tempos de interação de 0, 24 e 48 horas submetidas ao teste de MTT. Foi aplicado teste estatístico *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. *** $p < 0.001$.

4.4 Níveis de expressão dos RNAs de Bcl-2, BAX e caspases 3 e 9 de células H9c2 infectadas com Be-62

A expressão dos genes relacionados à apoptose celular *bcl-2*, *bax*, *caspase 3* e *caspase 9* em células H9c2 infectadas com a cepa Be-62 foi avaliada por PCR semi-quantitativa, técnica que permite analisar os níveis relativos de expressão do RNAm destes genes.

Observando-se a Figura 13, percebe-se que ocorreu alteração apenas nos níveis de RNAm de Bcl-2 (Figura 13A). Houve aumento da expressão do RNAm deste gene nos tempos 12 e 24 horas de interação. Logo após, no intervalo de 48h de interação, observa-se uma diminuição nos níveis transcricionais de Bcl2 de aproximadamente 50%, quando comparado ao controle experimental.

Em relação à expressão do RNAm das caspases 3 e 9 (Figura 13B e C, respectivamente) e de BAX (Figura 13D), não foi observada alteração nos níveis de expressão quando comparados ao controle.

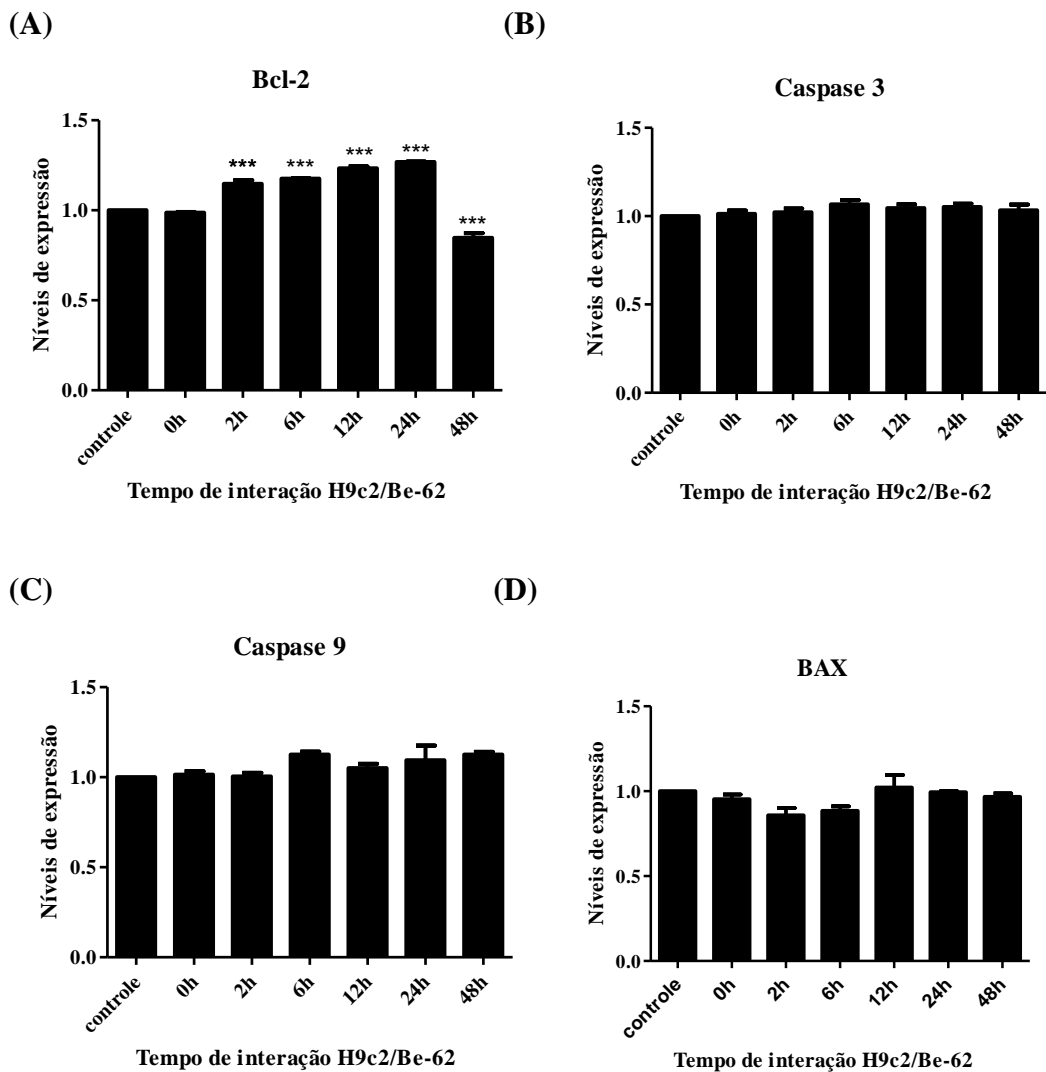


Figura 13. Níveis de expressão do RNAm de genes envolvidos na apoptose. Expressão dos RNAm de Bcl-2 (A) Caspase 3 (B) Caspase 9 (C) e BAX (D) em células H9c2 infectadas com a cepa Be-62 do *T. cruzi*. Foi aplicado teste estatístico *One-Way ANOVA* com pós-teste de Dunnett. *** $p < 0.001$.

4.5 Níveis de expressão do RNAm e da proteína COX-2

A expressão de COX-2 em células H9c2 infectadas com a cepa Be-62 do *T. cruzi* com tempos de interação entre eles de 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas foi avaliada através dos níveis de expressão do RNAm da COX-2 obtidos por PCR em tempo real e pelos níveis proteicos que foi determinada utilizando-se o método *Western blot*.

Observa-se que, em relação aos níveis de RNAm, houve aumento da expressão nos tempos de interação de 0, 6 e 24 horas quando comparados ao nível apresentado pelas células controle (Figura 14A).

Em relação à expressão proteica, observa-se aumento significativo de expressão nos tempos iniciais de interação 0, 2 e 6 horas (Figura 14B).

Pode-se notar que no tempo de 24 horas de interação, houve aumento do transcrito de COX-2, porém, não há alteração nos níveis proteicos.

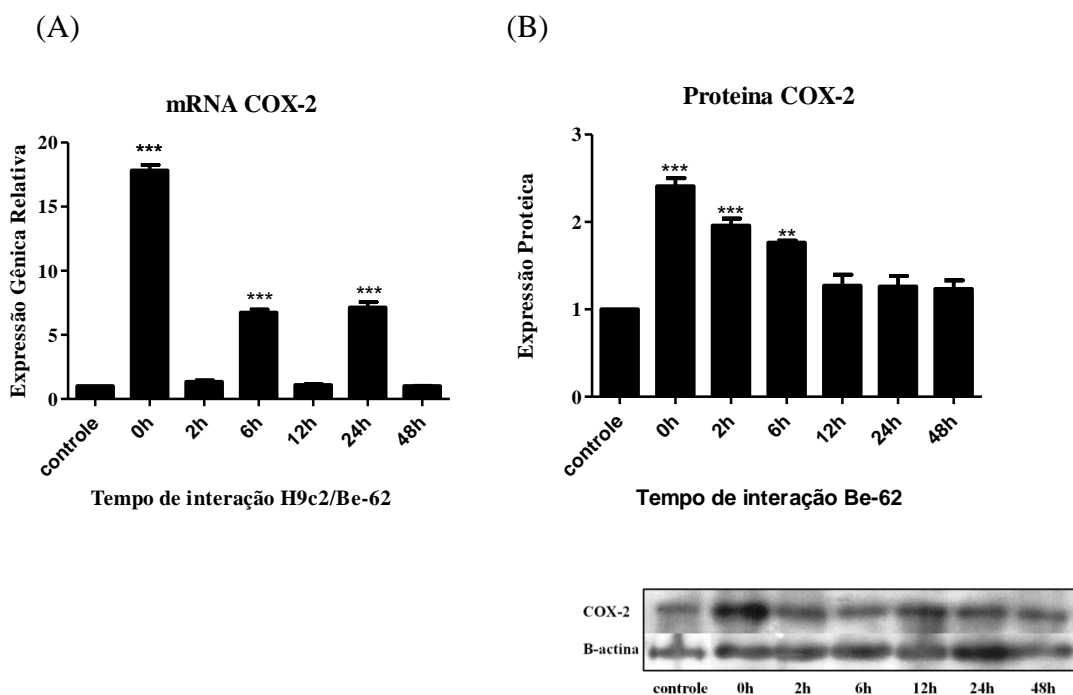


Figura 14. Níveis de expressão de COX-2. Expressão do RNAm (A) obtido pelo método de PCR em tempo real e da proteína (B) obtido pelo método de *Western blot* de COX-2 em células H9c2 infectadas com a cepa Be-62 do *T. cruzi*. Ambos os métodos tiveram a β -actina como gene normalizador. Foi aplicado teste estatístico *One-Way ANOVA* com pós-teste de Dunnett. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

4.6 Dosagem de PGE2 em células H9c2 infectadas com a cepa Be-62

Os níveis de PGE2 produzidos durante a infecção de células H9c2 pela cepa Be-62 do *T. cruzi* foram mensurados e, nas condições estudadas, observa-se que a cepa Be-62 induz aumento da sua produção em todos os tempos de interação célula/parasito quando comparado aos níveis produzidos pelas células controle (Figura 15).

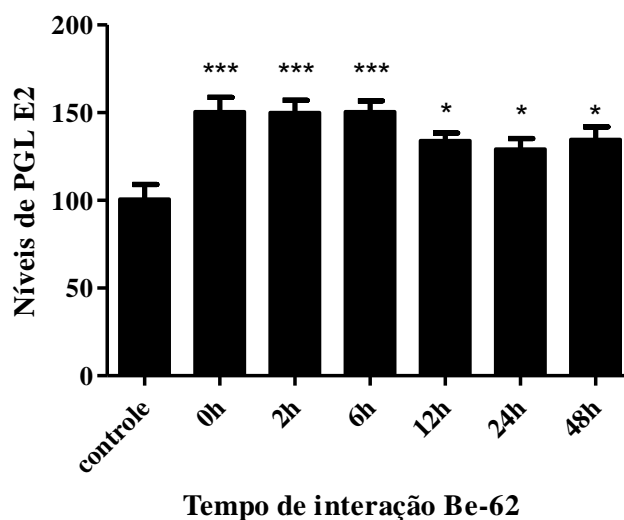


Figura 15. Níveis de PGE2. Dosagem da PGE2 produzida durante infecção de células H9c2 pela cepa Be-62 do *T. cruzi* com tempos de interação célula/parasito de 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas. Foi aplicado teste estatístico *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$ e *** $p < 0.001$.

4.7 Imunolocalização da proteína COX-2 em células H9c2 infectadas pela cepa Be-62

O núcleo (corado em azul) e as proteínas COX-2 (coradas em verde) presentes nas células H9c2 infectadas com a cepa Be-62 e também nas células controle foram preparada para análises de imunofluorescências adaptando-se a técnica descrita em Taneja *et al.*, (1998).

Pelas imagens mostradas na Figura 16, observa-se que na célula controle a proteína COX-2 localiza-se na região perinuclear. No tempo de 0 hora de interação não foi observada mudança na localização da proteína, porém, nos tempos de 2 horas ocorre

translocação da proteína e ela encontra-se localizada no núcleo da célula. Nos tempos de 12 e 48 horas a proteína está localizada no núcleo e também no citoplasma. Além disso, no intervalo de 48 horas, pode-se observar que a COX-2 encontra-se co-localizada com o *T. cruzi* presente no interior da célula.

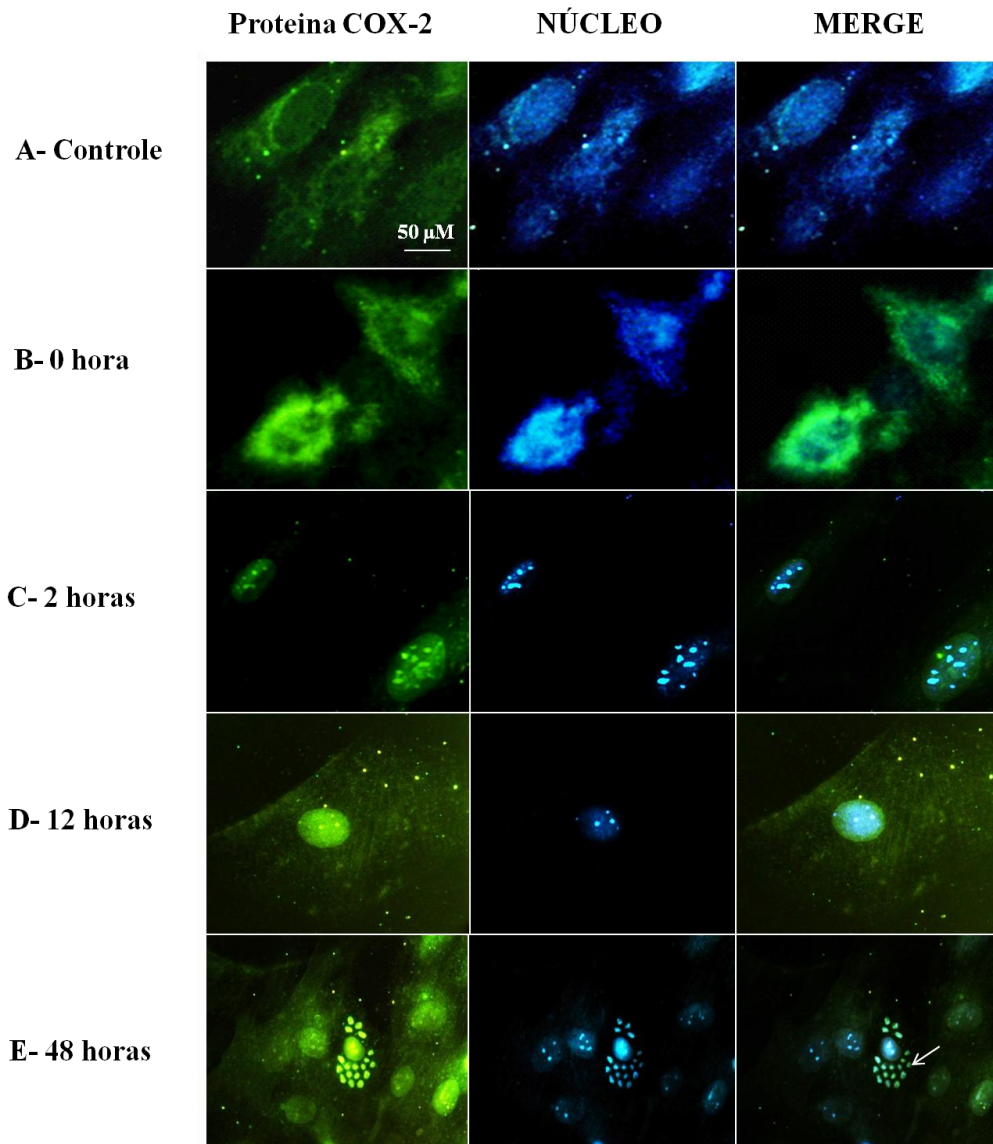


Figura 16. Imunolocalização da proteína COX-2. A proteína COX-2 foi marcada utilizando-se o método de imunofluorescência em células H9c2 controle (A) e infectadas com Be-62 por 2 horas e mantidas por 0 hora (B), 2 horas (C), 12 horas (D) e 48 horas (E) de interação. A seta indica a co-localização da proteína com o parasito.

4.8 Expressão dos genes *nf-kb*, *c-Jun*, *c-Fos* e *c-Myc*

Para verificar se durante a infecção com a cepa Be-62 os fatores de transcrição NF-kB, AP1(heterodímero formado pelas proteínas c-Jun e c-Fos) e c-Myc estão relacionados com a transcrição de COX-2, os níveis de expressão do RNAm de c-Myc e de c-Jun, c-Fos e NF-kB foram analisados por PCR em tempo real e a expressão da proteína NF-kB por *Western blot*. A análise proteica da expressão do gene é importante porque é a proteína que vai atuar como fator de transcrição ligando-se a região promotora do DNA.

A Figura 17A mostra que há aumento da expressão do RNAm de NF-kB durante os intervalos de 2, 6 e 12 horas de interação célula/parasito, porém, o aumento da expressão da proteína ocorre apenas durante os tempos de 2 e 12 horas de interação.

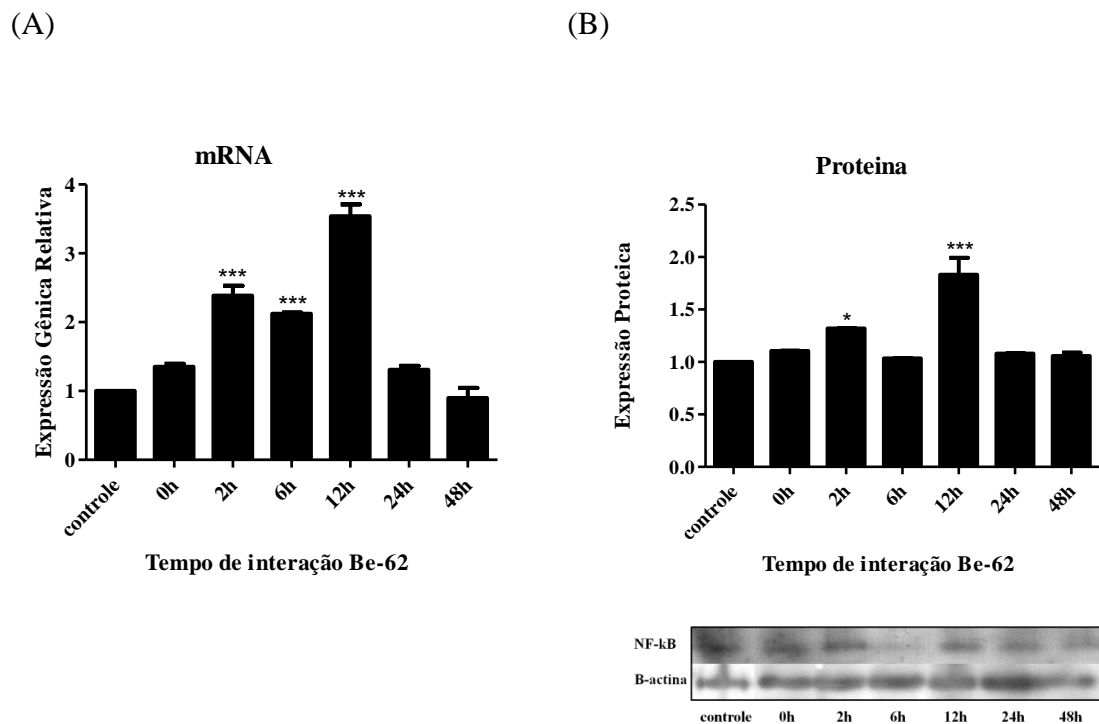


Figura 17. Níveis de expressão de NF- kB. Expressão de RNAm (A) obtido pelo método de PCR em tempo real e de proteína (B) obtido pelo método *Western blot* de NF-kB em H9c2 infectadas com *T. cruzi*. Ambos os métodos tiveram a β -actina como gene normalizador. Foi aplicado teste estatístico *One-Way ANOVA* com pós-teste de Dunnett. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$.

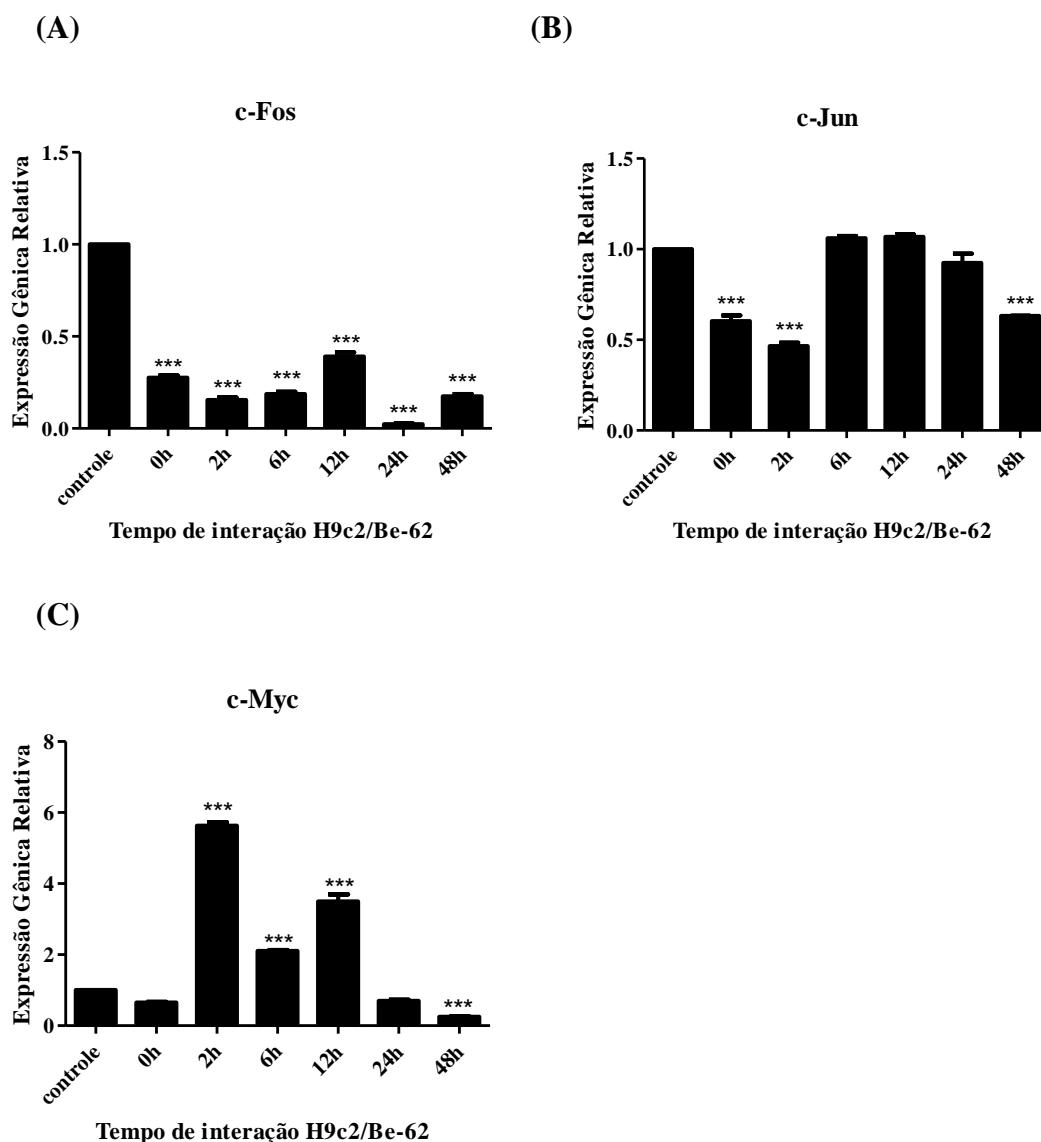


Figura 18. Níveis de expressão de RNAm de c-Jun, c-Fos e c-Myc. Os níveis de RNAm de c-Jun (A), c-Fos (B) e c-Myc (C) de células H9c2 infectadas com *T. cruzi* foram obtidos por PCR em tempo real tendo como gene normalizador a β -actina. Foi aplicado teste estatístico *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. *** $p < 0.001$.

A análise ainda demonstrou uma diminuição da expressão do RNAm de c-Fos durante todos os tempos de interação célula/parasito (Figura 18A). Para o transcrito c-Jun a diminuição da expressão de RNAm ocorreu pontualmente nos tempos de 0, 2 e 48 horas de interação (Figura 18B). Em relação à expressão do RNAm de c-Myc, houve aumento durante nos intervalos de 2, 6 e 12 horas de interação célula/parasito e

diminuição desta expressão no tempo de 48 horas de interação (Figura 18C). A análise dos resultados sugere a existência de um mecanismo inerente de transativação de vias moleculares.

4.9 Expressão do RNAm e da proteína CUGBP2

Para analisar se a CUGBP2 estaria envolvida na regulação da COX-2 em células H9c2 infectadas com a cepa Be-62, foram realizadas análises da expressão do RNAm de CUGBP2 por PCR em tempo real e também da proteína CUGBP2 por *Western blot* nestas células. À partir dos resultados obtidos (Figura 19A e B) observa-se que a cepa Be-62 induziu aumento significativo da expressão de CUGBP2 nas células H9c2, tanto a nível de RNAm quanto de proteína. Este aumento é observado durante todos os tempos de interação célula/parasito estudados.

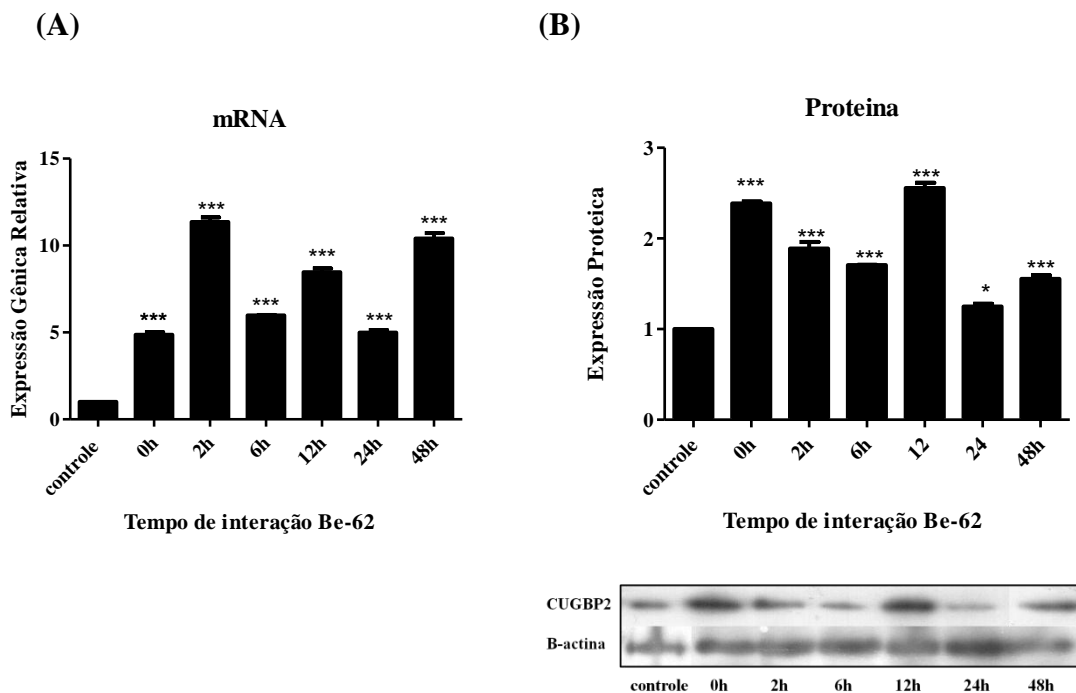


Figura 19. Níveis de expressão de CUGBP2. Expressão de RNAm (A) obtido pelo método PCR em tempo real e de proteína (B) obtido pelo método *Western blot* de CUGBP2 em H9c2 infectadas com *T. cruzi*. Ambos os métodos tiveram a β -actina como gene normalizador. Foi aplicado teste estatístico *One-Way ANOVA* com pós-teste de Dunnett. * $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.10 Microscopia de fluorescência com marcação do RNAm de COX-2 e da proteína CUGBP2

Para analisar uma possível co-localização da proteína CUGBP2 e do RNAm COX-2 nas células H9c2 infectadas ou não com a cepa Be-62, tripla marcação foi realizada. Na Figura 20, o núcleo, corado com DAPI, está marcado em azul, a proteína CUGBP2, corada com anticorpo marcado com FITC, está representada em verde e o RNAm de COX-2 que foi localizado com a técnica de RNA FISH está marcado em vermelho.

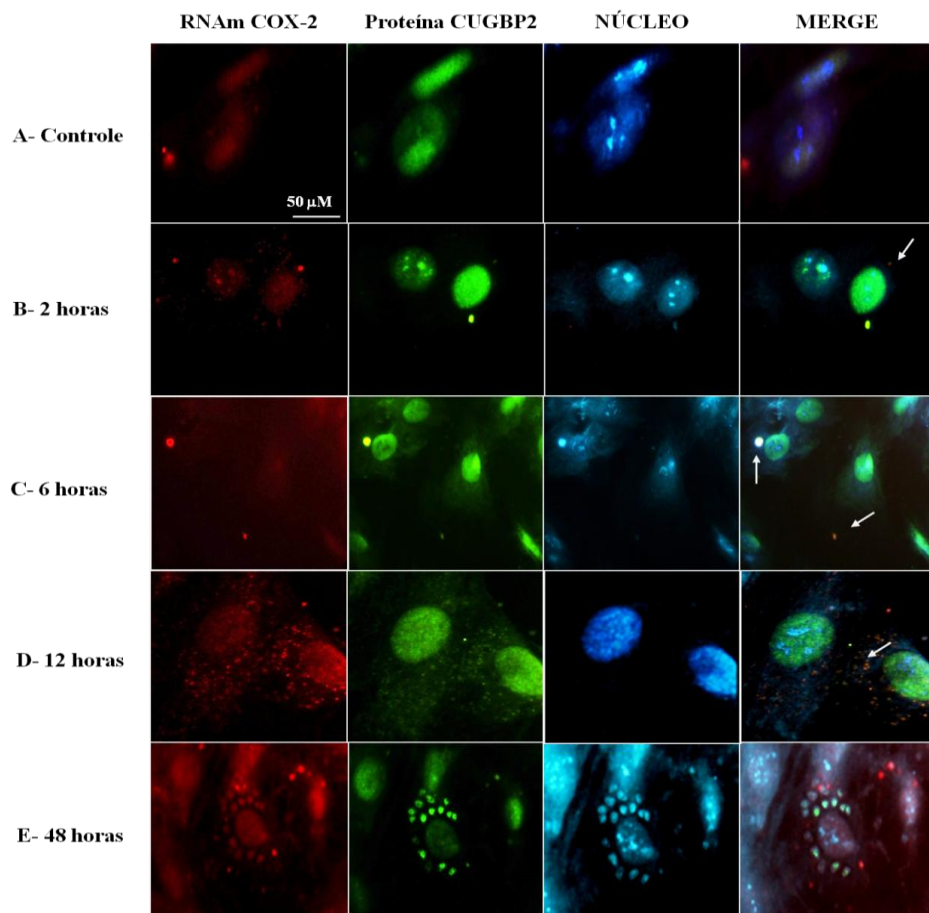


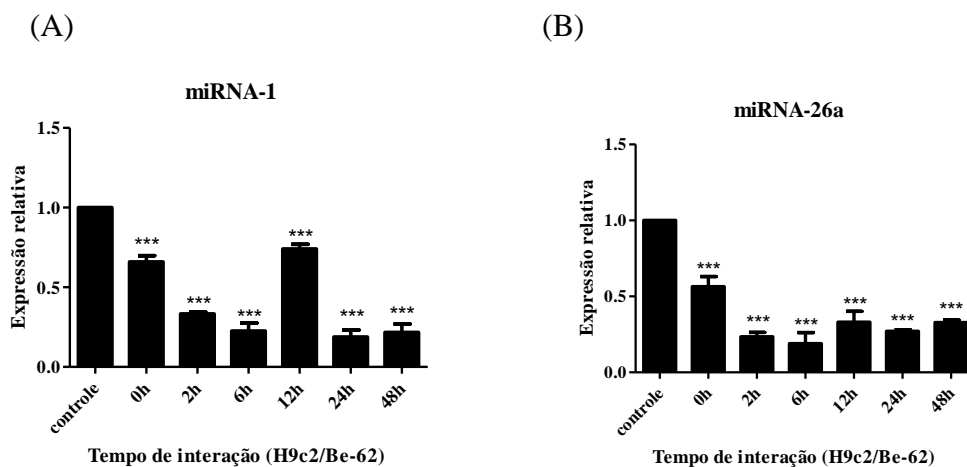
Figura 20. Microscopia de fluorescência com marcação do RNAm de COX-2 e da proteína CUGBP2. Células H9c2 controle (A) e infectadas pela cepa Be-62 durante os tempos de 2 horas (B), 6 horas (C), 12 horas (D) e 48 horas (E) tiveram o núcleo, RNAm de COX-2 e proteína CUGBP2 marcados utilizando-se o método de fluorescência. As setas indicam os grânulos no citoplasma.

A análise das imagens revela que na célula controle a proteína CUGBP2 e o RNAm de COX-2 localizam-se no núcleo, porém, durante os tempos de 2, 6, 12 e 48 horas de interação ocorre translocação da proteína CUGBP2 e do RNAm de COX-2 para o citoplasma. Além disso, durante o tempo de 48 horas de interação, pode-se observar que a proteína CUGBP2 e o RNAm de COX-2 encontram-se co-localizados com o *T. cruzi* presente no interior da célula. A proteína CUGBP2 e o RNAm de COX-2 também encontram-se co-localizados em grânulos no citoplasma durante os tempos de 2, 6 e 12 horas de interação.

4.11 Expressão de miRNAs

Para avaliar se miRNAs estão envolvidos na regulação da expressão de COX-2, CUGBP2 e PLA2 em células H9c2 infectadas com a cepa Be-62, foram realizadas análises da expressão dos miRNA-1, -26a, -26b, -451, e -340-3p por PCR em tempo real, tendo como normalizador o miRNA-U6. Os miRNAs foram escolhidos baseados na capacidade de controlarem a expressão de COX-2 de forma direta e indireta, pela modulação da expressão de CUGBP2 e PLA2.

Na Figura 21 pode-se observar que todos os miRNAs tiveram seus níveis de expressão diminuídos durante os tempos de interação célula/parasito quando comparados com o controle, exceto o miRNA-340-3p (Figura 21E) que apresentou aumento da expressão durante o tempo de 12 horas de interação.



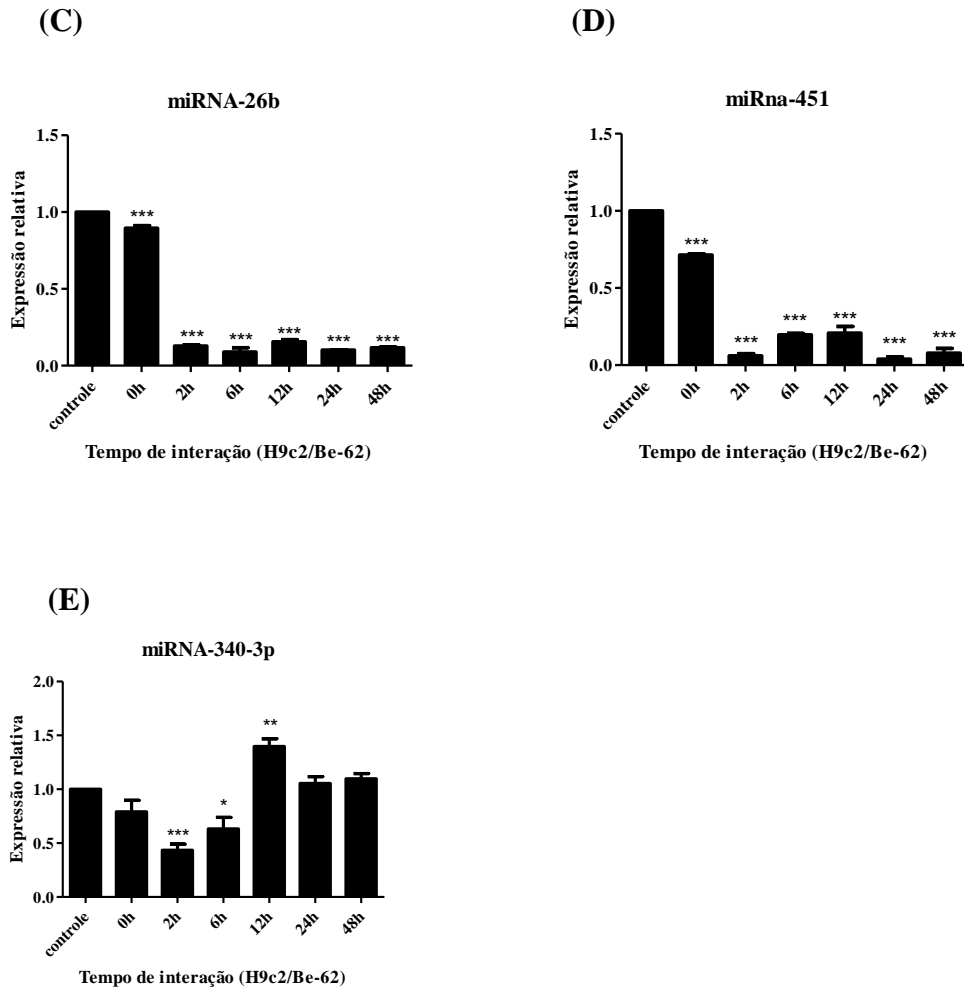


Figura 21 . Níveis de expressão dos miRNAs. Expressão dos miRNAs-1(A), -26a (B), -26b (C), -451 (D), -340-3p e (E) forma obtidos pelo método de PCR em tempo real tendo como normalizador o miRNA-U6 em H9c2 infectadas com *T. cruzi*. Foi aplicado teste estatístico *One-Way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ e *** $p < 0.001$.

5. DISCUSSÃO

O protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, a principal causadora de cardiomiopatia e insuficiência cardíaca em regiões de endemicidade na América Latina (Schmunis, 1994). Dentre as inúmeras respostas do hospedeiro frente a infecção, a inflamação intensa com envolvimento da PGE2 assume um importante papel na evolução da doença, contribuindo para o remodelamento cardíaco e deficiências funcionais deste órgão (Machado *et al*, 2008; Machado e Aliberti, 2009; Tanowitz *et al*, 2005; Freire-de-Lima *et al.*, 2000). Na literatura, são poucos os estudos que investigam a expressão e regulação da COX-2, enzima limitante da produção de PGE2, na doença de Chagas. São raros, também, estudos realizados com a cepa Be-62 do *T. cruzi*. Assim sendo, todos os resultados que obtivemos neste estudo são pioneiros e importantes para a melhor compreensão da doença de Chagas causada pela cepa em questão.

Para avaliar e compreender a regulação da expressão da proteína COX-2 em células H9c2 infectadas pela cepa Be-62 do *T. cruzi*, o RNAm e a proteína COX-2 foram investigados. Além disso, elementos moduladores da expressão gênica e correlatos ao controle de COX-2 também foram investigados, entre eles, fatores de transcrição, miRNAs e a proteína CUGBP2. Para a elucidação de particularidades moleculares que influenciam diretamente na expressão gênica de COX-2, investigamos os intervalos iniciais de interação célula/parasito (0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas após a infecção), pois, sabe-se que as respostas preliminares dos cardiomiócitos são importantes por desempenharem um papel fundamental no estabelecimento da infecção a longo prazo e, assim, influenciarem na progressão da doença (Burleigh e Woolsey, 2002, Vaena De Avalos *et al.*, 2002).

Nas condições estudadas, observamos que houve um índice de infecção das células de aproximadamente 30%. É importante que não haja uma taxa de infecção muito alta porque a quantificação de proteínas e RNAs de interesse, das células H9c2, poderia ser prejudicada pelas altas concentrações de proteínas e transcritos do próprio parasito. Além disso, não há necessidade de que todas as células sejam invadidas pelo *T. cruzi* porque as células infectadas e o próprio parasito liberam citocinas e fatores solúveis que atuam nas demais células e estas reagem como células infectadas (Petersen e Burleigh, 2003).

Entretanto, com relação à viabilidade celular, estudo aponta que a presença do parasito no interior da célula é essencial para que haja o impedimento da apoptose, um mecanismo de morte celular programada (Petersen, *et al.* 2006). A apoptose da célula hospedeira desempenha um importante papel na regulação imune durante a infecção parasitária (Damatta *et al.*, 2007) e foi associada ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca na doença de Chagas (Tostes *et al.*, 2005). De fato, ao realizarmos o teste de citotoxicidade pelo método de MTT, observamos que no período de 48 hora há uma diminuição de 50% da viabilidade celular (Figura 12). Corroborando com este resultado, observamos que, também no período de 48 horas de interação, a expressão do RNAm de Bcl-2, cuja proteína atua na inibição do processo apoptótico (Borner, 2003), apresenta níveis abaixo dos expressos por células não infectadas (Figura 13A). No que se refere à expressão das moléculas pró-apoptóticas, analisamos a expressão dos transcritos de BAX e Caspases 3 e -9 e observamos que não foram constatadas alterações em seus níveis de expressão (Figura 13). É importante lembrar que a simples análise da expressão dos RNAs destes genes, principalmente das caspases, podem sugerir a presença de um determinado mecanismo molecular, mas as análises não são suficientes para se concluir a ocorrência de uma resposta pró-apoptótica na célula. Para isso, seria necessário analisarmos os níveis de expressão destas proteínas e também mensurar a sua atividade, uma vez que elas já podem estar presentes na célula sob a forma inativa, necessitando apenas de um estímulo indutor para que haja sua ativação e, conseqüentemente, ocorra o processo de morte celular (Hengartner, 2000; Borner, 2003; Boatright e Salvesen, 2003; Rupnarain *et al.*, 2004; Petros *et al.*, 2004). Vários estudos apontam que a modulação de elementos da via das apoptoses auxiliam na invasão parasitária. Em Aoki *et al.* (2003) e Petersen *et al.* (2006), os autores demonstraram que a cruzipaina, uma glicoproteína expressa em diferentes cepas do *T. cruzi* e em todos os seus estágios de desenvolvimento, atua modulando a capacidade do parasito em inibir a apoptose celular. A atuação da cruzipaina é mediada pela expressão de Bcl-2 e pelo bloqueio da ativação da proteína Caspase 3.

Além da morte celular, várias evidências sugerem que a expressão da enzima COX-2 e a síntese de seus derivados, como a prostaglandina E2, possuem um papel importante na patogênese da doença de Chagas (Maya *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2011). Em nosso estudo, demonstramos que os níveis do RNAm e da proteína COX-2

nas células H9c2 são modulados durante a infecção pela cepa Be-62. Observamos aumento do transcrito deste gene nos intervalos de 0, 6 e 24 horas de interação célula/parasito (Figura 14A). A expressão da proteína COX-2 foi aumentada nos períodos iniciais de infecção, nos períodos de 0, 2 e 6 horas (Figura 14B). Vários fatores podem estar envolvidos na indução desta expressão causada pela infecção do *T. cruzi*, dentre eles, o aumento dos níveis de cálcio intracelular necessário para que ocorra a entrada do parasito na célula. A glicoproteína gp82 presente na superfície do *T. cruzi* adere à superfície da célula do hospedeiro e induz uma cascata de sinalização com o envolvimento da proteína fosfolipase C e IP3 que culmina com a mobilização de cálcio intracelular (Garzoni *et al.*, 2003; Taniwaki *et al.*, 2006). O cálcio pode se ligar ao domínio C2 da PLA2 levando-a a se associar à membrana plasmática onde é iniciada a produção da PGE2 que, finalmente, estimula a expressão da COX-2 via ativação de AKT e ERK1/2 em uma retroalimentação positiva, posto que a COX-2 é a enzima limitante da produção da PGE2 (Nalefski *et al.*, 2001; Obermajer *et al.*, 2011). De fato, estudo realizado por Sharma *et al.* (2013) *in vitro* e também *in vivo* com camundongos infectados com a cepa Brasil do *T. cruzi* mostrou que o parasito, ao invadir a célula, ativa a PLA2. Além disso, observamos em nosso estudo, aumento dos níveis da PGE2 durante todo o período estudado, inclusive nos períodos em que a proteína COX-2 apresentava níveis basais de expressão (Figura 15). Este mecanismo ativado pela infecção do parasito que resulta no aumento dos níveis de PGE2 pode indicar que este eicosanoide é importante para a sua sobrevivência no hospedeiro durante a fase aguda da doença. A elevação dos níveis de PGE2 induzida pela infecção do *T. cruzi* já foi relatada na literatura em estudos realizados *in vitro* e também *in vivo* (Abdalla *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2011).

A flutuação observada nos níveis do RNAm da COX-2, verificada no nosso estudo, pode estar relacionada com a multiplicação do *T. cruzi* no interior da célula. Análise microscópica revelou que o número de parasito intracelular manteve-se estável até as 6 horas de interação, a partir deste período observou-se aumento do número de amastigota intracelular que pode ter sido causado pela divisão do parasito. Constatamos o aumento deste número, novamente, após 24 horas de interação, período este que coincide com os picos de expressão do RNAm da COX-2. Este padrão de replicação do parasito em células cardíacas também foi observado por Manque *et al.* (2001). Para

compreender quais fatores transcricionais poderiam estar modulando a atividade transcricional de COX-2 nas células infectadas pela cepa Be-62, avaliamos a expressão de NFkB, AP1 e c-Myc por serem classicamente relacionados a expressão de COX-2. Foram realizadas análises da expressão do RNAm e proteína do NFkB (Figura 18A e B) e, a partir destes resultados, pudemos observar que esta proteína não parece estar envolvida na transcrição da COX-2, pois, o aumento nos níveis proteicos deste fator transcricional ocorrido nos períodos de 2 e 6 horas, não corresponde aos picos de expressão observados nos níveis do RNAm de COX-2. É conveniente ressaltar que a proteína NFkB poderia já estar expressa, porém inativada, no citoplasma e após a infecção pelo parasito ela poderia ser ativada e atuar na transcrição deste gene. Assim sendo, a análise exclusiva da sua expressão não é suficiente para concluir seu envolvimento no processo transcricional.

Analizamos, também, a expressão dos RNAs de c-Jun e c-Fos, cujas proteínas se dimerizam para originar o fator transcricional AP1 (Figura 19 A e B). Ao observar os resultados obtidos, podemos sugerir que AP1 não está envolvida na modulação da expressão de COX-2 porque a expressão de c-Fos apresentou-se abaixo do nível basal após a infecção pela cepa Be-62. A infecção da célula com esta cepa também induziu a diminuição da expressão de c-Jun nos períodos de interação de 0, 2 e 48 horas. Por outro lado, foi observado aumento da expressão de c-Myc nos períodos de 2, 6 e 12 horas, porém, houve diminuição destes níveis no período de 48 horas de interação. Desta forma, analisando-se apenas o perfil de expressão do RNAm, c-Myc também não parece estar envolvido na transcrição de COX-2. Futuramente, será necessário verificar a expressão proteica destes genes e avaliar a interação DNA-proteína para obter resultados mais concisos sobre o envolvimento destes fatores na transcrição da COX-2 em células infectadas com a Be-62. Estudos realizados com cardiomiócitos infectados com o *T. cruzi* revelaram aumento da expressão de c-Jun e c-Fos e também da NFkB, porém, não foi demonstrado o envolvimento destas proteínas na transcrição de *cox-2* (Huang *et al.*, 2003; Petersen *et al.*, 2006). Foi sugerido, entretanto, que o parasito ativa a NFkB para que esta, posteriormente, atue no processo anti-apoptótico desencadeado pela infecção.

Os resultados que obtivemos em relação à expressão da proteína COX-2 mostram que a infecção com a cepa Be-62 induz seu aumento apenas nos períodos

iniciais da interação, entretanto, no intervalo de 24 horas foi observado aumento dos níveis do RNAm COX-2 sem, contudo, haver aumento da expressão proteica. Neste caso, há uma grande possibilidade de estar ocorrendo uma regulação pós-transcricional (Weaver e Robert, 2007). O RNAm de COX-2 possui sequências ricas em AU na região 3' não traduzida onde proteínas que se ligam ao RNAm, como a CUGBP2, podem se ligar e impedir sua tradução. Esta regulação já foi descrita em estudos sobre o câncer de cólon e em epitélio intestinal submetido à radiação ionizante (Mukhopadhyay *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2008). Então, nós investigamos se durante a infecção pela cepa Be-62 ocorre a modulação da expressão da COX-2 pela proteína CUGBP2. Ao analisarmos a expressão desta proteína verificamos que houve aumento dos seus níveis durante todo o período estudado, inclusive quando os níveis da proteína COX-2 estavam elevados, dificultando, portanto, a constatação desta regulação. O silenciamento do gene *CUGBP2* possibilitaria uma análise mais apurada sobre esta modulação, todavia, após realizarmos esta técnica em células H9c2, não pudemos dar continuidade aos experimentos porque a diminuição da expressão da CUGBP2 provocou a morte celular, demonstrando que esta proteína é fundamental para a sobrevivência da célula (resultados não mostrados). Realizamos, então, a análise de microscopia de fluorescência que evidenciou a co-localização da proteína CUGBP2 e do RNAm de COX-2, a partir do período de 2 horas de interação, quando houve translocação destas moléculas e elas apresentaram-se em grânulos no citoplasma (Figura 21). Nas células não infectadas, ambas moléculas mantiveram-se no núcleo da célula. Estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que, em células cardíacas mantidas sob condição pró-inflamatória, as proteínas heterogêneas ligadoras de RNAs (hnRNPs) CUGBP2 auxilia no controle dos níveis da proteína COX-2 e do processo inflamatório pela translocação do RNAm COX-2 aos chamados grânulos de estresse e subsequentemente aos *P-bodies* (PB), grânulos citoplasmáticos envolvidos no processamento de RNAs (Moraes *et al.*, 2013). Existem relatos na literatura que outras hnRNPs, como TIA-1 (Antígeno intracelular -1 restrito a células T), AUF-1 (Fator ligante de sequências AU-1) dentre outras também atuam na regulação pós-transcricional, à medida que se ligam ao seu RNAm alvo e o transporta para grânulos de estresse/ou PB, onde o transcrito pode ser degradado e/ou processado (Gilks *et al.*, 2004; Esclatine *et al.*, 2004). Portanto, podemos sugerir que há uma real possibilidade que haja a regulação de COX-2 pela

CUGBP2 e esta regulação pode decorrer de uma resposta da célula para impedir o aumento exacerbado da expressão da COX-2 estimulada pela invasão do parasito.

No período de 48 horas de interação é possível visualizar o *T. cruzi* no interior da célula por meio da marcação de seu núcleo e, curiosamente, observamos que houve co-localização deste parasito com a proteína e RNAm COX-2 e também com a proteína CUGBP2 (Figuras 16D e 20E). Este resultado nos leva a especular sobre a possibilidade destas moléculas aderirem à superfície do *T. cruzi* ou, até mesmo, o parasita internalizá-las. Considerando que estes resultados apresentados são pioneiros, fica evidente que será necessário o desenvolvimento de estudos adicionais mais aprofundados para uma completa compreensão deste fenômeno.

Ao avaliarmos a imunolocalização da proteína COX-2, verificamos que a infecção pelo *T. cruzi* induziu a translocação desta proteína da região perinuclear para o núcleo e o citoplasma da célula. Utilizamos a técnica de imunolocalização por fluorescência para marcar a proteína COX-2 nas células não infectadas (controle) e nas células infectadas durante os tempos de interação já citados. Após a marcação, observamos que nas células não infectadas a proteína COX-2 localiza-se na região perinuclear (Figura 16A), corroborando com dados da literatura (Mendez e LaPointe, 2002; Ueno *et al.*, 2005; Brock e Peters-Golden, 2007; Engström *et al.*, 2010). Foi observada alteração de sua localização após o período de 2 horas (Figura 16C) de interação, quando houve translocação da proteína para o núcleo da célula e após o período de 12 horas (Figura 16D) quando ela localizava-se no núcleo e também no citoplasma da célula. A presença desta proteína no núcleo e sua translocação para o citoplasma já foi relatada em células cancerosas e em células do endotélio vascular, sendo que esta translocação ocorrida nas células endoteliais foi induzida pela citocina pró-inflamatória IL-1 (Maroni *et al.*, 2011; Parfenova *et al.*, 2001).

Na tentativa de compreender a sutileza da regulação da expressão gênica na célula cardíaca infectada pelo parasito, investigamos a regulação pós-transcricional modulada por miRNAs, uma classe de RNAs não codificantes que se ligam à sequência específicas da região 3' não traduzida do RNAm alvo impedindo a sua tradução (Marc *et al.*, 2008). Analisamos a expressão de miRNAs maduros que possuem como alvos os RNAs de COX-2 (miRNA-26a, -26b), CUGBP2 (miRNA-26a, -26b, -340-3p) e PLA2 (miRNA-1, -451).

Analisando os resultados que obtivemos, verificamos que a infecção das células com a cepa Be-62 induziu uma diminuição da expressão de todos miRNAs estudados, exceto do miRNA-340-3p no período de 12 horas de interação. Apesar de observado este aumento do miRNA-340-3p (Figura 21E), se analisarmos conjuntamente os níveis de expressão da CUGBP2, podemos verificar que não parece haver regulação da expressão da CUGBP2 pelo miRNA, pois os níveis desta proteína não foram diminuídos. Os miRNA-26a e -26b podem estar relacionados com a expressão da proteína CUGBP2, afinal, os níveis destes miRNAs apresentam-se baixos quando os níveis de expressão da CUGBP2 apresentam-se aumentados. Os resultado mostrados sugerem que a tradução de seu RNAm não está sendo inibida pelos miRNAs estudados nos intervalos de interação parasitária analisados. Neste sentido, a expressão das proteínas PLA2 e COX-2 não foram prejudicadas, garantindo a produção da PGE2. Se considerarmos que o aumento dos níveis deste eicosanoide é benéfico para a sobrevivência do parasito, podemos sugerir que a diminuição da expressão destes miRNAs foi induzida pelo *T. cruzi*. Por outro lado, para impedir a expressão exacerbada de COX-2 e, desta forma, a alta produção de PGE2, a célula induz a diminuição dos níveis de miRNAs relacionados ao controle da CUGBP2 e garante a regulação da COX-2.

Com os resultados obtidos em nosso trabalho, juntamente com dados obtidos na literatura, podemos sugerir o seguinte mecanismo induzido pelo *T. cruzi* ao invadir a célula cardíaca:

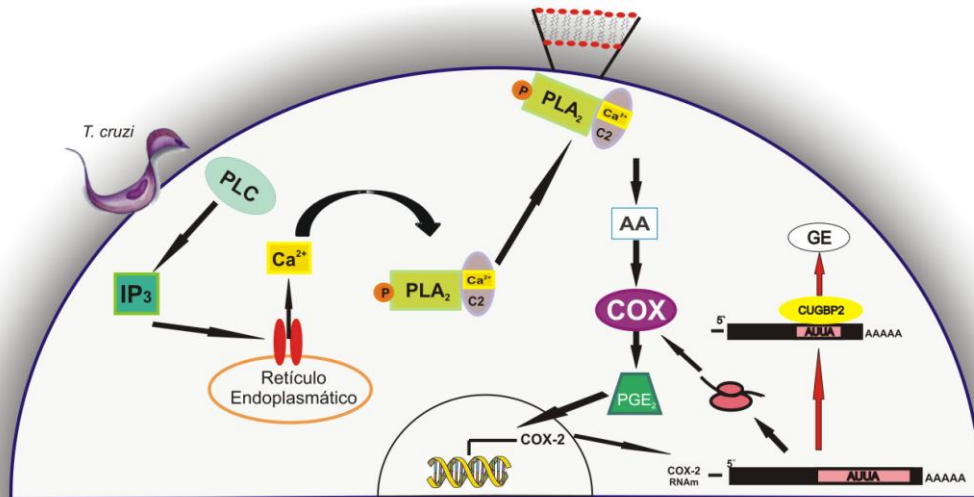


Figura 22. Esquema da regulação da expressão da COX-2 em célula infectada com *T. cruzi*, cepa Be-62. O *T. cruzi* se adere à superfície da célula do hospedeiro e induz uma cascata de sinalização com o envolvimento da proteína fosfolipase C (PLC) e IP3 que culmina com a mobilização de cálcio intracelular. O cálcio se liga ao domínio C2 da fosfolipase A2 (PLA₂) levando-a a se associar à membrana plasmática onde é iniciada, pela via do ácido araquidônico (AA), a produção da PGE₂ que estimula a expressão da COX-2 em uma retroalimentação positiva. Por outro lado, para impedir a expressão exacerbada de COX-2 e, conseqüentemente, a alta produção de PGE₂, a célula induz o aumento da expressão da CUGBP2 que se liga a região rica em AU do RNAm de COX-2 translocando-o para grânulos de estresse (GE) e impedindo a sua tradução.

5.1 CONCLUSÕES

Nas condições estudadas, a infecção pela cepa Be-62 do *T. cruzi* induz várias alterações celulares e moleculares, dentre elas podemos observar que:

Ocorre aumento da expressão e da atividade da proteína COX-2 com consequente aumento dos níveis de PGE₂.

Há translocação da COX-2 da região perinuclear para o núcleo e também para o citoplasma.

Os fatores de transcrição NFκB, AP1 e c-Myc parecem não estar envolvidos na expressão de COX-2.

Em relação a regulação pós-transcricional, a CUGBP2 parece modular a tradução de COX-2, porém, os miRNAs estudados não parecem estar envolvidos nesta regulação.

O parasito apresenta-se co-localizado à COX-2 e à CUGBP2, levantando a hipótese do parasito se aderir a estas moléculas, ou até mesmo, internalizá-las.

Considerando que todos os resultados apresentados são pioneiros e bastante promissores, será necessário o desenvolvimento de estudos adicionais para uma completa compreensão deste eventos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, G. K., FARIA, G. E., SILVA, K. T., CASTRO, E. C., REÍS, 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, 514-21.
- ANANT, S.; HENDERSON, J.; MUKHOPADHYAY, D.; NAVARATNAM, N.; KENNEDY, S.; MIN, J.; DAVIDSON, N. (2001). Novel role for RNA-binding protein CUGBP2 in mammalian RNA editing. *J Biol Chem* 2001, 276:47338–47351.
- ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. (2008). Stress granules: the tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences*; 33(3):141–150.
- ANDRADE, L.O.; GALVÃO, L.M.; MEIRELLES, M. N.; CHIARI, E., PENA, S.D.; et al. (2010). Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 834–837.
- ANDRADE, L.O.; GALVÃO, L.M.C.; MEIRELLES, M.N.S.L.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J.; MACEDO, A.M. (2010). Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 834-837.
- ANDRADE, S.G. (1974) Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Bahiano. *Rev Pat Trop* 3: 65-121.
- ANDREWS, N.W. (1995). Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Trends Cell Biol.* 5: 133-137.
- ARAÚJO-JORGE, T.C.; BARBOSA, H.S.; MEIRELLES, M.N.L. (1992). *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 43-56.
- ASHTON, A. W.; MUKHERJEE, S.; NAGAJYOTHI, F. N.; HUANG, H.; BRAUNSTEIN, V. L.; DESRUISSEAU, M. S.; FACTOR, S. M.; LOPEZ, L.; BERMAN, J. W.; WITTNER, M.; SCHERER, P. E.; CAPRA, V.; COFFMAN, T. M.; SERHAN, C. N.; GOTTLINGER, K.; WU, K. K.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. (2007). Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 204, 929-40.
- ASHTON, A. W.; MUKHERJEE, S.; NAGAJYOTHI, F.; HUANG, H.; BRAUNSTEIN, V. L.; DESRUISSEAU, M. S.; FACTOR, S. M.; LOPEZ, L.; BERMAN, J. W.; WITTNER, M.; SCHERER, P. E.; CAPRA, V.; COFFMAN, T. M.; SERHAN, C. N.; GOTTLINGER, K.; WU, K. K.; WEISS, L. M.; TANOWITZ H. B. (2007). Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol. 204, No. 4, pp. 929-940.

- BAKAY, M.; ZHAO, P.; CHEN, J.; HOFFMAN, E. (2002). A webaccessible complete transcriptome of normal human and DMD muscle. *Neuromuscul Disord*, 12: S125–S141.
- BAKHEET, T.; WILLIAMS, B.R.; KHABAR, K.S. (2006). Ared 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic Acids Research*. 34:D114.
- BARBARA, M.; LENDL, B.; MOLINA-DIAZ, A.; AYORA, M.J. (2005). Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by FT-Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids*, 134: 173-182.
- BARREAU, C.; PAILLARD, L.; OSBORNE, H.B. (2005) AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Research*. 33(22):7138–7150.
- BARRETT, M.P.; BURCHMORE, R.J.; STICH, A.; LAZZARI, J.O.; FRASCH, A.C.; CAZZULO, J.J.; KRISHNA, S. (2003). The trypanosomiasis. *Lancet* 362:1469–1480.
- BENCHIMOL BARBOSA, P.R. (2006). The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol*. 112(1):132-3.
- BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M.J.; MONTGOMERY, S.P. (2011). *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microb Rev*. 24(4):655-681.
- Clayton J. Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature* 2010, 465(7301):S12-S15.
- BERTELLI, M.S.; BRENER, Z. (1980). Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 66: 992-997.
- BERTELLI, M.S.; GOLGHER, R.R.; BRENER, Z. (1977). Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: effect of temperature on the intracellular differentiation in tissue culture. *J Parasitol* 63: 434-437.
- BOATRIGHT, K.M.; SALVESEN, G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*. 15:725-31.
- BORNER, C. (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*. 39:615-47.
- BRENER, Z. (1965). Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Parasitol.*, n. 59, p. 19-26.
- BRENER, Z.; GOLGHER, R.; BERTELLI, M.S.; TEIXEIRA, J.A. (1976). Strain-dependent thermosensitivity influencing intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi* in cell culture. *J Protozool* 23: 147-150.

- BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R.B.; COHEN, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PloS Biology*. 3(3):85.
- BROCK, T. G.; PETERS-GOLDEN, M. (2007). Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *TheScientificWorldJournal*, vol. 7, pp. 1273–1284.
- BURLEIGH, B.A. (2005). Host cell signaling in *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? *Sci STEK*. 293: p. 36
- BURLEIGH, B.A.; WOOLSEY, A.M. (2002). Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cel. Microbiol*. 4(11):701-711.
- CALVET, C. M.; MEUSER, M.; ALMEIDA, D.; MEIRELLES, M. N.; PEREIRA, M. C. (2004). *Trypanosoma cruzi*–cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. *Exp. Parasitol*. 107 20–30.
- CAMPOS, M.A.; ALMEIDA, I.C.; TAKEUCHI, O.; et al. (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosyl phosphatidyl inositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol*. 167: 416-423.
- CANÇADO, J.R.; BRENER, Z. (1979). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 362-424.
- CAO, Y.; PRESCOTT, S. M. (2002). Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *Journal of Cell Physiology*, v.190, n.3, p.279-286.
- CARVALHO, T.M.; DE SOUZA, W. (1989). Early events related with the behavior of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct Funct*. 45(6): 498-502.
- CELENTANO, A.M.; GORELIK, G.; SOLANA, M.E.; STERIN-BORDA, L.; BORDA, E.; GONZÁLEZ CAPPA, S.M. (1995). PGE2 involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Prostaglandins* 49: 141-153.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL (2009). Chagas Disease. Chagas Disease Topics. Atlanta, Georgia.
- CHAGAS, C. (1909). Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.s.p., agente etiológico de nova entidade mórbida no homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1: 159-218, 1909.
- CHAKRABARTY, A.; TRANGUCH, S.; DAIKOKU, T.; JENSEN, K.; FURNEAUX, H.; DEY, S.K. (2007). MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo

implantation. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 104(38):15144–15149.

CHANDRASEKHARAN, N. V. & SIMMONS D.L, (2004). Protein family Review: The Cyclooxygenases. *Genome Biology*: 5, 241.

CHEN, Z.; EGGERTMAN, T.L.; PATTERSON, A.P. (2007). ApoB mRNA editing is mediated by a coordinated modulation of multiple apoB mRNA editing enzyme components. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292: G53–65.

CHWIROT, B.W.; KUZBICKI, L. (2007). Cyclooxygenase-2 (COX-2): first immunohistochemical marker distinguishing early cutaneous melanomas from benign melanocytic skin tumours. *Melanoma Research*.17:139-45.

Corral, R.S.; Guerrero, N.A.; Cuervo, H.; Gironès, N.; Fresno, M. (2013) *Trypanosoma cruzi* Infection and Endothelin-1 Cooperatively Activate Pathogenic Inflammatory Pathways in Cardiomyocytes. *PLoS Negl Trop Dis* 7(2): e2034.

CUNHA-NETO E.; NOGUEIRA, L.G.; TEIXEIRA, P.C.; RAMASAWMY, R.; DRIGO, S.A.; GOLDBERG, A.C.; et al. (2009). Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.104(Suppl 1):252-8.

CUNHA-NETO, E., DZAU, V.J., ALLEN, P.D., STAMATIOU, D., BENVENUTTI, L., HIGUCHI, M.L., KOYAMA, N.S., SILVA, J.S., KALIL, J., LIEW, C-C. (2005). Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am. J.Pathol.* 167(2): 305-313.

DAIKOKU, T.; HIROTA, Y.; TRANGUCH, S.; JOSHI, A.R.; DEMAYO, F.J; LYDON, J.P.; et al. (2008). Conditional loss of uterine Pten unfailingly and rapidly induces endometrial cancer in mice. *Cancer Research*. 68(14):5619–5627.

DAMATTA, R.A.; SEABRA, S.H.; DEOLINDO, P.; ARNHOLDT, A.C.; MANHÃES, L.; GOLDENBERG, S.; DE SOUZA, W. (2007). *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiol Lett* 266: 29-33.

DAY, J.W.; RANUM, L.P.W. (2005). RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Neuromuscul. Disord.* 15(1): 5–16.

DE KLEIJN, D.; PASTERKAMP, G. (2003). Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research* 60, 58–67.

DE SOUZA, W. (1984). Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review of Cytology*. v. 86, p. 197-285.

- DE SOUZA, W. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design* 8: 269-285.
- DIAS, J.C.P. (2006). Chagas disease: successes and challenges. Editorial. *Cad Saude Publica* 22: 2021.
- DIXON, D.A. (2003). Regulation of COX-2 expression in human cancer. *Progress in Experimental Tumor Research*. 37:52–71.
- DIXON, D.A. (2004). Dysregulated post-transcriptional control of COX-2 gene expression in cancer. *Current Pharmaceutical Design*. 2004; 10(6):635–646.
- DIXON, D.A.; KAPLAN, C.D.; MCINTYRE, T.M.; ZIMMERMAN, G.A.; PRESCOTT, S.M. (2000). Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(16):11750–11757.
- DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. (2005). Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 251-261.
- DORSAN, R.T. & GUTKIND, J.S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Ver Cancer*. Feb; 7(2):79-94.
- DUJARDIN, G.; BURATTI, E.; CHARLET-BERGUERAND, N.; MARTINS DE ARAUJO, M.; MBOPDA, A.; LE JOSSIC-CORCOS, C.; PAGANI, F.; FEREC, C.; CORCOS, L. (2010). CELF proteins regulate CFTR pre-mRNA splicing: essential role of the divergent domain of ETR-3. *Nucleic Acids Res*, 38:7273–7285.
- DUTRA, W. O.; GOLLOB, K.J. (2008). Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Current Opinion in Infectious Disease*, v. 21, p. 287-292.
- DUTRA, W.O.; MENEZES, C.A.; VILLANI, F.N.; DA COSTA, G.C.; DA SILVEIRA, A.B.; et al. (2009). Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: Suppl 1208–218.
- ENGSTRÖM, L.; ROSÉN, K.; ANGEL, A.; FYRBERG, A.; MACKERLOVA, L.; KONSMAN, J.P.; ENGBLOM, D.; BLOMQVIST, A. (2008). Systemic immune challenge activates an intrinsically regulated local inflammatory circuit in the adrenal gland. *Endocrinology* 149:1436–1450.
- ESCLATINE, A.; TADDEO, B.; ROIZMAN, B. (2004). Herpes simplex virus 1 induces cytoplasmic accumulation of TIA-1/TIAR and both synthesis and cytoplasmic

accumulation of tristetraprolin, two cellular proteins that bind and destabilize AU-rich RNAs. *J Virol* 78: 8582–8592.

EULALIO, A.; BEHM-ANSMANT I; IZAURRALDE, E. (2007). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8(1):9–22.

FABIAN, M.R.; SONENBERG, N.; FILIPOWICZ, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry*. 79:351–379.

FERNANDES, M.C., CORTEZ, M., YONEYAMA, K.A.G., STRAUS, A.H., YOSHIDA, N., MORTARA, R.A. (2007). Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: Implication of cholesterol and host cell microdomains. *International Journal for Parasitology*, v.37, n.13, p.1431-1441.

FERNANDES, M.C.; CORTEZ, M.; FLANNERY, A.R.; TAM, C.; MORTARA, R.A.; ANDREWS, N.W. (2011). *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J Exp Med* 208: 909-921.

FRANTZ, S.; KOBZIK, L.; KIM, Y. D.; FUKAZAWA, R.; MEDZHITOV, R.; LEE, R. T.; KELLY, R. A. (1999). Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J. Clin. Invest.* 104, 271–280.

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.

GARNEAU, N.L.; WILUSZ, J.; WILUSZ, C.J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 8(2):113–126.

GARNEAU, N.L.; WILUSZ, J.; WILUSZ, C.J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8(2):113–126.

GAZZINELLI, R.T.; ROPERT, C.; CAMPOS, M.A. (2001). Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev.* 201: 9-25.

GILKS, N.; KEDERSHA, N.; AYODELE, M.; SHEN, L.; STOECKLIN, G.; et al. (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell* 15: 5383–5398.

GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. (1988). cAMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Experimental Parasitology*, 66:205-212.

- GOO, Y.H.; COOPER, T.A. (2009). CUGBP2 directly interacts with U2 17S snRNP components and promotes U2 snRNA binding to cardiac troponin T pre-mRNA. *Nucleic Acids Res* 2009, 37:4275–4286.
- GOOD, P., CHEN, Q.; WARNER, S.; HERRING, D. (2000). A family of human RNA-binding proteins related to the *Drosophila* Bruno translational regulator. *J Biol Chem*, 275:28583–28592.
- GOULET, A.; EINSPHAR, J.G.; ALBERTS, D.S.; BEAS, A.; BURK, C.; BHATTACHARYYA, A.; BANGERT, J.; HARMON, J.M.; FUJIWARA, H.; KOKI, A.; NELSON, M.A. (2003). Analysis of Cyclooxygenase 2 (COX-2) Expression During Malignant Melanoma Progression. *Cancer Biology & Therapy*. 2:713-18.
- GRIFFITHS-JONES, S.; GROCOCK, R.J.; VAN, D.S.; BATEMAN, A.; ENRIGHT, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acid Research* 34: D140-D144.
- GRIMSON, A., FARH, K.K.; JOHNSTON, W.K.; GARRETT-ENGELE, P.; LIM, L.P.; BARTEL, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell*. 27(1):91–105.
- GUARNER, J.; BARTLETT, J.; ZAKI, S.R.; COLLEY, D.G.; GRIJALVA, M.J.; et al. (2001). Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. *Am J Trop Med Hyg* 65: 152–158.
- HARRIS, R.S.; PETERSEN-MAHRT, S.K.; Neuberger, M.S. (2002). RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Mol. Cell*, 10, pp. 1247–1253
- HENGARTNER, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407:770-76.
- HUANG, H.; PETKOVA, S.B.; COHEN, A.W.; BOUZAHZAH, B.; CHAN, J.; ZHOU, J-N.; FACTOR, S.M.; WEISS, L.M.; KRISHNAMACHARY, M.; MUKHERJEE, S.; WITTNER, M.; KITSIS, R.N.; PESTELL, R.G.; LISANTI, M.P.; ALBANESE, C.; TANOWITZ, H.B. (2003) Activation of transcription factors AP-1 and NF- κ B in murine Chagasic myocarditis. *Infect Immun* 71:2859-2867.
- JI, J.; SHI, J.; BUDHU, A.; YU, Z.; FORGUES, M.; et al. (2009). MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N Engl J Med* 361: 1437–1447.
- KABUTUTU, Z.; MARTIN, S.K.; NOZAKI, T.; KAWAZU, S.; OKADA, T.; MUNDAY, C.J.; et al. (2003). Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H2 reductase in *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 33:221–228.

- KIRCHHOFF, L.V. (1996). American trypanosomiasis (Chagas`disease). *Gastroenterol. Clin. North Am.* 25: 517-533.
- KUHN, D.E.; MARTIN, M.M.; FELDMAN, D.S.; TERRY, A.V.; JR. NUOVO, G.J.; ELTON, T.S. (2008). Experimental validation of miRNA targets. *Methods* 44, 47–54.
- LADD, A.; COOPER, T. (2004). Multiple domains control the subcellular localization and activity of ETR-3, a regulator of nuclear and cytoplasmic RNA processing events. *J Cell Sci*, 117:3519–3529.
- LANA, M. & CHIARI, C.A. (1986). Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice-62 e berenice-78 de *Trypanosoma cruzi* isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81: 247-253.
- LEE, J.L.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D.R.; KOPELOVICH, L.; ATHAR, M. (2003). Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. [Review] [114 refs] *Toxicol Appl Pharmacol* 192:294–306.
- LESLIE, M. (2011). Drug Developers Finally Take Aim at a Neglected Disease. *Science*. 333(6045):933-935.
- LEWIS, B.P.; BURGE, C.B.; BARTEL, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *120:15–20*.
- LI, Y.; WANG, F.; LEE, J.-A.; GAO, F.-B. (2006). *MicroRNA-9a* ensures the precise specification of sensory organ precursors in *Drosophila*. *Genes & Dev.*(this issue).
- MACHADO, F.S.; MUKHERJEE, S.; WEISS, L.M.; TANOWITZ, H.B.; ASHTON, A.W. (2011). Bioactive lipids in *Trypanosoma cruzi* infection. *Adv Parasitol* 76: 1–31.
- MARNETT, L.J. (2000). Cyclooxygenase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 4:545-552.
- MARONI, P.; MATTEUCCI, E.; LUZZATI, A.; PERRUCCHINI, G.; BENDINELLI, P.; DESIDERIO, M. A. (2011). Nuclear co-localization and functional interaction of COX-2 and HIF-1 α characterize bone metastasis of human breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 129, no. 2, pp. 433–450.
- MARQUES DE ARAUJO, S.; CHIARI, E. (1988). Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C3H isogênicos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 175-181.
- MEIRELLES, M.N.L.; PEREIRA, M.C.S.; SINGER, R.H.; SOEIRO, M.N.C.; GARZONI, L.R.; SILVA, D.T.; BARBOSA, H.S.; ARAUJO-JORGE, T.C.; MASUDA, O.M.; CAPELLA, M.A.M.; LOPES, A.G.; VERMELHO, A.B. (1999). *Trypanosoma*

cruzicardiomyocytes: New contributions regarding a better understanding of this interaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(suppl I):149-152, 1999 in press.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2012). Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em URL: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional>

MOLLACE, V.; MUSCOLI, C.; MASINI, E.; CUZZOCREA, S.; SALVEMINI, D. (2005). Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev* 57, 217-252.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A.C. (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 17–30.

MORAES, K.C.M., WILUSZ, C.J., WILUSZ, J. (2006). CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. *RNA*. 12(6): 1-8.

MORAES, K.C.M.; MONTEIRO, C.J.; PACHECO-SOARES, C. A novel function for CUGBP2 in controlling the pro-inflammatory stimulus in H9c2 cells: subcellular trafficking of messenger molecules. *Cell Biology International* - submitted

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCIA, P.; VICKERMAN, K. (2004). An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(5): 1861-1875.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65 (1–2): 55–63.

MUKHERJEE, N.; CORCORAN, D.L.; NUSBAUM, J.D.; REID, D.W.; GEORGIEV, S.; HAFNER, M.; ASCANO JR., M.; TUSCHL, T.; OHLER, U.; KEENE, J.D. (2011) *Mol. Cell*, 43, pp. 327–339.

MUKHOPADHYAY D, HOUCHEM CW, KENNEDY S, DIECKGRAEFE BK, ANANT S. (2003). Coupled mRNA stabilization and translational silencing of cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein, CUGBP2. *Molecular Cell*. 11(1):113–126.

MUKHOPADHYAY, D., HOUCHEM, C.W., KENNEDY, S., DIECKGRAEFE, B.K., ANANT, S. (2003). Coupled mRNA stabilization and translational silencing of

cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein CUGBP2. *Mol.Cell.* 11(1): 113-126 (a).

MUKHOPADHYAY, D.; JUNG, J.; MURMU, N.; HOUCHEM, N.; DIECKGRAEFE, B.K.; ANANT, S. (2003). CUGBP2 plays a critical role in apoptosis of breast cancer cells in response to genotoxic injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1010: 504-509 (b).

MURMU, N.; JUNG, J.; MUKHOPADHYAY, D.; HOUCHEM, C.W.; RIEHL, T.E.; STENSON, W.F.; et al. (2004). Dynamic antagonism between RNA-binding protein CUGBP2 and cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2 in radiation damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 101(38):13873–13878.

NALEFSKI, E.A.; WISNER, M.A.; CHEN, J.Z.; SPRANG, S.R.; FUKUDA, M.; MIKOSHIBA, K.; FALKE, J.J. (2001). C2 domains from different Ca²⁺ signaling pathways display functional and mechanistic diversity. *Biochemistry* 40:3089–3100.

OBERMAJER, N.; MUTHUSWAMY, R.; ODUNSI, K.; EDWARDS, R. P.; KALINSKI, P. (2011). PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. *Cancer Res.* 71, 7463–7470.

OZINSKY, A.; UNDERHILL, D.M.; FONTENOT, J.D.; HAJJAR, A.M.; SMITH, K.D.; WILSON, C.B.; SCHROEDER, L.; ADEREM, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(25): 13766-13771.

PARASKEVA, C. & KAIDI, A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 30, 377–386.

PARFENOVA, H.; PARFENOV, V. N.; SHLOPOV, B. V. et al. (2001). Dynamics of nuclear localization sites for COX-2 in vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology*, vol. 281, no. 1, pp. C166–C178.

PARFENOVA, H.; PARFENOV, V. N.; SHLOPOV, B. V.; et al. (2001). Dynamics of nuclear localization sites for COX-2 in vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology*, vol. 281, no. 1, pp. C166–C178, 2001.

PETERSEN, C.A.; KRUMHOLZ, K.A.; CARMEN J, SINAI AP, BURLEIGH BA (2006). *Trypanosoma cruzi* infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells. *Infect Immun* 74:1580-1587.

PETERSEN, C.A; BURLEIGH, B.A. (2003). Role for IL-1b in *Trypanosoma cruzi* induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Infection and Immunity*, Vol 71(8), 4441-4447.

- PETROS, A.M.; OLEJNICZAK, E.T.; FESIK, S.W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1644:83-94.
- PRATA, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases* 1: 92-100.
- RASSI JR, A.; RASSI, A., MARIN-NETO, J.A. (2009). Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 152-158.
- RASSI JR, A.; RASSI, A., MARIN-NETO, J.A. (2009). Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 152-158.
- ROMAÑA, C.; MEYER, H. (1942). Estudo do ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* em cultura de tecidos de embrião de galinha. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 37 19–27.
- RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. (2004). Colon cancer: genetics and apoptotic events. *Biol Chem*. 385:449-64.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- SCHMUNIS, G. (1994). American trypanosomiasis as a public health problem. Pan American Health Organization, Washington, D.C.
- SEGGERSON, K.; TANG, L.; MOSS, E.G. (2002). Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev. Biol*. 243: 215–225.
- SELBACH, M.; SCHWANHAUSSER, B.; THIERFELDER, N.; FANG, Z.; KHANIN, R.; RAJEWSKY, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 455: 58–63.
- SHAO, J.; SHENG, H.; INOUE, H.; MORROW, J.D.; DUBOIS, R.N. (2000). Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem*. 275:33951–33956.
- SIRONI, M.; CAGLIANI, R.; POZZOLI, U.; BARDONI, A.; COMI, G.; GIORDA, R.; BRESOLIN, N. (2002). The dystrophin gene is alternative spliced throughout its coding sequence. *FEBS Lett*, 517:163–166.
- SMITH, W.L.; GARAVITO, R.M.; DEWITT, D.L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271:33157–33160.
- SMITH, W.L.; MARNETT, L.J. (1991). Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta* 1083:1–17.

- STERIN BORDA, L.; GORELIK, G.; POSTAN, M.; GONZALEZ CAPPA, S.; BORDA, E. (1999). Alterations in cardiac beta-adrenergic receptors in chagasic mice and their association circulating beta-adrenoceptor-related autoantibodies. *Cardiovasc Res* 41: 116-125.
- STERIN-BORDA L., CREMASCHI G., GENARO A., VILA ECHAGUE A., GOIN J.C., BORDA E. (1996). Involvement of NO and PKC activation on chagasic antibody activity upon myocardial contractility. *Mol. Cell Biochem.* 160/161:75–82.
- SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. (2007). Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.* 282 (16), 11613-11617.
- SULLY, G.; DEAN, J.L.; WAIT, R.; RAWLINSON, L.; SANTALUCIA, T.; SAKLATVALA, J.; CLARK, A.R. (2004). Structural and functional dissection of a conserved destabilizing element of cyclo-oxygenase-2 mRNA: evidence against the involvement of AUF-1 [AU-rich element/poly(U)-binding/degradation factor-1], AUF-2, tristetraprolin, HuR (Hu antigen R) or FBP1 (far-upstream-sequence-element-binding protein 1). *Biochem. J.* 377: 629-639.
- SUREBAN, S.M.; MURMUN RODRIGUEZ, P.; MAY, R.; MAHESHWARI, R.; DIECKGRAEFE, B.K.; HOUCHEM, C.W.; ANANT, S. (2007). Functional antagonism between RNA binding proteins HuR and CUGBP2 determines the fate of COX-2 mRNA translation. *Gastroenterology*, 132: 1055–1065.
- TANOWITZ, H.B.; HUANG, H.; JELICKS, L.A.; CHANDRA, M.; LOREDO, M.L.; et al. (2005). Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease. *Infect Immun* 73: 2496–2503.
- TANOWITZ, H.B.; KIRCHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. (1992). Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev* 5: 400-419.
- TOSTES JR, S.; BERTULUCCI; ROCHA-RODRIGUES, D.B.; PEREIRA, G.A.; RODRIGUES JR, V. (2005). Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. *Int J Cardiol* 99: 233-237.
- UENO, N.; TAKEGOSHI, Y.; KAMEI, D.; KUDO, I.; MURAKAMI, M. (2005). Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 338, no. 1, pp. 70–76.
- VAENA DE AVALOS, S.G.; BLADER, I.J.; FISHER, M.; BOOTHROYD, J.C.; BURLEIGH, B.A. (2002) Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. *J Biol Chem* 277: 639–644.
- VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 38:97-120. ISSN 0362-1642.

- VELOSO, V.M.; GUEDES, P.M.; ANDRADE, I.M.; CALDAS, I.S.; MARTINS, H.R.; CARNEIRO, C.M.; MACHADO-COELHO, G.L.; DE LANA, M.; GALVÃO, L.M.; BAHIA, M.T.; CHIARI, E. (2008). *Trypanosoma cruzi*: blood parasitism kinetics and their correlation with heart parasitism intensity during long-term infection of Beagle dogs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 103:528–534.
- VILLALTA, F.; DOBISH, M.C.; NDE, P.N.; KLESHCHENKO, Y.Y.; HARGROVE, T.Y.; JOHNSON, C.A.; WATERMAN, M.R.; JOHNSTON, J.N.; LEPESHEVA, G.I. (2013). VNI Cures Acute and Chronic Experimental Chagas Disease. J Infect Dis.
- WANG, H.J.; RUAN, H.J.; HE, X.J.; MA, Y.Y.; JIANG, X.T.; XIA, Y.J.; et al. (2010). MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion. European Journal of Cancer. 46(12):2295–2303.
- WARNER, T.D.; MITCHELL, J.A. (2004). Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. FASEB J 18: 790–804.
- WEAVER, R.J. (2007). "Part V: Post-transcriptional events". Molecular Biology. Boston: McGraw Hill Higher Education.
- WHO (2010). Media center Chagas disease(American Trypanosomiasis) Factsheet N° 340 June in <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>
- WILLIAMS, C.S.; GOLDMAN, A.P.; SHENG, H.; MORROW, J.D.; DUBOIS, R.N. (1999). Sulindac sulfide, but not sulindac sulfone, inhibits colorectal cancer growth. Neoplasia 1, 170-176.
- WILLIAMS-BANGLERO, S.; VANDEBERG, J. L.; BANGLERO, J.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. (2003). Genetic epidemiology of Chagas' Disease. Front Biosci 8:337-345.
- WINTER, J.; JUNG, S.; KELLER, S.; GREGORY, R.I.; DIEDERICHS, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nat Cell Biol 11:228–234.
- WYLLIE, D.H.; KISS-TOTH, E.; VISINTIN, A.; SMITH, S.C.; BOUSSOUF, S.; et al. (2000). Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. J. Immunol. 165:7125–32
- XU, K.; KITCHEN, C.M.; SHU, H.G.; MURPHY, T.J. (2007). Platelet-derived Growth Factor-induced Stabilization of Cyclooxygenase 2 mRNA in Rat Smooth Muscle Cells Requires the c-Src Family of Protein-tyrosine Kinases. The Journal of Biological Chemistry VOL. 282, NO. 45, pp. 32699–32709, November 9.
- YOSHIDA, N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion of *Trypanosoma cruzi*. An Acad Bras Cienc 78: 87-111.

YOUNG, L.E.; DIXON, D.A. (2010). Posttranscriptional regulation of cyclooxygenase 2 expression in colorectal cancer. *Current Colorectal Cancer Reports*. 2010; 6(2):60–67.

YOUNG, L.E.; DIXON, D.A. (2010). Posttranscriptional regulation of cyclooxygenase 2 expression in colorectal cancer. *Current Colorectal Cancer Reports*. 6(2):60–67.

ZHANG, L.; LEE, J.E.; WILUSZ, J.; WILUSZ, C.J. (2008). The RNA-binding protein CUGBP1 regulates stability of tumor necrosis factor mRNA in muscle cells: implications for myotonic dystrophy. *283(33):22457-63*.